

(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2016-516721

(P2016-516721A)

(43) 公表日 平成28年6月9日 (2016. 6. 9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/33 (2006.01)	C O 7 K 14/33	4 C O 8 5
A61K 39/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/08	4 H O 4 5
A61P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A61K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	A
C07K 1/113 (2006.01)	C O 7 K 1/113	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-502966 (P2016-502966)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015. 11. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/029035
 (87) 国際公開番号 W02014/144567
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/790, 423
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

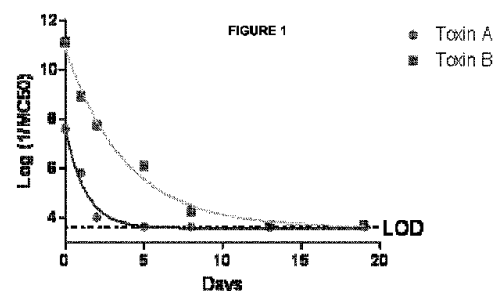
(71) 出願人 503263001
 サノフィ パストゥール インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 1
 8 3 7 0 スウィフトウォーター ディス
 カヴァリー ドライヴ
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100090468
 弁理士 佐久間 剛
 (72) 発明者 ハウザー, スティーヴン
 カナダ国 オンタリオ州 トロント ステ
 イールズ アヴェニュー ウェスト 1 7
 5 5 サノフィ パストゥール リミテッ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トキソイド、組成物および関連方法

(57) 【要約】

本開示は一般に、毒素不活性化の分野に関する。より詳細には、本開示はクロストリジウム毒素、これらの毒素を不活化する方法および（例えば、これらの方法で製造される）トキソイドを含む組成物（例えば、ワクチン）に関する。C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 毒素をホルムアルデヒドで不活化することを含む C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイドを製造する方法が提供される。これらの方法で調製されるトキソイドは高温（例えば、37）で安定であり、最小限の残存ホルムアルデヒドで非毒性のままである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドを製造する方法において、精製C．ディフィシル(C．difficile)毒素Aまたは精製C．ディフィシル(C．difficile)毒素Bを、約0.15%~0.5%ホルムアルデヒド(w/v)と共に、約17~32で約2~約21日間インキュベートすることにより不活化する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

トキソイドAを生成するために、毒素Aが約0.2%ホルムアルデヒドと共に約25で約2日間インキュベートされることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

トキソイドBを生成するために、毒素Bが約0.4%ホルムアルデヒドと共に約25で約13日間インキュベートされることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

請求項1または2に記載の方法で調製されるトキソイドA、および/または請求項1または3に記載の方法で調製されるトキソイドBを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 5】

精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBを、残存量のホルムアルデヒドを含む組成物と混ぜ合わせる工程を含むことを特徴とする、精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBを含む免疫原性組成物を調製する方法。

20

【請求項 6】

前記精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBが37で約6週間まで安定であることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記残存量のホルムアルデヒドが約0.001%~0.025%(w/v)であることを特徴とする、請求項5または6に記載の方法。

【請求項 8】

請求項5~7のいずれか一項に記載の方法を使用して調製されることを特徴とする組成物。

30

【請求項 9】

精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBを含む免疫原性組成物を調製する方法において、

精製C．ディフィシル(C．difficile)毒素Aおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)毒素Bを約0.15%~0.5%ホルムアルデヒド(w/v)と共に約17~32で約2~21日間インキュベートすることによって不活化する工程と、

40

精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBを、残存量のホルムアルデヒドを含む組成物と混ぜ合わせる工程とを含むことを特徴とする、方法。

【請求項 10】

前記精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドAおよび精製C．ディフィシル(C．difficile)トキソイドBが37で約6週まで安定であることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記残存量のホルムアルデヒドが約0.001%、0.004%、0.008%、また

50

は 0.016% (w/v)であることを特徴とする、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記トキソイド A および / またはトキソイド B が 20 mM クエン酸塩、pH 7.5、8% スクロース、および 0.016% ホルムアルデヒドの組成物中に維持されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3、請求項 5 ~ 7 または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

トキソイド A および / またはトキソイド B を含む前記組成物が凍結乾燥されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 14】

請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法を使用して調製されることを特徴とする組成物。

【請求項 15】

前記方法が毒素 A および毒素 B を含む C. ディフィシル (C. difficile) 培養を提供する工程と、培養から毒素 A および毒素 B を精製する工程とをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1、請求項 2、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法に従って製造されることを特徴とする、C. ディフィシル (C. difficile) トキソイド A。

20

【請求項 17】

請求項 1、請求項 3、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法に従って製造されることを特徴とする、C. ディフィシル (C. difficile) トキソイド B。

【請求項 18】

請求項 1、請求項 2、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法に従って前記 C. ディフィシル (C. difficile) トキソイド A が製造され、また請求項 1、請求項 3、請求項 5 ~ 7、または請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法に従ってトキソイド B が製造されることを特徴とする、C. ディフィシル (C. difficile) トキソイド A および C. ディフィシル (C. difficile) トキソイド B を含むワクチン組成物。

30

【請求項 19】

前記ワクチン組成物が約 0.001% ~ 0.020% ホルムアルデヒドを含むことを特徴とする、請求項 18 に記載のワクチン組成物。

【請求項 20】

前記ワクチン組成物が約 0.004% ホルムアルデヒドを含むことを特徴とする、請求項 19 に記載のワクチン組成物。

【請求項 21】

前記ワクチン組成物が 0.008% ホルムアルデヒドを含むことを特徴とする、請求項 19 に記載のワクチン組成物。

40

【請求項 22】

前記ワクチン組成物が約 0.016% ホルムアルデヒドを含むことを特徴とする、請求項 19 に記載のワクチン組成物。

【請求項 23】

前記トキソイド A および前記トキソイド B が 5 : 1 ~ 1 : 5 の A : B 比で前記組成物中に存在することを特徴とする、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 24】

50

前記トキソイド A および前記トキソイド B が 3 : 1 または 3 : 2 の A : B 比で前記組成物中に存在することを特徴とする、請求項 23 に記載のワクチン組成物。

【請求項 25】

前記ワクチン組成物が凍結乾燥、噴霧乾燥、または泡沫乾燥されることを特徴とする、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 26】

前記ワクチン組成物が液体であることを特徴とする、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 27】

1 つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤をさらに含むことを特徴とする、請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 28】

クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液、重炭酸緩衝液、または pH - 制御水溶液を含むことを特徴とする、請求項 4、請求項 8、請求項 14 または請求項 18 ~ 26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

糖、または糖アルコールをさらに含むことを特徴とする、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

スクロースおよびクエン酸塩を含むことを特徴とする、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記毒素 A を約 0.21% (w/v) ホルムアルデヒドと共に約 25 で約 6 ~ 13 日間インキュベートする工程によって、C. ディフィシル (C. difficile) 毒素 A をトキソイド (Toxoid A) に変換する方法。

【請求項 32】

前記インキュベーションが約 6 日間であることを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記インキュベーションが 0.21% (w/v) ホルムアルデヒド / 100 mM PO₄、pH 7 中で行われることを特徴とする、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記毒素 B を約 0.42% (w/v) ホルムアルデヒドと共に約 25 で約 13 ~ 約 20 日間インキュベートする工程によって C. ディフィシル (C. difficile) 毒素 B をトキソイド (Toxoid B) に変換する方法。

【請求項 35】

前記インキュベーションが約 13 日間であることを特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記インキュベーションが 0.42% (w/v) ホルムアルデヒド / 100 mM PO₄、pH 7 中で行われることを特徴とする、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、全体として本明細書に援用される、2013 年 3 月 15 日に提出した米国特許出願第 61 / 790,423 号明細書に基づく優先権を主張するものである。

【技術分野】

【0002】

本開示は一般に、毒素不活化の分野に関する。より詳細には、本開示は、クロストリジウム毒素、これらの毒素を不活化する方法、結果として生じるトキソイドを含む組成物（例えば、ワクチン）に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

細菌毒素は、当業者に周知の薬剤、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドまたは - プロピオラクトンなどを使用して不活化することが可能である。不活化毒素（トキシソイドとしても知られる）は、状況によって、細胞毒性に戻ったり細胞毒性を取り戻したりすることがある。

【0004】

1つのクロストリジウム・ディフィシルワクチンは、クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）菌株ATCC 43255の嫌気性培養から精製したトキシソイドAおよびトキシソイドBを含むホルマリン - 不活化ワクチンである。毒素は、個別に精製し、不活化（トキシソイド化）して、目標とするトキシソイドA：トキシソイドB比（例えば、3：2）で混合することが可能である。毒素Aおよび毒素Bのホルマリン介在トキシソイド化は、製剤の製品特性および品質特性の多くを、そして最も重要なことには、細胞毒性を防止することによるワクチンの安全性を規定し管理する上で、中心的な役割を果たす。

【0005】

ホルムアルデヒドを使用してC・ディフィシル（*C. difficile*）毒素AおよびBを不活化する方法は公開されている。例えば、（特許文献1）は、4.25% mg/mlホルムアルデヒドと共に4で18日間インキュベートした、部分的に精製されたC・ディフィシル（*C. difficile*）毒素AとC・ディフィシル（*C. difficile*）毒素Bの混合物を記述している。結果として得られるトキシソイド混合物を使用して、ホルムアルデヒド有りと無しで、調製物を調製した。残存ホルマリンの非存在下で、有毒型への部分的逆戻りは、より高温（28～37℃）で生じ、トキシソイドは検出可能な生物活性を数日から数週間にわたって取り戻した。残存ホルムアルデヒドを使用して逆戻りを防止することも可能であるが、（例えば、幾つかの監督機関によって設定された必要条件を満たすように）ワクチンに存在する量を制限することが望ましい。高温（例えば、37）で安定性を保持し、且つ、特に、様々な薬物監督機関によって設定された必要条件を満たすように、最小限のホルムアルデヒドを含むトキシソイドが、当該技術分野で必要である。本明細書に記載の方法は、残存ホルマリンのみを含有する、高温で安定なトキシソイドを提供する。このような方法およびその追加的利点は、本開示により提供される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6,669,520号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、高温で安定な、最小限のホルマリン（例えば、残存ホルムアルデヒド）のみを含有するトキシソイドを調製する方法および試薬を提供する。例示的な方法は、とりわけ、0.15%～約0.5%のいずれかの間のホルムアルデヒド（w/v）（例えば、0.2%～0.8%のいずれかの間、例えばトキシソイドAでは約0.2%（例えば、0.21%）および/またはトキシソイドBでは約0.4%（例えば、0.42%）など）と共に、適温（例えば、17～32のいずれかの間（例えば、約25））で、適当な時間（例えば、約2～約30日）（例えば、それぞれの毒素が対応するトキシソイドに不活化されるように）、インキュベートすることにより、精製された毒素Aおよび精製された毒素Bを不活化する工程によって、高温（例えば、37）で安定した、少量（例えば、残存量）のホルムアルデヒドを含有するトキシソイド組成物を提供する。次いで、トキシソイドを混ぜ合わせて、残存量のホルムアルデヒド（例えば、0.0001%～0.025%のいずれかの間、例えば0.004%、0.008%、または0.016%（w/v）など）のみを含有するトキシソイド含有免疫学的組成物および/またはワクチンを製造することが可能

である。トキシイド免疫学的組成物は、例えば、宿主に投与するために再構成された組成物（例えば、0.001%、0.004%または0.008%のいずれかの間のホルムアルデヒド（w/v））より高濃度のホルムアルデヒド（例えば、約0.016%ホルムアルデヒド（w/v））を含み得る凍結乾燥形であってもよい。この開示は、トキシイド、および免疫学的組成物および/またはワクチンを包含するようなトキシイドを含む組成物、ならびにその中間物（例えば、トキシイドAまたはトキシイドBのみを含む組成物）を製造する方法を提供する。当業者には明白になるであろうが、他の実施形態が本開示で提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】細胞毒性アッセイ結果のグラフ表示である。記載の方法（実施例2）に従って不活化を受けた毒素Aおよび毒素Bの各1バッチからの試料を使用して、IMR90細胞を使用した細胞毒性アッセイを実施した。毒素を不活化するためにホルムアルデヒドを添加した後、0日目、および幾日か後に、試料を採取して、材料の細胞毒性を評価した。y-軸は、毒性物質の存在下で細胞の50%が（それらの通常の線条形態とは対照的に）丸くなった最小濃度（MC50）を示す。アッセイの検出下限値（LOD）は、破線を使用して示されている。

【図2】C.ディフィシル（C. difficile）毒素Aおよび毒素Bを不活化する例示的な方法の略図である。

【図3】免疫試験結果のグラフ表示である。ハムスター負荷モデル（9匹のハムスター/群を5群使用）で実施した試験（実施例2に記載）で、トキシイドAおよびトキシイドBを、記載の方法に従って調製し、混ぜ合わせて、凍結乾燥組成物として処方した。組成物を再構成し、ワクチン接種前にアジュバント添加した。1群のハムスターにはプラセボを投与した。他の4群のハムスターのそれぞれに1つずつ、ヒト用量（HD）の組成物（100μg/用量）の異なる4つの希釈物を調製した。投与された組成物（すなわち、プラセボまたはHD希釈物）をX-軸に示す。致死荷量のC.ディフィシル（C. difficile）を投与後、グラフに示す通りに、各群の%生存（Y-軸）が決定された。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本開示は、クロストリジウムトキシイドを調製する方法、これらの方法で調製されるクロストリジウムトキシイドおよびこれらのトキシイドを含む組成物を提供する。本明細書で特に興味深いものは、C.ディフィシル（C. difficile）毒素Aおよび/またはC.ディフィシル（C. difficile）毒素Bおよび/またはそれらの誘導体（例えば、遺伝的に無毒化したバージョン、切断型、フラグメントなど）である。本開示の目的上、毒素Aおよび/または毒素Bは、当該技術分野における標準的な技術を使用して毒素Aおよび/または毒素Bと同定され得る任意のC.ディフィシル（C. difficile）毒素を含み得る。例示的な技術としては、例えば、ELISA、ドットブロットまたはインビロアッセイなどのイムノアッセイを挙げることができる。そのような同定を行うのに有用な試薬としては、例えば、抗毒素Aウサギポリクローナル抗血清（例えば、Abeam（登録商標）製品番号ab35021またはAbeam（登録商標）製品番号ab93318）または抗毒素Aマウスモノクローナル抗体（例えば、Abeam（登録商標）製品番号ab19953（mAb PCG4）または製品番号ab82285（mAb B618M）のいずれか）、抗毒素Bウサギポリクローナル抗血清（例えば、Abeam（登録商標）製品番号ab83066）または抗毒素Bマウスモノクローナル抗体（例えば、Abeam（登録商標）製品番号ab77583（mAb B428M）、製品番号ab130855（mAb B423M）、または製品番号ab130858（mAb B424M）のいずれか）（Abeam（登録商標）（Cambridge, MA）から全て入手可能）を挙げることができる。

【0010】

本開示は、クロストリジウムトキシイドを調製する方法、これらの方法で調製されるク

10

20

30

40

50

ロストリジウムトキソイドおよびこれらのトキソイドを含む組成物を提供する。本明細書で特に興味深いものは、C．ディフィシル（C．d i f f i c i l e）毒素Aおよび／またはC．ディフィシル（C．d i f f i c i l e）毒素Bおよび／またはそれらの誘導体（例えば、遺伝的に無毒化したバージョン、切断型、フラグメントなど）である。本開示の目的上、毒素Aおよび／または毒素Bは、当該技術分野における標準的な技術を使用して毒素Aおよび／または毒素Bと同定され得る任意のC．ディフィシル（C．d i f f i c i l e）毒素を含み得る。例示的な技術としては、例えば、E L I S A、ドットプロットまたはインビボアッセイなどのイムノアッセイを挙げることができる。そのような同定の実施に有用な試薬としては、例えば、抗毒素Aウサギポリクローナル抗血清（例えば、A b e a m（登録商標）製品番号a b 3 5 0 2 1またはA b e a m（登録商標）製品番号a b 9 3 3 1 8）または抗毒素Aマウスモノクローナル抗体（例えば、A b e a m（登録商標）製品番号a b 1 9 9 5 3（m A b P C G 4）または製品番号a b 8 2 2 8 5（m A b B 6 1 8 M）のいずれか）、抗毒素Bウサギポリクローナル抗血清（例えば、A b e a m（登録商標）製品番号a b 8 3 0 6 6）または抗毒素Bマウスモノクローナル抗体（例えば、A b e a m（登録商標）製品番号a b 7 7 5 8 3（m A b B 4 2 8 M）、製品番号a b 1 3 0 8 5 5（m A b B 4 2 3 M）、または製品番号a b 1 3 0 8 5 8（m A b B 4 2 4 M）のいずれか）（A b e a m（登録商標）（C a m b r i d g e、M A）から全て入手可能）を挙げることができる。

【0011】

本明細書では、1）毒素Aおよび毒素Bを含むC．ディフィシル（C．d i f f i c i l e）培地を提供する工程；2）各毒素の別々の組成物を提供するために、培地から毒素Aおよび毒素Bを精製する工程；3）それぞれ、トキソイドA組成物およびトキソイドB組成物を生成するために、0．15％～約0．5％のいずれかの間（w/v）（例えば、0．2％～0．8％のいずれかの間、トキソイドAでは約0．2％（例えば、0．21％）および／またはトキソイドBでは約0．4％（例えば、約0．42％）など）のホルムアルデヒドと共に、適温（例えば、17～32のいずれかの間（例えば、約25））で、適当な時間（例えば、約2～約21日）（例えば、それぞれの毒素が対応するキソイドに不活化されるように）インキュベートすることによって、精製した毒素Aおよび精製した毒素Bを不活化する工程；および、4）残存量のホルムアルデヒド（例えば、約0．0001％～0．025％のいずれかの間、例えば0．0001％、0．0002％、0．0003％、0．0004％、0．0005％、0．0006％、0．0007％、0．0008％、0．001％、0．0016％、0．002％または0．025％（w/v）のいずれかの間（好ましくは、0．0004％または0．0008％のいずれかの間））のみを含有するトキソイド免疫学的組成物および／またはワクチンを製造するために、トキソイドを混ぜ合わせる工程；の1つまたは複数によって、高温（例えば、37）で安定な、且つ少量のホルムアルデヒドを含有するC．ディフィシル（C．d i f f i c i l e）トキソイド組成物を製造する方法が提供される。組成物に含まれるホルムアルデヒドの量は一般に、組成物のパーセンテージ（重量／容量（「w/v」））として言及されるが、タンパク質濃度などの、特定の要因に基づいて化学量論を調整することが重要であろう。例えば、ここで考えられる好適なホルムアルデヒド濃度は、互いにポリペプチドを実質的に架橋せずに（例えば、分子間架橋を生成せずに）、個々の毒素Aポリペプチドおよび／または毒素Bポリペプチド内で分子間架橋を提供する濃度である。実施例に示す通り、0．5mg/mlの毒素Aを含む組成物は、0．21％（w/v）のホルムアルデヒドを必要とするにすぎないかもしれない。しかし、より高濃度の毒素Aを含む組成物は、相当量の分子間架橋を生じないで必要な分子内架橋を生成するため（例えば、トキソイド化）に、より高濃度またはより低濃度のホルムアルデヒドを必要とするかもしれない。同じ原理が毒素Bのトキソイド化にも当てはまる可能性がある。特定の組成物に適した条件は、本明細書に記載の技術を使用して当業者により決定されてもよく、当該技術で入手できる通りであってもよい。例えば、ある特定の量のホルムアルデヒドが、組成物中の特定の毒素をトキソイド化するのに有効かどうかは、実施例部分に記載の細胞毒性アッセイ、陰イオン交換クロマトグラ

10

20

30

40

50

フィ、サイズ排除クロマトグラフィ、アミン含量分析、抗原性および免疫原性アッセイのいずれか1つ以上を使用して決定することが可能である。本明細書ではホルムアルデヒドが使用されるが、当業者により決定され得る他の類似した薬剤をその代わりに使用することも理解すべきである。例えば、特定の実施形態では、ホルムアルデヒドの代わりにグルタルアルデヒドを使用することが可能である。加えて、本明細書では、リン酸緩衝液中でのトキシイド化が使用されるが、当業者により決定され得る他の類似した薬剤をその代わりに使用することも理解すべきである。例えば、特定の実施形態では、グリシンおよび/またはリジンを含有する緩衝液。そのような代用を行うためには異なる濃度が必要な可能性があるが、そのような代用に適した条件は、本明細書に記載の技術（例えば、実施例部分に記載の細胞毒性アッセイ、陰イオン交換クロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、アミン含量分析、抗原性および免疫原性アッセイのいずれか1つ以上）を使用して決定することが可能である。

10

【0012】

特定の実施形態で、毒素Aは、適当な時間（例えば、1～60分のいずれかの間、例えば10分など）、適量のホルムアルデヒド（例えば、約0.2%）ホルムアルデヒドと混合してトキシイドAを製造し、次いで適温（例えば、約25℃）で適当な時間（例えば、約2～21日、例えば約6～12日のいずれか（例えば、約6日）など）、インキュベートすることが可能である。幾つかの好ましい実施形態では、本明細書の実施例に示す通り、毒素Aを、約0.21%（w/v）ホルムアルデヒドを含む調合物の中で、約25℃で約6～約12日間インキュベートすることにより、毒素AをトキシイドAに変換することが可能である。特定の実施形態で、毒素Bを適当な時間（例えば、1～60分のいずれかの間、例えば10分など）、適量のホルムアルデヒド（例えば、約0.42%）と混合し、次いで適温（例えば、約25℃）で適当な時間（例えば、約2～30日、例えば約13～21日のいずれか（例えば、約21日））インキュベートして、トキシイドBを製造することが可能である。幾つかの好ましい実施形態では、本明細書の実施例に示す通り、約0.42%（w/v）ホルムアルデヒドを含む調合物中、約25℃で約13～約20日間、毒素Bをインキュベートすることにより、毒素BをトキシイドBに変換することが可能である。ホルムアルデヒドを、37%ホルムアルデヒドの原液から、毒素Aまたは毒素Bを含む溶液に所望の量まで（例えば、無菌的に）導入し、続いて暫く（例えば、5～10分）インキュベートして、適温で適当な期間（例えば、2～8日で複数日）貯蔵することが可能である。特定の実施形態で、精製毒素Aおよび精製毒素Bを混ぜ合わせ、次いで適当な時間（例えば、1～60分のいずれかの間、例えば10分など）適量のホルムアルデヒド（例えば、約0.42%）と混合し、次いで適温（例えば、約25℃）で適当な時間（例えば、約2～30日、例えば約13～21日のいずれか（例えば、約21日））インキュベートして、トキシイドAおよびトキシイドBを製造することが可能である。トキシイドは、適当な緩衝液（例えば、20～150mMのいずれかの間のリン酸塩（例えば、100mM）、pH7.0）に含まれていてもよい。次いで、トキシイドA組成物およびトキシイドB組成物を適当な緩衝液中で混ぜ合わせて（例えば、20mMクエン酸塩、pH7.5、5%～8%スクロース（例えば、8%）などの適当な緩衝液中への透析濾過による）、トキシイドA/B免疫学的組成物および/またはワクチン（例えば、本明細書では「組成物」と集合的に呼ばれることがある）を製造することが可能である。このような組成物は、標準技術を使用して凍結乾燥形で調製することも可能である。このように、特定の実施形態で、トキシイド免疫学的組成物は、例えば、それ（例えば、製剤）から再構成された組成物より高濃度のホルムアルデヒドを含み得る、凍結乾燥形であってもよい。例えば、凍結乾燥組成物は、約0.016%ホルムアルデヒド（w/v）を含み得るが、宿主に投与するために再構成した後は、組成物（例えば、製剤）は、0.016%未満のホルムアルデヒド（w/v）（例えば、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01（w/v）のいずれかの間）を含み得る。次いで、特定の実施形態で、トキシイドA/B免疫学的組成物および/またはワクチン（例えば、「製剤」）は、0.0001%～0.025

20

30

40

50

%のいずれかの間のホルムアルデヒド (w/v) (例えば、0.001%、0.002%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01%、0.016%、0.02%または0.025% (w/v) のいずれかの間) (例えば、「残存ホルムアルデヒド」) を含み得る。製剤中に残存ホルムアルデヒドが含まれることは、組成物がより高温 (例えば、4℃以上、例えば室温または37℃など) で暫く (例えば、約6週) で維持される場合に、トキシイドAおよび/またはトキシイドBが、それぞれ、毒素Aまたは毒素Bに逆戻りするのを減少および/または防止することが可能な点で特に有益であることが判明している。場合によっては、ホルムアルデヒドの量を増加して、毒素不活性化時間を減少し得ることは理解される。最終組成物 (例えば、免疫学的組成物、ワクチン) は、残存量のホルムアルデヒドを含むに過ぎないであろう。実施例に示す通り、これらのプロセスは意外なことに、好ましい生化学的特性および機能特性を有する、免疫学的トキシイドA/B-含有組成物を提供する。

10

【0013】

特定の実施形態で、本明細書に記載の方法におけるどの時点でも、中のホルムアルデヒドの官能性を妨害し得る特定の緩衝液成分の量を調整することは、有益であろう。例えば、TRISは、ホルムアルデヒド介在修飾に関してタンパク質と事実上競合できるアミン基を有し、その結果、反応混合物中のホルムアルデヒド実効濃度を低減させる。したがって、毒素および/またはトキシイドが製造される組成物中のTRISの量を低レベルに維持することは有益かもしれない。例えば、毒素調製物中の残存TRIS値は、より好適なレベル (例えば、約1~約5 µg/ml未満 (例えば、1 µg/ml (例えば、検出限界未満) または5 µg/ml) に低減させることが可能である。実施例に示す通り、毒素調製物中の残存TRIS値は、例えば、(例えば、フラットストックMillipore PES50Kを用いた) タンジェント流濾過を使用して (例えば、中空糸膜または他のタイプの膜に対立するものとして)、精製毒素Aおよび/または精製毒素Bを25 mM Tris中に透析濾過し (MgCl₂を除去するため)、次いでリン酸緩衝液 (例えば、100 mM PO₄, pH 7) 中に透析濾過することによって、驚くほど、より好適なレベル (例えば、1 µg/ml未満) に低減させることが可能である。結果として得られる低濃度のTRISは、特定の実施形態で、人がトキシイド化プロセスを成し遂げるために必要なホルムアルデヒドの量をより効果的に調節することを可能にすることができる。他の実施形態は、例えば、アミン基を含まない緩衝液 (例えば、MEM、酢酸塩、クエン酸塩) および/またはpH-制御水溶液 (例えば、酸または塩基を添加し得る生理食塩水または水) を使用することを含んでもよい。

20

30

【0014】

このように、幾つかの好ましい実施形態では、トキシイド化反応において、Trisはリン酸緩衝液などの別の緩衝液に代替され得る。例えば、実施例に記載の通り、清澄C₁₂₆ディフィシル (C₁₂₆ diffiicile) 培養濾液を、Tris緩衝液 (例えば、50 mM Tris/NaCl/0.2 mM EDTA/1 mM DTT, pH 7.5) に処理される (例えば、タンジェント流濾過などによって濃縮され透析濾過される) ことが可能である。次いで、結果として生じる溶液を (例えば、メンブランフィルターを使用して) 濾過し、硫酸アンモニウム濃度をほぼ適量に (例えば、約0.4 Mに) 調節し、次いで (例えば、メンブランフィルターを使用して) さらに濾過を実施することが可能である。C₁₂₆ディフィシル (C₁₂₆ diffiicile) 毒素Aおよび毒素Bを含有する、この水溶液を、次には、疎水性相互作用クロマトグラフィにかけ、毒素を、Tris緩衝液で洗浄することが可能なサイズ排除 (例えば、セファロース) カラムに結合させることが可能である。次いで、C₁₂₆ディフィシル (C₁₂₆ diffiicile) 毒素を、DTTおよびIPAを含有するTris緩衝液で溶離してプールし、WFIを使用して伝導度を約9 mS以下に調節することが可能である。(プールして溶離した) これらのC₁₂₆ディフィシル (C₁₂₆ diffiicile) 毒素を、次には、Tris緩衝液を用いた平衡化を含む陰イオン交換クロマトグラフィなどの、別の方法で、さらに精製することが可能である。次いで、毒素Aを低塩Tris緩衝液で溶離し、毒素Bを高塩Tris緩衝液で溶離することが可

40

50

能である。精製毒素 A または精製毒素 B を含有する溶液を、次には、それぞれ濃縮して、 100 mM PO_4 、 $\text{pH } 7$ などのリン酸緩衝液中に透析濾過することが可能である（この場合、残存 TRIS 値は、好ましくは約 $1\text{ 未満} \sim \text{約 } 5\text{ }\mu\text{g/ml}$ である）。より低濃度のリン酸塩（例えば、 20 mM ）は適当でない可能性があり、多量体化の増加につながり得る（これは、可能な場合には最小限に抑えるべきである）ことが判明している。したがって、好ましい好適なリン酸緩衝液は、例えば 25 、 30 、 35 、 40 、 45 、 50 、 55 、 60 、 65 、 70 、 75 、 80 、 85 、 90 、 95 、 100 、 105 、 110 、 115 、 120 、 125 、 130 、 135 、 140 、 145 、 150 、 155 、 160 、 165 、 170 、 175 、 180 、 185 、 190 、 195 または 200 mM のいずれかの間の、約 20 mM 以上から約 200 mM までの任意の濃度のリン酸塩を含んでもよい。本明細書の実施例に示す通り、次には、毒素 A を、 100 mM PO_4 、 $\text{pH } 7$ 中に約 0.21% (w/v) ホルムアルデヒドを含む調合物と約 25 で約 6 日間、混合することによって、毒素 A をトキシイド A に変換することが可能である。また、幾つかの好ましい実施形態では、本明細書の実施例に示す通り、毒素 B を、 100 mM PO_4 、 $\text{pH } 7$ 中に約 0.41% (w/v) ホルムアルデヒドの調合物と約 25 で約 13 日間混合することによって、毒素 B をトキシイド B に変換することが可能である。当業者には理解されるであろうが、他の好適な緩衝液も考えられる。

10

【0015】

トキシイド A 組成物および / またはトキシイド B 組成物を分析して、その組成物の特性が許容できるかどうかを決定することにより、当業者は、特定の条件（例えば、緩衝液（またはその成分）、時間、温度）が、トキシイド A 組成物および / またはトキシイド B 組成物の調製および / または維持に使用するのに好適かどうかを決定することが可能である。例えば、組成物は、細胞毒性アッセイ（例えば、 $\text{IMR}-90$ 細胞系（例えば、実施例参照）またはベロ（ Vero ）細胞を使用して）、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィ（ AEX-HPLC ）、サイズ排除高速液体クロマトグラフィ（ SEC-HPLC ）、酵素結合免疫吸着測定法（ ELISA ）、 280 nm における吸光度を使用して測定された濃度、復帰分析（例えば、実施例参照）、および / またはインビボ力価アッセイ（例えば、実施例に記載のハムスター力価アッセイ）を使用してテストすることが可能である。好ましい条件で調製された組成物は一般に次のいずれか 1 つまたは複数を示す：細胞毒性アッセイで測定される細胞で皆無またはそれに近い細胞毒性；トキシイドの多量体化を殆どまたは全く示さない（または別の条件と比べてある条件下では少なくともより少ない、より少ないことが好ましい） AEX-HPLC および / または SEC-HPLC クロマトグラム；（例えば、一般に 1 から遠い $\text{ELISA/A } 280$ 値を示す可能性がある好ましくない条件で調製された組成物と比較して）1 に近い $\text{ELISA/A } 280$ 値；テスト期間中に、トキシイドから毒素への皆無またはそれに近い復帰；および / またはインビボアッセイ中の免疫原性（例えば、ハムスター力価アッセイにおける 4.8 以上の $\text{Log } 10$ 力価）。当業者により決定され得る通り、他の方法を使用してこれらの決定を行うことも可能である。

20

30

【0016】

本明細書に記載の方法は、 C. difficile の事実上のあらゆる菌株に由来する毒素に適用できる。 C. difficile の好ましい菌株は、毒素 A および / または毒素 B を産生する菌株であり、例えば、トキシノタイプ 0（例えば、 $\text{VPI } 10463 / \text{ATCC } 43255$ 、 630 ）、 IIII （例えば、 $027 / \text{NAP/B } 1$ ）、 V （例えば、 078 ）および VIIII （例えば、 017 ）の菌株を挙げることができるが、その限りではない。方法は、組み換え方法を使用して産生される C. difficile 毒素にも適用できる。毒素（例えば、毒素 A および / または毒素 B）は、当該技術分野で公知（例えば、米国特許第 $6,669,520$ 号明細書）の方法を使用して、 C. difficile の培養濾液から精製することが可能である。 C. difficile の培養濾液から毒素を精製する例示的な方法は、本明細書の実施例に記述されている。

40

50

好ましくは、毒素は、75%、80%、85%、90%、95%、99%のいずれかの間、またはそれを超える純度を有する。毒素は、一緒に不活化してもよく、または別々に不活化してもよい。例えば、精製毒素を所望の毒素A：毒素B比（例えば、3：1、3：2、5：1、1：5）で混合し、次いで不活化してもよく、個々に不活化してもよい。好ましくは、毒素は個々に不活化して、トキシイドを製造する。用語「トキシイド」は本明細書では、化学処理によって部分的にまたは完全に不活化された毒素を記述するために使用される。毒素は、例えば、インビトロ細胞毒性アッセイで、またはインビボアッセイで、測定するとき、未処理の毒素より少ない毒性（例えば、100%、99%、95%、90%、80%、75%、60%、55%、50%、25%または10%以下の毒性）を有する場合、不活化されていると言われる。本明細書で開示される通り、毒素はホルムアルデヒド処理を使用して不活化される。他の可能な化学的手段としては、例えば、グルタルアルデヒド、過酸化物、 α -プロピオラクトンまたは酸素処理などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0017】

トキシイドが毒素に逆戻りするのを防止する量のホルムアルデヒドと共に毒素をインキュベートすることによって、不活化を実行することが可能である。逆戻りは、精製毒素Aまたは精製毒素Bを含む緩衝液中に適量のホルムアルデヒドを含有することによって防止することが可能である。緩衝液中のホルムアルデヒドの量は、逆戻りを防止するのに適当なホルムアルデヒド濃度を維持するように調節することが可能である。この目的を達成するために、残存濃度のホルムアルデヒドが緩衝液（および/または医薬組成物）中に含まれてもよい。残存濃度のホルムアルデヒドは、逆戻りを防ぎ且つ/または本明細書に記載の組成物が投与される者に対して副作用を示す危険性が低いものである。例えば、残存ホルムアルデヒド濃度は、0.0001%~0.025%ホルムアルデヒド（w/v）のいずれかの間の範囲（例えば、0.004%、0.008%、0.016%、または0.01%のいずれかの間）、約0.001%~約0.020%（w/v）、約0.004%~約0.020%（w/v）（例えば、約0.016%±0.04%）、または特に約0.004%~0.010%（w/v）（例えば、約0.008%）の範囲であってもよい。逆戻りの防止は一般に、37℃での貯蔵後、本明細書に記載のインビトロアッセイなどのインビトロアッセイで、検出可能な細胞毒性が認められない場合に分かる（例えば、実施例における細胞毒性アッセイ参照）。逆戻りの「実質的な」防止は一般に、37℃での貯蔵後、実施例に記載のインビトロアッセイで、トキシイドの10%以下が毒素に戻ることを意味する。好適なインビトロ細胞毒性アッセイは、例えばベロ（Vero）細胞を使用した、細胞ベースの蛍光アッセイであってもよい。別の好適なインビトロ細胞毒性アッセイは、IMR90細胞（例えば、ATCC（登録商標）寄託番号CCL-186）を使用して実施することが可能である。試験物質（例えば、トキシイド）の毒性は、細胞の50%が、その正常な線状形態と比較して丸くなる最小濃度（例えば、MC-50）として決定し得る。本明細書の実施例に記載の通り、本明細書に記載の方法で作られたトキシイドおよび0.008%以下のホルムアルデヒドを含むワクチン組成物は、37℃で貯蔵後、インビトロアッセイで検出可能な細胞毒性を示さなかった。物理化学的分析（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィ）を使用して逆戻りを確認することも可能であるが、インビトロ細胞毒性アッセイの方が有益であろう。トキシイドの力価は、IgG抗毒素Aまたは抗毒素B IgG力価の平均値を測定する、ハムスターインビボ力価アッセイでも測定し得る。

【0018】

特定の実施形態では、37%ホルムアルデヒドの溶液から適量のホルムアルデヒドを毒素に加えることが可能である。毒素は、好ましくは、ホルムアルデヒドを加える前に、好適な緩衝液（例えば、100mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0）中にある。その中の毒素濃度は、例えば、約0.1~約5mg/mL（例えば、0.5mg/mL）であってもよい。不活化プロセスを開始するために、毒素をまず最初に、適当な濃度のホルムアルデヒド（例えば、約0.1%~約0.6%）と、適当な時間（例えば、10分）混合してもよい。例えば、精製毒素A（100mMリン酸ナトリウム、pH7.0中、0.5

mg/ml 精製毒素 A) を、約 0.2% のホルムアルデヒド中で約 10 分間混合してもよい。また精製毒素 B (例えば、100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中、0.5 mg/ml 精製毒素 B) を約 0.4% のホルムアルデヒド中で約 10 分間混合してもよい。次いで、このような混合物を、(例えば、0.2 μm メンブランフィルターを使用して) 濾過して、280 nm における吸光度によるタンパク質濃度に影響を及ぼす可能性がある小さいタンパク質集合体を除去することが可能である(例えば、所期のトキソイド A : トキソイド B 比で医薬組成物の精密な調合を可能にする)。次いで、混合物を約 1 ~ 約 21 日(例えば、約 2 日、約 6 日、または約 13 日)間インキュベートすることにより、不活化を続けることが可能である。例えば、毒素 A 混合物を、適温(例えば、約 25 °C)で、13 日間以下(例えば、約 2 日、約 6 日、または約 13 日)、インキュベートすることが可能である。毒素 B 混合物を、適温(例えば、約 25 °C)で、21 日間以下(例えば、約 2 日、約 6 日、または約 13 日)、インキュベートすることが可能である。この方法で、トキソイド A および/またはトキソイド B の調合物を提供することが可能である。そのような調合物は一般に、少なくとも 90%、95%、99% または 100% のいずれかの間のトキソイド(例えば、不活化毒素)を含む。

【0019】

これらのトキソイド調合物は、緩衝液と直接混合することが可能であるが、好ましくは調合物を濃縮して適当な緩衝液中に透析濾過する。好ましくは、ホルムアルデヒドの除去および緩衝液への交換を確実にしながらタンパク質奪取を最小限に抑えるために、濃縮および透析濾過は、タンジェント流濾過を使用して行われる。緩衝液は、好ましくは、トキソイドの安定性を高め且つ/またはトキソイドの凝集を遅延または減少させる少なくとも 1 つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含む。使用に適した賦形剤としては、例えば糖類(例えば、スクロース、トレハロース)または糖アルコール類(例えば、ソルビトール)、および塩類(塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム)またはそれらの組合せなどが挙げられるが、その限りではない。加えて、好適な賦形剤は、例えば、米国特許出願公開第 2011/045025 号(米国特許出願第 12/667,864 号)明細書に記載のもののいずれであってもよい。不活化に次いで、不活化された毒素(すなわち、トキソイド)の溶液を濃縮および/または限外濾過および/または透析濾過して、トキソイドの、細胞毒性形への(例えば、毒素への)逆戻りを防止、または実質的に防止する、pH 8.0 以下(例えば、6.5 ~ 7.7、たとえば 6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 または 8.0 のいずれかの間)の適当な緩衝液(例えば、約 5 ~ 約 100 mM (例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または 100 mM のいずれかの間のクエン酸塩、リン酸塩、グリシン、炭酸塩、重炭酸塩などの、しかしその限りではない、緩衝液)(例えば、20 mM クエン酸塩、pH 7.5)中に保存する。例示的な緩衝液は、例えば、適量のホルムアルデヒド(例えば、0.016% (w/v))を含有する 20 mM クエン酸塩、pH 7.5、5% ~ 8% スクロースであってもよい。当業者に理解されるであろうが、他の緩衝液なども適する可能性がある。

【0020】

トキソイドは、医薬組成物(例えば、免疫原性および/またはワクチン組成物)として使用するために処方され得る。例えば、薬学的に許容される希釈剤(例えば、生理食塩水)に懸濁したトキソイド懸濁液によって、または薬学的に許容される担体とのトキソイドの共同によって、投与するための、C. ディフィシル(C. difficile)トキソイドを含む組成物を調製することが可能である。このような医薬製剤は、当該技術分野で公知の 1 つまたは複数の賦形剤(例えば、希釈剤、増粘剤、緩衝剤、保存料、アジュバント、デタージェントおよび/または免疫賦活薬)を含んでもよい。好適な賦形剤は、トキソイドと、そしてアジュバント(アジュバント添加組成物中)と混合可能であり、その例は当業者に公知であり、入手可能である。組成物は液体であってもよく、凍結乾燥(標準方法通り)または泡沫乾燥(例えば、米国特許公開第 2009/110699 号明細書に

10

20

30

40

50

記載)されていてもよい。例示的な凍結乾燥ワクチン組成物は、例えば、トキソイドAおよびトキソイドB、20mMクエン酸塩、8%スクロース、0.016%ホルムアルデヒド、pH7.5を含んでもよい。

【0021】

投与用ワクチンを調製するために、例えば、注射用水、または好適な希釈剤または緩衝液などの水溶液で、乾燥組成物を再構成することが可能である。幾つかの例で、希釈剤は、本明細書に記載のホルムアルデヒドを含む。希釈剤は、ホルムアルデヒドを含む、または含まずに、アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)を含んでもよい。例示的な希釈剤は、NaClおよび水酸化アルミニウムの水溶液であってもよい。このような希釈剤を使用して、乾燥組成物を再構成することが可能である。医薬組成物は、約10~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (例えば、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれか)の、1回量のトキソイドを含んでもよい。一般に、注射1回量の体積は約0.5mLまたは1.0mLである。対象者で誘発される免疫応答を調整するために、投薬量を増減することができる。トキソイドは、アジュバントの存在下または非存在下で、当業者が決定することができる量で投与することができる。有益なアジュバントとしては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびアルミニウムヒドロキシリン酸などの、アルミニウム化合物などが挙げられる。

10

【0022】

免疫学的組成物および/またはワクチン組成物は、経皮(例えば、筋肉内、静脈内、腹腔内または皮下)経路、経皮経路、粘膜経路によって、当業者により適当であると決定される量および投薬計画で、症候性C.ディフィシル(C. difficile)感染症を発症する危険性がある、または危険にさらされている対象者に投与することができる。これらの対象個体群としては、例えば、広域スペクトル抗生物質を受けた対象者、例えば高齢の入院患者、介護施設入所者、慢性疾患患者、癌患者、AIDS患者、集中治療室の患者、および透析治療を受けている患者などが挙げられる。ワクチンは、1、2、3、4回またはそれ以上、投与することができる。多回投与されるとき、投与は、例えば、1週間、1ヵ月または数ヵ月、互いに離れていてもよい。したがって、この開示は、医薬組成物を対象者に投与することによって、毒素、トキソイド、および/またはC.ディフィシル(C. difficile)に対する免疫応答を誘発する方法も提供する。これは、対象者の免疫系にトキソイドを曝露するために、本明細書に記載の医薬組成物(例えば、免疫原性組成物および/またはワクチン)を対象者に投与することにより達成することが可能である。このように、免疫原性組成物および/またはワクチンを使用して、症候性C.ディフィシル(C. difficile)感染症を予防および/または治療することが可能である。

20

30

【0023】

組成物は、キット(例えば、ワクチンキット)に含まれてもよい。例えば、キットは、本明細書に記載の組成物が乾燥状態で入っている第1の容器および組成物を再構成するための水溶液が入っている第2の容器を含んでもよい。キットは、再構成された液体の組成物を投与するための機器(例えば、皮下注射器、マイクロニードルアレイ)および/または使用説明書を任意選択的に含んでもよい。本明細書に記載の組成物は良好な安定性を有することができ、中温(例えば、約2~8)およびより高い温度(例えば、約15、25、37またはそれ以上)での貯蔵期間後、無細胞毒性のままであり得ることが分かっているため、このようなキットは可能である。以下にさらに記述する通り、幾つかの実施例で、組成物は、37での貯蔵後、無細胞毒性のままであった(例えば、逆戻りの証拠がない)。

40

【0024】

したがって、この開示は、例えば、約0.15%~0.5%ホルムアルデヒド(w/v)と共に約17~32で約2~約21日間インキュベートすることにより精製C.ディフィシル(C. difficile)毒素Aおよび/または精製C.ディフィシル(C. difficile)毒素Bを含む組成物を提供することである。

50

d i f f i c i l e) 毒素 B を不活化することによって、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイドを製造する方法を提供する。特定の実施形態では、毒素 A を、約 0 . 2 % ホルムアルデヒドと共に約 25 で約 2 日間インキュベートして、トキソイド A を製造することが可能である。特定の実施形態では、毒素 B を約 0 . 4 % ホルムアルデヒドと共に約 25 で約 13 日間インキュベートして、トキソイド B を製造することが可能である。このような方法で調製されるトキソイド A および / またはトキソイド B を含む組成物も提供される。精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド B を、残存量のホルムアルデヒド (例えば、0 . 001 % ~ 0 . 025 % のいずれかの間、たとえば 0 . 004 %、0 . 008 %、または 0 . 016 % (w / v) のいずれかの間) を含む組成物と混ぜ合わせることにより、精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド B を含む免疫原性組成物を調製する方法も提供する。特定の実施形態で、本方法は、37 で約 6 週間まで安定な、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および / または精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド B の組成物を提供することが可能である。このように、特定の実施形態で、本明細書に記載の方法は、約 0 . 15 % ~ 0 . 5 % ホルムアルデヒド (w / v) と共に約 17 ~ 32 で約 2 ~ 約 21 日間インキュベートすることにより精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 毒素 A または精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) B 毒素を不活化すること、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド B を残存量のホルムアルデヒドを含む組成物と合わせることも含んでもよい。このような方法で調製される C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および B 組成物は、37 で約 6 週間まで安定であり得る。このような組成物中の残存量のホルムアルデヒドは、0 . 001 % ~ 0 . 025 %、0 . 004 %、0 . 008 %、または 0 . 016 % (w / v) のいずれかの間であり得る。本組成物は、約 20 m M クエン酸塩、p H 7 . 5、4 % ~ 8 % スクロース、および 0 . 016 % ホルムアルデヒドも含んでもよい。特定の実施形態で、組成物は凍結乾燥されていてもよい。これらの方法は、毒素 A および毒素 B を含む C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 培養を提供することおよびその培養から毒素 A および毒素 B を精製することも含んでもよい。これらの方法に従って製造される C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A またはトキソイド B も提供される。特定の実施形態で、このような組成物はワクチン (例えば、症候性 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 感染症に対して防護反応、予防反応および / または治療反応を提供する組成物) である。組成物 (例えば、ワクチン組成物) は、トキソイド A およびトキソイド B を、5 : 1 ~ 1 : 5、例えば、3 : 1 または 3 : 2 などの A : B 比で含んでもよい。特定の実施形態で、組成物は、凍結乾燥、フリーズドライ、噴霧乾燥、または泡沫乾燥されていてもよく、あるいは液体であってもよい。このような組成物は、1 つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。組成物は、例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液、または重炭酸緩衝液などの緩衝液、または p H - 制御水溶液、および / または 1 つまたは複数の糖類 (例えば、スクロース、トレハロース) および / または糖アルコール (ソルビトール) を含んでもよい。他の実施形態は、当業者に明白になるであろう。

【0025】

「精製」毒素は一般に、毒素が例えば培養濾液から単離されて、当該技術分野で公知の方法を使用して、少なくともある程度精製されていることを意味する。毒素を精製する例示的な方法は、例えば本明細書に記述されている。特定の実施形態で、精製毒素は、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれ以上のいずれかの間の純度を有し得る。同様に、「精製」トキソイドは、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % またはそれ以上のいずれかの間の純度を有するトキソイドであり得る。

【0026】

用語「約」、「およそ」などは、数値の列挙または範囲の前に来る場合、まるでその用

10

20

30

40

50

語がその列挙または範囲の中の各個々の値の直前に来るかのように、その列挙または範囲の中の各個々の値に個別に関係する。これらの用語は、それらが関係する値が正確にその値である、その値に近い、またはその値と類似していることを意味している。例えば、「約」または「およそ」は、示された値の10%の範囲内の値を示し得る（例えば、「約30%」は、27%から33%までの任意のところを含み得る）。

【0027】

本明細書で使用される場合、被験体または宿主とは、個体であることが意図される。被験体には、飼育慣らされた動物（例えば、ネコおよびイヌ）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、およびヤギ）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）およびトリが含まれ得る。一態様において、被験体は、哺乳動物（例えば、霊長類またはヒト）である。

10

【0028】

用語「インキュベート」、「混合」、「貯蔵」（またはその同義語および／または派生語）は、互換的に使用することが可能である。例えば、毒素を、ホルムアルデヒドを含む溶液と共にインキュベートすることが可能である。このようなインキュベーションは、場合によって、例えば、組成物が運動によって積極的に混合される（例えば、ミキシングバーなどを使用して）かまたは本質的に定常状態で維持されていることを意味することがある。

【0029】

任意選択のまたは任意選択でとは、その後に記述される事象または状況が、起こってもよいし起こらなくてもよいこと、および、その記述には、その事象または状況が起こる場合とそれが起こらない場合とが含まれることを意味している。例えば、任意選択で組成物はある組合せを含み得るという語句は、その組成物が、異なる分子の組合せを含んでもよいし、組合せを含まなくてもよいことを意味しており、その結果、この記述には、組合せと組合せの不在（すなわち、組合せの個々の構成要素）との両方が含まれることとなる。

20

【0030】

範囲は、本明細書において、約ある特定の値から、および／または約別の特定の値までとして表され得る。そのような範囲が表される場合、別の態様は、そのある特定の値からおよび／またはその他方の特定の値までを含む。同様に、既述約またはおよそというの使用により値が概数として表される場合、その特定の値は別の態様を構成することが理解されよう。さらに、各範囲の端点は、他方の端点との関連でも他方の端点から切り離しても意味があることが理解されよう。範囲（例えば、90～100%）は、その範囲自体に加えてその範囲内の各個別の値もまるで各値が個々に列挙されているかのように含むことが意図される。

30

【0031】

予防する（prevent）、予防する（preventing）、および予防（prevention）という用語が所与の状態のための所与の処置に関連して本明細書において使用される場合（例えば、感染症を予防する）、処置された被験体が臨床的に観察可能なレベルの状態を全く発現させないか、彼／彼女が処置の無い場合に罹るであろうよりも緩慢にかつ／または劣る程度にそうした状態を発現させるかのいずれかであることを意味することが意図される。これらの用語は、被験体がそうした状態の態様を全く経験しない状況のみに限定されるものではない。例えば、処置は、それが、状態の所与の発現を生じさせることが予想されたであろう刺激への被験体の曝露の間与えられ、そうでない場合に予想されるよりも少ないかつ／または軽いその状態の症状を被験体が経験することを結果としてもたらすならば、その状態を予防したと言われるであろう。処置は、被験体が感染症の軽度の顕在症状しか示さないことを結果としてもたらすことにより症候性感染症を「予防」し得るのであり、C.ディフィシル（C. difficile）微生物が全く存在してはならないということを含意するものではない。

40

【0032】

同様に、所与の処置に関して症候性感染症の危険性に関連して本明細書において使用さ

50

れる低減する (reduce)、低減する (reducing)、および低減 (reduction) (例えば、症候性C.ディフィシル (C. difficile) 感染症の危険性を低減する) とは、典型的に、被験体が、処置 (例えば、開示される毒素またはトキソイドを用いた投与またはワクチン接種) の不在下における症候性感染症発現のコントロールまたは基礎レベルと比較してより緩慢にまたはより劣る程度に症候性感染症を発現させることをいう。症候性感染症の危険性の低減は、被験体が感染症の軽度の顕在症状または感染症の遅延した症状しか示さないことを結果としてもたらし得るのであり、これは、C.ディフィシル (C. difficile) 微生物が全く存在してはならないということを含意するものではない。

【0033】

本開示内において引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書により援用される。特定の実施形態が、以下の実施例においてさらに説明される。これらの実施形態は、例として提供されるにすぎず、決して特許請求の範囲の範囲を限定することが意図されるものではない。

【実施例】

【0034】

以下の実施例は、説明目的のためだけに提供されるものであり、本開示の範囲を限定することが意図されるものではない。形態の変更および等価物の代用は、状況が示唆し得るまたは好都合とし得る場合に企図されている。本明細書においては特定の用語が採用されてきたが、そのような用語は、説明的な意味で解釈されるものであり、限定目的のものではない。本開示およびこれらの実施例において使用されるが明示的に説明されていない分子遺伝学、タンパク質生化学、および免疫学の方法は、科学文献に詳細に報告されており、当業者の能力の範囲に十分に入る。

【0035】

実施例 1

C.ディフィシル (C. difficile) ワーキングシード (菌株 VPI 10463 / ATCC 43255) を使用して、大豆ペプトン、酵母抽出物、リン酸緩衝液および炭酸水素ナトリウムを含む、pH 6.35 ~ 7.45 の予備状態調節培地 (SYS 培地) に接種し、4 mL ワーキングセルバンク (Working Cell Bank (WCB)) バイアルから 160 L 培養にスケールアップした。所望の密度および 10 ~ 12 時間インキュベーション期間に達したとき、清澄化および 0.2 μ m 濾過のために全 160 L の培養を処理した。もう 1 つの生産発酵槽から培養を採取し、C.ディフィシル (C. difficile) 細胞および細胞片不純物を除去するために、(例えば、マイスナー (Meisner) メンブランフィルターを使用して) 膜濾過を行った。結果として生じる清澄化した培養濾液を濃縮し、タンジェント流濾過により 50 mM Tris / NaCl / 0.2 mM EDTA / 1 mM DTT、pH 7.5 中に透析濾過した。結果として生じる溶液を、メンブランフィルターを使用して濾過し、硫酸アンモニウムの濃度を高め (例えば、約 0.4 M に)、次いで (例えば、メンブランフィルターを使用して) さらに濾過を実施した。この水溶液は、C.ディフィシル (C. difficile) 毒素 A および毒素 B を含んでいた。この水溶液を、疎水性相互作用クロマトグラフィにかけた。C.ディフィシル (C. difficile) 毒素は、セファロースカラムに結合された。カラムを Tris 緩衝液で洗浄し、C.ディフィシル (C. difficile) 毒素の 2 画分を、DTT および IPA を含有する Tris 緩衝液で溶離した。HIC から溶離した 2 つの毒素画分をプールし、WFI を使用して、伝導度を 9 mS 以下に調整した。(プールされた溶離液中の) C.ディフィシル (C. difficile) 毒素を、陰イオン交換クロマトグラフィでさらに精製した。溶離した水溶液を、陰イオン交換カラムを通過させて、毒素をカラムに結合させた。カラムを Tris 緩衝液で平衡化し、毒素 A を低塩 Tris 緩衝液で溶離し、毒素 B を高塩 Tris 緩衝液で溶離した。精製毒素 A および精製毒素 B をそれぞれ濃縮し、100 mM PO₄、pH 7 中に透析濾過した。タンパク質濃度は約 0.5 mg / mL であり、各毒素の純度は 90 % 以上であった。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

37%ホルムアルデヒド溶液を、毒素A透析濾液および毒素B透析濾液のそれぞれに無菌的に加えて、最終濃度0.42%を得た。溶液を混合し、その後2～8℃で18～22日間貯蔵した。不活化後、毒素透析濾液を、製剤緩衝液(20mMクエン酸塩/5%スクロース、pH7.5)中に透析した。37%ホルムアルデヒド溶液を添加することにより、必要に応じてホルムアルデヒド濃度を調整した。トキシイドAおよびトキシイドBを、重量で3:2(A:B)の比率で混ぜ合わせ、凍結乾燥した。凍結乾燥生成物は、トキシイドA(0.24mg/mL)、トキシイドB(0.16mg/mL)、20mMクエン酸ナトリウム、5%(w/v)スクロースおよび指示濃度のホルムアルデヒドを含んでいた。

10

【 0 0 3 7 】

37℃で6週間にわたって潜在的逆戻りを観察するために、復帰分析を実施した。トキシイドAおよびトキシイドBを含む組成物は、異なる量の残存ホルムアルデヒド(0%、0.008%、および0.016%(w/v))を用いて処方し、37℃または4℃のいずれかで貯蔵して、毎週1回6週間、細胞毒性アッセイによりテストした。これらの試験のデータを表1に示す。4℃で、生成物は、残存ホルムアルデヒド無添加であっても復帰分析を通過する。しかし37℃では、復帰テストを通過するためには0.016%残存ホルムアルデヒドが必要である。

【 0 0 3 8 】

【表1】

20

表1
37℃で貯蔵した製剤の復帰分析

4℃	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目
0%	-	-	-	-	-	-
0.008%	-	-	-	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-
37℃	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目
0%	+	+	+	+	+	+
0.008%	-	+	+	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-

*-＝細胞毒性検出されず；＋＝細胞毒性

30

【 0 0 3 9 】

実施例2

37℃で安定なトキシイドを提供するであろうトキシイド化方法を特定するために、本明細書に記載の実験を実施した。C.ディフィシル(C. difficile)ワーキングシード(菌株VPI10463/ATCC43255)を使用して、無菌の使い捨てバッグ内の予備状態調節培地(大豆ペプトン、酵母抽出物、リン酸緩衝液およびD-ソルビトールを含む、pH7.1～7.3)に接種し、目標とするODが達成されるまで35～39℃で培養をインキュベートした。30Lシード1培養を使用して、250L無菌使い捨て培養バッグ内の培地に接種し、目標とするODが達成されるまで35～39℃で、培養をインキュベートした。シード2培養を使用して、1000L無菌使い捨て培養バッグに接種し、目標のODが達成されるまで35～39℃で培養をインキュベートした。もう1つの生産発酵槽から培養を採取し、C.ディフィシル(C. difficile)細胞および細胞片不純物を除去するために、(例えば、Pall Depth 700p/80p/0.2μm 0.02平方メートル/Lを使用した)深層濾過にかけ、プロテアーゼ活性を制限するために同時に冷却した(例えば、約37℃～19℃)。結果として生じる清澄化された培養濾液を濃縮し、フラットストック・ミリポア(Millipore)を使用したタンジェント流濾過により、約4℃の温度で(プロテアーゼ活性低下のため)、25mM、Tris/50mM、NaCl/0.2mM、EDTA、pH、7.5～8.0中に、透析濾過し、DTTを添加しなかった。結果として生じる溶液を、メンブラ

40

50

ンフィルターを使用して濾過し、硫酸アンモニウムの濃度を、（例えば、約 0.9 M に）、高め、次いで、（例えば、メンブランフィルターを使用して）さらなる濾過を実施した。この水溶液は、C.ディフィシル（C. difficile）毒素 A および毒素 B を含んでいた。この水溶液を、疎水性相互作用クロマトグラフィにかけた。C.ディフィシル（C. difficile）毒素は、ブチルセファロース樹脂（例えば、GE Butyl SFF セファロースなど）に結合された。カラムを 0.9 mM 硫酸アンモニウム 25 mM Tris、pH 8.0 で洗浄し、C.ディフィシル（C. difficile）毒素を、25 mM Tris、pH 8.0 で溶離し、WFI を使用して伝導度を 7 mS 以下に調整した。（溶離液中の）C.ディフィシル（C. difficile）毒素を、陰イオン交換クロマトグラフィでさらに精製した。溶離した水溶液を、陰イオン交換カラム（例えば、Tosoh Q 650 M）を通過させて、毒素をカラムに結合させた。カラムを 25 mM Tris pH 7.5 で平衡化し、毒素 A を、25 mM Tris、pH 8.0 中 27 mM $MgCl_2$ で溶離し、毒素 B を、25 mM Tris、pH 8.0 中 135 mM $MgCl_2$ で溶離した。精製毒素 A および精製毒素 B をそれぞれ濃縮し、先ず 25 mM Tris 中に（例えば、 $MgCl_2$ を除去するため）に、次いで 100 mM PO_4 、pH 7 中に透析濾過した。毒素 A の平均収率は約 0.021 g 純毒素 / L 発酵（UV280）であり、SDS Page で評価した純度は、平均して約 97.2 % であった。毒素 B の平均収率は約 0.011 g 純毒素 / L 発酵（UV280）であり、SDS Page で評価した純度は、平均して約 993.9 % であった。このプロセスから生成される毒素は 90 % 以上の純度を示し、前の処理工程の後に残されるマトリックス残存（例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS））の減少も示す。実質的に実施例 1 に記載の通りのプロセスからの毒素マトリックス中の残存 TRIS 値は、約 100 ~ 800 $\mu g / ml$ 変化したが、この実施例に記載の精製プロセスからの毒素マトリックス中の残存 TRIS 値は 1 $\mu g / ml$ 未満（すなわち、検出限界未満）である。ホルムアルデヒドとのトキシド化反応に関して、ホルムアルデヒド介在修飾に関してタンパク質と事実上競合できるアミン基を有し、その結果、反応混合物中の有効なホルムアルデヒド濃度を低減させる。したがって、このプロセスで作られるトキシドのトキシド化速度論は、実施例 1 に記載のプロセスで調製されるトキシドの速度論と比較して速いことがデータから示唆される。

【0040】

温度およびホルムアルデヒド濃度に関して、トキシド化プロセスで試験を実施し、トキシド化インキュベーション期間の関数として解析した。同レベルの免疫原性を維持しながら、（実施例 1 に記載されているような）従来のプロセスを使用して生成されるトキシドより優れた安全性プロフィールおよび優れた逆戻り特性を提供する頑強なトキシド化プロセスを開発することが目的であった。37 で復帰分析を通過し、最小量の残存ホルムアルデヒドを含む製剤を生産するであろうトキシド化条件が望まれた。これらの実験で、毒素濃度は 0.5 mg / ml で一定であり、反応は全て 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 中で実施された。各トキシド化反応で評価した温度は 4、15 および 25 であった。ホルムアルデヒド濃度は、トキシド A 反応では 0.21 %（「0.2 %」）または 0.42 %（「0.4 %」）の間で変化し、トキシド B 反応では 0.42 %（「0.4 %」）と 0.84 %（「0.8 %」）の間で変化した。各反応条件について、毒素濃度は 0.5 mg / ml に調整され、100 ml 規模で実施された。次いで、個々の反応の各々が目標濃度に到達するまで、37 パーセント（37 %）ホルムアルデヒドを加えた。反応を、5 ~ 10 分間、穏やかに攪拌して目標温度のインキュベーター内に置いた（インキュベーションの 1 時間以内に目標温度が達成された）。個々の反応を、毎日、最高 21 日間モニターした。試料を抜き取り、細胞毒性分析、AEX-HPLC、SEC-HPLC、SDS-PAGE および TNBS アッセイで分析した。トキシド化条件に応じて特定の時間間隔で、試料を抜き取り、処方して動物実験、復帰分析および ELISA テストを実施した。

【0041】

速度論的細胞毒性分析

トキシイド化反応に続いて細胞毒性分析を実施し、従って試料を反応混合物から毎日直接抜き取り、同日分析にかけた。トキシイド化プロセスに続いてIMR90細胞で細胞毒性分析を実施し、トキシイド化の速度論は単相であり、細胞毒性中和に毒素Aでは平均 5 ± 1 日かかり、毒素Bは 13 ± 2 日に近かった（全反応で3倍安全域に及ばない）。1バッチを使用して得られたデータを図1に示す。y-軸は、物質の毒性の反映であり、細胞の正常な線状形態の代わりに、毒性物質の存在下で細胞の50%が丸くなる最小濃度を表す、MC50値を含む。2つの毒素のMC50値は、1000倍異なり；Bはより細胞毒性であり、そのMC50値は低 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であった。これらの実験で、最高濃度である $200\mu\text{g}/\text{ml}$ でテストしたとき、細胞毒性は皆無であったため、トキシイドの絶対MC50値は未確認であった。不活化プロセスの全期間は18～21日であった。

10

【0042】

表2に、毒素Aおよび毒素Bのトキシイド化反応に関する細胞毒性分析のデータを示す。表2は、毒素とのホルムアルデヒドの別々の反応のそれぞれの細胞毒性の減損を示すために必要な時間量（日数）を表す。毒素Aおよび毒素Bのトキシイド化反応のデータから、2、3の一般的傾向が明白である。ホルムアルデヒド濃度が上昇するにつれて、毒素を不活化するために必要な時間は減少する。加えて、反応温度が上昇するにつれて、毒素を不活化するために必要な時間はやはり減少する。温度またはホルムアルデヒド濃度のいずれかの上昇と共にトキシイド化の速度が加速されることがデータから示唆される。多くの可能性のある条件は、速度論的細胞毒性分析から特定され、また3倍安全域は、細胞毒性の初期減損を3倍外挿することによって達成できることがデータから示唆される。例えば、毒素Aは25にて0.2%ホルムアルデヒドで2日に無毒化し、したがって、適当な安全域を適用することは、反応を6日間続けることが最小限必要であろう。細胞毒性の減損に関する承認基準に基づけば（速度論的分析に基づけば）、種々のトキシイド化反応条件は予想通りになり、他の分析を使用したさらなる評価は、条件を絞り込むであろう。

20

【0043】

【表 2】

表 2
速度論的試験の細胞毒性結果

	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	9日目
トキシイドA 0.2%, 4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トキシイドA 0.2%, 15°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-
トキシイドA 0.2%, 25°C	+	+	-	-	-	-	-	-	N.D.
トキシイドA 0.4%, 4°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-
トキシイドA 0.4%, 15°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
トキシイドA 0.4%, 25°C	+	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
トキシイドB 0.8%, 4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
トキシイドB 0.8%, 15°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-
トキシイドB 0.8%, 25°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
トキシイドB 0.4%, 4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トキシイドB 0.4%, 15°C	+	+	+	+	+	-	-	-	-
トキシイドB 0.4%, 25°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*+: 細胞毒性; -: 細胞毒性検出されず; N.D.: 測定せず

10

20

30

40

50

【0044】

D o E 反応の速度論的 A E X - H P L C 分析

種々のトキシイド化パラメータをさらに評価するツールとして、A E X - H P L C (拡張勾配方法) を使用することができる。A E X プロフィールは、好適なトキシイド化条件の絞り込みに有益なツールであり得る。トキシイド A およびトキシイド B の両者で、2 つの部分母集団が、共に毒素より長い保持時間を有する A E X クロマトグラムで観察された。ピーク母集団は、反応が進行するにつれて移動し、毒素へのさらなる修飾が示唆される。潜在的に、これは、タンパク質上の荷電特性をより少ない正に変え、その結果カラム樹脂 (四級アンモニウム樹脂) との結合親和力を高める、毒素上のアミン基と反応するホルムアルデヒドを表す。温度およびホルムアルデヒド濃度は、より多いホルムアルデヒドタンパク質修飾を示す時間の関数としてピーク母集団プロフィールに影響して「シフトする」ことができる; 毒素 A および毒素 B の両トキシイド化反応で、温度およびホルムアルデヒド濃度の上昇と共に第 2 のピーク母集団へのより急速なシフトが確認される。評価の見地から、より多くのタンパク質修飾を確実にするためには、第 2 のピークで単分散プロフィールを有することがより望ましいであろう。トキシイド A では、25 で 0.21% ホル

ムアルデヒド、>6日、または15で42%ホルムアルデヒド、>6日の条件は、所望の単分散第2ピークプロファイルを与える。トキシイドBでは、15で0.4%または0.8%ホルムアルデヒド、>10日間、または25で0.4%ホルムアルデヒド>5日間の条件は、所望の単分散第2ピークプロファイルを結果的にもたらした。最高のホルムアルデヒド濃度および温度での反応は、より多いトキシイド母集団を時間の関数として生成し始め、より広範なタンパク質修飾（特に、0.4%ホルムアルデヒド、25での毒素Aの不活化の場合）が示唆されることに注目することは重要である。

【0045】

速度論的SEC-HPLC分析

SECプロファイルは、好適なトキシイド化条件の絞り込みに有益なツールであり得る。クロマトグラムによって、ホルムアルデヒド誘導性分子間架橋の結果として起こり得る多量体化の程度を理解することができる。トキシイド上の多量体化の量を最小限に抑え、実施例で製造される生成物のものと類似したプロファイルを達成することが望ましい。個々の反応をSEC-MALSで毎日モニターし、多量体化の出現について定性的に分析した。トキシイドB反応に関して分析した条件は全て多量体化を何も示さなかった。トキシイドAでは、主として最高のホルムアルデヒド濃度を用いた条件で、過度の多量体化が確認された。このようにSEC-MALSデータは、温度、時間またはホルムアルデヒド濃度に関して、トキシイドB条件を差別しない。しかし、トキシイドAでは、より高温およびホルムアルデヒド濃度は連携して多量体化に導けることがデータから示唆される。

【0046】

速度論的アミン含量(TNBS)分析

ホルマリン介在トキシイド化は、ホルムアルデヒドを基本とする部分を形成する反応を通して、タンパク質上の遊離アミン含量（例えば、リジンの-アミノ基）の減少をもたらす。トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)アッセイを使用して、以前の物質上の修飾の程度をモニターしようとし、反応終了時の修飾の程度は、トキシイドAおよびトキシイドBはそれぞれ-35%および65%であることが分かった（残っている遊離アミン含量の逆関数）。この試験では、TNBSアッセイを使用して遊離アミン含量もモニターした。温度および時間が増加するにつれて、%遊離アミン含量はより速く漸近線に接近することを、条件は示した。このように、アミン修飾の程度は、最大限、毒素Aでは~40%、毒素Bでは75%と推定され得る（残存する遊離アミン含量の逆関数）。アミン含量は細胞毒性の減損とほとんど相関関係がないが、ホルムアルデヒドと毒素との反応の程度を追跡するのに使用することができる。例えば、アミン修飾は、25で、Aに関しては6日で、Bに関しては約10日で、完成しているようである。反応がより低温で実施されると、同程度のアミン修飾を達成するために要する時間は増加する。このように、より高温は、より短い期間でより完全な反応をもたらすであろうということがデータから示唆される。

【0047】

抗原性の解析

種々のトキシイド化パラメータをさらに評価するツールとして、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)も使用することができる。生成物のELISAプロファイルを使用して、好適なトキシイド化条件を絞り込むことができる。生成されたトキシイドを、以前の物質から生成された抗体に対してELISAで測定し、トキシイド化時間の関数として解析した。ここでELISAを使用して毒素量を検出し、280nmにおける吸光度を使用して測定した濃度と比較した。トキシイド化反応で抗原が進行するにつれて、ELISA値は低下する可能性があり、実施例1トキシイドで確認された反応からの変化を示す（潜在的に多量体化を示す）。変化性がアッセイでみられたが、より高温およびより高いホルムアルデヒド濃度はより低いELISA応答をもたらすことがデータから示唆される。例えば、25の0.4%ホルムアルデヒドを使用すると、25の0.2%ホルムアルデヒドよりも速くELISA値が下がることになる。同様に、0.4%ホルムアルデヒド、25を用いる条件は、4の0.4%ホルムアルデヒドにおけるものよりも速くELI

S A 値が下がることになる。評価ツールとして、E L I S A 応答を 7 0 % 以上に保つことが望ましかった；多くの条件が特定された。

【 0 0 4 8 】

免疫原性の解析

ハムスター力価検定による免疫原性の測定を使用して、トキソイド化条件を評価することが可能である。トキソイド A およびトキソイド B には、4 . 8 以上の平均 L o g 1 0 I g G 力価応答という I g G 応答が選択された。これらの研究から生成されるトキソイドは、以前の条件から誘導されるトキソイドから有意に低い応答を持たないため、それらの仕様に従って評価され、さらに精査された。加えて、全ての可能性がある浸透性（時間、温度およびホルムアルデヒド濃度に関して）を評価できるというわけではなかったため、速度論的細胞障害性分析（3 x 安全域）ならびに本明細書に記載の生理化学的特徴に基づいて、トキソイドが選択された。トキソイドは、ハムスター力価検定のための二価物質（非凍結乾燥）として処方され、I g G 応答について血清を分析した。全てのトキソイド化条件は、力価仕様を通過したばかりでなく（すなわち、平均 I g G 価応答 4 . 8 L o g 1 0 ）以前（実施例 1）の物質と統計学的に等しい力価応答を有していた（有意差は認められなかった）。加えて、インビトロ負荷アッセイを使用して全ての血清をテストしたところ、中和抗体活性を有していた。重要な品質特性として、これらのトキソイド化条件はいずれも許容できたことがデータから示唆される。

10

【 0 0 4 9 】

製剤（「D P」）の復帰分析

評価段階にあるトキソイド化条件を使用して調製したトキソイド A およびトキソイド B を使用して、製剤（トキソイド A およびトキソイド B を含む組成物）を調合した。調合物は、0 %、0 . 0 0 4 %、および場合によって、0 0 8 %（w / v）の残存ホルムアルデヒドのいずれかを含んでいた。トキソイド A 組成物またはトキソイド B 組成物から全て（または本質的に全て）のホルムアルデヒドを除去し、次いで除去された組成物に指示量のホルムアルデヒドを添加することによって、調合物を調製した。製剤を、3 7 で実施される復帰分析にかけた。製剤復帰分析のデータを表 3 に示す。細胞毒性が陰性であった製剤は、（ - ）と記述されている。

20

【 0 0 5 0 】

多数の製剤調合物が復帰分析を通過した（すなわち、3 7 で貯蔵後、検出可能な細胞毒性がなかった）。2 製剤（0 . 0 0 4 %ホルムアルデヒドまたは0 . 0 0 8 %ホルムアルデヒド（「残存ホルムアルデヒド」）を含む）は、3 7 で貯蔵後、検出可能な細胞毒性がなかった：（i）1 3 日間、0 . 2 %ホルムアルデヒド、1 5 でのインキュベーションにより不活化されたトキソイド A、1 3 日間、0 . 8 %ホルムアルデヒド、1 5 でのインキュベーションにより不活化されたトキソイド B を含む製剤（表 3、テスト 1 3 および 1 4 のパラメータ）；および（ii）6 日間、0 . 2 %ホルムアルデヒド、2 5 でのインキュベーションにより不活化されたトキソイド A、1 3 日間、0 . 4 %ホルムアルデヒド、2 5 で不活化されたトキソイド B を含む製剤（表 3、テスト 2 2 および 2 3 のパラメータ）。例えば、1 3 日間、0 . 4 %ホルムアルデヒド、4 でのインキュベーションによって不活化されたトキソイド A および 2 1 日間、0 . 8 %、4 で不活化されたトキソイド B を含む製剤ならびに 1 3 日間、0 . 4 %ホルムアルデヒド、4 で不活化されたトキソイド A および 2 1 日間、0 . 8 %ホルムアルデヒドおよび 4 で不活化されたトキソイド B を含む製剤を含む、0 . 0 0 8 %ホルムアルデヒドを含む他の幾つかの製剤もまた、3 7 で貯蔵後、検出可能な細胞毒性がなかった。この分析から特定された最適トキソイド化条件は次の通りであった：毒素 A のトキソイド化：1 0 0 m M N a P O ₄ p H 7 中、0 . 5 m g / m l 毒素 A、0 . 2 1 %ホルムアルデヒド、2 5 、6 日間；および毒素 B のトキソイド化：1 0 0 m M N a P O ₄ p H 7 中、0 . 5 m g / m l 毒素 B、0 . 4 2 %ホルムアルデヒド、2 5 、1 3 日間（表 3、テスト 2 2 のパラメータ）。これらの条件はまた、他の生理化学的アッセイで測定するとき、所望のプロフィールを有していた。A E X は、各トキソイドで、同質のピーク母集団を示した。S E C M A L S

30

40

50

は最小限の多量体化を示し、T N B S は所与の時点で最大アミン修飾を達成する各反応を示した。加えて、E L I S A (A 2 8 0) 応答は維持された。

【 0 0 5 1 】

【 表 3 - 1 】

表 3
復帰分析 (37°C)

テスト	Txd A	Txd B	37°C	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
			試料						
1	6d, 0.4%, 4°C	21d, 0.8%, 4°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	13d, 0.4%, 4°C	21d, 0.8%, 4°C	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
4			DP+0.004% Form.	+	+	-	-	-	-
5			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
6	6d, 0.2%, 15°C	13d, 0.8%, 15°C	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
7			DP+0.004% Form.	+	+	-	-	-	-
8	6d, 0.2%, 15°C	13d, 0.4%, 15°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	6d, 0.2%, 15°C	18d, 0.4%, 15°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	13d,	13d,	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+

10

20

30

【 0 0 5 2 】

【表 3 - 2】

13	0.2%, 15°C	0.8%, 15°C	DP+0.004% Form.	-	-	-	-	-	-
14			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
15	13d, 0.2%, 15°C	13d, 0.4%, 15°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	13d, 0.2%, 15°C	18d, 0.4%, 15°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	6d, 0.2%, 25°C	6d, 0.4%, 25°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20			DP+0.004% Form.	-	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21	6d, 0.2%, 25°C	13d, 0.4%, 25°C	DP+0% Form.	-	+	+	+	+	+
22			DP+0.004% Form.	-	-	-	-	-	-
23			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
2 3週DP									
24	6d, 0.4%, 4°C	21d, 0.8%, 4°C	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
26	13d, 0.4%, 4°C	21d, 0.8%, 4°C	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
27			DP+0.004% Form.	+	+	+	+	-	-
28			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-

DP=製剤;Form.=ホルムアルデヒド;+:細胞毒性;- 細胞毒性検出されず;N.D. 測定せず

【 0 0 5 3 】

表 1 および表 3 は、毒素 A および毒素 B からトキシイドを調製するためにはパラメータ 2 2 が最適であることを示す。これらの条件は以下の通りである：

トキシイド A の調製：1 0 0 m M NaPO_4 、p H 7 中 0 . 5 m g / m l 毒素 A、0 . 2 1 %ホルムアルデヒド、2 5 、 6 日間；および、

トキシイド B の調製：1 0 0 m M NaPO_4 、p H 7 中 0 . 5 m g / m l 毒素 B、0 . 4 2 %ホルムアルデヒド、2 5 、 1 3 日間。

【 0 0 5 4 】

これらの手順は、6 日（トキシイド A）または 1 3 日（トキシイド B）インキュベーションの前に、1 0 分混合ステップに続いて 0 . 2 μm 濾過も含む。3 7 °C での逆戻りをテストする前に、トキシイド A およびトキシイド B を 2 0 m M クエン酸塩、p H 7 . 5、0 . 0 0 4 %ホルムアルデヒド中に透析濾過した。この手順を図 2 に図示する。クエン酸塩緩衝液中 0 . 0 0 8 %ホルムアルデヒドも、一般に 3 7 °C で良好な安定性を提供する。

【 0 0 5 5 】

このデータは、トキシイド A では、より長いインキュベーション時間は結果的により低い E L I S A 値になることを示す意外な免疫学的データ（ハムスターにおける I g G 応答）によってさらに検証され、ホルムアルデヒド誘導性毒素修飾の増加が示唆される（E L I S A / A 2 8 0 6 日目 = 0 . 9 4 ; 1 2 日目 = 0 . 6 4）。対照的に、トキシイド B では、より長いインキュベーション時間はより高い E L I S A 値をもたらした（E L I S A

A / A 2 8 0 1 3 日目 = 0 . 5 3 ; 2 0 日目 = 0 . 7 3) 。 望ましい E L I S A / A 2 8 0 値は、1 . 0 前後である。1 2 日インキュベーション期間は毒素 A をトキソイド化するために適当かかもしれず、2 0 日インキュベーション期間は毒素 B のトキソイド化に適当かもしれないと、当業者は理解すべきである。しかし、上述の通り、このデータを考慮しても、1 3 日インキュベーション期間は、毒素 B をトキソイド化するのに最適であると考えられた。

【 0 0 5 6 】

スケール解析

トキソイドは、特定された最適トキソイド化条件を使用して、より大規模で製造された (発売規模 (2 0 0 L 発酵) の 1 / 1 0) ; すなわち、下記の条件を使用して毒素 A および毒素 B を不活化した : A のトキソイド化 : 1 0 0 m M N a P O ₄ p H 7 中、0 . 5 m g / m L 毒素 A 、 0 . 2 1 % (w / v) ホルムアルデヒド、2 5 、 6 日間 ; および、B のトキソイド化 : 1 0 0 m M N a P O ₄ p H 7 中、0 . 5 m g / m L 毒素 B 、 0 . 4 2 % (w / v) ホルムアルデヒド、2 5 、 1 3 日間。反応中の様々な期間に採取したトキソイド試料を使用して、トキソイド化反応の速度論を評価した。小規模で製造されたトキソイドと比較して、トキソイドは同一の速度論的細胞毒性プロファイルを有しており、反応の 2 日目に細胞毒性の減損が確認された。加えて、トキソイドは、小規模で製造されたトキソイドと類似した A E X プロファイルおよび類似したアミン修飾を有していた (T N B S アッセイで測定したとき) 。 1 / 1 0 規模のトキソイド化反応から生成されたトキソイドの免疫原性もハムスター力価アッセイで評価した。小規模で製造されたトキソイドと同様、トキソイドは 4 . 8 L o g 以上の平均 I g G 力価応答を与え、実施例 1 に記載のプロセスに従って調製されたトキソイドと統計学的に同等の力価応答を提供した。1 / 1 0 規模でトキソイドから誘導された製剤に対して復帰分析を実施し、小規模で同一トキソイド化条件から誘導された製剤と比較した。1 / 1 0 規模でトキソイドから誘導された製剤は、小規模で誘導されたものと同じ逆戻り特性を有し、0 . 0 0 4 % ホルムアルデヒドでも復帰分析を通過した。より大規模で (例えば、1 0 0 0 L および 2 0 0 0 L 発酵培養を使用して) 、製造されたトキソイドで、類似した結果が得られた。これらの研究データは、トキソイド化方法が拡大縮小可能であることを示す。大規模で製造されたトキソイドは、小規模で製造されたものと同じ速度論的細胞毒性プロファイル、ハムスター力価および逆戻り特性を有していた。再現性に関して、毒素 A および毒素 B のトキソイド化プロセスは、6 回以上再現され、解析は、類似したロット間特性を示した。

【 0 0 5 7 】

免疫付与試験

精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド A および精製 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) トキソイド B を、実質的に上述の方法 (例えば、表 3 におけるパラメータ 2 2) に従って調製し、ワクチン組成物として処方した。トキソイド A およびトキソイド B を、重量で 3 : 2 の比率で混ぜ合わせ、スクロース (4 . 0 % ~ 6 . 0 % w / v) およびホルムアルデヒド (0 . 0 1 2 % ~ 0 . 0 2 0 % w / v) を含むクエン酸塩緩衝液を用いて処方し、凍結乾燥した。各組成物を下記の希釈剤で再構成し、ワクチンとして使用する前に水酸化アルミニウムをアジュバント添加した。シリアゴールデンハムスターが、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) ワクチン開発のための強力なモデルとなる。(例えばワクチン接種なしでは) ハムスターは、クリンダマイシン抗生物質の単一腹腔内 (I P) 用量で前処置した後、および毒素原性 C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 生物の胃内 (I G) 接種を受けた後に、激症下痢および出血性盲腸炎を迅速に発現させ、2 ~ 4 日以内に死亡する。ワクチンを、希釈剤 (0 . 5 7 % 塩化ナトリウムおよび 8 0 0 μ g / m L アルミニウムを含む) で再構成した。再構成したワクチンは、1 0 0 μ g / 用量のトキソイド、0 . 0 0 8 % ホルムアルデヒドおよび 4 0 0 μ g / 用量のアルミニウムを含有していた。ハムスター (9 匹のハムスター / 群) に、異なる用量の C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) ワクチン (ヒト用量 (1 0 0 μ g / 用量) (H D) の 4 つの希釈物) での (0 日目、1 4 日目、および 2 7 日目におけ

る) 3回の筋肉内免疫によりワクチン接種したか、またはプラセボ (A l O H) を注射した。41日目に、ハムスターを、10mg/kgの2-リン酸クリンダマイシンという化学形態の抗生物質で、I P 経路により前処置した。41日目に、ハムスターを、10mg/kgの2-リン酸クリンダマイシンという化学形態の抗生物質で、I P 経路により前処置した。42日目に、抗生物質を用いた前処置の28時間後に、致死量の、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) A T C C 4 3 2 5 5 菌株由来の孢子調製物をI G 経路によりハムスターに負荷した。保護抗力を、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 感染症と関係する症状の出現の動態および死亡率を測定することにより評価した。結果は、当該ワクチンがC . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 毒素原性細菌での致死性の攻撃から用量依存的な様式でハムスターを保護することを証明するものであり、H D / 20 (100 μ g/mLのA l O Hの存在下における5 μ gのトキシイドA + B) という用量でのワクチン接種により、100%保護が誘導された (図3)。死および疾患 (体重減少および下痢) から保護された。本研究の結果は、いくつかのインビボ研究を代表するものである。したがって、開示される方法により調製されたトキシイドは、C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) 疾患に対する防御免疫を提供する。

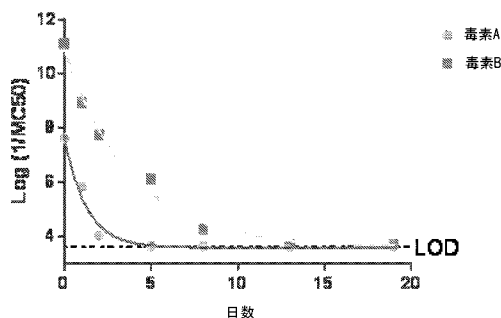
10

20

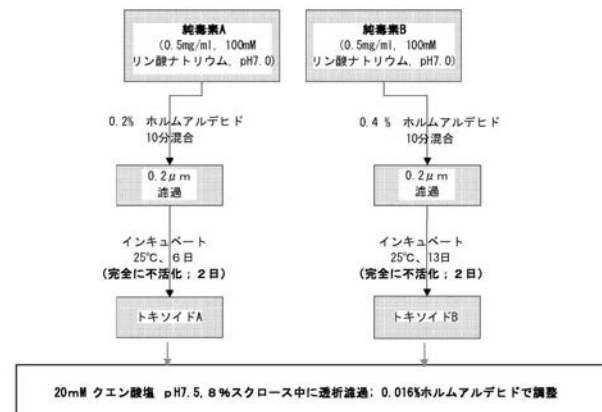
【0058】

好ましい実施形態に関して特定の実施形態を記述してきたが、変更および修正が当業者に思い浮かぶであろうことが理解される。したがって、添付の特許請求の範囲は、以下の特許請求の範囲の範囲内に入る全てのそのような等価の変更を対象として含むことが意図されている。

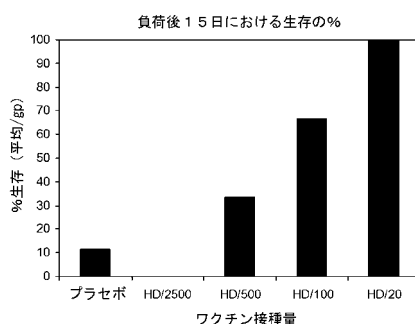
【図1】



【図2】



【図3】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/029035**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 31-36(completely); 9, 10, 14-18(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/029035

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/08 A61K47/00
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, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/20304 A1 (ORAVAX INC [US]) 29 April 1999 (1999-04-29) page 18 -----	1-4,9, 10, 14-18, 31-36
X	WO 2005/058353 A1 (ACAMBIS INC [US]; THOMAS WILLIAM D JR [US]; GIANNASCA PAUL J [US]; ZHA) 30 June 2005 (2005-06-30) page 14 - page 18 ----- -/--	1-4,9, 10, 14-18, 31-36

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 2014

Date of mailing of the international search report

08/10/2014

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

Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/029035

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	N. G. ANOSOVA ET AL: "Systemic antibody responses induced by a two-component Clostridium difficile toxoid vaccine protect against C. difficile-associated disease in hamsters", JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. Pt 9, 21 March 2013 (2013-03-21), pages 1394-1404, XP055122429, ISSN: 0022-2615, DOI: 10.1099/jmm.0.056796-0 the whole document	1-4,9, 10, 14-18, 31-36
A	----- LORNA E. LANCASTER ET AL: "An assessment of thermal stability of Clostridium difficile toxoid formulations", HUMAN VACCINES, vol. 7, no. 2, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 202-210, XP055122446, ISSN: 1554-8600, DOI: 10.4161/hv.7.2.13986 the whole document	1-4,9, 10, 14-18, 31-36
A	----- KOTLOFF K ET AL: "Safety and immunogenicity of increasing doses of a clostridium difficile toxoid administered to healthy adults", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 69, no. 2, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 988-995, XP002986519, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.69.2.988-995.2001 the whole document	1-4,9, 10, 14-18, 31-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/029035

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9920304	A1	29-04-1999	AU 754270 B2 07-11-2002
			AU 1108299 A 10-05-1999
			CA 2307331 A1 29-04-1999
			DE 69829400 D1 21-04-2005
			DE 69829400 T2 13-04-2006
			EP 1024826 A1 09-08-2000
			EP 2305293 A2 06-04-2011
			EP 2305303 A2 06-04-2011
			US 6214341 B1 10-04-2001
			US 2001051153 A1 13-12-2001
			WO 9920304 A1 29-04-1999

WO 2005058353	A1	30-06-2005	AU 2004299105 A1 30-06-2005
			AU 2011201804 A1 12-05-2011
			CA 2550108 A1 30-06-2005
			EP 1708743 A1 11-10-2006
			EP 2394658 A2 14-12-2011
			JP 4904163 B2 28-03-2012
			JP 2007514749 A 07-06-2007
			JP 2012031182 A 16-02-2012
			US 2004126383 A1 01-07-2004
			US 2006029608 A1 09-02-2006
			US 2007231336 A1 04-10-2007
			US 2013177592 A1 11-07-2013
			WO 2005058353 A1 30-06-2005

International Application No. PCT/ US2014/ 029035

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 31-36(completely); 9, 10, 14-18(partially)

Method for inactivating C. difficile toxins A or B by incubating 0.15%-0.5% formaldehyde (w/v) at about 17-32 °C for about 21 days

2. claims: 5-8, 11-13, 19-30(completely); 9, 10, 14-18(partially)

Method for preparing an immunogenic composition comprising toxoid A and toxoid B of C. diffiicle by adding a composition comprising a residual amount of formaldehyde

フロントページの続き

(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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

F ターム(参考) 4C085 AA05 BA12 CC07 CC24 DD03 DD13 DD84 EE07
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA83 DA86 EA31 FA50 FA65
FA73