

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6944946号
(P6944946)

(45) 発行日 令和3年10月6日 (2021. 10. 6)

(24) 登録日 令和3年9月15日 (2021. 9. 15)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 39/102 (2006. 01) A 6 1 K 39/102
A 6 1 K 39/295 (2006. 01) A 6 1 K 39/295
A 6 1 K 47/64 (2017. 01) A 6 1 K 47/64
A 6 1 P 37/04 (2006. 01) A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/04 (2006. 01) A 6 1 P 31/04

請求項の数 14 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2018-546269 (P2018-546269)	(73) 特許権者	318010328
(86) (22) 出願日	平成29年10月11日 (2017. 10. 11)		K Mバイオロジクス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/036781		熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02018/074296	(74) 代理人	100145403
(87) 国際公開日	平成30年4月26日 (2018. 4. 26)		弁理士 山尾 憲人
審査請求日	令和2年5月20日 (2020. 5. 20)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	特願2016-206033 (P2016-206033)		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成28年10月20日 (2016. 10. 20)	(74) 代理人	100156111
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		弁理士 山中 伸一郎
		(72) 発明者	森山 真
			熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号 K
			Mバイオロジクス株式会社内
		(72) 発明者	深田 勝彦
			熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 K
			Mバイオロジクス株式会社菊池研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低分子化PRPを用いたH i bコンジュゲートワクチンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリリボシルリビトールリン酸 (PRP) とキャリアたん白質とを結合反応によりPRPコンジュゲートを調製する方法において、ネイティブPRPよりも低分子化されたPRPを用いることにより、調製後のPRPコンジュゲートからPRPの遊離が抑制されることを特徴とする方法であって、PRPコンジュゲートの調製後、PRPコンジュゲートがpH5.4～6.3の溶液で保存することを含む、方法。

【請求項 2】

pH5.4～6.3の溶液で37℃、4週間の苛酷試験における遊離PRP含量が50%未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

PRPの低分子化の方法が物理的破碎である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

PRPの低分子化の方法が酸又はアルカリによる加水分解である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

低分子化したPRPの分子量が80～150kDaである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

PRPコンジュゲートを調製する結合反応において、PRPとキャリアたん白質が重量比 2 :

1 から 4 : 1 で反応に供される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

PRP とキャリアたん白質が重量比 4 : 1 で反応に供される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

PRP コンジュゲートを調製する結合反応の前に、1-シアノ-4-（ジメチルアミノ）ピリジンテトラフルオロボレート（CDAP）を用いて、低分子化したPRPを活性化させる工程を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

キャリアたん白質が破傷風トキソイドである、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

破傷風トキソイドの純度が2,500～3,500LF/mgPNである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

破傷風トキソイドの純度が2,900～3,300LF/mgPNである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法を含む、ヘモフィルス・インフルエンザ b 型菌（Hib）コンジュゲートワクチンの製造方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の製造方法で製造したHibコンジュゲートワクチンの、混合ワクチンの製造における使用。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の製造方法で製造したHibコンジュゲートワクチンの、沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチンとの5種混合ワクチンの製造における使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリリボシルリビトールリン酸（PRP）とキャリアたん白質とを結合反応によりPRPコンジュゲートを調製する方法、並びにヘモフィルス・インフルエンザ菌 b 型（Hib）コンジュゲートワクチンの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘモフィルス・インフルエンザ菌は通性嫌気性グラム陰性桿菌であり、フィラメント状や球菌状の形態を呈する「多形性」という性質をもち、芽胞や鞭毛をもたない。莢膜の有無によって無莢膜株と有莢膜株に分類され、有莢膜株である b 型株（Hib）の病原性が特に高いことで知られる。Hib感染は乳幼児における髄膜炎の主要な要因であり、上気道に定着したHib菌が血中に侵入し、菌血症から全身に広がり、髄膜炎、咽頭蓋炎、関節炎などの全身感染症を惹起する。

【0003】

Hib感染の防御にはHibの莢膜多糖体であるPRPに対する抗体が有効であることが知られているが、PRP成分のみに基づくHibワクチンはT細胞非依存性のため、免疫系の未熟な生後18ヶ月未満の乳幼児に対しては効果不十分である。そこで、PRPにキャリアたん白質をコンジュゲート（結合）させてT細胞依存性にしたコンジュゲートワクチンが開発され、乳幼児に対して使用されている。

【0004】

PRPなどの多糖類をキャリアたん白質と結合したコンジュゲートワクチンは公知である。特許文献1は、Hibと糖たん白質コンジュゲートの製法及び混合ワクチンとしての使用について開示しており、特許文献2はオリゴ糖コンジュゲートワクチンの改良された製造方法について開示している。

【0005】

PRPの生産方法も公知である。特許文献3は、Hib株を培地で培養後、上清を精製し、PRPを抽出する方法を開示している。

【0006】

破傷風トキソイドは、WHO規格により1,000Lf/mgPNを超える純度が要求されている。世界各国の製造業者34社中31社はこの基準を満たしており、そのうち15社は1,500Lf/mgPNを超える純度を達成しているとの報告がある（非特許文献1）。また欧州薬局方（EP：European Pharmacopoeia）のHibコンジュゲートワクチンの規格では、>1,500Lf/mgPNとなっている。破傷風トキソイドの精製方法としては、硫酸沈殿やトリクロロ酢酸沈殿、カラムクロマトグラフィー（ゲルろ過クロマト、アフィニティークロマト）、塩析、透析などが用いられている。

10

【0007】

多糖類とキャリアたん白質の結合比に関する検討は、特許文献4にて報告されている。特許文献4によれば、多糖類のたん白質に対する比が1：0.3ないし1：2であることを特徴とする複合ワクチンについて開示されている。

【0008】

Hibコンジュゲートワクチンの免疫原性を評価する方法としては、ラットを用いた免疫原性試験が知られており、抗体価についてはELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay；酵素免疫測定法）等にて評価される（非特許文献2～4）。他には、マウスやモルモット（非特許文献5）、サル（非特許文献6）を用いた評価が知られている。

20

【0009】

PRPコンジュゲートからPRPが遊離した遊離PRPと、PRPに対する抗体価については、逆相関することが知られており、遊離PRPが上昇しにくいワクチンは安定性、有効性の観点から重要であることが知られている（非特許文献7）

【0010】

長さの異なるPRPを用いて、還元アミノ化法によりHibコンジュゲートを調製し、免疫原性評価を行った結果については、非特許文献8に報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開昭62-30726

30

【特許文献2】特開平6-340550

【特許文献3】特表2015-522272

【特許文献4】特表平11-507026

【特許文献5】PCT公開第93/15760号

【特許文献6】米国特許第4673574号

【特許文献7】欧州公開第161188号

【特許文献8】欧州公開第208375号

【特許文献9】欧州公開第477508号

【特許文献10】米国特許第4220717号

【特許文献11】米国特許第4459286号

40

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Vaccine 14 (4) (1996) 313-320

【非特許文献2】The Journal of Infectious Diseases, 190, 1177-1182, 2004

【非特許文献3】The Journal of Infectious Diseases, 191, 58-64, 2005

【非特許文献4】Vaccine 24 (2006) 3505-3512

【非特許文献5】Vaccine 16 (1998) 1842-1849

【非特許文献6】Vaccine 19 (2001) 902-907

【非特許文献7】Vaccine 25 (2007) 194-200

【非特許文献8】Vaccine 33 (2015) 2646-2654

50

【非特許文献 9】 Infection and Immunity, 40 (1) 1983, 245-256
 【非特許文献 10】 Biologicals 35 (2007) 235-245
 【非特許文献 11】 Vaccine 32 (2014) 5650-5656
 【非特許文献 12】 Vaccine 12 (8) (1994) 700-706
 【非特許文献 13】 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (6) (2000)
) 1087-1091

【非特許文献 14】 Journal of Microbiology and Biotechnology (2003), 13(3), 469-472

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0013】

PRPコンジュゲートを抗原としたHibコンジュゲートワクチンは、乳幼児に対する免疫原性も高く有効であるが、ワクチン保存中にキャリアたん白質からPRPが遊離することによる保存安定性の低下が課題となっている。より安定なHibコンジュゲートワクチンの開発が望まれているものの、遊離PRP含量の上昇を抑える有効な方法は報告されていない。

【0014】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、保存安定性に優れるPRPコンジュゲートの調製方法とHibコンジュゲートワクチンの製造方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

20

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ネイティブPRPよりも適度に低分子化したPRPを用いることにより、遊離PRP含量の上昇が抑制された安定なPRPコンジュゲートの調製方法を見出した。さらに本発明者らは、PRPとキャリアたん白質を反応に供する際の重量比、キャリアたん白質（特に破傷風トキソイド）の純度、PRPコンジュゲート調製後の保存溶液のpHについて精力的に検討することにより、より安定なHibコンジュゲートワクチンの製造方法を見出した。

【0016】

したがって、本発明は以下を含む。

[1] ポリリボシルリビトールリン酸（PRP）とキャリアたん白質とを結合反応によりPRPコンジュゲートを調製する方法において、ネイティブPRPよりも低分子化されたPRPを用いることにより、調製後のPRPコンジュゲートからPRPの遊離が抑制されることを特徴とする調製方法。

30

[2] PRPコンジュゲートの調製後、pH5.4～6.3の溶液で保存することを含む、[1]に記載の方法。

[3] pH5.4～6.3の溶液で37℃、4週間の苛酷試験における遊離PRP含量が50%未満である、[2]に記載の方法。

[4] PRPの低分子化の方法が物理的破碎である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5] PRPの低分子化の方法が酸又はアルカリによる加水分解である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

40

[6] 低分子化したPRPの分子量が80～150kDaである、[1]～[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7] PRPコンジュゲートを調製する結合反応において、PRPとキャリアたん白質が重量比2：1から4：1で反応に供される、[1]～[6]のいずれか一項に記載の方法。

[8] PRPとキャリアたん白質が重量比4：1で反応に供される、[7]に記載の方法。

[9] PRPコンジュゲートを調製する結合反応の前に、1-シアノー-4-（ジメチルアミノ）ピリジンテトラフルオロボレート（CDAP）を用いて、低分子化したPRPを活性化させる工程を含む、[1]～[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10] キャリアたん白質が破傷風トキソイドである、[1]～[9]のいずれか一項に記載の方法。

50

[11]破傷風トキソイドの純度が2,500~3,500LF/mgPNである、[10]に記載の方法。
[12]破傷風トキソイドの純度が2,900~3,300LF/mgPNである、[11]に記載の方法。
[13][1]~[11]のいずれか一項に記載の方法を含む、ヘモフィルス・インフルエンザ菌b型菌(Hib)コンジュゲートワクチンの製造方法。
[14][13]に記載の製造方法で製造したHibコンジュゲートワクチンの、混合ワクチンとしての使用。
[15][13]に記載の製造方法で製造したHibコンジュゲートワクチンの、沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチンとの5種混合ワクチンとしての使用。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、調製後のPRPコンジュゲートを長期間安定に保存することが可能となる。さらには、Hibコンジュゲートワクチンを十分な免疫原性を保ったまま、安定に保存することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

図1~図7について以下に説明する。

【図1】本発明の一実施形態により調製したPRPコンジュゲートを、37℃で4週間保存した際の遊離PRP含量(%)の上昇とPRP分子量の関係を示したグラフである。

【図2】本発明の一実施形態によりPRP分子量を変えて調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲートワクチンを、ラットに1/25SHD(Single Human Dose)と1/50SHDで免疫した際の免疫原性を示したグラフである。

【図3】本発明の一実施形態により結合反応に供するPRPとキャリアたん白質の重量比を変えて調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲートワクチンを、ラットに1/25SHDと1/50SHDで免疫した際の免疫原性を示したグラフである。

【図4】本発明の一実施形態により結合反応に供するPRPとキャリアたん白質の重量比を変えて調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲート混合ワクチンを、ラットに1/100SHDと1/500SHDで免疫した際の免疫原性を示したグラフである。

【図5】本発明の一実施形態により調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲート混合ワクチンを、投与量を変えてラットに3回免疫した際の免疫原性を示したグラフである。

【図6】本発明の一実施形態により結合反応に供するPRPとキャリアたん白質の重量比を変えて調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲート混合ワクチンを、37℃で4週間保存した際の遊離PRP含量(%)の上昇と保存溶液pHの関係を示したグラフである。

【図7】本発明の一実施形態により結合反応に供するPRPとキャリアたん白質の重量比を変えて調製したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲート混合ワクチンを、10℃で45ヶ月間保存した際の遊離PRP含量(%)の上昇と保存溶液pHの関係を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0020】

本発明の実施形態に係るPRPコンジュゲートの調製方法は、PRPとキャリアたん白質の結合反応を行うにあたって、ネイティブPRPよりも低分子化されたPRPを用いることにより、調製後のPRPコンジュゲートからPRPの遊離が抑制されることを特徴とする。本調製方法により得たPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲートワクチンについても同様に保存安定性に優れており、かつ十分な免疫原性を保持している。

【0021】

PRPコンジュゲートは公知の結合技術によって調製することができる。例えばPRPをチオ

10

20

30

40

50

エーテル結合を介して結合することができる。この結合方法では、PRPを1-シアノ-4-(ジメチルアミノ)ピリジントラフルオロボレート(CDAP)で活性化することにより、シアン酸エステルを形成する。このようにして活性化されたPRPは、直接又はスパーサー基を介してキャリアたん白質のアミノ基と結合できる。好ましくは、シアン酸エステルをヘキサンジアミンと結合し、チオエーテル結合の形成を伴うヘテロライゲーション化学反応によりアミノ誘導体化多糖とキャリアたん白質をコンジュゲートさせる(特許文献5)。

【0022】

上記の他、還元アミノ化方法によりコンジュゲートを調製することもできる(特許文献6~9)。さらに別の方法として、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)で誘導体化した臭化シアン(CNBr)活性化多糖を、カルボジイミド縮合でキャリアたん白質に結合する方法が挙げられる(非特許文献9)。

10

【0023】

キャリアたん白質としては、破傷風トキソイドや百日咳トキソイド、ジフテリアトキソイド、ジフテリアトキソイドの遺伝子変異体であるCRM197、非莢膜型ヘモフィルス・インフルエンザD抗原、髄膜炎グループBの外膜たん白質(OMP)などが挙げられる。PRPコンジュゲートに典型的なキャリアたん白質は、破傷風トキソイドである。

【0024】

破傷風トキソイドをキャリアたん白質として用いる場合、その純度は、WHO規格である1,000Lf/mgPN以上で使用する。本発明の方法では、破傷風トキソイドの純度はより高い方が良く、2,500~3,500Lf/mgPNであることが好ましい。より好ましくは2,900~3,300Lf/mgPNである。

20

【0025】

PRPを低分子化する方法としては、高圧乳化機による物理的破碎が挙げられる。この場合、10,000~30,000psiの圧力にて、10分~2時間をかけて破碎を行う。好ましくは20,000~30,000psiの圧力で10分~2時間、さらに好ましくは、25,000~30,000psiの圧力で10分~2時間で破碎を行う。

【0026】

PRPを低分子化する方法としては、酸、酸化剤やアルカリを用いた加水分解を用いることもできる。酸、酸化剤としては塩酸、硫酸、過ヨウ素酸ナトリウムなどが挙げられ、アルカリとしては水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどが挙げられる。

30

【0027】

低分子化していないネイティブPRPの分子量は250~400kDa程度であるため、低分子化されたPRPの分子量は250kDa未満となる。本発明においては、80~150kDaであることが好ましく、より好ましくは80~100kDaである。

【0028】

分子量の測定は非特許文献10や非特許文献11に記載されているHPLC(High Performance Liquid Chromatography; 高速液体クロマトグラフィー)装置を用いた方法にて行う。この場合、校正曲線はプルラン等を用いて作成し、ピークトップの分子量をプルラン等の換算値として求めることができる。あるいはMALS(Multi Angle Light Scattering; 多角度光散乱検出器)を用いた方法にて絶対分子量を求めることもできる。その他、分子量の測定が可能な方法であればどのような方法を用いても良い。

40

【0029】

低分子化したPRPを用いることで、PRPコンジュゲートの保存安定性が向上する作用メカニズムについては、(1)低分子化PRPコンジュゲートの場合、キャリアたん白質と結合しているPRPの長さが短いため、加水分解によりPRPが切断されても、遊離するPRPの総量が少なくなること、(2)PRPが低分子化していることで、コンジュゲートの間に存在しているPRPは切断されにくいこと、の2点が推察される。ただし、立体構造上の制約もあり、単純に低分子化しすぎても安定性は改善せず、短ければ良いというわけではない。

【0030】

50

本発明における一実施形態において、キャリアたん白質に対する過剰な抗体応答を回避するため、またキャリアたん白質の使用量を減らしてキャリアたん白質あたりのワクチン生産性を高めるために、PRPとキャリアたん白質は重量比2：1から4：1の範囲で結合反応に供される。より好ましい重量比は4：1である。

【0031】

PRPコンジュゲート保存溶液のpHは5.0～6.6が好ましく、より好ましくはpH5.4～6.3である。pH調整は、塩酸や酢酸などの酸、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどのアルカリ液にて調整しても良いし、緩衝液を使用することも可能である。保存溶液は前述のpHの範囲を維持できる組成であれば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、MES緩衝溶液であっても良く、コハク酸緩衝溶液等の他の緩衝溶液であっても構わない。

10

【0032】

遊離PRP含量の測定は非特許文献12～14などに記載の方法で行うことができる。安定性を検討する際の長期保存試験の温度条件は、5±3℃もしくは凍結を避けて10℃以下にて行う。あるいは、より高温条件下で安定性を加速的に評価しても構わない。

【0033】

本発明による方法にて作製したHibコンジュゲートワクチンの免疫原性は、ラットやサルなどの動物に免疫し、抗PRP抗体価を測定することによって求める。抗体価は、ELISAなどにより測定する。あるいは、非特許文献11にあるような補体とHib菌を用いる血清殺菌抗体(SBA; Serum Bactericidal antibody)試験にて評価を行っても良い。抗体価とSBA価は一定程度相関することが非特許文献11に記載のように知られているため、ELISAによる抗体価にて評価を行っても良い。

20

【0034】

本発明による方法にて製造したHibコンジュゲートワクチンは、免疫干渉を起こしにくいため、他の抗原との混合ワクチンとしても良い。例えば、沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチンとの混合ワクチンなどが挙げられる。

【0035】

本発明による方法で製造したHibコンジュゲートワクチンはアジュバントと共に用いても良い。剤型は液状製剤であっても良く、凍結乾燥製剤であっても良い。

【0036】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定

30

【実施例1】

【0037】

低分子化PRPの作製

特許文献10や11などに記載の定法に従って、NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)を加えたBHI (Brain Heart Broth)培地にて、Hibを8～14時間、37℃で培養し、上清をエタノール沈殿で精製することによりプルラン換算量でピークトップ分子量が250～400kDaの精製PRPを得た。精製PRPを含むプロセス液を高圧乳化機(Microfluidics社製)にて10,000psi、20,000psi、30,000psiの各圧力にて15～20回処理し、PRPを物理的に破碎することにより低分子化した。得られた低分子化PRPを分子サイズ分析し、ピークトップ分子量がそれぞれ155kDa、108kDa、81kDaであることを確認した。

40

【実施例2】

【0038】

PRPコンジュゲートの調製

得られた各低分子化PRPの2～12mg/mLを、100mg/mL濃度のCDAPにてPRPに対する重量比が0.2～2.0となる条件にて反応させ、さらに0.5MのADHと2時間反応させた。その後、透析を行って未反応物を除去することで活性化PRPを得た。活性化PRPと2,900～3,300LF/mgPNの純度の破傷風トキソイド(TT)原液(化学及血清療法研究所製)を、1：1、2：1、4：1の重量比で縮合剤であるEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)と共にそれぞれ反応させた。濃度に応じて40分から4時間反応し、その後透析す

50

ることで、PRP/TT比が0.48、0.77、1.0のPRPコンジュゲートを得た。

【実施例 3】

【0039】

PRPコンジュゲートの保存安定性評価

作製したPRPコンジュゲート（リン酸緩衝溶液、pH6.8）の保存安定性を、37℃の苛酷試験にて評価した。保存開始時、2週間後及び4週間後における遊離PRP含量（%）を非特許文献13に記載のDOC処理後、非特許文献10に記載のリボース試験を用いて測定した。その結果を図1に示す。低分子化していないネイティブPRPや155kDaのPRPに比べて、より低分子化した108kDaや81kDaのPRPの方が、遊離PRP含量の上昇を抑制できることが分かった。

【実施例 4】

【0040】

PRPコンジュゲート保存溶液のpH検討

pHが6.0、6.3、6.6、7.0であるリン酸緩衝液を調製し、PRPコンジュゲート（低分子化後PRP分子量142kDa）の保存溶液のpHによる影響を37℃の苛酷条件にて評価した。保存開始時、2週間後及び4週間後における遊離PRP含量（%）を実施例3と同様の方法を用いて測定した結果、pH6～7の範囲においてpHが低いほど、遊離PRP含量の上昇を抑えられることが分かった（表1）。

【0041】

【表1】

検体	PB	pH	遊離PRP (%)				
			37℃ , 0w	37℃ , 2w	37℃ , 4w	増加量(2 w-0w)	4w-0w
Hib-TT (PRP 142kDa, 1:1)	-	7.0	5.71	30.9	34.8	25.2	29.1
		6.6	3.08	17.2	25.7	14.1	22.6
	50 mmol/ L	6.3	3.72	13.7	20.4	10.0	16.7
		6.0	2.92	11.9	17.2	9.0	14.3
	20 mmol/ L	6.6	3.77	16.3	23.8	12.5	20.0
		6.3	3.40	11.9	18.7	8.5	15.3
		6.0	3.50	10.2	15.4	6.7	11.9

【実施例 5】

【0042】

Hibコンジュゲートワクチンの免疫原性評価

1群5匹のSDラット（メス、5週齢）の背部にPRPコンジュゲート（PRP分子量：Native、155kDa、108kDa、88kDaとPRPの分子量を変えたもの、又は、PRPとキャリアたん白質の重量比を変えて実施例2で調製したもの）を抗原とするHibコンジュゲートワクチンを、0.5mL皮下接種し、4週間後に2回目の接種を行った。2回目の接種から2週後に採血を行い、自家調製したELISAにて抗体価を測定した。その結果を図2及び図3に示す。既存のHibコンジュゲートワクチン（サノフィパスツール社製「アクトヒブ（ActHIB）（商標名）」）に比べて同等以上の抗PRP抗体価が得られていることを確認した。

【実施例 6】

【0043】

PRPコンジュゲートを含む混合ワクチンの調製、及び免疫原性評価

DTP-IPV 4 種混合ワクチン（沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチン；化学及血清療法研究所製「クワトロバック（Quattrovac）（商標名）」）又は沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（化学及血清療法所製）に不活化ポリオウイルス（IPV；Salk株）を加えたものに、PRPコンジュゲートを加えることで 5 種混合ワクチンを調製した。

【0044】

1 群 5 匹のSDラット（メス、5 週齢）の背部にPRPコンジュゲート（PRP分子量：Native, 155、108、88kDaとPRP分子量を変えたもの、又はPRPとキャリアたん白質の重量比を変えて実施例 2 で調製したもの）を抗原とするHibコンジュゲートワクチンを0.5mL皮下接種し、4 週間後に 2 回目の接種を行った。2 回目の接種から 2 週後に採血を行い、自家調製したELISAにて抗体価を測定した。その結果を図 4 に示す。PRPとキャリアたん白の重量比を 4：1 で反応させたPRPコンジュゲートを用いた 5 種混合ワクチンの100分の1シングルヒューマンドーズ（1/100SHD）のみ低めの抗PRP抗体価を示したが、それ以外は既存のHibコンジュゲートワクチン（サノフィパスツール社製「アクトヒブ（ActHIB）（商標名）」）を用いた 5 種混合ワクチンと同等以上の抗PRP抗体価を示した。重量比 4：1 の反応条件は、1/500SHD条件でアクトヒブ（ActHIB）（商標名）よりも高い抗体価を示した。

【0045】

調製した 5 種混合ワクチンの免疫原性を、1 群 10 匹のラット（Wister、メス、8 週齢）の背部に 3 週間隔で 3 回皮下投与して、接種 3 週間後に採血を行い、自家調製したELISAにて抗体価を測定した。結果を図 5 に示す。5 種混合ワクチンの用量を変えて、既存のHibコンジュゲートワクチン（サノフィパスツール社製「アクトヒブ（ActHIB）（商標名）」）と混合した 5 種混合ワクチンと比較したところ、3 回接種後では、既存のHibコンジュゲートワクチンでは10 µgの値が最も高かったのに対し、本発明のHibコンジュゲートワクチンでは 2 µgの値が最も高く、より少ない用量で同等の免疫原性を得られると推察された。

【実施例 7】

【0046】

PRPコンジュゲート原液の安定性評価

Hib原液の濃度とpHを変えて37℃に1週間加温して、PRPコンジュゲート原液の安定性の評価を行った。結果を表 2 に示す。原液の保管条件としては、高濃度の方がより安定であった。高濃度条件下でもpHは6.8よりも6.0の方が安定であった。

【0047】

【表 2】

検体	緩衝液	PRP濃度 [mg/mL]	遊離PRP(%)		
			37°C0w	37°C1w	増加量 (1w-0w)
Hib A	10mM PBS(pH6.8)	0.5	10.8	21.9	11.1
	20mM PBS(pH6.0)	0.5	10.8	19.5	8.7
	10mM PBS(pH6.8)	1	10.8	19.3	8.5
	20mM PBS(pH6.0)	1	10.8	16.5	5.7
Hib B	10mM PBS(pH6.8)	0.5	6.9	17.9	11.0
	20mM PBS(pH6.0)	0.5	6.9	17.3	10.4
	10mM PBS(pH6.8)	1	6.9	15.3	8.4
	20mM PBS(pH6.0)	1	6.9	13.2	6.3

10

20

【実施例 8】

【0048】

PRPコンジュゲートを含む混合ワクチンのpHの安定性への影響評価

混合ワクチンのpHが5.0、5.4、5.7、6.0となるように緩衝液を加え、対象検体を37°Cの苛酷条件で4週間加温した後、遊離PRPを測定した。結果を表3に示す。混合ワクチンのpHは6.0、5.7、5.4の方が良く、pH5.0は不安定となる結果であった。なお、混合ワクチン中のHib以外の抗原の免疫原性への影響も確認したが、pHの影響は見られなかった。

30

【0049】

【表 3】

検体	リン酸濃度	pH	37°C, 4w 平均値(%)	4°C, 4w 平均値(%)	差(%)
DTP-IPV(Sabine)-Hib	20mM	5.0	38.0	7.46	30.5
		5.4	24.7	8	16.7
		5.7	21.0	8.3	12.70
		6.0	22.8	8.59	14.2
	50mM	5.0	30.8	7.9	22.9
		5.4	23.5	8.2	15.3
		5.7	21.8	7.7	14.1
		6.0	23.9	8.3	15.60
DTP-IPV(Salk)-Hib	20mM	6.0	27.5	18.8	8.70
		7.0	45.9	25.1	20.8

40

【0050】

混合ワクチンのpHを6.0又は6.8とし、37°C 4週間加温した場合、10°Cで45ヶ月間保存した後、遊離PRPを測定した。結果を図6、図7に示した。本発明の一実施形態により調製

50

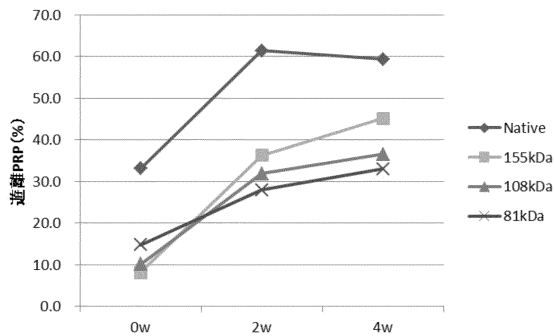
したPRPコンジュゲートを抗原とするHibコンジュゲート混合ワクチンにおいてpH6.8よりもpH6.0に合わせた方がより安定であった。37℃で2週間加温した結果は10℃で12ヶ月間保存した遊離PRPの値に近く、37℃で4週間加温した結果は10℃で45ヶ月間保存した遊離PRPの値に近かった。図6、図7より37℃で加温した場合と10℃で保存した場合のいずれでも、同様の傾向が確認された。

【産業上の利用可能性】

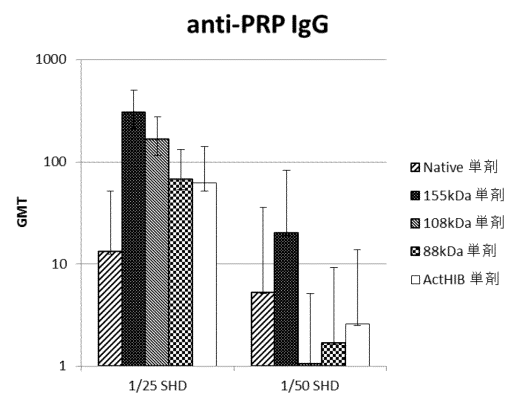
【0051】

本発明による調製方法は、Hibコンジュゲートワクチンの製造及びHibコンジュゲートワクチンを含む混合ワクチンの製造において利用可能である。

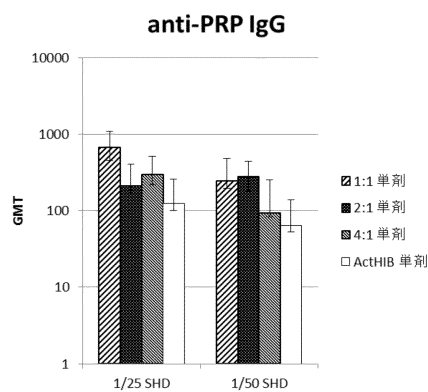
【図1】



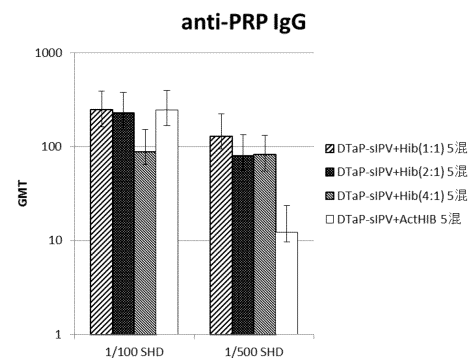
【図2】



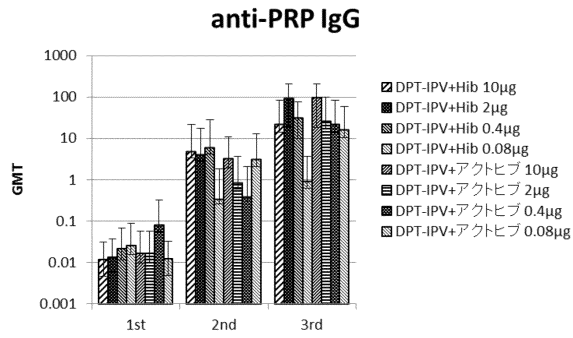
【図3】



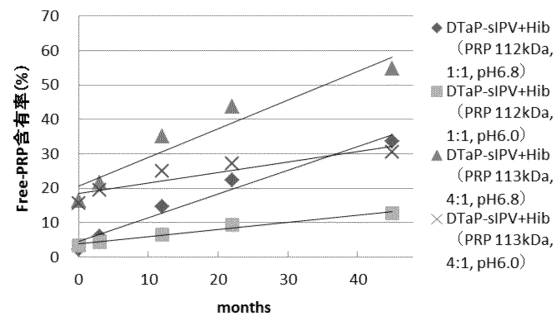
【図4】



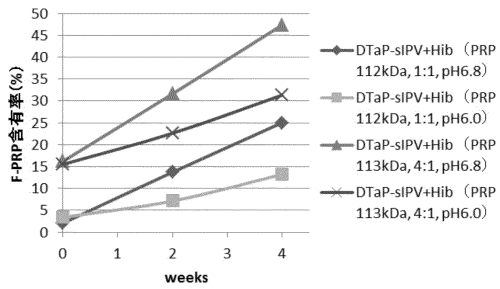
【図 5】



【図 7】



【図 6】



フロントページの続き

- (72)発明者 来海 和彦
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KMバイオロジクス株式会社菊池研究所内
- (72)発明者 三原 由揮
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KMバイオロジクス株式会社菊池研究所内
- (72)発明者 米村 宏
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KMバイオロジクス株式会社菊池研究所内
- (72)発明者 城野 洋一郎
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

審査官 新熊 忠信

- (56)参考文献 国際公開第2015/052684 (WO, A2)
特表2016-509081 (JP, A)
特表2002-539294 (JP, A)
特開2014-240395 (JP, A)
特表2007-529503 (JP, A)
特開2016-104813 (JP, A)
特開2015-166365 (JP, A)
特表平07-509481 (JP, A)
国際公開第2014/142135 (WO, A1)
特開2015-028032 (JP, A)
Carbohydrate Polymers, 2015年, Vol.116, pp.167-172

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 39/00-39/44
A61P 37/00
A61P 31/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)