

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3626996号
(P3626996)

(45) 発行日 平成17年3月9日(2005.3.9)

(24) 登録日 平成16年12月17日(2004.12.17)

(51) Int. Cl.⁷ F I
A 6 1 K 39/29 A 6 1 K 39/29
A 6 1 K 39/295 A 6 1 K 39/295
A 6 1 K 39/39 A 6 1 K 39/39

請求項の数 25 (全 17 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平6-500162 (86) (22) 出願日 平成5年5月15日(1993.5.15) (65) 公表番号 特表平7-508267 (43) 公表日 平成7年9月14日(1995.9.14) (86) 国際出願番号 PCT/EP1993/001276 (87) 国際公開番号 W01993/024148 (87) 国際公開日 平成5年12月9日(1993.12.9) 審査請求日 平成12年5月15日(2000.5.15) (31) 優先権主張番号 9211081.6 (32) 優先日 平成4年5月23日(1992.5.23) (33) 優先権主張国 英国(GB) (31) 優先権主張番号 9213308.1 (32) 優先日 平成4年6月23日(1992.6.23) (33) 優先権主張国 英国(GB)</p>	<p>(73) 特許権者 グラクソスミスクライン・バイオロジカル ス・ソシエテ・アノニム ベルギー国ペー—1330リクセンザルト 、リュ・デュ・ランスティテュート89番 (74) 代理人 弁理士 青山 稜 (74) 代理人 弁理士 田中 光雄 (72) 発明者 ベトレ, ジャン ベルギー国ペー—1330リクセンザルト 、リュ・デュ・ランスティテュート89番 、スミスクライン・ピーチャム・バイオロ ジカルス(ソシエテ・アノニム)</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎表面抗原および他の抗原からなる複合ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

B型肝炎表面抗原(HBsAg)およびn種の他の抗原を、水酸化アルミニウム(AH)およびリン酸アルミニウム(AP)のうち1種またはそれ以上のアジュバントとともに含有するワクチン組成物であって、nが2またはそれ以上であり、HBsAbを吸着させるためのアジュバントがリン酸アルミニウム(AP)であり、該他の抗原が、下記のもの：

ジフテリア、破傷風、百日ぜき、ポリオ、ヘモフィルス・インフルエンザbおよびA型肝炎

のうち2種またはそれ以上に対する免疫を提供するように選択されるワクチン組成物。

【請求項2】

さらなる抗原がA型脳膜炎およびC型脳膜炎に対して有効な抗原から選択されるものである請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項3】

少なくとも1種の他の抗原がリン酸アルミニウム(AP)に吸着している請求項1または2記載のワクチン組成物。

【請求項4】

少なくとも1種の他の抗原が水酸化アルミニウム(AH)に吸着している請求項1または2記載のワクチン組成物。

【請求項5】

nが2、3、4、5または6である請求項1ないし4のいずれか1つに記載のワクチン組

成物。

【請求項 6】

他の抗原がジフテリア (D)、破傷風 (T) および百日ぜき (P) に対する免疫性を付与する請求項 5 記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

百日ぜき成分が全細胞性百日ぜき (Pw) または無細胞性百日ぜき抗原 (Pa) である請求項 5 記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

加えて、ヘモフィルス・インフルエンザ b (Hib) に対する抗原を含んでなる請求項 6 または 7 記載のワクチン組成物。

10

【請求項 9】

加えて、不活性化ポリオ (IPV) を含んでなる請求項 6 ないし 8 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

加えて、A 型肝炎に対する抗原を含んでなる請求項 6 ないし 9 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

ワクチンの安定性が、HBsAg 成分の免疫原性を実質的に失うことなく、37 で 1 週間保持できるものである、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

ワクチンの HBsAg の免疫原性が、適当なワクチン接種計画にて 1 ヶ月間隔でワクチン投与した場合に、ヒト小児において 200mIU/ml (3 回目の接種の 1 ヶ月後) またはそれ以上の幾何平均が認められるものである、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物。

20

【請求項 13】

医薬として用いられる請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

リン酸アルミニウム (AP) に吸着した HBsAg を水酸化アルミニウム (AH) またはリン酸アルミニウム (AP) に吸着した 1 またはそれ以上の他の抗原と混合することを特徴とする、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 つに記載のワクチン組成物の製法。

30

【請求項 15】

リン酸アルミニウム (AP) 上に吸着された HBsAg ならびにリン酸アルミニウム (AP) または水酸化アルミニウム (HA) 上に吸着されたジフテリア、破傷風、百日ぜき、ポリオ、ヘモフィルス・インフルエンザ b および A 型肝炎から選択される他の n 種の抗原 (ここに n は 2 またはそれ以上) を含むワクチン組成物であって、リン酸アルミニウム (AP) が HBsAg を吸着するためのアジュバントとして用いられており、そのことにより HBsAg 成分の安定性および / または免疫原性が、HBsAg を水酸化アルミニウム (HA) 上に吸着させた対応混合ワクチンのそれよりも高められているワクチン組成物。

【請求項 16】

ワクチンの安定性が、HBsAg 成分の免疫原性を実質的に失うことなく、37 で 1 週間保持できるものである、請求項 15 記載のワクチン組成物。

40

【請求項 17】

ワクチンの HBsAg の免疫原性が、適当なワクチン接種計画にて 1 ヶ月間隔でワクチン投与した場合に、ヒト小児において 200mIU/ml (3 回目の接種の 1 ヶ月後) またはそれ以上の幾何平均が認められるものである、請求項 15 または 16 に記載のワクチン組成物。

【請求項 18】

DTP - B 型肝炎ワクチン組成物である請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項記載のワクチン組成物。

【請求項 19】

DTP - B 型肝炎 - Hib ワクチン組成物である請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項記載のワクチン組

50

成物。

【請求項 2 0】

DTP - B 型肝炎 - Hib - IPV ワクチンである請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項記載のワクチン組成物。

【請求項 2 1】

DTP - B 型肝炎 - Hib - IPV - A 型肝炎 ワクチンである請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項記載のワクチン組成物。

【請求項 2 2】

無細胞性百日ぜき (Pa) 成分がワクチン組成物中に存在し、その Pa がペルタクチンを含んでなる、請求項 1 ないし 13 または 15 ないし 21 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。 10

【請求項 2 3】

無細胞性百日ぜき (Pa) 成分がワクチン組成物中に存在し、その Pa がペルタクチンを含んでなる、請求項 14 記載の製法。

【請求項 2 4】

0.5ml 用量のワクチンが、以下の活性成分：

ジフテリアトキソイド：7.5Lf

破傷風トキソイド：3.25Lf

全細胞性百日ぜき抗原：150U

HBsAg：10 μ g 蛋白

を含んでなる請求項 7 記載のワクチン組成物。 20

【請求項 2 5】

0.5ml 用量のワクチンが、以下の活性成分：

ジフテリアトキソイド：25Lf

破傷風トキソイド：10Lf

不活性化百日ぜきトキシン：25 μ g

繊維状赤血球凝集素：25 μ g

ペルタクチン：8 μ g

を含んでなる請求項 7 記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、新規ワクチン製剤、その製法および治療におけるその使用に関する。詳細には、本発明は、B 型肝炎感染を治療するための B 型肝炎 ワクチン成分を含有する新規複合ワクチン製剤に関する。 30

B 型肝炎 (HB) ウイルス感染は広範囲にわたる問題であるが、多人数を免疫するために用いられるワクチンが、現在、市販されている (例えば、「エンゲリックス (Engerix) - B (スミスクライン・ビーチャム・ピーエルシー (SmithKline Beecham plc))。エンゲリックス - B は、遺伝子組み換え法により得られた B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) を B 型肝炎抗原成分として含有している。

しかしながら、B 型肝炎 ワクチンを他のワクチンと同時に投与することがしばしば必要あるいは望ましいとされており、このことは、複数回の注射を意味する。複数改変された抗体の注射に関連する問題としては、より複雑な投与方法および注射体積の合計量が多いことが挙げられる。 40

それゆえ、他の抗原と混合された B 型肝炎抗原からなる混合ワクチンが必要である。他の抗原とは、特に、ワクチン製剤中において、A 型肝炎 (HA)、ジフテリア (D)、破傷風 (T)、全細胞性百日ぜき (Pw)、無細胞性百日ぜき (Pa)、ヘモフィルス・インフルエンザ b (Hib) およびポリオ (P) を予防することのできる抗原である。

水酸化アルミニウム (AH) は、ワクチン製剤においてアジュバントとして広く用いられている。例えば、エンゲリックス B には水酸化アルミニウムに吸着した B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) が使用されている。本発明者らも、A 型肝炎 ワクチンおよび DT、DTPw および DTPa 混合ワクチンに AH をうまく使用した。しかしながら、AH - 吸着 HBsAg を混合製剤において他のワクチンと混合して使用する場合、HBsAg に対する免疫応答の実質的減少があり、接 50

種後、低度あるいは不十分な血清防御しか起こらない。さらに、混合ワクチンのHBsAg成分の安定性が低い。

コリアン・チェイル・シュガー・カンパニー・リミテッド (Korean Cheil Sugar Co Ltd.) により製造されている市販 1 価 (monovalent) ワクチン (ヘパシン (HEPPACINE)) 中に HBsAg を吸着したリン酸アルミニウム (AP) が使用されている。本発明者らは、AH - 吸着 HBsAg 1 価ワクチン (エンゲリックス B) と AP - 吸着 1 価ワクチンとの間に免疫特性の有意な相違がないことを見出ししている。

欧州特許出願公開第 0339667 号には、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムいずれかをアジュバントとして用いた HBsAg および AP 型肝炎抗原からなる 2 価ワクチンが開示されている。しかしながら、HBsAg からなる多価ワクチンのアジュバントとして水酸化アルミニウムを避ける必要性はないように思われる。そのうえさらに、HBsAg 以外の少なくとも 1 種の抗原が水酸化アルミニウムに吸着しており、HBsAg がリン酸アルミニウムに吸着している 2 価または多価 B 型肝炎ワクチンの開示文書または他の文書は存在しないようである。

10

実際には、HBsAg からなる安定かつ有効な多価 (multivalent) ワクチンの先行開示はないようである。

本発明は 1 の態様において、 n の値が 1 またはそれ以上である、1 種またはそれ以上のアルミニウム塩からなるアジュバントと混合された B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) および n 個の他の抗原からなり、HBsAg を吸着するのに用いられるアジュバントが水酸化アルミニウムでない混合ワクチン組成物を提供する (ただし、 n が 1 である場合には、他の抗原は A 型肝炎に対する抗原ではない)。

20

好ましくは、 n は 2、3、4、5 または 6 である。

本発明の利点は、HBsAg の免疫原性の実質的な減少が混合ワクチン製剤において起こらないことである。ワクチン製剤中において HBsAg 成分を吸着させるための AH の使用を避けることは、製品の安定性を著しく向上させることにもなる。本発明のさらなる利点は、多数回の注射に関連する上記問題が克服ないしは軽減され、高度に免疫原のある混合製剤が提供されることである。本発明組成物は、特に、小児への投与に適している。

好ましくは、HBsAg を AP に吸着させる。特に、本発明者らはヒトの臨床研究において、混合ワクチンにおいて AP - 吸着 HBsAg を 1 種またはそれ以上の AH - 吸着または AP - 吸着抗原と混合した場合、免疫原性の実質的な減少が起こらないことを見だしている。製剤中の AP - 吸着 HBsAg の安定性も、AH - 吸着 HBsAg より高い。

30

したがって、さらなる態様において、HBsAg 以外の少なくとも 1 種の抗原がリン酸アルミニウムに吸着している本発明ワクチン組成物が提供される。

さらなる好ましい態様において、HBsAg 以外の少なくとも 1 種の抗原が AH に吸着している。

さらなる態様において、本発明は、AP に吸着した B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) および以下のウイルスの 1 種またはそれ以上に対する免疫性を提供する抗原から選択される、AP または AH に吸着した抗原からなる混合ワクチンを提供する。以下のウイルスとは、ジフテリア (D)、破傷風 (T)、百日ぜき (P)、不活性化ポリオ (IPV)、ヘモフィルス・インフルエンザ b (Hib) および A 型肝炎である。

40

小児用ワクチンにおいては、例えば B、A および C 型脳膜炎に対して有効であることが知られている抗原ならびに耳炎メディアのような他の併存しうる抗原を含んでいてもよい。本明細書に用いる「2 価」なる語は、合計 2 種の抗原の混合からなるワクチンをいう。「多価」は、2 種より多い種類の抗原、例えば 3、4 または 5 もしくは 6 種の抗原からなるワクチン組成物をいう。

「リン酸アルミニウム」および「水酸化アルミニウム」なる語は、ワクチンのアジュバントとして安定なすべての形態の水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムをいう。例えば、リン酸アルミニウムは不溶性リン酸アルミニウム (非晶質、半結晶または結晶) となり、所望により (しかし他の方法によっても)、可溶性アルミニウム塩とリン酸塩とを混合することにより製造されうる。「水酸化アルミニウム」は、水酸化アルミニウムの

50

不溶性沈澱（非晶質、半結晶または結晶）であり、所望により（しかし他の方法によっても）、アルミニウム塩の溶液を中和することにより製造されうる。特別には、市販されている種々の形態の水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムゲルが適当である（例えば、デンマーク、ベドビーク（Vedbeak）2950のスーパーフォス（Superfos）社により市販されているアルヒドロゲル（Alhydrogel）（水中3%水酸化アルミニウム懸濁物）およびアジュ・フォス（Adju-fos）（セイライン中2%リン酸アルミニウム懸濁物が挙げられる）。

本発明者らにより初めて、HBsAgからなる安定かつ有効な多価ワクチン組成物を提供されうることが理解されよう。

したがって、本発明のさらなる態様において、HBsAgおよび少なくとも2つの他の抗原からなる、2種以上の疾患の予防に指向された安定かつ有効な混合ワクチン組成物が提供される。

10

アジュバントの選択に関しては、HBsAgをAPに吸着させ、HBsAg以外の少なくとも1種の抗原をAHに吸着させた場合、優れた効果が得られる。しかしながら、他の適当なアジュバントを使用することもできる。例えば、HBsAg以外の1種またはすべての抗原をAPに吸着させてもよい。

本発明による好ましい安定な混合ワクチンは、

ジフテリア - 破傷風 - 百日ぜき - B型肝炎（DTP - HB）

ジフテリア - 百日ぜき - B型肝炎（DT - HB）

DTP - IPV（不活性化ポリオワクチン） - B型肝炎

20

である。

Hib成分を含有するワクチンについては、投与直前にワクチンを処方することにより、Hib抗原を一時的に使用してもよいことが理解されよう。このようにして、本発明の範囲内の以下の混合ワクチン組成物を、例えば、製造することができる。

以下の混合ワクチンとは、

Hib - B型肝炎

DTP - Hib - B型肝炎

IPV - DTP - Hib - B型肝炎

である。

より詳細には、本発明の範囲内の特別なワクチンは、

30

ジフテリア - 破傷風 - 百日ぜき（AHまたはAPに吸着したDTP） - B型肝炎（APに吸着したHBsAg）

ジフテリア - 破傷風（APまたはAHに吸着したDT） - B型肝炎（APに吸着したHBsAg）である。

本明細書中、「安定な」なる語は、本発明ワクチンが37℃で1週間、HBsAg成分の免疫原性を何ら実質的に失わないことを意味する。

本明細書中、「有効な」なる語は、ヒト小児において、適切なワクチン接種計画において1カ月間隔でワクチン投与した場合、3回目の接種後1カ月に後にヒト小児において、混合ワクチン中のHBsAgの免疫原性が少なくとも200mIU/ml、好ましくは300mIU/mlまたはそれ以上の幾何平均の力価であることにより特徴づけられるワクチン組成物をいう。

40

さらなる態様において本発明は、HBsAgおよびワクチンが37℃で1週間、HBsAg成分の免疫原性を何ら実質的に失わないように選択された安定化アジュバントからなる多価ワクチン組成物を提供する。好ましくは、該多価ワクチン組成物を、さらに、ヒト小児において、適切なワクチン接種計画において1カ月間隔でワクチン投与した場合、3回目の接種後1カ月に後にヒト小児において、混合ワクチン中のHBsAgの免疫原性が少なくとも200mIU/ml、好ましくは300mIU/mlまたはそれ以上の幾何平均の力価であることにより特徴づける。

本明細書で用いる「適当なワクチン接種計画」とは、特に小児の服用に関する当業者に知られたワクチン投与量の経時変化をいう。例えば3、4および5カ月の計画を使用する。例えば、本発明DTP - HBsAg含有ワクチンに関して適当である。

1の態様において、HBsAgを水酸化アルミニウム以外のアルミニウム塩に吸着させること

50

ができる。多価ワクチン製剤中の他の抗原をAPまたはAHに（または両方に）吸着させることができ、下記実施例に示すようにAHに有利に吸着する。

有利には、本発明ワクチン製剤は百日ぜきワクチンからなる。

適当には、百日ぜき成分は、部分精製または高度に精製された抗原を含有する全細胞性百日ぜきワクチンまたは無細胞性百日ぜきワクチンである。

上記混合物が、所望によりA型肝炎に対して防御的な成分、すなわちHAV抗原を含んでいてもよい。

有利には、B型肝炎混合ワクチンは小児用ワクチンである。

抗原の製造およびアジュバントとの吸着方法は当業者によく知られている。例えば下記参照。

B型肝炎表面抗原(HBsAg)の製造は十分に開示されている。例えば、ハーフォード(Harford)ら(1983年)、ディベロップ・バイオロ・スタンダード(Develop.Biol.Standard)第54巻,125頁、グレッグ(Gregg)ら(1987年)、バイオテクノロジー(Biotechnology)第5巻,479頁、EP-A第0226846号、EP-A-0299108号およびそれらの引用文献参照。

本明細補中、「B型肝炎表面抗原」または「HBsAg」は、HBV表面抗原の抗原性を示すすべてのHBsAg抗原またはそのフラグメントを意味する。所望ならば、本明細書記載のHBsAgが、HBsAgの226個のアミノ酸配列(チオライス(Tiollais)ら、ネイチャー(Nature)、第317巻,489頁(1985年)およびその中で引用された文献参照)の他に、上記文献およびEP-A第0278940号記載のプレS配列の全部または一部を含んでいてもよい。詳細には、HBsAgが、ad血清型のB型肝炎ウイルス上のオープンリーディングフレームに対するHBsAgのL-蛋白の175~400番目の残基に連結した133~145番目の残基に連結した12~52番目の残基からなるアミノ酸配列よりなるポリペプチドからなってもよい(このポリペプチドはL*)と呼ばれる。EP第0414374号参照)。本発明の範囲内のHBsAgが、EP第0198474号(エンドトロニクス(Endotronics))記載のプレS1-プレS2-SポリペプチドまたはEP第0304578(マコーミック・アンド・ジョーンズ(McCormick and Jones))記載のアナログごときそのアナログを含んでいてもよい。本明細書記載のHBsAgは、例えばWO第91/14703号または欧州特許出願公開第0511855A1記載の「莢膜変異株」のような変異株、あるいは特に145番目のグリシンからアルギニンへのアミノ酸置換を有するHBsAgに関するものでかってもよい。

通常は、HBsAgは粒子状であろう。該粒子が、例えばS蛋白のみからなってもよく、あるいは例えばL*が上記定義のものであり、SがHBsAgのS-蛋白を意味するような(L*,S)のごとき混成粒子であってもよい。有利には、該粒子は酵母において発現される形態である。

本発明ワクチンに使用するのに適した抗原は、すでに市販されており、その詳細が世界保健機関(World Health Organization)から得ることができる。例えば、IPV成分がソーク(Salk)不活性化ポリオワクチンであってもよい。百日ぜきワクチンが、全細胞性生成物、無細胞性生成物または組換え生成物からなってもよい。特に、百日ぜき成分がPT(百日ぜき毒素)またはそのサブフラクション、FHA(糸状血球凝集素抗原)、凝集原(繊毛の)および69kDa蛋白(ペルタクチン、繊毛の凝集原でない)をはじめとする外膜蛋白であってもよい。文献:ロビンソン,エイ(Robinson,A.)アイアンズ,エル・アイ(Irons,L.I.)およびアシュワース,エイ・イー(Ashworth,A.E.),ワクチンズ(Vaccines),第3巻,1985年,11~22頁;およびブレナン,エイチ・ジェー(Brennan,H.J.),リー,エス・エム(Li,S.M.),カウエル,ジェー・エル(Cowell,J.L.),ビシェン,エム・イー(Bishen,M.E.)スティーブン,エイ・シー(Steven,A.C.),ノボトニー,ピー(Novotony,P.),マンクラーク,シー・アール(Manclarck,C.R.),インフェクション・アンド・イムニティー(Infection and Immunity),第56巻,1988年,3189~3195頁。

A型肝炎に対する防御を提供する成分は、好ましくは、HAVのHM-175株由来の死滅弱毒化ワクチンである「ハブリックス(Havrix)」（スミスクライン・ビーチャム・バイオロジカルズ(SmithKline Beecham Biologicals))である[エフ・イー・アンドレ(F.E.Andre)、エイ・ヘプバーン(A.Hepburn)およびイー・ドン(E.D'Hondt),「インアクティ

10

20

30

40

50

ベイツィッド・キャンディデイト・ワクチンズ・フォー・ヘパタイトス A (Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A), プログ・メディ・ウイロロ (Prog. Med. Virol.), 第37巻, 72~95頁 (1980年) 参照。製品「ハブリックス」に関する論文集 (1991年) がスミスクライン・ピーチャム・バイオロジカルズから出版されている]。

フレミッヒ (Flehmg) ら (上記引用文献56~71頁) はA型肝炎の臨床的態様、ウイルス学、免疫学および伝染病学について再調査を行い、このありふれたウイルス感染に対するワクチンの開発へのアプローチについて議論した。

本明細書中、「HAV抗原」は、ヒトのHAVに対する抗体の中和を刺激することのできるすべての抗原をいう。好ましくは、HAV抗原は不活性化弱毒ウイルス粒子からなってもよく、あるいは例えばHAVキャプシドまたはHAVウイルス蛋白であってもよい。便利には、それらを組換えDNA法により得ることができる。

一般的には、ワクチン標品は、ボラー (Voller) ら編, ニュー・トレンズ・アンド・ディベロップメンツ・イン・ワクチンズ (1978年) (米国メリーランド州ボルチモア (Baltimore) のユニバーシティー・パーク・プレス (University Park Press)) に記載されている。

個々のワクチン用量中の抗原量は、典型的なワクチンの有意かつ有害な副作用なしに免疫防御応答を誘導する量として選択される。一般的には、個々の用量は、全免疫原 1~1000 µg、好ましくは 2~100 µg、より好ましくは 1~40 µg、最も好ましくは 1~5 µg からなると考えられる。特別なワクチンの最適量は、対象中の抗体力価および他の応答の測定をはじめとする標準的研究により確認される。最初の接種コースには、DTP免疫化に関するWHO推奨に従い1ないし2カ月間隔で2または3回のワクチン投与が含まれる。

よって、本発明は、ヒト、特に小児のB型肝炎および他の感染の予防方法であって、上記本発明態様のいずれかに従って、処置が必要な対象のヒトを免疫学的に有効量のワクチンで処置することからなる方法を提供する。

本発明のさらなる態様において、B型肝炎ウイルス感染の予防のための本発明混合ワクチンの製造のためのHBsAgの使用が提供される。

本発明のさらなる態様において、本発明多価ワクチンにおける安定剤として作用させるため、および/またはHBsAgの効力を維持するためのAPの使用が提供される。

特別には、本発明は、HBsAgおよび少なくとも1種の他の抗原 (好ましくは少なくとも2種の他の抗原) からなり、そのことによって、HBsAg成分の安定性および/または免疫原性が、HBsAg成分がAHに吸着されている対応する混合ワクチンにおけるよりも高い安定な混合ワクチンを製造する目的の、リン酸アルミニウムの使用を提供する。

より特別には、本発明は、ワクチンを37°Cで1週間 (すなわち7日間) おいてもHBsAgの免疫原性の実質的損失がない使用を提供する。

ヒト小児の適当な接種計画で1カ月間隔で接種するコースの3回目の投与1カ月後の幾何平均力価 (GMT) が200、好ましくは300mIU/mlより大きい使用が提供される。

本発明のさらなる態様において、下記実施例記載のB型肝炎の予防に効果的な混合 (すなわち2価 (bivalent) または多価) ワクチンの製造法が提供される。

1の好ましい態様において、HBsAg以外の抗原をすべてAHに吸着させる。例えば、非常に効果的なDTPa - B型肝炎ワクチンをこのようにして製造することができる。

一般的には、本発明のいかなる態様の混合ワクチン組成物も以下のごとく製造することができる。必要なDT、DTPw、DTPa、HAまたは他の成分を適当なアジュバント、特にAHまたはAPに吸着させる。HBsAgを、上記から選択される適当な安定化アジュバント、特別にはAH以外のアルミニウム塩上に吸着させる。好ましくは、HBsAgをAP上に吸着させる。それぞれの成分の吸着を完全かつ安定にするための時間経過後、別の成分を適当な条件下で混合する。

吸着済みのHBsAg成分を添加する前に、ある種の成分、例えばDT、DTPwおよびDTPa成分を別々に混合することができる。HBsAgおよび他のあるいは上記抗原に対する付加的な抗原からなる多価ワクチンを同様の方法で製造することができる。

好ましい態様において、リン酸アルミニウム - 吸着HBsAgを1種またはそれ以上の水酸化

10

20

30

40

50

アルミニウムまたはリン酸アルミニウムに吸着した抗原と混合することからなる、本発明混合ワクチン組成物の製造法が提供される。

以下の実施例により本発明を説明する。

実施例 1 ~ 5

製剤

本発明の特別な製剤を下記のごとく製造した。

実施例 1 混合ワクチン製剤のための濃縮物としての $AlPO_4$ に吸着したHBsAg

等張セイライン中のアルミニウム0.03ないし0.3g(リン酸アルミニウムとして)を含有するリン酸アルミニウムの懸濁液を、最終体積10ないし100ml中にHBsAg蛋白10mgを含有するHBsAg濃縮物と混合する。pHを5~6.5に合わせた後、混合物を攪拌しながら室温で10~24時間置く。ついで、所望により、防腐剤(すなわちメルチオレート(merthiolate),1:20,000ないし1:10,000または2-フェノキシエタノール,3ないし6mg/ml)を添加してもよく、ついで、等張セイラインで体積を50mlとする。

10

実施例 2 ジフテリア - 破傷風 - B型肝炎混合ワクチン製剤

A1(水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミとして)0.35gに吸着したジフテリアトキソイド25,000Lfおよび破傷風トキソイド10,000Lfを含有する濃縮物を、最終体積0.15リットルの等張セイライン中で調製し、ついで、DTおよびDTPワクチンに関してWHOにより示されているようにpHを6ないし7の間に合わせる。この濃縮物を、実施例1のB型肝炎濃縮物0.05lと混合する。

この混合物の体積を等張セイラインで0.5リットルとする。所望により防腐剤(メルチオレート,1:20,000ないし1:10,000または2-フェノキシエタノール,3ないし6mg/ml)を添加してもよい。DTおよびDTPワクチンに関してWHOにより示されているように最終pHを6ないし7の間に合わせる。

20

このバルクワクチンの0.5ml用量は、活性成分として、

Dトキソイド:25Lf

Tトキソイド:10Lf

HBsAg:10 μ g(蛋白として)

を含有する。

所望により、より多量またはより少量の活性成分を使用するために方法を修正してもよい。

30

実施例 3 ジフテリア - 破傷風 - 百日ぜき(全細胞性ワクチン) - B型肝炎混合ワクチン製剤

A1(水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして)0.45mgに吸着したジフテリアトキソイド7,500Lf、破傷風トキソイド3,250Lfおよびビー・ペルツシス(B.pertussis)抗原15,000キャパシティーユニットを含有するベーリングウエルケ(Behringwerke)から購入した濃縮物を、最終体積0.4リットルの等張セイライン中に調製し、DTPワクチンに関してWHOにより示されているようにpHを6~7に合わせる。この濃縮物を、実施例1のB型肝炎濃縮物0.05リットルと混合する。

この混合物の体積を等張セイラインで最終体積0.5リットルとする。所望により防腐剤(メルチオレート,1:20,000ないし1:10,000または2-フェノキシエタノール,3ないし6mg/ml)を添加してもよい。DTおよびDTPワクチンに関してWHOにより示されているように最終pHを6ないし7の間に合わせる。

40

このバルクワクチンの0.5ml用量は、活性成分として、

Dトキソイド:7.5Lf

Tトキソイド:3.25Lf

Pw抗原:150U

HBsAg:10 μ g(蛋白として)

を含有する。

所望により、より多量またはより少量の活性成分を使用するために方法を修正してもよい。

50

実施例 4 ジフテリア - 破傷風 - 百日ぜき (無細胞性成分) ワクチン製剤

A1 (水酸化アルミニウムおよびリン酸塩ゲルとして) 0.35mgに吸着したジフテリアトキソイド25,000Lf、破傷風トキソイド10,000Lfを、最終体積0.15リットルの等張セイライン中に調製し、DTPワクチンに関してWHOにより示されているように最終pHを6ないし7の間に合わせる。それぞれA1 (水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして) 0.05gと混合された不活性化百日ぜき毒素 (DTPa) 25mg、糸状凝集素 (FHA) 25mgおよび所望により69kDa外膜蛋白 (ペルタクチン) 8mgを添加する。ビー・ペルツシス (B.pertussis) 抗原PT、FHAおよびペルタクチンを、例えば欧州特許出願第427462号、PCT出願W0第91/12020号記載の方法のような当該分野で知られた方法により、あるいは生理学的に許容されかつ有効なビー・ペルツシス抗原が得られる他の方法により調製することができる。

10

この混合物を等張セイラインで最終体積0.5リットルとする。所望により防腐剤 (メルチオレート, 1:20,000ないし1:10,000または2 - フェノキシエタノール, 3ないし6mg/ml) を添加してもよい。DTおよびDTPワクチンに関してWHOにより示されているように最終pHを6ないし7の間に合わせる。

このバルクワクチンの0.5ml用量は、活性成分として、

Dトキソイド:25Lf

Tトキソイド:10Lf

DTdトキソイド:25 μ g

FHAトキソイド:25 μ g

69kDaOMP:8 μ g (所望による)

20

所望により、より多量またはより少量の活性成分を使用するために方法を修正してもよい。

実施例 5 ジフテリア - 破傷風 - 百日ぜき (無細胞性成分) - B型肝炎混合ワクチン製剤
実施例 1で調製したHBsAg吸着濃縮物50mlを最終混合物にさらに添加すること以外は実施例 4の方法を適用する。

得られた混合物を等張セイラインで最終体積0.5リットルとする。所望により防腐剤 (メルチオレート, 1:20,000ないし1:10,000または2 - フェノキシエタノール, 3ないし6mg/ml) を添加してもよい。DTおよびDTPワクチンに関してWHOにより示されているように最終pHを6ないし7の間に合わせる。

このバルクワクチンの0.5ml用量は、活性成分として、

30

Dトキソイド:25Lf

Tトキソイド:10Lf

DTdトキソイド:25 μ g

FHAトキソイド:25 μ g

69kDaOMP:8 μ g (所望による)

所望により、より多量またはより少量の活性成分を使用するために方法を修正してもよい。

実施例 6 ~ 10

動物およびヒトでの研究

実施例 6 A型肝炎 - B型肝炎混合ワクチン製剤

40

最終体積約125ml中、A1 (水酸化アルミニウムとして) 0.02ないし0.2g、好ましくは0.04 ~ 0.1gに吸着した不活性化A型肝炎ウイルス濃縮物 (460,000Elisaユニット) を、実施例 1記載のリン酸アルミニウムに吸着したHBsAg10mgを含有する濃縮物50mlと混合する。

得られた混合物に等張セイラインおよびアミノ酸濃縮物 (トラバソール (Travasol), バクスター - トラベノール・インク (Baxter - Travenol Inc) 製) を添加して最終体積0.5リットル (アミノ酸1.5g含有) とする。その結果pHは6ないし7の間となる。

バルクワクチン1ml用量中には、活性成分として、

A型肝炎ウイルス抗原:800Elisaユニット

HBsAg:20 μ g (蛋白)

所望により、より多量またはより少量の活性成分を使用するために方法を修正してもよい

50

結果：

HBsAg (1価ワクチン) を吸着した水酸化アルミニウム (AH) とリン酸アルミニウム (AP) とを比較する臨床的研究

最初は血清反応陰性の健康な成人ボランティアを、20 μ g のHBsAg蛋白を1カ月間隔で3回接種して免疫化した。2回目および3回目の接種1カ月後に得た血清中の抗体レベルをオーサブ (アボット) (Ausab (Abbott) test) 試験を用いて測定した。バックグラウンドよりも有意に高い力価を有する対象について応答があるものとした。力価をミリIU/ml で表した。

結果をミリIU/ml で表した幾何平均 (GMT) として示す。

HBsAg ロット	アジュバント	対象数	2回目の接種後 (2カ月目)		3回目の接種後 (3カ月目)	
			GMT	応答者 %	GMT	応答者 %
100	AH	43	32	86	141	100
101	AH	45	26	93	198	98
102	AH	46	30	84	147	93
105/P	AP	7	43	83	380	100

HBsAg ロット	アジュバント	対象数	2回目の接種後 (2カ月目)		3回目の接種後 (3カ月目)	
			GMT	応答者 %	GMT	応答者 %
102	AH	51	14	82	126	98
103	AH	50	15	83	110	98
102	AH	54	17	83	133	96
104/P	AP	54	18	96	270	98
105/P	AP	51	14	90	156	96

実施例7

マウス免疫原性試験およびアジュバントとしての水酸化アルミニウム (HA) またはリン酸アルミニウム (AP) を伴ったHBsAgからなる混合ワクチンに関する加速安定性試験の結果10匹の0F1マウスの群を、皮下注射により、2.5 μ g のHBsAg (単一成分または混合) で2回 (0日目、14日目) 免疫化した。21日目の血液を抜き取り、オーサブ (アボット) 試験を用いて抗-HBsAg力価を測定した。抗体力価をミリIU/mlとして計算した。バックグラウンドよりも有意に高い力価を有する動物について応答があるものとした。また結果を幾何

10

20

30

40

50

平均 (GMT) で計算した。

DT - HB、DTPw - HB、DTPa - HBの結果により、HBsAgを吸着したAPが、応答を示した動物およびGMTの両方においてHBsAgを吸着したAHよりも良好な結果を示した。HBsAgを吸着したAPに対する応答は、1価のHBsAg投与により得られる応答と比肩しうるものであった。

ワクチン	4℃		37℃, 7日目		45℃, 7日目	
	応答動物 の数	GMT	応答動物 の数	GMT	応答動物 の数	GMT
エンゲリックスB (HB+AH)	7/10	3.0	9/10	1.7	6/10	2.7
エンゲリックスB (HB+AH)	9/10	5.4	8/10	1.3	5/10	6
HB (AH)	9/10	4.5	10/10	5.5	9/10	3.2
HB (AP)	9/10	5.4	10/10	5.0	7/10	6.9
DTPw(AH)HB(AH)	4/10	1.4	nd	nd	nd	nd
DTPw(AH)HB(AP)	9/10	5.2	8/10	1.6	8/10	2.6
DT(AH)HB(AH)	6/10	1.7	nd	nd	nd	nd
DT(AH)HB(AP)	8/10	4.4	9/10	2.1	10/10	3.6
DTPa(AH)HB(AH)	5/10	1.7	nd	nd	nd	nd
DTPa(AH)HB(AP)	10/10	1.8	8/10	8	9/10	2.4

nd : 試験せず

実施例 8

サルにおけるDTPwと混合したHBsAgの免疫原性

水酸化アルミニウム (AH) およびリン酸アルミニウム (AP) 吸着抗原についての結果

セルコピテヌス・エチオプス (Cercopithecus aethiops) のサルに、0日目および30日目に10μgのHBsAg(単独または混合)を2回注射した。30日目および57日目の血清を取り、抗-HBsAg力価を測定(アークサブ, アボット試験)した。バックグラウンド(接種前の血清)よりも有意に高いレベルの抗体を有する動物を応答したものと見なした。GMTをミリIU/mlで計算した。

AP吸着HBsAgがAH吸着HBsAgよりも良好な結果を示した。その応答は、1価のHBsAg投与により得られる応答と比肩しうるものであった。

ワクチン	1回目の接種後 (30日目)		2回目の接種後 (57日目)	
	応答動物 の数	GMT	応答動物 の数	GMT
エンゲリックスB (HB)(AH)	4/5	10	5/5	666
DTPw(AH)HB(AH)	4/5	20	5/5	31
DTPw(AH)HB(AP)	5/5	12	5/5	414

10

実施例9

水酸化アルミニウム(AH)またはリン酸アルミニウム(AP)に吸着したHBsAgを用いた混合DTPwワクチンでの臨床的研究

3、4および5カ月齢において、対象に、DTPwおよび10 μ gのHBsAg蛋白を含有する0.5ml用量を3回接種した。6カ月目に採血し、オーサブ試験で血清の力価を測定した。応答した対象(血清変換)のパーセント値は、バックグラウンドよりも有意に抗体レベルが上昇した対象数と関連する。防御のパーセント値は、力価が10ミリIU/mlに等しいか、またはそれより高い対照数と関連する。GMTはミリIU/mlである。

20

DTPw-HBに関する結果により、AP吸着HBsAgが、AH吸着HBsAgと比較して満足な応答を引き起こしたことが示される。血清変換速度およびGMTは、1価のHBsAgワクチン(エンゲリックスB)で典型的に見られるデータと比肩するものであった。

ワクチン	対象数	採血時期	応答%	防御%	GMT
DTPw(AH)HB(AH)	32	2回目の後	nd	nd	nd
		3回目の後	94	84	38.5
DTPw(AH)HB(AP)	29	2回目の後	97	97	63
		3回目の後	100	100	469

30

実施例10

A型肝炎-B型肝炎混合ワクチンにおける水酸化アルミニウム(AH)またはリン酸アルミニウム(AP)に吸着したHBsAgの免疫原性および安定性

10匹のOF1マウスに、0日目および14日目に、2.5 μ gのHBsAgを皮下注射により2回投与して免疫化した。21日目に採血し、実施例7のごとく抗-HBsAgの力価を測定した。

40

HA-HB混合品の免疫原性および安定性の結果により、AP吸着HBsAgがより高い抗体レベルおよびより安定な形態を提供したことが示された。

ワクチン	暴露	応答対象数	GMT
HA(AH)HB(AH)	4℃	9/10	41
	1カ月, 37℃	6/10	5.6
	1カ月, 45℃	5/10	6.4
HA(AH)HB(AP)	4℃	10/10	80
	1カ月, 37℃	9/10	45
	1カ月, 45℃	8/10	18
エンゲリックスB HB(AH)	4℃	8/10	58

10

実施例11: ヒトにおけるさらなる臨床結果

1. 小児におけるDTPw - B型肝炎ワクチンの免疫原性

実験 A

スロバキアでの研究: 計画: 3 - 4 - 5 カ月。リン酸アルミニウム上のHBsAg10 µg;
ベーリングウェルケから購入したDTPw (AH上のDT; AHとAPからなる混合物上のPw)
抗-Hbs力価

20

HBsAgアジュバント	時期	N	GMT	SP(%)
水酸化物	II回目の後(5カ月)	44	45	79.5
水酸化物	III回目の後(6カ月)	13	34	69.2
リン酸塩	II回目の後(5カ月)	32	80	97.0
リン酸塩	III回目の後(6カ月)	32	396	100

30

この実施例および他の実施例において、II回目の後は2回目の接種の後を意味し、III回目の後は3回目の接種の後を意味する。つねに計画に示された注射時期の1カ月後にGMTを測定した。SPは血清変換率である。

抗-ジフテリア、破傷風、B百日ぜきの力価

III回目の結果	N	GMT	0.1%IU/ml 以上である%値	GMT 接種後/接種前
抗-ジフテリア	38	2.302	100	37.4
抗-破傷風	38	3.281	100	38.4
抗-B百日ぜき	38	61	-	7.7

40

実験 B

ギリシャでの研究: 計画 2 - 4 - 6 カ月 (実験 Aと同じワクチン)

抗-HBs力価 (中間結果)

HBsAgアジュバント	時期	N	GMT	SP(%)
水酸化物	7カ月目	22	284	90.5
水酸化物	7カ月目	17	193	94.4
リン酸塩	7カ月目	23	1794	92.0

実験 C

10

スロバキアでの実験：計画 3 - 4 - 5 カ月 (リン酸アルミニウム上のHBsAg = 5 μ g; 実験 A と同様ベーリングウェルケから購入したDTP)

抗-HBs力価

時期	N	GMT	SP(%)
II回目の後	21	94	90.5
III回目の後	18	311	100

実験 D

20

スロバキアでの研究：計画 3 - 4 - 5 カ月 (リン酸アルミニウム上のHBsAg = 10 μ g; 実験 A と同様ベーリングウェルケから購入したDTPw)

抗-HBs力価

時期	N	GMT	SP(%)
接種前	24	0	0
II回目の後(5カ月目)	13	259	92.3
III回目の後(6カ月目)	10	592	100.0

10

抗-ジフテリア抗体

時期	N	GMT	SP(%)	GMT 接種後/接種前
接種後	32	0.054	6.3	1.0
II回目の接種後	16	1.094	93.8	20.4
III回目の接種後	11	2.314	100.0	43.1

20

抗-破傷風抗体

時期	N	GMT	SP(%)	GMT 接種後/接種前
接種後	32	0.083	34.4	1.0
II回目の接種後	16	3.146	100.0	37.9
III回目の接種後	11	7.989	100.0	96.4

30

抗-B百日ぜき抗体

時期	N	GMT	GMT 接種後/接種前
接種後	32	8	1.0
II回目の接種後	16	20	2.7
III回目の接種後	11	50	6.6

40

2. DTPaの免疫原性 - 小児におけるB型肝炎ワクチン

実験 A

トルコでの研究。AP上HBsAg10 µg; AH上DTP(無細胞性)。

予備試験の結果

グループ1 (DTPa-AP上HBsAg混合)

時期	N	S+	%	GMT
接種前	19	0	0	0
I回目の接種後	19	4	21.1	2.4
II回目の接種後	19	18	94.7	14.6
III回目の接種後	19	19	100.0	34.5

10

グループ2 (DTPa+AP上HBsAg;同時に個別注射)

時期	N	S+	%	GMT
接種前	8	0	0	0
I回目の接種後	8	2	25.0	3.7
II回目の接種後	8	5	62.5	3.3
III回目の接種後	7	6	83.7	3.85

20

キー：N＝試験対象数；S＋＝所定の採血時期に血清変換していた対照数；
 %＝血清変換率；GMT＝血清変換体の幾何平均抗体力価

フロントページの続き

(72)発明者 ハウザー, ピエール
ベルギー国ベー 1330リクセンザルト、リュ・デュ・ランステイテュート89番、スミスクラ
イン・ビーチャム・バイオリジカルス(ソシエテ・アノニム)

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特開平01-279842(JP, A)
特開昭61-036228(JP, A)
Coursaget P et al., Infect Immun, 1986年 3月, 51(3), 784-7

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K 39/29

A61K 39/295

A61K 39/39