



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I749085 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：106135074

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61K39/102 (2006.01)

A61K39/08 (2006.01)

A61K47/54 (2017.01)

(30)優先權：2016/10/20 日本

2016-206033

(71)申請人：日商KM生物醫藥股份有限公司(日本)KM BIOLOGICS CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：森山真 MORIYAMA, MAKOTO (JP)；深田勝彦 FUKADA, KATSUHIKO (JP)；来海和彦 KIMACHI, KAZUHIKO (JP)；三原由揮 MIHARA, YUKI (JP)；米村宏 YONEMURA, HIROSHI (JP)；城野洋一郎 KINO, YOICHIRO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

US 6,060,067A

US 2009/0010959A1

US 2012/0107346A1

US 2016/0015952A1

WO 2014/097099A2

WO 2015/052684A2

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：7 共 27 頁

(54)名稱

使用低分子化PRP之Hib接合型疫苗之製造方法

(57)摘要

本發明提供保存安定性優良之PRP接合物的調製方法及Hib接合型疫苗之製造方法。本發明之PRP接合物之調製方法之特徵為當進行PRP與載體蛋白質之結合反應時，藉由使用比天然PRP更低分子化之PRP，抑制PRP從調製後之PRP接合物的游離。以由本調製方法所得到之PRP接合物作為抗原的Hib接合型疫苗，亦同樣地保存安定性優良，且保持充分之免疫原性。

A method for preparing PRP conjugate with excellent storage stability and a process for preparing a Hib conjugate vaccine are provided. A method for preparing PRP conjugate of the present invention is characterized by that, in carrying out a binding reaction between PRP and a carrier protein, PRP with a lowered molecular weight than that of native PRP is used to suppress release of PRP from the PRP conjugate after preparation. A Hib conjugate vaccine comprising as an antigen the PRP conjugate obtained by the method has also excellent storage stability and retains sufficient immunogenicity.

公告本
發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

使用低分子化 PRP 之 Hib 接合型疫苗之製造方法

A PROCESS FOR PREPARING A Hib CONJUGATE VACCINE
USING PRP WITH A LOWERED MOLECULAR WEIGH

【中文】

本發明提供保存安定性優良之 PRP 接合物的調製方法及 Hib 接合型疫苗之製造方法。本發明之 PRP 接合物之調製方法之特徵為當進行 PRP 與載體蛋白質之結合反應時，藉由使用比天然 PRP 更低分子化之 PRP，抑制 PRP 從調製後之 PRP 接合物的游離。以由本調製方法所得到之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型疫苗，亦同樣地保存安定性優良，且保持充分之免疫原性。

【英文】

A method for preparing PRP conjugate with excellent storage stability and a process for preparing a Hib conjugate vaccine are provided. A method for preparing PRP conjugate of the present invention is characterized by that, in carrying out a binding reaction between PRP and a carrier protein, PRP with a lowered molecular weight than that of native PRP is used to suppress release of PRP from the PRP conjugate after preparation. A Hib conjugate vaccine comprising as an antigen the PRP conjugate obtained by the method has also excellent storage stability and retains sufficient immunogenicity.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

本案的圖皆為結果數據，故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

使用低分子化 PRP 之 Hib 接合型疫苗之製造方法

A PROCESS FOR PREPARING A Hib CONJUGATE VACCINE
USING PRP WITH A LOWERED MOLECULAR WEIGHT

【技術領域】

【0001】本發明係關於藉由聚磷酸核糖基核糖醇(PRP)與載體蛋白質進行結合反應，調製 PRP 接合物之方法、以及流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)b 型(Hib)接合型疫苗之製造方法。

【先前技術】

【0002】流感嗜血桿菌為兼嫌氣性(facultative anaerobic)革蘭氏陰性桿菌，具有呈現絲狀或球菌狀之形態的「多形性」性質，無芽胞或鞭毛。依據有無莢膜分類為無莢膜株及有莢膜株，已知為有莢膜株之 b 型株(Hib)的病原性特別高。Hib 感染為乳幼兒之髓膜炎的主要原因，附著於上呼吸道之 Hib 菌侵入血中，從菌血症擴及全身，引起髓膜炎、咽頭蓋炎、關節炎等全身感染症。

【0003】已知針對 Hib 之莢膜多糖體，即 PRP，的抗體在 Hib 感染之防禦方面有效，然而由於只基於 PRP 成分之 Hib 疫苗為 T 細胞非依存性，對於免疫系統尚未成熟之出生後未滿 18 個月的乳幼兒效果不充分。因此，使 PRP 與載體蛋白質接合(conjugate)(結合)，開發 T 細胞依存性之

接合型疫苗，而使用於乳幼兒。

【0004】PRP 等多糖類與載體蛋白質結合而成之接合型疫苗為周知。專利文獻 1 揭示有關 Hib 與糖蛋白質之接合物之製法及作為混合疫苗使用，專利文獻 2 揭示有關寡聚糖接合型疫苗之改良製造方法。

【0005】PRP 之生產方法亦為周知。專利文獻 3 揭示以培養基培養 Hib 株後，將上清液精製，萃取 PRP 的方法。

【0006】破傷風類毒素，依照 WHO 規格，要求超過 1,000Lf/mgPN 之純度。據報導世界各國之製造業者 34 公司中有 31 公司符合此基準，其中有 15 公司達到超過 1,500LF/mgPN 之純度(非專利文獻 1)。又，歐州藥局方(EP: European Pharmacopoeia)之 Hib 接合型疫苗的規格方面，為 >1,500Lf/mgPN。就破傷風類毒素之精製方法而言，可使用硫酸銨沉澱或三氯乙酸沉澱、管柱層析(凝膠過濾層析、親和層析)、鹽析、透析等。

【0007】關於多糖類與載體蛋白質之結合比的檢討，於專利文獻 4 中報導。若依據專利文獻 4，揭示關於一種複合疫苗，其特徵為多糖類對蛋白質之比為 1:0.3 至 1:2。

【0008】就評價 Hib 接合型疫苗之免疫原性的方法而言，已知有使用大鼠之免疫原性試驗，關於抗體價，係依據 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; 酵素免疫測定法)等進行評價(非專利文獻 2 至 4)。其他方面，已知有使用小鼠、天竺鼠(非專利文獻 5)、或猴(非專利文獻 6)之評價。

【0009】已知 PRP 從 PRP 接合物游離而得之游離 PRP，與對抗 PRP 之抗體價，成為逆相關，又，已知游離 PRP 不易上升之疫苗，從安定性、有效性之觀點而言，甚為重要(非專利文獻 7)。

【0010】有關使用長度不同之 PRP，藉由還原胺化法調製 Hib 接合物，進行免疫原性評價之結果，於非專利文獻 8 中報導。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0011】

[專利文獻 1] 日本特開昭 62-30726

[專利文獻 2] 日本特開平 6-340550

[專利文獻 3] 日本特表 2015-522272

[專利文獻 4] 日本特表平 11-507026

[專利文獻 5] PCT 公開第 93/15760 號

[專利文獻 6] 美國專利第 4673574 號

[專利文獻 7] 歐州公開第 161188 號

[專利文獻 8] 歐州公開第 208375 號

[專利文獻 9] 歐州公開第 477508 號

[專利文獻 10] 美國專利第 4220717 號

[專利文獻 11] 美國專利第 4459286 號

[非專利文獻]

【0012】

[非專利文獻 1] Vaccine 14 (4) (1996) 313-320

[非專利文獻 2] The Journal of Infectious Diseases, 190, 1177-1182, 2004

[非專利文獻 3] The Journal of Infectious Diseases, 191, 58-64, 2005

[非專利文獻 4] Vaccine 24 (2006) 3505-3512

[非專利文獻 5] Vaccine 16 (1998) 1842-1849

[非專利文獻 6] Vaccine 19 (2001) 902-907

[非專利文獻 7] Vaccine 25 (2007) 194-200

[非專利文獻 8] Vaccine 33 (2015) 2646-2654

[非專利文獻 9] Infection and Immunity, 40(1)1983, 245-256

[非專利文獻 10] Biologicals 35 (2007) 235-245

[非專利文獻 11] Vaccine 32 (2014) 5650-5656

[非專利文獻 12] Vaccine 12 (8) (1994) 700-706

[非專利文獻 13] Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (6) (2000) 1087-1091

[非專利文獻 14] Journal of Microbiology and Biotechnology (2003), 13(3), 469-472

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0013】以 PRP 接合物作為抗原之 Hib 接合型疫苗，雖對乳幼兒之免疫原性亦高度有效，然而在疫苗保存中由於 PRP 從載體蛋白質游離，造成保存安定性降低之問題。雖然期望開發更安定的 Hib 接合型疫苗，然而未曾報導能

抑制游離 PRP 含量上升的有效方法。

【0014】本發明為鑑於上述情事而產生者，提供保存安定性優良之 PRP 接合物的調製方法及 Hib 接合型疫苗之製造方法。

[用於解決課題之手段]

【0015】本發明人等，為能解決上述課題而專心檢討之結果，發現藉由使用比天然 PRP 更適度低分子化之 PRP，而調製游離 PRP 含量上升受到抑制之安定 PRP 接合物的方法。再者，本發明人等藉由努力檢討有關 PRP 及載體蛋白質付諸於反應時之重量比，載體蛋白質(尤其破傷風類毒素)之純度，PRP 接合物調製後之保存溶液的 pH，發現更安定之 Hib 接合型疫苗的製造方法。

【0016】亦即，本發明包含以下事項。

[1]一種調製方法，係藉由聚磷酸核糖基核糖醇(PRPP)與載體蛋白質進行結合反應，而調製 PRP 接合物之方法，其特徵為藉由使用比天然 PRP 更低分子化之 PRP，而抑制 PRP 從調製後之 PRP 接合物游離。

[2]如[1]記載之方法，包含 PRP 接合物於調製後，保存於 pH5.4 至 6.3 之溶液中。

[3]如[2]記載之方法，其中於 pH5.4 至 6.3 之溶液，37℃、4 週之苛酷試驗中，游離 PRP 含量小於 50%。

[4]如[1]至[3]中任一項記載之方法，其中 PRP 之低分子化的方法為物理性破碎。

[5]如[1]至[3]中任一項記載之方法，其中 PRP 之低分

子化的方法為藉由酸或鹼之水解。

[6]如[1]至[5]中任一項記載之方法，其中低分子化之 PRP 的分子量為 80 至 150kDa。

[7]如[1]至[6]中任一項記載之方法，其中在調製 PRP 接合物之結合反應中，PRP 及載體蛋白質係以重量比 2：1 至 4：1 付諸於反應。

[8]如[7]記載之方法，其中 PRP 及載體蛋白質係以重量比 4：1 付諸於反應。

[9]如[1]至[8]中任一項記載之方法，包含在調製 PRP 接合物之結合反應之前，使用 1-氰基-4-(二甲基胺基)吡啶四氟硼酸鹽(CDAP)，使低分子化 PRP 活化的步驟。

[10]如[1]至[9]中任一項記載之方法，其中載體蛋白質為破傷風類毒素。

[11]如[10]記載之方法，其中破傷風類毒素之純度為 2,500 至 3,500LF/mgPN。

[12]如[11]記載之方法，其中破傷風類毒素之純度為 2,900 至 3,300LF/mgPN。

[13]一種流感嗜血桿菌 b 型(Hib)接合型疫苗之製造方法，包含[1]至[11]中任一項記載之方法。

[14]一種以[13]記載之製造方法所製造之 Hib 接合型疫苗的用途，係作為混合疫苗使用。

[15]一種以[13]記載之製造方法所製造之 Hib 接合型疫苗的用途，係與沉降精製之百日咳、白喉、破傷風及不活化小兒麻痺之混合疫苗合製成五合一混合疫苗使用。

[發明之效果]

【0017】若依照本發明，可將調製後之 PRP 接合物長期安定地保存。再者，可使 Hib 接合型疫苗保有原來充分的免疫原性而安定地保存。

【圖式簡單說明】

【0018】

關於第 1 圖至第 7 圖係說明如下。

[第 1 圖]係展示藉由本發明之一實施態樣所調製的 PRP 接合物於 37°C 保存 4 週後，游離 PRP 含量(%)之上升與 PRP 分子量之關係圖。

[第 2 圖]係展示以藉由本發明之一實施態樣改變 PRP 分子量而調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型疫苗，以 1/25SHD(Single Human Dose)及 1/50SHD 對大鼠進行免疫時之免疫原性圖。

[第 3 圖]係展示以藉由本發明之一實施態樣改變付諸於結合反應之 PRP 與載體蛋白質之重量比而調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型疫苗，以 1/25SHD 及 1/50SHD 對大鼠進行免疫時之免疫原性圖。

[第 4 圖]係展示以藉由本發明之一實施態樣改變付諸於結合反應之 PRP 與載體蛋白質之重量比而調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型混合疫苗，以 1/100SHD 及 1/500SHD 對大鼠進行免疫時之免疫原性圖。

[第 5 圖]係展示將以藉由本發明之一實施態樣調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型混合疫苗，在改變投與

量下，對大鼠進行 3 次免疫時之免疫原性圖。

[第 6 圖]係展示以藉由本發明之一實施態樣改變付諸於結合反應之 PRP 與載體蛋白質之重量比而調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型混合疫苗，於 37°C 保存 4 週時，游離 PRP 含量(%)之上升與保存溶液 pH 之關係圖。

[第 7 圖]係展示以藉由本發明之一實施態樣改變付諸於結合反應之 PRP 與載體蛋白質之重量比而調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型混合疫苗，於 10°C 保存 45 個月時，游離 PRP 含量(%)之上升與保存溶液 pH 之關係圖。

【實施方式】

[用於實施發明之態樣]

【0019】以下，詳細說明本發明之較佳實施態樣。但是，本發明並未限定於以下之實施態樣。

【0020】根據本發明之實施態樣的 PRP 接合物之調製方法，其特徵為當進行 PRP 與載體蛋白質之結合反應時，藉由使用比天然 PRP 更低分子化之 PRP，而抑制 PRP 從調製後之 PRP 接合物游離。關於以依照本調製方法所得到之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型疫苗，同樣地保存安定性優良，且保持充分之免疫原性。

【0021】PRP 接合物可藉由周知之結合技術調製。例如可將 PRP 經由硫醚鍵結合。在此結合方法中，藉由將 PRP 以 1-氰基-4-(二甲基胺基)吡啶四氟硼酸鹽(CDAP)活化，形成氰酸酯。以此種方式活化之 PRP，可直接或經由間隔基與載體蛋白質之胺基結合。較佳為將氰酸酯與己二胺結

合，藉由伴隨硫醚鍵之形成的異源接合化學反應，使胺基衍生物化多糖與載體蛋白質接合(專利文獻 5)。

【0022】除上述之外，亦可藉由還原胺化方法調製接合物(專利文獻 6 至 9)。再者，就其他方法而言，可列舉將以己二酸二醯肼(ADH)衍生物化之溴化氰(CNBr)活化多糖，藉由碳化二亞胺縮合而結合於載體蛋白質的方法(非專利文獻 9)。

【0023】就載體蛋白質而言，可列舉破傷風類毒素、百日咳類毒素、白喉類毒素、為白喉類毒素之基因變異體的 CRM197、非莢膜型流感嗜血桿菌 D 抗原、髓膜炎 B 群之外膜蛋白質(OMP)等。對 PRP 接合物而言，典型的載體蛋白質為破傷風類毒素。

【0024】在使用破傷風類毒素作為載體蛋白質之情況，其純度係以 WHO 規格的 1,000Lf/mgPN 以上使用。在本發明之方法中，破傷風類毒素之純度越高越好，以 2,500 至 3,500 Lf/mgPN 為較佳。更佳為 2,900 至 3,300 Lf/mgPN。

【0025】就將 PRP 低分子化之方法而言，可列舉藉由高壓乳化機之物理性破碎。在此情況，藉由 10,000 至 30,000psi 之壓力，以 10 分鐘至 2 小時進行破碎。較佳為以 20,000 至 30,000psi 之壓力經 10 分鐘至 2 小時，更佳為以 25,000 至 30,000psi 之壓力經 10 分鐘至 2 小時進行破碎。

【0026】就將 PRP 低分子化之方法而言，亦可採取使用酸、氧化劑或鹼之水解。就酸、氧化劑而言，可列舉鹽酸、硫酸、過碘酸鈉等，就鹼而言，可列舉氫氧化鈉、碳

酸氫鈉等。

【0027】由於未進行低分子化之天然 PRP 的分子量為約 250 至 400kDa，經低分子化之 PRP 的分子量成為小於 250kDa。在本發明中，以 80 至 150kDa 為較佳，更佳為 80 至 100kDa。

【0028】分子量之測定係藉由使用非專利文獻 10 或非專利文獻 11 所記載之 HPLC(High Performance Liquid Chromatography；高效液體層析)裝置之方法進行。在此情況，校正曲線係使用普魯蘭多糖等製成，可求得為普魯蘭多糖等之換算值的峰頂之分子量。或者，亦可藉由使用 MALS(Multi Angle Light Scattering；多角度光散射檢測器)之方法，求取絕對分子量。此外，只要為能進行分子量之測定的方法，任何方法均可使用。

【0029】藉由使用低分子化之 PRP，提高 PRP 接合物之保存安定性的作用機構，推測有以下 2 點：(1)於低分子化 PRP 接合物之情況，由於與載體蛋白質結合之 PRP 的長度短，即使藉由水解而 PRP 被切斷，游離之 PRP 的總量變少，(2)藉由 PRP 低分子化，接合物之間所存在的 PRP 不易切斷。但是，立體構造上亦有限制，只是單純地過於低分子化，安定性亦無法改善，並非所謂越短越好。

【0030】在本發明之一實施態樣中，為了避免對載體蛋白質產生過度的抗體回應，又為了減少載體蛋白質之使用量而提高每單位載體蛋白質之疫苗生產性，PRP 與載體蛋白質係以重量比 2：1 至 4：1 之範圍付諸於結合反應。

更佳之重量比為 4 : 1。

【0031】PRP 接合物保存溶液之 pH 以 5.0 至 6.6 為較佳，更佳為 pH5.4 至 6.3。pH 調整可藉由鹽酸或乙酸等酸，氫氧化鈉、碳酸氫鈉等鹼液進行調整，亦可使用緩衝液。保存溶液只要能維持前述之 pH 之範圍的組成即可，可為磷酸緩衝溶液、乙酸緩衝溶液、MES 緩衝溶液，亦可為琥珀酸緩衝溶液等其他緩衝溶液。

【0032】游離 PRP 含量之測定可依照非專利文獻 12 至 14 等所記載之方法進行。檢討安定性時之長期保存試驗的溫度條件，係於 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 或在避免凍結下於 10°C 以下進行。或者，亦可於更高溫條件下加速地評價安定性。

【0033】依照本發明之方法所製作的 Hib 接合型疫苗之免疫原性，可藉由對大鼠或猴等動物施予免疫，測定抗 PRP 抗體價而求得。抗體價係藉由 ELISA 等測定。或者，亦可藉由使用如非專利文獻 11 之補充物及 Hib 菌的血清殺菌抗體 (SBA; Serum Bactericidal antibody) 試驗而進行評價。由於如非專利文獻 11 所記載，已知抗體價與 SBA 價有一定程度相關，亦可藉由採用 ELISA 對抗體價進行評價。

【0034】依照本發明之方法所製造的 Hib 接合型疫苗，由於不易引起免疫干擾，亦可作成與其他抗原之混合疫苗。例如，可列舉與沉降精製之百日咳、白喉、破傷風及不活化小兒麻痺之混合疫苗合製成之混合疫苗等。

【0035】採用本發明之方法所製造的 Hib 接合型疫苗，亦可與佐劑一起使用。劑型可為液狀製劑，亦可為凍

結乾燥製劑。

【0036】以下，藉由實施例詳細地說明本發明，然而本發明不受此等實施例任何限定。

[實施例 1]

【0037】低分子化 PRP 之製作

依據專利文獻 10 或 11 等所記載之固定方法，藉由在添加 NAD(菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide))之 BHI(腦心湯(Brain Heart Broth))培養基中，將 Hib 於 37°C 培養 8 至 14 小時，並將上清液以乙醇沉澱而精製，得到峰頂分子量(為普魯蘭多糖換算量)為 250 至 400kDa 的精製 PRP。將含精製 PRP 之製成液藉由高壓乳化機(Microfluidics 公司製)，以 10,000psi、20,000psi、30,000psi 等各種壓力處理 15 至 20 次，藉由物理方式將 PRP 破碎，進行低分子化。將所得到之低分子化 PRP 進行分子大小分析，確認峰頂分子量分別為 155kDa、108kDa、81kDa。

[實施例 2]

【0038】PRP 接合物之調製

使 2 至 12mg/mL 之所得到的各低分子化 PRP，於 100mg/mL 濃度之 CDAP 中，以對 PRP 之重量比成為 0.2 至 2.0 之條件反應，並進一步與 0.5M 之 ADH 反應 2 小時。然後，進行透析除去未反應物，得到活化 PRP。使活化 PRP 與 2,900 至 3,300LF/mgPN 純度之破傷風類毒素(TT)原液(化學及血清療法研究所製)及為縮合劑之 EDC(1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺)一起反應，其中 PRP 與 TT 原液

之重量比分別為 1:1、2:1、4:1。視濃度反應 40 分鐘至 4 小時，然後進行透析，得到 PRP/TT 比為 0.48、0.77、1.0 之 PRP 接合物。

[實施例 3]

【0039】 PRP 接合物之保存安定性評價

藉由 37°C 之苛酷試驗評價所製作之 PRP 接合物(磷酸緩衝溶液，pH6.8)的保存安定性。於非專利文獻 13 所記載之 DOC 處理後，使用非專利文獻 10 所記載之核糖試驗測定保存開始時、2 週後及 4 週後的游離 PRP 含量(%)。將其結果示於第 1 圖。由此可知與未低分子化之天然 PRP 或 155kDa 之 PRP 相比，更低分子化的 108kDa 或 81kDa 之 PRP 較能抑制游離 PRP 含量之上升。

[實施例 4]

【0040】 PRP 接合物保存溶液之 pH 檢討

調製 pH 為 6.0、6.3、6.6、7.0 之磷酸緩衝液，以 37 °C 之苛酷條件，評價 pH 對於 PRP 接合物(低分子化後 PRP 分子量為 142kDa)之保存溶液的影響。使用與實施例 3 同樣之方法測定保存開始時、2 週間後及 4 週間後之游離 PRP 含量(%)的結果，可知在 pH6 至 7 之範圍內，pH 越低，越能抑制游離 PRP 含量之上升(表 1)。

【0041】

[表 1]

檢體	PB	pH	游離 PRP(%)				
			37°C, 0w	37°C, 2w	37°C, 4w	增加量 (2w-0w)	4w-0w
Hib-TT (PRP 142kDa, 1:1)	-	7.0	5.71	30.9	34.8	25.2	29.1
	50 mmol/L	6.6	3.08	17.2	25.7	14.1	22.6
		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

[實施例 5]

【0042】 Hib 接合型疫苗之免疫原性評價

將以 PRP 接合物 (PRP 分子量：天然、或改變 PRP 之分子量為 155kDa、108kDa、88kDa 者，或改變 PRP 與載體蛋白質之重量比，於實施例 2 調製者) 作為抗原之 Hib 接合型疫苗，以 0.5mL 之量皮下接種於 1 群 (5 隻) SD 大鼠 (雌性，5 週齡) 之背部，並於 4 週後進行第 2 次之接種。從第 2 次接種 2 週後進行採血，藉由自行調製之 ELISA 測定抗體價。將其結果示於第 2 圖及第 3 圖。確認與已有之 Hib 接合型疫苗 (Sanofi Pasteur 公司製「ActHIB(商標名)」) 相比，得到同等以上之抗 PRP 抗體價。

[實施例 6]

【0043】含 PRP 接合物之混合疫苗之調製，及免疫原性評價

在 DTP-IPV 之四合一混合疫苗(沉降精製之百日咳、白喉、破傷風及不活化小兒麻痺(沙賓株)之混合疫苗；化學及血清療法研究所製「Quattrovac(商標名)」)或添加有不活化小兒麻痺病毒(IPV；Salk 株)之沉降精製之百日咳、白喉及破傷風之混合疫苗(化學及血清療法所製)中，加入 PRP 接合物而調製五合一混合疫苗。

【0044】將以 PRP 接合物(PRPP 分子量：天然、或改變 PRP 分子量為 155、108、88kDa 者，或改變 PRP 與載體蛋白質之重量比，於實施例 2 調製者)作為抗原之 Hib 接合型疫苗，以 0.5mL 之量皮下接種於 1 群(5 隻)SD 大鼠(雌性，5 週齡)之背部，於 4 週後進行第 2 次之接種。第 2 次接種後 2 週後進行採血，以自行調製之 ELISA 測定抗體價。將其結果示於第 4 圖。只有使用 PRP 與載體蛋白以重量比 4：1 反應而得之 PRP 接合物之五合一混合疫苗於 1/100 單次人類劑量(1/100SHD)下顯示低抗 PRP 抗體價，除此以外，均顯示與現有之 Hib 接合型疫苗(Sanofi Pasteur 公司製「ActHIB(商標名)」)的五合一混合疫苗同等以上之抗 PRP 抗體價。重量比 4：1 之反應條件，於劑量為 1/500SHD 之條件下，亦顯示比 ActHIB(商標名)更高之抗體價。

【0045】關於所調製之五合一混合疫苗之免疫原性，將五合一混合疫苗以 3 週間隔皮下投與至 1 群(10 隻)大鼠(Wister，雌性，8 週齡)之背部，共計 3 次，於接種 3 週後

進行採血，藉由自行調製之 ELISA 測定抗體價。將結果示於第 5 圖。改變五合一混合疫苗之用量，並與混合有現有之 Hib 接合型疫苗 (Sanofi Pasteur 公司製「ActHIB(商標名)」) 的五合一混合疫苗比較，3 次接種後，現有之 Hib 接合型疫苗以用量為 $10\ \mu\text{g}$ 時之值最高，相對地，本發明之 Hib 接合型疫苗以用量為 $2\ \mu\text{g}$ 時之值為最高，推測能以較少用量得到同等之免疫原性。

[實施例 7]

【0046】PRP 接合物原液之安定性評價

改變 Hib 原液之濃度及 pH，於 37°C 加溫 1 週，進行 PRP 接合物原液之安定性的評價。將結果示於表 2。就原液之保管條件而言，高濃度者較為安定。即使於高濃度條件下，pH6.0 者仍比 6.8 者安定。

【0047】

[表 2]

檢體	緩衝液	PRP 濃度 [mg/mL]	游離 PRP(%)		
			37°C 0w	37°C 1w	增加量 (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

[實施例 8]

【0048】含 PRP 接合物之混合疫苗之 pH 對安定性的影響評價

以使混合疫苗之 pH 成為 5.0、5.4、5.7、6.0 的方式添加緩衝液，將對象檢體於 37°C 之苛酷條件加溫 4 週後，測定游離 PRP。將結果示於表 3。結果混合疫苗之 pH 為 6.0、5.7、5.4 者良好，pH 為 5.0 時變成不安定。再者，雖然確認混合疫苗中 Hib 以外之抗原對免疫原性的影響，但未見到 pH 之影響。

【0049】

[表 3]

檢體	磷酸 濃度	pH	37°C, 4w 平均值(%)	4°C, 4w 平均值 (%)	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

【0050】在將混合疫苗之 pH 調成 6.0 或 6.8，於 37°C 加溫 4 週之情況，於 10°C 保存 45 個月後，測定游離 PRP。

將結果示於第 6 圖、第 7 圖。在以藉由本發明之一實施態樣所調製之 PRP 接合物作為抗原的 Hib 接合型混合疫苗中，pH6.0 者比 pH6.8 者更為安定。於 37°C 加溫 2 週之結果，接近於 10°C 保存 12 個月的游離 PRP 之值，於 37°C 加溫 4 週之結果，與於 10°C 保存 45 個月的游離 PRP 之值接近。從第 6 圖、第 7 圖可確認於 37°C 加溫之情況及於 10°C 保存之情況，任一種均有同樣之傾向。

[產業上之可利用性]

【0051】依照本發明之調製方法，可利用於 Hib 接合型疫苗之製造，及含 Hib 接合型疫苗的混合疫苗之製造。

【符號說明】

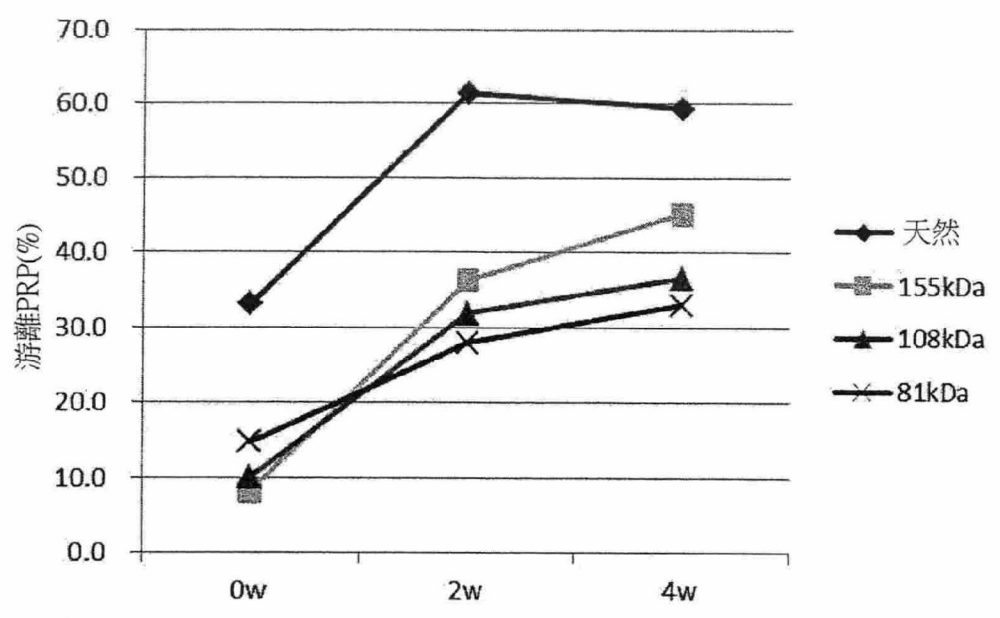
無。

申請專利範圍

1. 一種藉由聚磷酸核糖基核糖醇(PRP)與載體蛋白質進行結合反應而調製 PRP 接合物之方法，係藉由使用比天然 PRP 更低分子化之 PRP，而抑制 PRP 從調製後之 PRP 接合物游離，並且，包含 PRP 接合物於調製後保存在 pH5.4 至 6.3 之溶液中。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中於 pH5.4 至 6.3 之溶液，37°C、4 週之苛酷試驗中，游離 PRP 含量小於 50%。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，其中 PRP 之低分子化的方法為物理性破碎。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，其中 PRP 之低分子化的方法為藉由酸或鹼水解。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，其中低分子化之 PRP 的分子量為 80 至 150kDa。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，其中在調製 PRP 接合物之結合反應中，PRP 及載體蛋白質係以重量比 2：1 至 4：1 付諸於反應。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中 PRP 及載體蛋白質係以重量比 4：1 付諸於反應。
8. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，包含在調製 PRP 接合物之結合反應前，使用 1-氰基-4-(二甲基胺基)吡啶四氟硼酸鹽(CDAP)使低分子化之 PRP 活化的步驟。
9. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之方法，其中載體蛋白

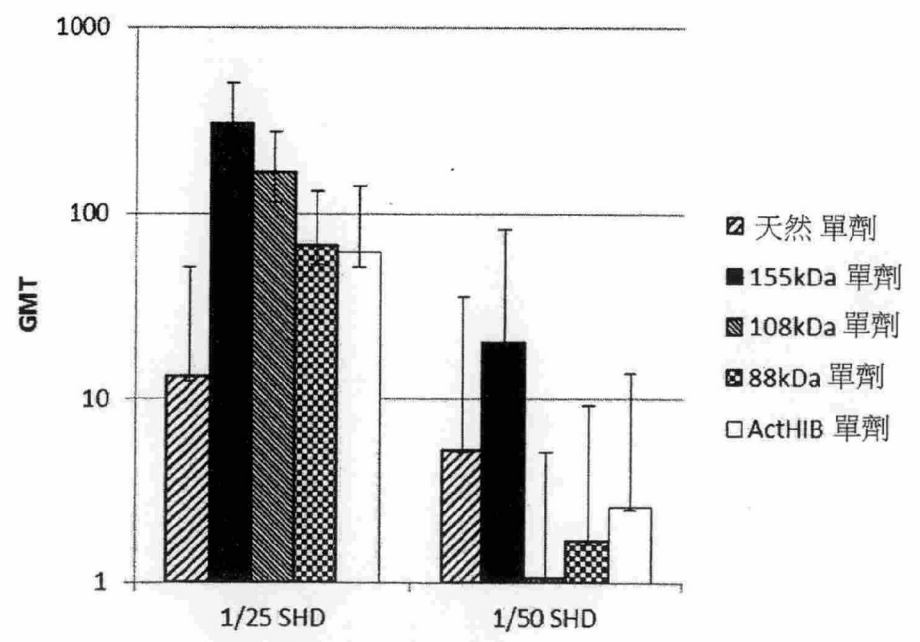
- 質係破傷風類毒素。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中破傷風類毒素之純度為 2,500 至 3,500LF/mgPN。
 11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中破傷風類毒素之純度為 2,900 至 3,300LF/mgPN。
 12. 一種流感嗜血桿菌 b 型菌(Hib)接合型疫苗之製造方法，包含：藉由聚磷酸核糖基核糖醇(PRP)與載體蛋白質進行結合反應而調製 PRP 接合物之方法，其係藉由使用比天然 PRP 更低分子化之 PRP，而抑制 PRP 從調製後之 PRP 接合物游離，並且，包含 PRP 接合物於調製後保存在 pH5.4 至 6.3 之溶液中。
 13. 一種以如申請專利範圍第 12 項所述之製造方法所製造之 Hib 接合型疫苗之用途，係用於製造混合疫苗。
 14. 一種以如申請專利範圍第 12 項所述之製造方法所製造之 Hib 接合型疫苗之用途，係用於製造與沉降精製之百日咳、白喉、破傷風及不活化小兒麻痺之混合疫苗合製成的五合一混合疫苗。

圖式

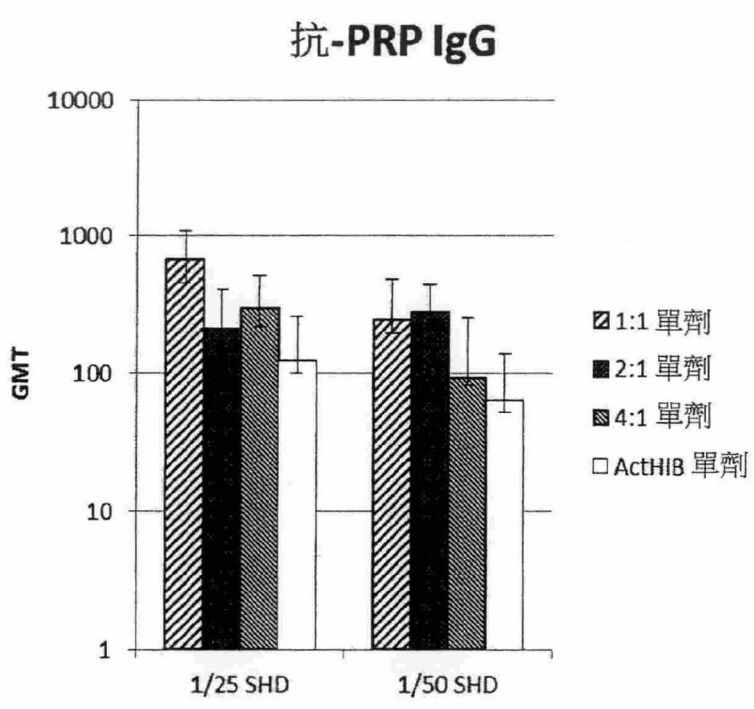


第1圖

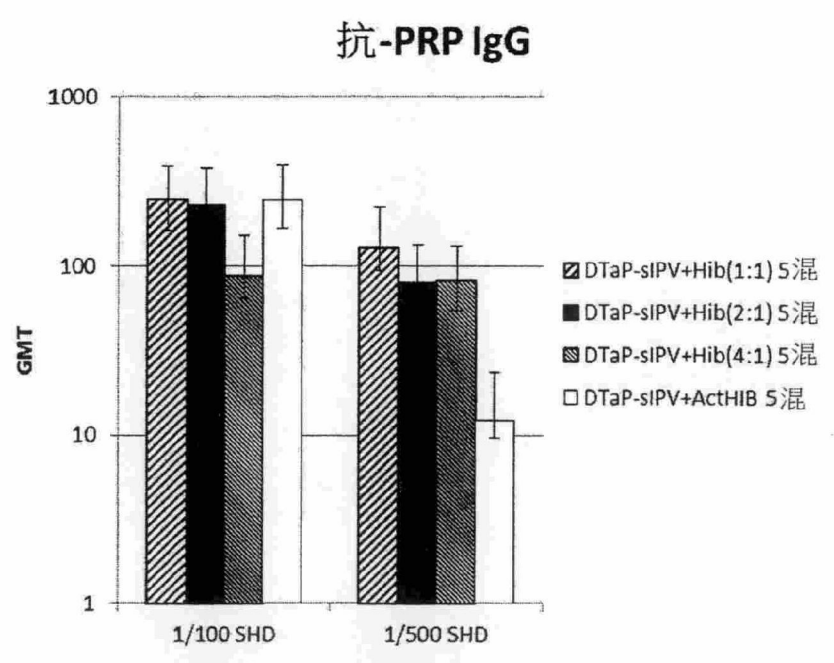
抗-PRP IgG



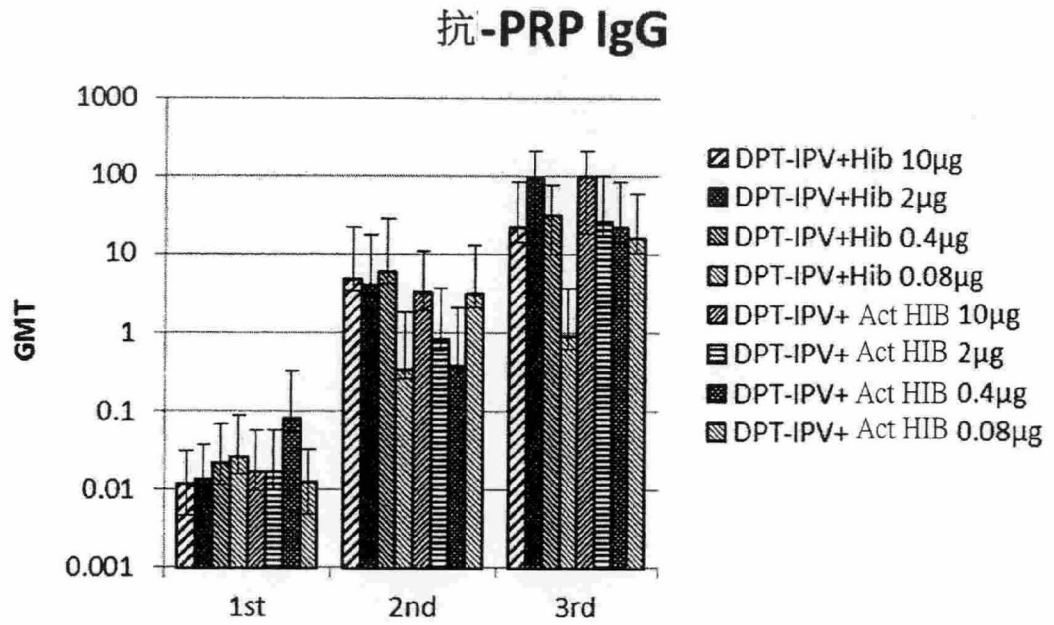
第2圖



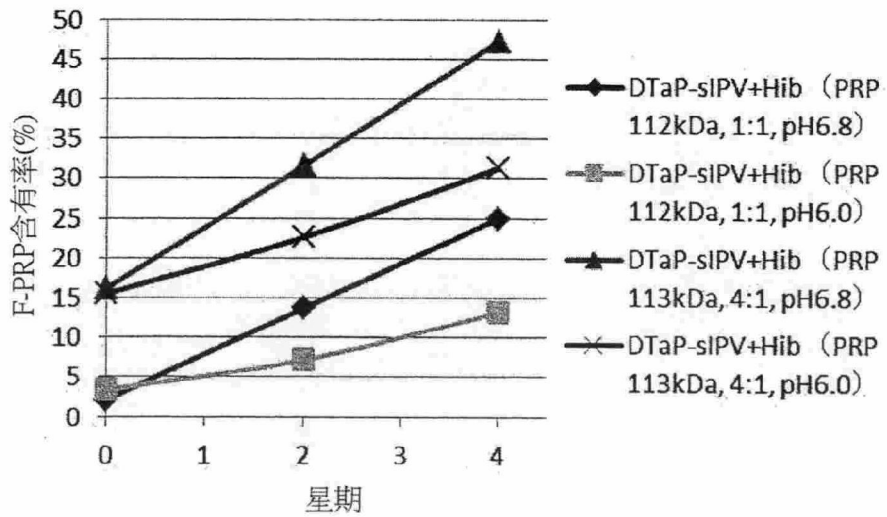
第3圖



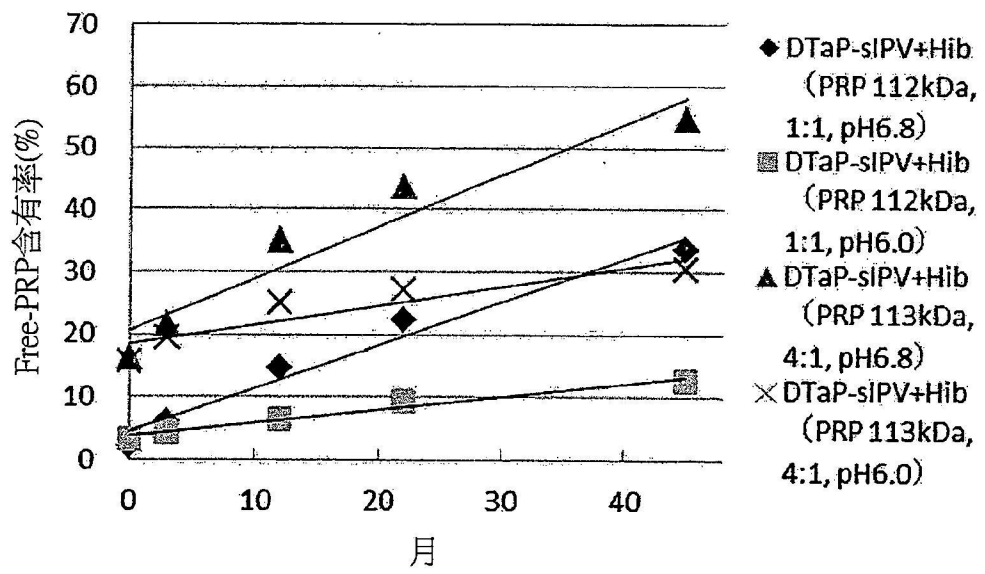
第4圖



第5圖



第6圖



第7圖