

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6611720号

(P6611720)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/145 (2006.01)
A 6 1 K 47/36 (2006.01)
A 6 1 P 31/16 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 39/145
A 6 1 K 47/36
A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 37/04
A 6 1 K 47/26

請求項の数 19 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-540347 (P2016-540347)
(86) (22) 出願日 平成26年9月3日(2014.9.3)
(65) 公表番号 特表2016-535065 (P2016-535065A)
(43) 公表日 平成28年11月10日(2016.11.10)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/053902
(87) 国際公開番号 W02015/034924
(87) 国際公開日 平成27年3月12日(2015.3.12)
審査請求日 平成29年9月1日(2017.9.1)
(31) 優先権主張番号 61/873,032
(32) 優先日 平成25年9月3日(2013.9.3)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31) 優先権主張番号 61/873,419
(32) 優先日 平成25年9月4日(2013.9.4)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 505477235
ジョージア テック リサーチ コーポレ
イション
アメリカ合衆国 ジョージア 30332
ー0415, アトランタ, エヌ. ダブ
リュー., テンス ストリート 505
(74) 代理人 100079108
弁理士 稲葉 良幸
(74) 代理人 100109346
弁理士 大貫 敏史
(74) 代理人 100117189
弁理士 江口 昭彦
(74) 代理人 100134120
弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱安定性ワクチン製剤及びマイクロニードル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インフルエンザ抗原と、
マルトデキストリン 17、マルトデキストリン 4、マルトデキストリン 13、及びこれ
らの組み合わせからなる群から選択される賦形剤と、
を含み、
乾燥固体形態であり、
グリセロールを含まない、ワクチン組成物。

【請求項 2】

前記賦形剤が約 1 重量% ~ 約 20 重量% の量で存在する、請求項 1 に記載のワクチン組
成物。

【請求項 3】

インフルエンザ抗原と、
トレハロース及びマルトデキストリン 13、アルギニン及びマルトデキストリン 13、
ヘプタグルコン酸カルシウム及びマルトデキストリン 13、マルトデキストリン 13 及び
クエン酸ナトリウム、並びにマルトデキストリン 13 及び乳糖からなる群から選択される
賦形剤の配合物と、
を含み、
乾燥固体形態であり、
グリセロールを含まない、ワクチン組成物。

【請求項 4】

前記賦形剤の配合物が約 1 重量% ~ 約 20 重量%の全量で当該組成物中に存在する、請求項 3 に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

前記配合物の 2 種の前記賦形剤が約 1 : 15 ~ 約 15 : 1 の重量比で当該組成物中に存在する、請求項 3 に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

前記配合物の 2 種の前記賦形剤が約 1 : 1 の重量比で当該組成物中に存在する、請求項 3 に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

前記インフルエンザ抗原が、インフルエンザ A、インフルエンザ B、インフルエンザ C、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

前記インフルエンザ抗原が、全不活性化インフルエンザウイルス、分割不活性化インフルエンザウイルス、サブユニット不活性化インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス様粒子、またはこれらの組み合わせを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

更に 1 つ以上の補助剤を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

前記インフルエンザ抗原が、1 つ以上の前記賦形剤を伴わない前記インフルエンザ抗原を含む比較組成物と比較して、当該組成物中で 6 ヶ月間にわたり改善された安定性を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

前記インフルエンザ抗原が、1 つ以上の前記賦形剤を伴わない前記インフルエンザ抗原を含む比較組成物と比較して、当該組成物中で 3 ヶ月間にわたり改善された安定性を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

前記インフルエンザ抗原が、最高 40 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 50 %を維持する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 13】

前記インフルエンザ抗原が、最高 40 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 75 %を維持する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

前記ワクチン組成物が、溶解可能なマイクロニードルまたはマイクロニードルコーティングの形態である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 15】

前記マイクロニードルが約 100 μm ~ 約 2000 μm の高さを有する、請求項 14 に記載のワクチン組成物。

【請求項 16】

ワクチン組成物の調製方法であって、

インフルエンザ抗原、並びにマルトデキストリン 17、マルトデキストリン 4、マルトデキストリン 13、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される賦形剤を含む、水溶液を調製することと、

前記溶液を約 1 ~ 約 60 の温度で乾燥させて、乾燥固体ワクチン組成物を形成することと、

を含み、

前記ワクチン組成物にグリセロールを含めない、

方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

ワクチン組成物の調製方法であって、

インフルエンザ抗原、並びにトレハロース及びマルトデキストリン 13、アルギニン及びマルトデキストリン 13、ヘプタグルコン酸カルシウム及びマルトデキストリン 13、マルトデキストリン 13及びクエン酸ナトリウム、及びマルトデキストリン 13及び乳糖からなる群から選択される賦形剤の配合物を含む、水溶液を調製することと、

前記溶液を約 1 ~ 約 60 の温度で乾燥させて、乾燥固体ワクチン組成物を形成することと、

を含み、

前記ワクチン組成物にグリセロールを含めない、

方法。

10

【請求項 18】

前記水溶液が前記溶液の乾燥前にマイクロニードルのアレイを形成するための鑄型に注がれる、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

基材と、前記基材から延在し、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の前記ワクチン組成物を含むマイクロニードルのアレイと、を含む、経皮パッチ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本出願は、ワクチン、具体的にはインフルエンザ及びはしか用ワクチンで使用されるウイルスを安定化させるための製剤及び方法に関する。本出願は更に、溶解可能なマイクロニードルまたはコーティングされたマイクロニードル中での使用に好適なインフルエンザ及びはしかワクチンの乾燥固体製剤に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年9月4日出願の米国仮特許出願第61/873,419号、及び2013年9月3日出願の米国仮特許出願第61/873,032号に対する優先権を主張し、当該出願の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

30

連邦政府による資金提供を受けた研究開発に関する声明

本発明は、米国政府の資金提供により、国立衛生研究所からの契約番号第U01EB012495号下で行われた。

【背景技術】

【0004】

世界保健機構(WHO)による統計は、各年、数百万人の人々が伝染病を患うことを示す。例えば、インフルエンザは毎年3百~5百万人で重篤な疾患を引き起こすと見積もられ、25万~50万件もの死亡をもたらす。はしかは毎年2千万人を超える人々に感染すると見積もられ、15万件を超える死亡をもたらす(ほとんどが5歳未満の小児)。これらの感染を防ぐ主要な手段は、ワクチン接種キャンペーンの成功である。

40

【0005】

例えば、WHOの見積もりによると、はしか伝染の妨害には、90%を超えるワクチン適用範囲率が必要とされる。この高いバーは、強いワクチン、及びワクチン製造業者と、公衆衛生専門家と、現場でワクチンを投与する医療従事者との間の協調した努力を必要とする。したがって、かかるワクチンの広い普及をより困難にする多くの障害がある。

【0006】

はしか生ワクチンは1960年代初頭以来入手可能であり、正しく与えられた場合非常に有効であるが、それはヒトへの使用に承認された生ワクチンの中でより不安定なものの1つであると考えられるので、保存条件がその広い普及を妨げる場合がある。WHOの見積もりによると、現場に送達されたはしかワクチンストックの60%超が、損傷、取り扱

50

いミス、または不適切な再構成のために利用することができない。

【0007】

インフルエンザワクチンは、現在2～8℃の温度で維持されなければならない液体製剤中でのみ入手可能であり、同様の障害に直面している。したがって、改善された安定性を有し、より容易に輸送され、集団ワクチン接種にとってより便利な、ワクチンの生成を可能にするワクチンの乾燥固体製剤について要求がある。この要求にも関わらず、乾燥ワクチン製剤の開発は、考慮する必要がある多くの変数を含む。例えば、Chen et al., "Opportunities and challenges of developing thermostable vaccines," Expert Rev. Vaccines 8(5), 547-557 (2009)を参照のこと。

10

【0008】

乾燥ワクチン製剤の調製に関連する鍵となる考慮のいくつかとして、様々な熱及び機械的ストレスへのウイルスの曝露、並びにそれらの損傷を最小限にするための賦形剤の選択が挙げられる。更に、製剤構成要素は選択される加工方法と適合性でなければならない。

【0009】

凍結乾燥及び噴霧乾燥は、製薬産業において活性医薬成分（API）溶液を乾燥させる最も広く使用されている方法のうちの2つである。凍結乾燥は、はしかワクチンを含む、いくつかの市販のAPI製品を生成するために使用されてきた。不安定な生体分子に対して凍結乾燥プロセスを使用することの困難として、2、3の例を挙げれば、ウイルスの低温への曝露、ウイルス粒子の氷結晶表面への吸着、及び脱水ストレスがある。

20

【0010】

噴霧乾燥は、凍結乾燥などの他のタンパク質保存/乾燥技術に優って、高体積生成物スループット（>5,000lb/時間）及び製造時間の減少を与える利点を有する。ウイルスなどの熱不安定性APIを安定化させるために噴霧乾燥を使用することの困難として、3つの鍵となる領域、霧吹き条件、乾燥条件、及び得られた乾燥材料の固体状態性質、の制御が挙げられる。例えば、霧吹き中に液体流を破壊して微細液滴にするプロセスは、製品に適用される過剰のせん断応力、表面張力、及び圧力を含む場合があり、生理活性の損失をもたらす。別の困難として、液滴乾燥速度の制御及び各液滴内での構成要素とのその相互作用が挙げられる。プロセスパラメータ、例えば乾燥速度及び液滴サイズ、並びに製剤構成要素、例えば表面活性及び分子サイズ（すなわち、拡散速度）に依存して、粒子サイズ、表面組成、及び表面形態を含む得られる乾燥粒子の性質を操作することは可能である。生物製剤の保存安定性は一般的に噴霧乾燥粒子の多孔性及び表面領域によってはもちろん、その表面の濃縮度によって影響されるので、この制御は重要である。それゆえ、最も通常使用されている脱水技術と関連付けられる多くの不利益を含む、多くの不利益は、最も広く使用されているワクチン製剤調製方法と関連付けられる。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

それゆえ、単純な、便利な、投与が簡単な、投与量提示を提供することによる、より安定で、かつ集団ワクチン接種により適合した、改善されたインフルエンザワクチン製剤及び改善されたはしかワクチン製剤を提供することは望ましいであろう。乾燥安定ワクチン製剤を調製するための改善された方法を提供することも望ましいであろう。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、改善された安定性を有するインフルエンザ及びはしかワクチンの乾燥固体製剤を提供することによる上記要求及び必要の1つ以上に取り組む。それらの調製方法も、それらの患者への投与のためのデバイス及び方法と共に提供される。

【0013】

一態様では、インフルエンザ抗原と、マルトデキストリン17、マルトデキストリン4、アルギニン、マルトース、ヒスチジン、ヘプタグルコン酸カルシウム、マルトデキスト

50

リン 13、ヘパリン、ラフィノース、ミオイノシトール、ショ糖、ソルビトール、アラビトール、果糖、グルコン酸カリウム、アドニトール、キシリトール、チオ硫酸ナトリウム、アスパラギン、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、T R I S、クエン酸ナトリウム、ズルシトール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される賦形剤とを含む、ワクチン組成物が提供される。

【0014】

別の態様では、インフルエンザ抗原と、トレハロース及びアルギニン、トレハロース及びヘプタグルコン酸カルシウム、トレハロース及びマルトデキストリン 13、ショ糖及びアルギニン、アルギニン及びヘプタグルコン酸カルシウム、アルギニン及びマルトデキストリン 13、ヘプタグルコン酸カルシウム及びマルトデキストリン 13、マルトデキストリン 13 及びクエン酸ナトリウム、マルトデキストリン 13 及び乳糖、並びにソルビトール及びクエン酸ナトリウムからなる群から選択される賦形剤の配合物とを含む、ワクチン組成物が提供される。

10

【0015】

さらに別の態様では、はしか抗原と、セリン、ショ糖、アスパラギン、グリシン、トレオニン、ヒスチジン、トレハロース、プロリン、ソルビトール、マルトース、タウリン、ズルシトール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される賦形剤とを含む、ワクチン組成物が提供される。

【0016】

別の態様では、ワクチン組成物は、はしか抗原と、アミノ酸及び炭水化物を含む賦形剤の配合物とを含む。アミノ酸は、セリン、アスパラギン、グリシン、トレオニン、ヒスチジン、プロリン、タウリン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択してよい。炭水化物は、ショ糖、トレハロース、ソルビトール、マルトース、ズルシトール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択してよい。

20

【0017】

また別の態様では、提供されるワクチン組成物の 1 つを含むマイクロニードルのアレイを含む、経皮パッチが提供される。

【0018】

別の態様では、インフルエンザ抗原またははしか抗原のいずれか、及び 1 つ以上の特定の賦形剤または賦形剤の配合物を含む水溶液を調製することと、この溶液を環境温度で乾燥させて乾燥固体ワクチン組成物を形成することとを含む、ワクチン組成物の調製方法が提供される。

30

【0019】

更なる態様では、患者にワクチン接種する方法が提供される。一実施形態では、この方法は患者の皮膚の角質層を介して 1 つ以上のマイクロニードルを挿入することを含み、ここで、この 1 つ以上のマイクロニードルは提供されるワクチン組成物の 1 つを含む。別の実施形態では、この方法は、生理学的に許容される液体媒体中で、提供されるワクチン組成物の 1 つを再構成して注入可能な溶液または懸濁液を形成することと、この注入可能な溶液または懸濁液を患者に投与することとを含む。

【0020】

40

追加の態様は、部分的には以下の説明で示され、部分的にはこの説明から明らかであり、あるいは以下に説明する態様の実施により理解され得る。以下に説明する利点は、付属の特許請求の範囲で特に示される要素及び組み合わせの手段により実現され、得られるであろう。上記一般的な説明及び以下の詳細な説明の両方は単に例示及び説明であり、限定ではないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図 1】図 1 は、一実施形態に従う、ワクチン組成物を含む複数のマイクロニードルの側面図である。

【図 2】図 2 は、様々なワクチン製剤の乾燥後に残る相対的赤血球凝集素 (H A) 活性を

50

示す棒グラフである。

【図 3】図 3 は、個々の賦形剤と比較した賦形剤の様々な配合物の乾燥後に残る相対的 H A 活性を示す棒グラフである。

【図 4】図 4 は、様々な期間の保存後の、様々なワクチン製剤の乾燥後に残る相対的 H A 活性を示す線グラフである。

【図 5】図 5 は、マイクロニードルパッチ中の様々な三価サブユニットインフルエンザワクチン製剤の乾燥後、及び様々な期間の保存後の、H A 活性を示す棒グラフである。

【図 6】図 6 は、マイクロニードルパッチ中の様々な一価サブユニットインフルエンザワクチン製剤の乾燥後、及び様々な期間の保存後の、H A 活性を示す棒グラフである。

【図 7】図 7 は、マイクロニードルパッチ中の一価サブユニットワクチン製剤の乾燥後、及び様々な期間の加速保存後に残る、相対的 H A 活性を示す棒グラフである。

【図 8】図 8 は、様々な賦形剤を伴う様々なはしかワクチン製剤の乾燥、及び 3 7 で 1 週間の保存後に残る、相対的 e G F P - M e V 活性を示す棒グラフである。

【図 9】図 9 は、様々な賦形剤を伴う様々なはしかワクチン製剤の乾燥、及び 3 7 で 1 ヶ月間の保存後に残る、相対的 e G F P - M e V 活性を示す棒グラフである。

【図 10】図 10 は、賦形剤の配合物を伴う様々なワクチン製剤の乾燥、及び 3 7 で 1 ヶ月間の保存後に残る、相対的 e G F P - M e V 活性を示す棒グラフである。

【図 11】図 11 は、賦形剤の配合物を伴う様々なワクチン製剤の乾燥、及び 4 5 で 1 ヶ月間の保存後に残る、相対的 e G F P - M e V 活性を示す棒グラフである。

【図 12】図 12 は、トレオニン及びショ糖の配合物を含むワクチン製剤の乾燥、並びに様々な期間及び温度での保存後に残る、相対的 e G F P - M e V 活性を示す線グラフである。

【図 13】図 13 A ~ C は、再構成された市販のはしかワクチン（図 13 A）及び市販の凍結乾燥はしかワクチン（図 13 B）と比較した、防湿ポーチ中で保存したマイクロニードルパッチ中の例示的なはしかワクチン製剤の安定性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

改善された安定性を有するインフルエンザまたははしか用ワクチン製剤の乾燥固体形態が開発された。薬学製剤での使用のための本分野で既知の多くの賦形剤の中から、どの賦形剤または賦形剤配合物が予想外にインフルエンザまたははしか抗原に改善された熱安定性を提供するかを特定するために、スクリーニングプロセスを使用した。ある特定の賦形剤と混合した抗原を含むワクチン組成物の乾燥固体形態を提供することにより、通常、活性の損失及びワクチンの損傷と関連付けられる問題の多くを避けることができ、これによりワクチンの消耗を減少させ、ワクチン接種キャンペーンまたは他のワクチン接種シナリオで使用可能な製品の量を増大させることが発見された。

【0023】

本明細書中または本明細書の残りの部分で以下に特に指示がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味を有する。本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明する目的のためであるのみで、限定であるとは意図されないことも理解されるべきである。本発明の説明及び請求において、以下の用語は、以下に示される定義に従って使用されるであろう。

【0024】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、所与の量の値が示される値の 10 % 以内、または任意にその値の 5 % 以内、またはいくつかの実施形態ではその値の 1 % 以内の範囲の量を含んでよいことを示す。

【0025】

本明細書で使用される場合、用語「環境温度」は、約 16 ~ 約 27、またはより典型的には約 18 ~ 約 24、及び多くの場合約 22 などの、典型的な制御された室内温度を指す。

【0026】

10

20

30

40

50

「安定な」製剤または組成物は、その中の生物学的に活性な物質が、保存に際して本質的にその物理的安定性及び／または化学的安定性及び／または生物学的活性を保持する、製剤または組成物である。安定性は、選択された温度で選択された期間、測定してよい。物質が実際にその期間保存される前に、予想される棚寿命を見積もるために傾向分析を使用してよい。

【0027】

本明細書で使用される場合、本明細書で説明される固体ワクチン製剤についての用語「乾燥」または「乾燥させた」は、任意の水の実質的な部分が除去されて固体相組成物が生成される、組成物を指す。この用語は完全な水分の不在を必要としない。本明細書で説明されるワクチン組成物は一般的に、約0.1重量%～約25重量%の含水量を有する。

10

【0028】

本出願の実施形態は、乾燥固体製剤中に1つ以上の抗原及び1つ以上の選択された賦形剤を含むワクチン組成物を含む。この1つ以上の選択された賦形剤は、このワクチン組成物の乾燥及び保存中にこの1つ以上の抗原の安定性を有利に改善することが発見された。

【0029】

好ましい実施形態では、ワクチン組成物はマイクロニードルまたは別の物質から形成されたマイクロニードル上のコーティングの形態である。ワクチン組成物は、生物学的組織への、例えば患者の皮膚へのマイクロニードルの挿入後にインピボで可溶化されるようになる。それゆえ、製剤マイクロニードルまたは製剤コーティングは本明細書中で「溶解可能な」と言及される。代替の実施形態では、ワクチン製剤の乾燥固体形態は、粒子または患者への投与前の再構成に好適な他の形態であってよい。例えば、ワクチン組成物を、生理学的に許容される液体中で再構成して、中空針または中空マイクロニードルを介する注入に好適な溶液または懸濁液を生成してもよい。

20

【0030】

複数の溶解可能なマイクロニードルを有する例示的なマイクロニードルアレイを図1に示す。マイクロニードルアレイ10は、複数のマイクロニードル14を有する基礎基材12を含む。実施形態では、この複数のマイクロニードル14は、約100 μ m～約200 μ m、約100 μ m～約1500 μ m、約100 μ m～約1000 μ m、または約500 μ m～約1000 μ mの高さを有する。マイクロニードルのアレイは任意の好適な密度を有してよい。例えば、アレイ中のマイクロニードルを偶数行または互い違いの行で配置してよく、ここで各マイクロニードルはその最も近い近隣のマイクロニードルから、およそそのマイクロニードルの高さと同じ距離分、離れている。このアレイは本質的に任意の好適な数のマイクロニードルを含んでよい。一実施形態では、アレイのマイクロニードル中のワクチン組成物の総質量は、患者に予防として有効な量の抗原を送達するのに好適である。非限定的な例では、アレイは、5～10,000マイクロニードル、例えば50～1000マイクロニードル、または50～200マイクロニードルを含んでよい。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、溶解可能なマイクロニードルは、以下に説明する方法を用いて好適な鋳型中でワクチン組成物を乾燥させることにより形成することができる。他の実施形態では、ワクチン組成物は、金属、ポリマー、またはシリコンなどの生体適合性材料を含む1つ以上のマイクロニードル上にコーティングすることができる。かかるマイクロニードル及びそれらの製造方法の非限定的な例は、米国特許第6,334,856号及び米国特許公開第2008/0213461号で開示されている。

40

【0032】

ワクチン組成物は、生物学的に有効な量の1つ以上の抗原を含有してよい。本明細書で使用される場合、「生物学的に有効な量」は、所望の免疫学的応答を刺激または開始するために必要とされる1つ以上の抗原の量を指す。したがって、所望の免疫学的応答を達成するために必要とされる1つ以上の抗原の量は、抗原の型、送達部位（例えば、皮下または筋肉）、及び抗原の送達についての溶解及び放出速度論を含む様々な要因に依存して必然的に変化するであろう。例えば、実施形態では、ワクチン組成物が約1分間～約60分

50

間の溶解期間にわたりインピボで溶解するように調合されることは望ましい。本明細書で
使用される場合、「溶解の期間」または「溶解期間」は、溶解可能なマイクロニードルの
場合には、マイクロニードルが実質的に基礎基材から離れるように、マイクロニードルが
投与中に十分に湿るのにかかる時間、またはマイクロニードル上のコーティングの場合に
は、マイクロニードル上のコーティングが実質的に投与中にマイクロニードルから離れる
のにかかる時間を意味する。

【 0 0 3 3 】

インフルエンザワクチン製剤

実施形態では、抗原はインフルエンザ抗原である。抗原は、インフルエンザビリオンから調製し、または組換えホストで発現して精製形態で使用してよい。抗原は生きたウイルスまたは不活性化ウイルスの形態をとってよく、全ウイルス、分割ウイルス、サブユニットウイルス、またはウイルス様粒子であってよい。例えば、インフルエンザ抗原は全不活性化インフルエンザウイルス、分割不活性化インフルエンザウイルス、サブユニット不活性化インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス様粒子、またはこれらの組み合わせであってよい。

【 0 0 3 4 】

インフルエンザ抗原は、インフルエンザ A、インフルエンザ B、またはインフルエンザ C として分類されるインフルエンザウイルスの 1 つ以上の株を含んでよい。組成物は 1 つの抗原 (一価)、2 つの抗原 (2 価)、3 つの抗原 (三価 / 3 価)、または 4 つ以上の抗原 (4 価または n 価) を含んでよい。例えば、実施形態では、インフルエンザ抗原は、2 つのインフルエンザ A 株及び 1 つのインフルエンザ B 株の組み合わせ、または 2 つのインフルエンザ A 株及び 2 つのインフルエンザ B 株の組み合わせであってよい。インフルエンザ A 株の非限定的な例として、赤血球凝集素 (H A) サブタイプ、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 10、H 11、H 12、H 13、H 14、H 15、H 16、H 17、または H 18、及び受容体破壊酵素 (N A) サブタイプ、N 1、N 2、N 3、N 4、N 5、N 6、N 7、N 8、または N 9 が挙げられる。インフルエンザ抗原の特定の株は、H 1 N 1、H 2 N 2、H 3 N 2、H 5 N 1、H 5 N 3、H 7 N 1、H 7 N 7、H 7 N 9、または H 9 N 2 を含んでよい。

【 0 0 3 5 】

ワクチン製剤中の 1 つ以上のインフルエンザ抗原の量は、所望の免疫学的応答を得るように調節してよい。実施形態では、生物学的に有効な量インフルエンザ抗原は、1 株のインフルエンザ抗原当たり約 1 μ g ~ 約 100 μ g の H A であってよい。例えば、用量節約インフルエンザワクチン中のインフルエンザ抗原の生物学的に有効な量は 1 株のインフルエンザ抗原当たり約 1 μ g ~ 約 10 μ g の H A であってよく、季節性インフルエンザワクチンの通常用量中のインフルエンザ抗原の生物学的に有効な量は 1 株のインフルエンザ抗原当たり約 15 μ g の H A であってよく、または季節性インフルエンザワクチンの高用量中のインフルエンザ抗原の生物学的に有効な量は 1 株のインフルエンザ抗原当たり約 60 μ g の H A であってよい。例えば、三価ワクチン中の各株の H A 含有量は単回のヒト用量について 15 μ g、すなわち 45 μ g の全 H A に設定される。

【 0 0 3 6 】

インフルエンザワクチン組成物は更に、任意の賦形剤を伴わないインフルエンザ抗原の乾燥固体製剤と比較して、乾燥固体製剤中でインフルエンザ抗原の安定性を増大させることが発見されている 1 つ以上の選択された賦形剤を含む。実施形態では、インフルエンザ抗原の安定性を増大させる賦形剤として、マルトデキストリン 17、マルトデキストリン 4、アルギニン、トレハロース、マルトース、ヒスチジン、ヘプタグルコン酸カルシウム、マルトデキストリン 13、ヘパリン、ラフィノース、ミオイノシトール、ショ糖、ブドウ糖、乳糖、ソルビトール、アラビトール、果糖、グルコン酸カリウム、シクロデキストリン - 、アドニトール、キシリトール、チオ硫酸ナトリウム、アスパリジン、2 - ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン、T R I S、クエン酸ナトリウム、及びズルシトールが挙げられる。賦形剤は、約 1 重量 % ~ 約 90 重量 %、約 2 重量 % ~ 約 75 重量 %

10

20

30

40

50

、約 5 重量%～約 50 重量%、または約 5 重量%～約 20 重量%の量でワクチン組成物中に存在してよい。

【0037】

特定の実施形態では、インフルエンザワクチン組成物は更に、任意の賦形剤を伴わないインフルエンザ抗原の乾燥固体製剤と比較して、乾燥固体製剤中でインフルエンザ抗原の安定性を増大させることが発見されている 2 つ以上の賦形剤の選択された配合物を含む。特定の実施形態では、2 つ以上の賦形剤の配合物は驚くべきことに、任意の賦形剤単独の効果より大きな効果を提供し、いくつかの場合、インフルエンザ抗原の安定性に対して多数の賦形剤の付加的効果より大きい効果を提供する。実施形態では、インフルエンザ抗原の安定性を増大させる賦形剤の配合物は、トレハロース及びアルギニン、トレハロース及びヘプタグルコン酸カルシウム、トレハロース及びショ糖、トレハロース及びマルトデキストリン 13、ショ糖及びアルギニン、アルギニン及びヘプタグルコン酸カルシウム、アルギニン及びマルトデキストリン 13、ヘプタグルコン酸カルシウム及びマルトデキストリン 13、マルトデキストリン 13 及びクエン酸ナトリウム、マルトデキストリン 13 及び乳糖、並びにソルビトール及びクエン酸ナトリウムを含む。

10

【0038】

賦形剤の配合物は、約 1 重量%～約 90 重量%の全量で組成物中に存在してよい。例えば、賦形剤の配合物は、約 2%～約 75%、約 5%～約 50%、または約 5%～約 20%の全量で組成物中に存在してよい。配合物中の各賦形剤の割合は変化してよい。ある特定の実施形態では、2 つの賦形剤の配合物中の賦形剤は、約 1:15～約 15:1 の比でワクチン組成物中に存在する。例えば、配合物の賦形剤は、約 1:9～約 9:1、約 1:2、または約 1:1 の比で組成物中に存在してよい。

20

【0039】

実施形態では、ワクチン組成物は更に、抗原に対する患者の免疫応答を増大させる 1 つ以上の補助剤を含む。好適な免疫応答増強補助剤として、アルミニウムゲルまたはアルミニウム塩が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、補助剤は、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、または硫酸アルミニウムカリウムであってよい。追加の補助剤は、ポリ(I:C)、イミキモド、及び本分野で既知の他のものを含んでよい。

【0040】

本明細書で提供されるインフルエンザワクチン組成物は有利に、改善された安定性を有することを特徴とし得る。本明細書で使用される場合、インフルエンザワクチン組成物の「改善された安定性」は、一元放射免疫拡散法(SRID)または酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて、所与の時間及び温度での保存後に水溶液中に溶解された場合の組成物のHA活性を測定することにより決定することができる。例えば、ELISAは、株特異的抗体をマイクロウェルプレート上にコーティングし、ワクチン水溶液をインキュベートして標的抗原が固定された抗体に結合することを可能にする、典型的なサンドイッチELISAであってよい。次いで、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合させた別の株特異的抗体を標的抗原に結合させる。これらのマイクロウェルに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を添加することにより、HRPを青色シグナルに変換し、これを読んで対照と比較することができる。

30

40

【0041】

例えば、本ワクチン組成物は、賦形剤を伴わないインフルエンザ抗原を含む比較組成物と比較して1ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して3ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して6ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して9ヶ月間にわたり、またはかかる比較組成物と比較して1年間にわたり、組成物中で改善された安定性を有するインフルエンザ抗原により特徴付けることができる。

【0042】

いくつかの実施形態では、組成物の安定性は、インフルエンザ抗原の最初の活性と比較した、室温での、または最高40℃の高温での保存後のインフルエンザ抗原の相対的活性により示される。例えば、組成物の安定性は、最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後に

50

その活性の少なくとも50%、最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも60%、最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも70%、最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも75%、最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも80%、または最高40℃の温度での3ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも90%を維持するインフルエンザ抗原により特徴付けることができる。

【0043】

はしかワクチン製剤

別の態様では、抗原は、はしか抗原である。抗原は生きたウイルスまたは不活性化ウイルスの形態をとってよく、はしか抗原は典型的に生きた弱毒化ウイルスの形態である。いくつかの実施形態では、はしか抗原は、おたふく風邪抗原、風疹抗原、水痘抗原、またはこれらの組み合わせ（その各々は最も通常には生きた弱毒化ウイルスの形態である）と混合してよい。

【0044】

ワクチン組成物中のはしか抗原の量は、所望の免疫学的応答を得るように調節してよい。例えば、ワクチン中のはしか含有量は典型的に、単回のヒト用量について1000 TCID₅₀ ~ 約10⁷ TCID₅₀（TCID₅₀は組織培養感染用量中央値として定義される）に設定される。例えば、ワクチン組成物中のはしかワクチンの生物学的に有効な量は、約1⁷ TCID₅₀であり得る。

【0045】

はしかワクチン組成物は更に、任意の賦形剤を伴わないはしか抗原の乾燥固体製剤と比較して、乾燥固体製剤中のはしか抗原の安定性を増大させることが発見されている1つ以上の選択された賦形剤を含む。実施形態では、はしか抗原の安定性を増大させる賦形剤として、セリン、ショ糖、アスパラギン、グリシン、トレオニン、ヒスチジン、トレハロース、プロリン、ソルビトール、マルトース、タウリン、ズルシトール、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0046】

特定の実施形態では、はしかワクチン組成物は更に、1つ以上のアミノ酸及び炭水化物を含む、選択された賦形剤配合物を含む。ある特定の実施形態では、この配合物は、セリン、アスパラギン、グリシン、トレオニン、ヒスチジン、プロリン、タウリン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸、並びにショ糖、トレハロース、ソルビトール、マルトース、ズルシトール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上の炭水化物を含む。好ましい実施形態では、アミノ酸はタウリンまたはトレオニンを含み、炭水化物はショ糖、トレハロース、またはソルビトールを含む。はしか抗原を安定化させるのに有効な他の賦形剤配合物は、トレオニン及びショ糖、トレオニン及びトレハロース、トレオニン及びソルビトール、アスパラギン及びトレハロース、アスパラギン及びソルビトール、セリン及びショ糖、セリン及びソルビトール、グリシン及びショ糖、グリシン及びトレハロース、ヒスチジン及びショ糖、タウリン及びショ糖、並びにタウリン及びトレハロースを含む。

【0047】

賦形剤の配合物は、約1重量% ~ 約90重量%の全量ではしかワクチン組成物中に存在してよい。例えば、賦形剤の配合物は、約2 ~ 約75%、約5% ~ 約50%、または約5% ~ 約20%の全量で組成物中に存在してよい。配合物中の各賦形剤の割合は変化してよい。ある特定の実施形態では、2つの賦形剤の配合物中の賦形剤は、約1 : 15 ~ 約15 : 1の比でワクチン組成物中に存在する。例えば、配合物の賦形剤は、約1 : 9 ~ 約9 : 1、約1 : 2、または約1 : 1の比で組成物中に存在してよい。

【0048】

本明細書で提供されるはしかワクチン組成物は有利に、改善された安定性を有することを特徴とし得る。本明細書で使用される場合、はしかワクチン組成物の「改善された安定性」は、所与の時間及び温度での保存後に組織培養感染アッセイ（TCID₅₀）を用い

10

20

30

40

50

ることにより決定することができる。あるいは、改善された安定性は、実施例 8 で説明するように複製に際して G F P を生成する遺伝子改変はしか変異体を用いて決定することができる。

【 0 0 4 9 】

例えば、ワクチン組成物は、はしか抗原が、賦形剤を伴わないはしか抗原を含む比較組成物と比較して組成物中で 1 ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して 3 ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して 6 ヶ月間にわたり、かかる比較組成物と比較して 9 ヶ月間にわたり、またはかかる比較組成物と比較して 1 年間にわたり、改善された安定性を有することを特徴とし得る。

【 0 0 5 0 】

実施形態では、組成物の安定性は、はしか抗原の最初の活性と比較した、室温で、または最高 4 0 の高温での保存後のはしか抗原の相対的活性により示すことができる。例えば、組成物の安定性は、最高 4 0 の温度での 1 週間の保存後にその活性の少なくとも 1 0 %、最高 4 0 の温度での 1 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 1 0 %、最高 4 0

の温度での 1 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 2 5 %、最高 4 0 の温度での 1 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 5 0 %、最高 4 0 の温度での 1 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 8 0 %、最高 4 0 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 1 0 %、最高 4 0 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 5 0 %、最高 4 0 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 8 0 %、最高 4 0 の温度での 6 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 1 0 %、最高 4 0 の温度での 3 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 5 0 %、または最高 4 0 の温度での 6 ヶ月間の保存後にその活性の少なくとも 8 0 % を維持するはしか抗原により特徴付けることができる。

【 0 0 5 1 】

製造方法

本明細書中で説明するインフルエンザ及びはしかワクチン製剤は一般的に、好適な基材上で抗原及び選択された賦形剤（複数可）を含む水溶液を乾燥させることにより調製される。この水溶液は、水性緩衝塩を含む溶液中で 1 つ以上の抗原及び 1 つ以上の賦形剤を混合することにより調製することができ、この溶液の非限定的な例として、H E P E S、酢酸アンモニウム、リン酸緩衝食塩水、及び二塩基性リン酸カリウムが挙げられる。

【 0 0 5 2 】

この水溶液は様々な好適な基材上で乾燥させてよいが、しかしながら、基材は乾燥プロセス中の抗原活性の損失を最小限にするように選択されることが好ましい。例えば、水溶液は、金属基材、ポリマー基材、シリコン基材、または織物基材上で乾燥させてよい。実施形態では、水溶液は、ポリジメチルシロキサン（P D M S）基材上で乾燥される。一実施形態では、基材は 1 つ以上のマイクロニードルを形成するための鋳型である。

【 0 0 5 3 】

水溶液は、任意の好適な温度及び圧力条件で乾燥させてよく、これらは好ましくは抗原の生物学的活性を維持するように選択される。好ましい実施形態では、水溶液は環境温度でワクチン組成物の乾燥固体形態を形成するのに十分な時間、乾燥される。例えば、水溶液を環境温度で約 3 0 分間～約 1 週間の期間、乾燥させて、乾燥固体ワクチン製剤を形成させることができる（例えば、約 4 5 分間～約 1 週間、約 1 時間～約 1 週間、約 1 時間～約 1 日間など）。他の実施形態では、水溶液を、真空乾燥、または空気乾燥及び真空乾燥の組み合わせを用いて乾燥させてよい。様々な温度及び湿度レベルが水溶液を乾燥させるために使用され得るが、製剤は好ましくは 1 ～ 6 0 の温度（例えば、1 5 ～約 4 5、約 2 5 ～約 4 5、またはおよそ環境温度で）及び 0 ～ 1 0 % 相対湿度で乾燥される。

【 0 0 5 4 】

ワクチン組成物が溶解可能なマイクロニードルの形態である一実施形態では、水溶液は、マイクロニードルまたはマイクロニードルのアレイを形成するための鋳型に注がれ、その後、溶液が乾燥される。本明細書で使用される場合、水溶液を「注いだ」または「注ぐ

10

20

30

40

50

こと」は、水溶液で鋳型を充填する任意の好適な方法を含み、その例として沈積、コーティング、印刷、噴霧、及びマイクロフィリング技術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

製剤がコーティングされたマイクロニードルの形態である実施形態では、マイクロニードルまたはマイクロニードルアレイは、例えば米国特許公開第2008/0213461号で説明される浸漬コーティング法を用いて、水溶液でコーティングされ、その後、溶液が乾燥される。

【0056】

製造後で使用前に、ワクチン組成物は包装され、例えば約2 ~ 約8 の温度の冷蔵で、例えば0 未満の温度の冷凍庫で、環境温度で、または例えば最高50 の非制御温度で、保存される。保存は、製品の棚寿命の間、または製品の棚寿命未満の期間であってよい。ワクチンバイアルモニターまたは他の温度指示器を、ワクチン組成物が許容されるレベルの熱曝露を超えた場合を特定するために使用してよい。有利に、本明細書で提供されるワクチン組成物は、汚染、分解、及びワクチン組成物が可変温度に曝露された場合に起こりうる活性損失を最小限にすることにより、以前から存在している製剤より大きな熱安定性を与える。したがって、本明細書で提供されるワクチン組成物の保存温度は、以前から存在している製剤についてより、重要でない。

【0057】

投与方法

本明細書で提供されるインフルエンザ及びはしかワクチン製剤は任意の好適な手段により患者に投与することができる。本明細書で使用される場合、用語「患者」は典型的に、ワクチン接種を必要とする小児または成人ヒトを指す。好適な投与方法の例として、注入及び/またはマイクロニードルを介した経皮送達が挙げられる。例えば、患者は、患者の皮膚の角質層を介して、ワクチン組成物から形成された、またはワクチン組成物でコーティングされた、1つ以上のマイクロニードルを挿入することによりワクチン接種され得る。

【0058】

別の例では、ワクチン組成物は、生理学的に許容される液体媒体中で再構成されて、注入可能な溶液または懸濁液を形成し、次いで、この注入可能な溶液または懸濁液は患者に注入される。ワクチン製剤は皮下用シリンジ中で直接的に、または滅菌バイアルもしくは他の容器中で再構成してよい。次いで、再構成されたワクチン組成物は、例えば筋内、皮内、または皮下注入により患者に注入され得る。

【0059】

本発明の実施形態は更に、以下の非限定的な例を参照して理解することができる。

【0060】

実施例1

インフルエンザワクチンの溶液を、様々な界面活性剤を用いていずれかがインフルエンザ抗原活性に負の影響を与えるかどうかを特定するために調製した。界面活性剤(Lutrol F68、Tween20、SDS、CTAB、CHAPS)を他の賦形剤を伴わないサブユニットインフルエンザワクチン溶液(B/Brisbane/60/2008、60 µg/mL HA)に添加し、これらをステンレススチール表面上にて環境温度で40分間乾燥させた。続いてワクチンを塩溶液中に再溶解した。この溶液を、HA活性を測定するために酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で評価し、乾燥させなかったワクチンストックと比較した。対照溶液に対する界面活性剤の効果を考慮した場合、乾燥後にワクチン安定性について試験した界面活性剤のいずれの間でも有意差は見られなかった(データは示されていない)。

【0061】

実施例2

サブユニットインフルエンザワクチン(B/Brisbane/60/2008、60

10

20

30

40

50

μg/mL HA) を、150 mM 酢酸アンモニウム中で15% w/vの濃度で様々な可能性のある賦形剤と混合した(表1)。これらの溶液をポリジメチルシロキサン表面上にて環境温度で乾燥させ、乾燥剤を伴って全体で24時間保存した。次いで、このワクチンを塩溶液中に再溶解し、実施例1で説明するように活性について分析した。

【表1】

表1：試験した賦形剤

マルトデキストリン4	アスパラギン	ヒト血清アルブミン1 (付属する脂肪酸及びイモングロブリンを含む血液から)
アルギニン	2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン	トリプトファン
トレハロース	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (TRIS)	チロシン
マルトース	クエン酸ナトリウム	セリン
ヒスチジン	ズルシトール	ウシ血清アルブミン
ヘプタグルコン酸カルシウム	クエン酸カリウム	クレアチン
マルトデキストリン13	卵白アルブミン	ロイシン
ショ糖	グリシン	硫酸カリウム
ブドウ糖	メチルグルコシド	コハク酸ナトリウム
ヘパリン	シクロデキストリン-β	イソロイシン
ラフィノース	リジン	乳酸エチル
ミオイノシトール	リン酸ナトリウム	フェニルアラニン
乳糖	バリン	アラビノース
ソルビトール	トレオニン	リン酸カリウム
アラビトール	ガラクトース	キシロース
果糖	アラニン	亜硫酸カリウム
シクロデキストリン-γ	メチオニン	システイン
グルコン酸カリウム	プロリン	グリセロール
アドニトール	マンニトール	チオグリコール酸ナトリウム
キシリトール	ヒト血清アルブミン2 (脂肪酸及び免疫グロブリンを伴わない精製されたもの)	
チオ硫酸ナトリウム	グルタミン	

【0062】

結果を図2に示す(非製剤化ワクチンと比較した場合、p値<0.05)。図の右側の棒は、賦形剤が添加されていないワクチンを示す。賦形剤は概して3つのカテゴリー：正の効果を示し安定化効果を与えた賦形剤(マルトデキストリン4、アルギニン、トレハロース、マルトース、ヒスチジン、ヘプタグルコン酸カルシウム、マルトデキストリン13、ショ糖、ブドウ糖、ヘパリン、ラフィノース、ミオイノシトール、乳糖、ソルビトール、アラビトール、果糖、シクロデキストリン-γ、グルコン酸カリウム、アドニトール、キシリトール、チオ硫酸ナトリウム、アスパラギン、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、TRIS、クエン酸ナトリウム、及びズルシトール)、統計的に有意な効果を示さなかった賦形剤(クエン酸カリウム、卵白アルブミン、グリシン、メチルグルコシド、シクロデキストリン-β、リジン、リン酸ナトリウム、バリン、トレオニン、ガラクトース、アラニン、メチオニン、プロリン、マンニトール、ヒト血清アルブミン2、グルタミン、ヒト血清アルブミン1、トリプトファン、チロシン、セリン、ウシ血清アルブミン、クレアチン、ロイシン、及び硫酸カリウム)、及び乾燥に際してワクチン活性を更に減少させた賦形剤(コハク酸ナトリウム、イソロイシン、乳酸エチル、フェニルアラニン、アラビノース、リン酸カリウム、キシロース、亜硫酸カリウム、システイン、グリセロール、及びチオグリコール酸ナトリウム)に分類された。

【0063】

実施例3

賦形剤の組み合わせを、単一構成要素賦形剤により提供される安定性と比較するために選択した。サブユニットインフルエンザワクチン (B / Brisbane / 60 / 2008、60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ HA) を、同じ賦形剤総濃度 (15% w / v) で1つまたは2つの賦形剤と共に調合し、次いでポリジメチルシロキサン表面上にて環境温度で1時間乾燥させ、乾燥剤を伴って40℃で1週間保存した。ワクチンを塩溶液中に再溶解し、次いで実施例1で説明するように活性について分析した。結果を図3に示す。ほとんどの組み合わせは構成要素である賦形剤の範囲内の活性量を保持したが、しかしながら、2つの組み合わせ - マルトデキストリン17 / 乳糖及びソルビトール / クエン酸ナトリウム - は、それらの構成要素と比較して優れた活性を有することが示された。

【0064】

10

実施例4

様々な賦形剤 (15% w / v) を伴うサブユニットインフルエンザワクチン (B / Brisbane / 60 / 2008、60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ HA) の製剤をポリジメチルシロキサン表面上にて環境温度で1時間乾燥させ、乾燥剤を伴って40℃で最長1ヶ月間保存した。このワクチンを塩溶液中に再溶解し、次いで、実施例1で説明するように活性について分析した。結果を図4に示す。

【0065】

非製剤化ワクチンはその活性を非常に速く失った。全ての他の製剤は短期保存中に優れたパフォーマンスを示したが、しかしながら、数種の製剤のみ、全研究にわたり活性の統計的有意差を有しなかった。これらの製剤は、トレハロース / ショ糖、ショ糖 / アルギニン、及びアルギニン / ヘプタグルコン酸カルシウムなどの、賦形剤の組み合わせを含んだ。

20

【0066】

実施例5

三価サブユニットインフルエンザワクチン (B / Brisbane / 60 / 2008、A / Brisbane / 59 / 2007 (H1N1)、及びA / Victoria / 210 / 2009 (H3N2)、1700 ~ 1850 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を賦形剤の様々な組み合わせ (15% w / v の総濃度) と共に調合した。製剤をポリジメチルシロキサン鑄型中にて環境温度及び真空下で4時間乾燥させ、次いで乾燥器内にて環境温度で2日間更に乾燥させることにより、これらの製剤で溶解マイクロニードルパッチを生成し、その後、これらのマイクロニードルを離型させ、乾燥剤を伴ってアルミニウムボート中に包装し、25℃で保存した。所与の時点で、いくつかのパッチを塩溶液中に溶解し、実施例1で説明するように3つの株の活性について分析した。結果を図5に示す。

30

【0067】

実施例6

一価サブユニットインフルエンザワクチン (B / Brisbane / 60 / 2008、630 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を様々な賦形剤 (10% w / v) または賦形剤の組み合わせ (等しい割合で10% w / v の総濃度) と共に調合した。溶解マイクロニードルパッチを実施例5で説明するようにこれらの製剤で生成し、乾燥剤を伴って25℃で保存した。所与の時点で、いくつかのパッチを塩溶液中に溶解し、実施例1で説明するように活性について分析した。結果を図6に示す。

40

【0068】

実施例7

サブユニットインフルエンザワクチン (B / Brisbane / 60 / 2008、60 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を賦形剤 (10% w / v) または賦形剤の組み合わせ (等しい割合で10% w / v の総濃度) と共に調合した。次いで、これらの製剤をポリジメチルシロキサン表面上にて環境温度で1時間乾燥させ、乾燥剤を伴って40℃で保存した、所与の時点で、ワクチンを塩溶液中に再溶解し、実施例1で説明するように活性について分析した。結果を図7に示す。

【0069】

50

実施例 8

乾燥及びある範囲の温度での保存後のはしかウイルスの安定性を調べるために、ハイスルーブットアッセイを e G F P - M e V を用いて開発した。複製中に e G F P を生成するように改変した遺伝子改変はしかワクチンウイルスをボストン大学の P a u l D u P r e x 教授の研究室から譲り受けた。次いで、このストックを以前に説明するように V e r o 細胞中で繁殖させてウイルスタイターを増大させた。最終的なタイターは T C I D 5 0 アッセイを用いて測定し、 3.0×10^5 ウイルス単位 / m L であった。

【 0 0 7 0 】

様々な賦形剤をこの改変はしかウイルスの安定性を評価するために選択した。賦形剤及び試験した濃度のリストを表 2 に示す。全ての列挙された割合は乾燥前の水溶液の重量 / 体積パーセントを表す。

【表 2】

表 2：試験された賦形剤及び濃度

アラニン (300 mM)	アラビノース (15% w/v)
アルギニン (300 mM)	アラビトール (300 mM)
アスパラギン (300 mM)	ズルシトール (1% w/v)
システイン (300 mM)	果糖 (15% w/v)
グルタミン (300 mM)	ガラクトース (15% w/v)
グリシン (300 mM)	乳糖 (5% w/v)
ヒスチジン (300 mM)	マルトース (15% w/v)
イソロイシン (300 mM)	ラフィノース (15% w/v)
ロイシン (300 mM)	ソルビトール (15% w/v)
リジン (300 mM)	ショ糖 (15% w/v)
メチオニン (300 mM)	トレハロース (15% w/v)
フェニルアラニン (100 mM)	キシリトール (15% w/v)
プロリン (300 mM)	キシロース (15% w/v)
セリン (300 mM)	キトサン (5%)
タウリン (300 mM)	ヒト血清アルブミン (2%)
トレオニン (300 mM)	ヒドロシル化ラクタアルブミン (2%)
チロシン (300 mM)	塩化マグネシウム (1M)
バリン (300 mM)	硫酸マグネシウム (1M)
	シュウ酸ナトリウム (1%)

【 0 0 7 1 】

全ての賦形剤製剤を、 3.0×10^5 T C I D 5 0 / m L のタイターの e G F P - はしかワクチンウイルス (e G F P - M e V) のストックと 1 : 1 の比で混合した。次いで、この製剤の 3 μ L 試料を、ステンレススチールチップ上にコーティングし、このチップを遠心分離管に入れ、水分汚染に対して保護するために密閉した色変化乾燥剤 (D r i e r i t e , S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) を伴って不透明袋中で保存した。全ての試料をドラフト中で 22 にて 24 時間乾燥させ、その後、様々な期間保存した。保存から取り出した後、各試料の乾燥剤を水分表示についてチェックした。任意の汚染が検出された場合、その試料を捨てた。

【 0 0 7 2 】

乾燥した試料を、2% ウシ胎児血清 (F B S , G i b c o) を含有する 1 m L の D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e M e d i u m (D M E M) (G i b c o , G r a n d I s l a n d , N Y) 溶液で再構成し、V e r o 細胞の単層を含有する 96 ウェルプレートを用いて蛍光活性について試験した。プレート中の各ウェルに、100 μ L の再構成したウイルス溶液を添加した。このプレートを 37 で 72 時間インキュベートして、ウイルス繁殖を促進した。インキュベーション後、各ウェルを 300 μ L の滅菌リン酸緩衝食塩水 (P B S , S i g m a - A l d r i c h) で洗浄し、培地及び非感染ウイルス粒子を除去した。任意の残りの溶液を試験前にウェルから吸引除去した。96 ウェルプレートリーダーを用いて 485 の励起波長及び 520 の放出波長で各ウェルを測

定することにより、蛍光検出を行った。各試料の検出されたシグナルを同じ濃度の液体 e G F P - M e V を含有する正の対照と比較した。

【 0 0 7 3 】

列挙された賦形剤を含む試料を、乾燥後に e G F - M e V の活性を維持するそれらの能力を査定するために様々な時間及び温度で保存した。賦形剤をより厳密な条件への曝露後に段階的な様式で考慮から削除した。

【 0 0 7 4 】

D I - H ₂ O 中の 3 0 0 m M のトレオニン (S i g m a - A l d r i c h) 及び 1 5 % w / v ショ糖 (S i g m a - A l d r i c h) からなる安定化溶液を最終的な保存実験のために作成した。試料を上記に説明する方法を用いて作成し、4、22、及び45で1~24週間保存した。安定化剤を含有しない e G F P - M e V の乾燥試料からなる対照を22で1~4週間保存したものも含めた。

【 0 0 7 5 】

全ての統計を P r i s m ソフトウェアバージョン 6 . 0 2 (G r a p h p a d 、 L a J o l l a 、 C A) を用いて計算した。個々の試料間の比較を、独立 t 検定を用いて行い、これは $p < 0 . 0 5$ の有意カットオフであった。多数の試料間の比較を、2 要因分散分析 (t w o - w a y A N O V A) を用いて T u k e y 事後検定及び $p < 0 . 0 5$ の有意カットオフで行った。E x c e l 2 0 1 3 (M i c r o s o f t 、 R e d m o n d 、 W A) を用いて指数ベストフィット直線を決定した。全ての結果の平均は、試験した試料の等差中項を表す。

【 0 0 7 6 】

安定性スクリーンに進む前に、e G F P アッセイのパラメータをより良く理解するために初期実験を行った。V e r o 細胞のコンフルエント層を含有する多数の 9 6 ウェルプレート、減少する濃度の e G F P - M e V に感染させ、次いで 2、3、または 4 日間インキュベートして、蛍光活性が時間にわたりどのように変化するかを調べた。結果は、3 日間のインキュベーション後、2 5 0 T C I D ₅₀ / m L の濃度で開始する、ウイルス濃度と蛍光強度との間の直線的相関があることを示した (図示されていない)。このインキュベーション時間を全ての続く実験について選択した。

【 0 0 7 7 】

最初のリストの賦形剤の安定化可能性を迅速に査定するために、高温短期保存研究を行った。この最初のスクリーニング研究は、選択した賦形剤の大多数の削除をもたらした。37で7日間の保存後、試験した試料の約 4 1 % がそれらの最初の活性の 1 % 未満しか保持しなかった。1 0 % 残留活性のカットオフ値が 37 で 1 週間保存した生弱毒化はしかワクチンについての W H O 要求に対応するので、これを選択した。これは最初のリストの約 6 0 % の削除をもたらした (図 8)。最初のスクリーン後、1 4 個の試料を第 2 のスクリーニング実験での更なる調査のために選択した。

【 0 0 7 8 】

残りの賦形剤の安定化可能性を更に査定するために、より長い保存条件を第 2 のスクリーンのために選択した。37で1ヶ月後、4 つの試料のみが 1 % を超える残留活性を示した (図 9)。この第 2 のスクリーン中、賦形剤グリシン及びショ糖が個々に非常に低い安定化活性 (それぞれ、0 . 5 3 % 及び 0 . 6 1 % の残留する活性) を示したとき、しかしながら、これらの賦形剤が混合された場合には、乾燥ワクチンの残留活性は 3 0 . 4 5 % ($p < 0 . 0 0 0 5$) まで有意に増大したことに気付いた。このことから、はしかワクチンを安定化するために、より大きな範囲の炭水化物糖及びアミノ酸を用いることの効果を調査した。

【 0 0 7 9 】

組み合わせは、最初のスクリーン中に任意の安定化活性を示したこれらの 2 つのカテゴリ中の全ての賦形剤から作成した。全てのアミノ酸も対照として使用するために個々に試験した。37で1ヶ月間保存後、結果はより初期の観察に適合し、試験したどのアミノ酸も炭水化物糖と対にした場合、より高い安定化能力を示した (図 1 0)。ショ糖を含

10

20

30

40

50

む組み合わせが7つの試験したアミノ酸の6つについて最も高い残留活性を有したので、ショ糖を最も強い第2の安定化剤と決定した。より低い活性を有した安定化組み合わせを排除するために、40%のカットオフ限界をこのスクリーンに使用した。

【0080】

最終的なスクリーンを、より広範な安定性実験に使用するための賦形剤の最も良い組み合わせを決定するために行った。45℃での1ヶ月間の保存後、各試料の残留活性を試験した。このスクリーンは、アミノ酸トレオニン及び糖ショ糖の組み合わせが、この苛酷な温度条件での保存後にその元の活性のほぼ14%を保持して、最も高い安定化可能性を有することを示した(図11)。

【0081】

次いで、最も高いパフォーマンスを示す賦形剤混合物をより長期間の実験に供して、更にeGFP-MeVの感染性を維持するその能力を調べた。試料をある範囲の温度で最長2ヶ月間保存した。室温(25℃)で1週間保存後、任意の安定化賦形剤を含まない対照試料は、eGFPアッセイを用いて測定すると、その感染性の100%を失っていた。安定化溶液(トレオニン+ショ糖)を含む試料は、もっと優れたパフォーマンスを示した(図12)。4℃及び25℃で保存した試料は、1ヶ月間の保存後、それぞれ、平均でそれらの活性の95%及び89%を保持した。より高い温度(45℃)で保存した試料はこの時点で顕著により高い損失を示し、eGFP蛍光検出を用いて測定すると、それらの感染性の32%しか保持していなかった。最後の6ヶ月の時点で、より低い温度で保存した試料は非常に安定であることが証明された。4℃及び25℃試料は、それぞれ、それらの元の感染性の100%及び90%を保持した。45℃で保存した試料は、この時点でそれらの感染性の1%未満しか維持していなかった。指数ベストフィット直線により $R^2 = 0.9961$ で計算される45℃試料の崩壊速度は $k = -0.216$ であることが分かった。4℃及び25℃試料は6ヶ月の時点までに顕著な量の活性を失わなかったため、これらの崩壊速度は計算しなかった。

【0082】

生弱毒化はしかワクチンの安定化は以前から研究されているが、環境温度及び圧力下での乾燥は、まだよく研究されていない代替策である。マイクロニードルパッチなどの多くのワクチン送達システムは、噴霧乾燥、凍結乾燥、または同様の方法を用いて乾燥された化合物に十分に適合されない。したがって、これらの実験は、乾燥及び続く保存後にはしかワクチンを安定化させる、市販のヒトで承認された賦形剤化合物の能力を調べた。糖及びアミノ酸の両方を含有する賦形剤製剤は、いずれかの賦形剤が個々に試験された場合に示した安定化可能性より非常に優れた安定化可能性を示した。最も有効な製剤は、トレオニン及びショ糖の混合物を含み、4℃及び25℃で6ヶ月後に私たちのeGFPアッセイにより測定すると、ほとんど完全なはしかワクチン活性を維持することができていた。それは45℃で8週間を超える期間で10%を超える活性を維持することもできた。

【0083】

実施例9

ミクロンスケールのポリマーニードルを含有するパッチを、はしかワクチンを封入するために調合した。安定化はしかワクチンをマイクロ鑄型に充填し、マイクロニードルの先端に向かってワクチンを局在化させる2段階プロセスにより、マイクロニードルパッチを生成した。次いで、マイクロニードルマトリックス材料溶液をこの鑄型上に注いで、マイクロニードルの残りの部分及びパッチ裏打ちを形成した。

【0084】

マイクロニードルパッチは100個の角錐マイクロニードルを含有し、各々は基部で600µmの高さ、300µmの幅であり、3µm未満の先端半径まで先細になっていた。マイクロニードルは、各パッチ中に封入された生弱毒化はしかワクチンの標準用量を含有した。

【0085】

はしかマイクロニードルワクチンの安定性を、様々な温度でほぼ4ヶ月間保存したマイ

10

20

30

40

50

クロニードルパッチ上のワクチンウイルスタイターを測定することにより査定した。再構成した液体はしかワクチンは不安定であり、25 で28日以内及び40 で1週間未満で本質的に全ての有効性を失った(図13A~13C)。市販の凍結乾燥ワクチンも40 で不安定性を示し、28日後に100倍を超える感染性及び3ヶ月以内に1000倍を超える感染性を失った。対照的に、マイクロニードルパッチは、25 でほぼ4ヶ月間完全な有効性を維持し、40 でほぼ4ヶ月後に10倍未満しか感染性を失わなかった。

【0086】

図13A及び13Bの比較は、固体状態のはしかワクチンを安定化させることにおいて有効な製剤は、液体状態のはしかワクチンを安定化させることにおいて必ずしも有効ではないことを示した。同じワクチン製剤が液体及び固体について使用されたが、液体及び固体の安定性プロファイルは非常に異なった。これらの観察は、乾燥ワクチンが液体中で再構成される場合、ワクチン製剤の安定性は顕著に減少され得ることを示した研究により、より広く支持される。

【0087】

賦形剤が液体または固体ワクチン製剤を安定化させるために有効であるかどうかの予測不可能性は、液体ワクチン安定性の先行研究と本出願の結果との間で観察される相違によっても証明される。例えば、以前の研究は乳糖が液体はしかワクチン製剤を安定化させることを特定したが、乳糖は乾燥はしかワクチン製剤を安定化することはできなかった。例えば、Kissmann J, et al., "Stabilization of measles virus for vaccine formulation," Hum. Vaccine 4(5): 350-9 (2008)、及び実施例8を比較せよ。しかしながら、ショ糖は、はしかワクチン製剤の液体及び固体形態の両方を安定化させることにおいて有効であった。Id.

【0088】

実施例10

実施例9のマイクロニードルパッチを用いたはしかワクチン接種後の免疫応答をアカゲザルで評価した。アカゲザルにおける免疫応答はヒト免疫応答と強い相関を示すので、アカゲザルは、はしかワクチン接種研究の十分に確立されたモデルである。1群のサルがマイクロニードルパッチを介して生弱毒化はしかワクチンの標準ヒト用量を受容し、正の対照群は皮下注入を介して同用量のワクチンを受容した。

【0089】

マイクロニードルパッチは、以前の発見とよく一致する、マイクロニードル当たり0.28Nに対応する28Nの力で皮膚に押し付けてよい。この力はヒトの親指により容易に印加することができる。マイクロニードルはブタ死骸皮膚への挿入に際して迅速に溶解した。1分以内に、マイクロニードルの先端は溶解した。10分以内に、マイクロニードルはほぼ完全に溶解した。

【0090】

ワクチン消耗を最小限にし、正確な投与を提供するために、はしかワクチンがパッチの裏打ち内でよりむしろ、皮膚に入るマイクロニードル内で濃縮されていることを確実にした。使用前に、サルのワクチン接種に使用される各パッチは約3100TCID₅₀のはしかワクチンを含有した。アカゲザルの皮膚への手動での適用10分後、マイクロニードルパッチ裏打ち及び任意の残りのマイクロニードルの使い残りは、このマイクロニードルパッチにロードされた元のワクチンの9.4±2.2%を含有し、このことはワクチン用量の90%超が皮膚に送達されたことを示した。

【0091】

血清試料を毎週得て、はしかウイルスに対する抗体について試験した。免疫応答の進行をモニターするために、血清試料をELISAによりはしか特異的IgMの存在について試験した。早くもワクチン接種14日後に、はしか特異的IgMが両群で各動物について検出された。はしか特異的IgM抗体の存在により、全ての動物がワクチン接種後はしかに対して初期免疫応答を生成したことが確認された。

【 0 0 9 2 】

中和抗体は、両群でワクチン接種 2 1 日後に開始して最初に検出され、2 8 日目に約 4 7 0 0 m I U / m L のピークまで増大した。ピークタイター及びピークタイターまでの時間は 2 群間で有意差がなかった ($p > 0 . 0 5$)。マイクロニードルパッチ群及び皮下注入群の両方で、全ての動物は血清転換し、全ての動物は $> 1 2 0$ m I U / m L のタイターを有し、これはヒトで保護的であると考えられる。中和抗体タイターはワクチン接種後少なくとも 1 3 3 日間維持された。概して、両方のワクチンはアカゲザルにおいて強固な抗体応答を生成し、これらのデータはマイクロニードルパッチを用いたはしかワクチン接種は従来の皮下注入によるワクチン接種と同等の中和抗体タイターを誘発したことを示す。抗体応答のタイミング及び大きさは、先行研究において皮下注入によるアカゲザルの実験的ワクチン接種後に観察されたものと同様であった。

10

【 0 0 9 3 】

C D C 及びジョージア工科大学の動物実験施設委員会により承認されるように、アカゲザル (M a c a c a m u l a t t a) においてマイクロニードルパッチの免疫原性を皮下注入と比較した。はしか中和抗体タイターをブランク減少中和アッセイにより測定した。血清の 2 倍希釈物を 1 : 4 の希釈で開始して試験した。C D C 4 1 で以前に開発された酵素結合免疫吸着 I g M アッセイをはしかウイルスに対する血清 I g M 抗体を検出するために使用した。結果は標準カットオフ値を用いることにより決定した。

【 0 0 9 4 】

マイクロニードルパッチは希釈液での再構成を必要とせず、皮膚内で 1 0 分以内に溶解し、穏やかな一過性の皮膚紅斑のみを引き起こした。両群のアカゲザルは保護と一致するはしかに対する中和抗体応答を生成し、中和抗体タイターは同等であった。加えて、マイクロニードルパッチは高温での保存後に許容されるレベルの強さを維持し、このことは標準の凍結乾燥ワクチンと比較して改善された熱安定性を示唆した。それゆえ、はしかマイクロニードルパッチワクチンは非ヒト霊長類において免疫原性であり、このアプローチはワクチン接種適用範囲を改善するのに役立ち得る有望な送達方法を提供した。

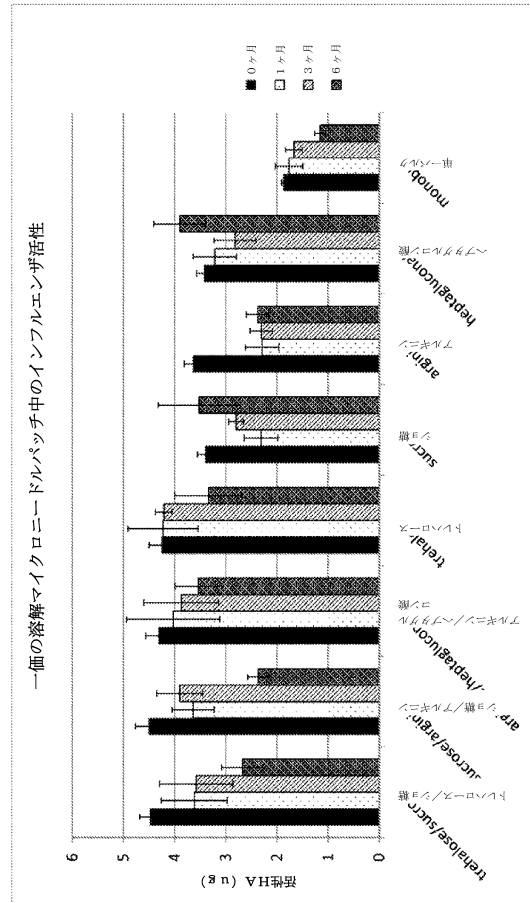
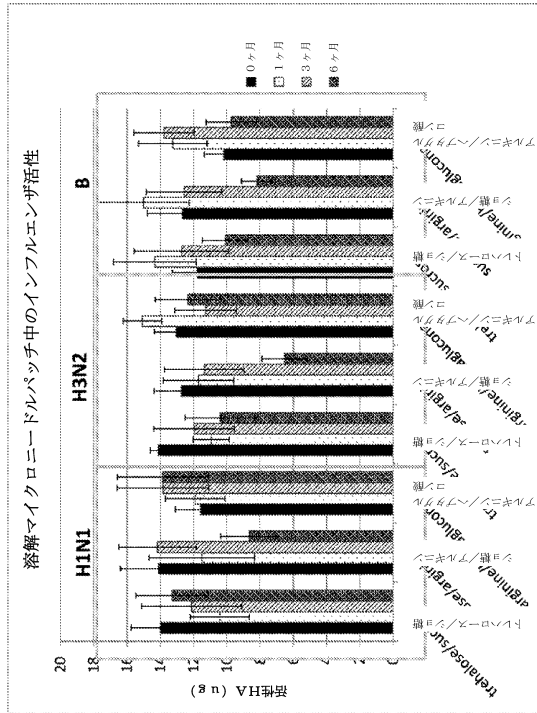
20

【 0 0 9 5 】

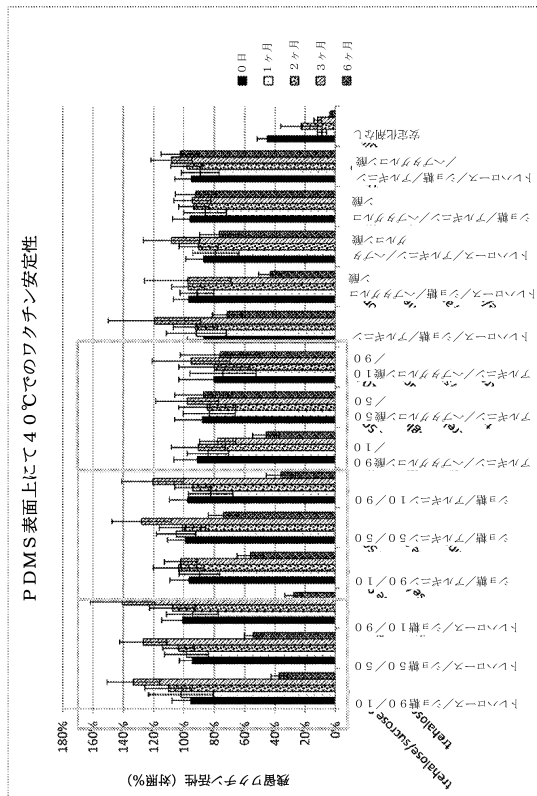
本発明は、その特定の実施形態について詳細に説明されているが、当業者は上記の理解を得るに際して、これらの実施形態の変更、変形、及び同等物を容易に認識し得ることが理解されるであろう。したがって、本発明の範囲は、付属の特許請求の範囲及びその任意の同等物の範囲として査定されるべきである。

30

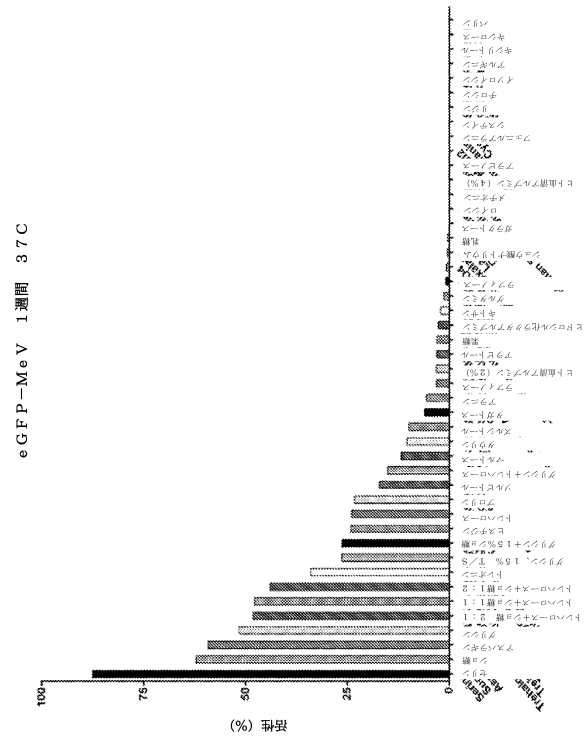
【 図 6 】



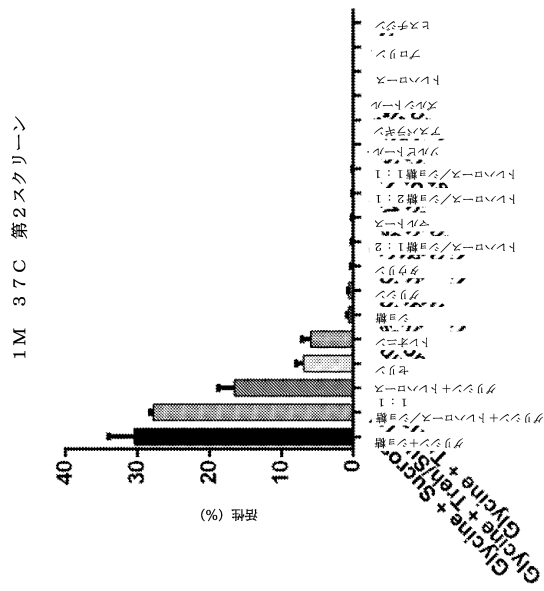
【 図 7 】



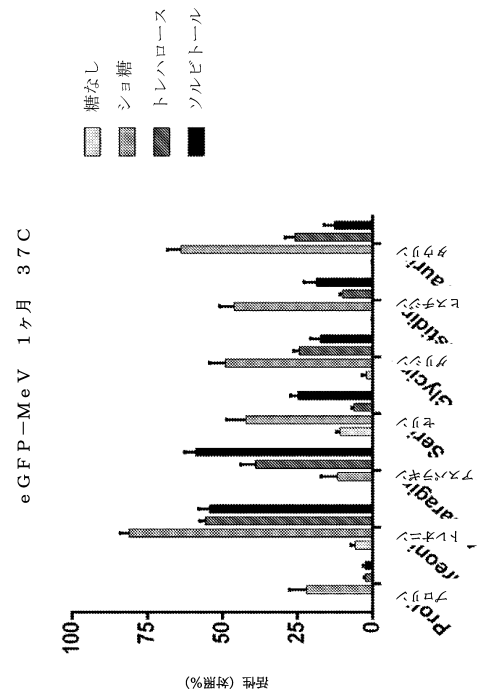
【 図 8 】



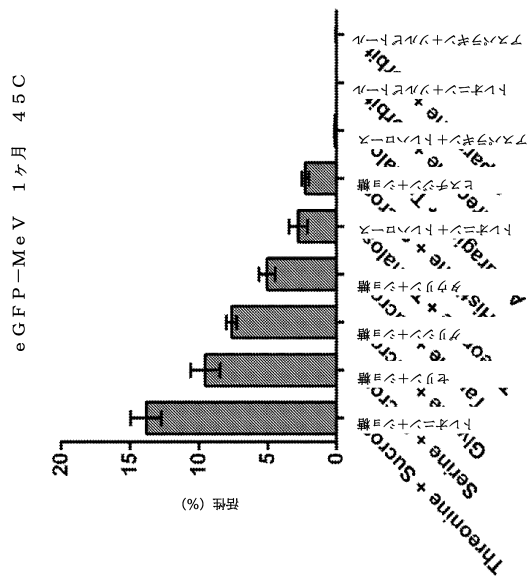
【図 9】



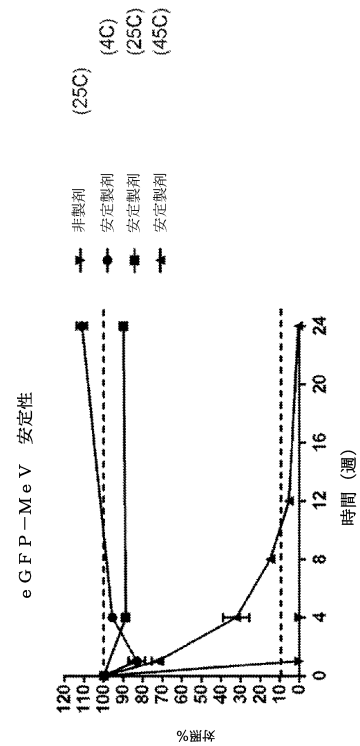
【図 10】



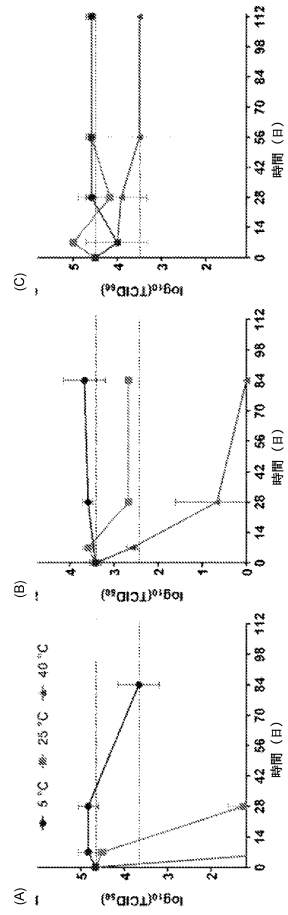
【図 11】



【図 12】



【図 13】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	9/70	(2006.01)	A 6 1 K	9/70	
A 6 1 M	37/00	(2006.01)	A 6 1 M	37/00	5 3 0
			A 6 1 M	37/00	5 2 0

前置審査

- (72)発明者 ミスティリス, マシュー ジョセフ
アメリカ合衆国, ジョージア州 3 0 3 1 8, アトランタ, ノースウェスト, 1 0 番 ストリート
4 0 1, アpartment ビー - 2 0 5
- (72)発明者 エデズ, ウィリアム クリストファー
アメリカ合衆国, ジョージア州 3 0 3 0 7, アトランタ, キャンドラー パーク ドライブ 4
1 0, アpartment シー 8
- (72)発明者 ボマリウス, アンドレアス セバスチャン
アメリカ合衆国, ジョージア州 3 0 3 2 7, アトランタ, ヴァーノン スプリングス コート
1 1 0 5
- (72)発明者 ブラウスニツ, マーク
アメリカ合衆国, ジョージア州 3 0 3 0 7, アトランタ, ウェイブリー ウェイ 9 3 4

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 特表2 0 1 3 - 5 0 1 0 0 1 (J P , A)
特表2 0 0 9 - 5 0 8 8 6 6 (J P , A)
特開2 0 1 3 - 1 2 6 9 8 9 (J P , A)
特表2 0 1 1 - 5 1 4 8 9 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 1 4 5
A 6 1 K 9 / 7 0
A 6 1 K 4 7 / 1 2
A 6 1 K 4 7 / 1 8
A 6 1 K 4 7 / 2 6
A 6 1 K 4 7 / 3 6
A 6 1 M 3 7 / 0 0
A 6 1 P 3 1 / 1 6
A 6 1 P 3 7 / 0 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A P l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)