

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6253161号  
(P6253161)

(45) 発行日 平成29年12月27日 (2017.12.27)

(24) 登録日 平成29年12月8日 (2017.12.8)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 9/19 (2006.01)** A 6 1 K 9/19  
**A 6 1 K 47/10 (2006.01)** A 6 1 K 47/10  
**A 6 1 K 47/18 (2006.01)** A 6 1 K 47/18  
**A 6 1 K 47/02 (2006.01)** A 6 1 K 47/02  
**A 6 1 K 39/13 (2006.01)** A 6 1 K 39/13

請求項の数 19 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2014-560879 (P2014-560879)  
(86) (22) 出願日 平成25年3月5日 (2013.3.5)  
(65) 公表番号 特表2015-509529 (P2015-509529A)  
(43) 公表日 平成27年3月30日 (2015.3.30)  
(86) 国際出願番号 PCT/NL2013/050139  
(87) 国際公開番号 W02013/133702  
(87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)  
審査請求日 平成28年2月9日 (2016.2.9)  
(31) 優先権主張番号 12158086.4  
(32) 優先日 平成24年3月5日 (2012.3.5)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
(31) 優先権主張番号 61/606,577  
(32) 優先日 平成24年3月5日 (2012.3.5)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514215240  
デ スタート デル ネーデルランデン、  
ヴェルト、 ドール デ ミニステル  
ヴァン ヴイダブリューエス ミニステリ  
ー ヴァン ボルクスゲツォントヘイト、  
ベルジーン エン シュポルト  
DE STAAT DER NEDERL  
ANDEN, VERT. DOOR D  
E MINISTER VAN VWS  
MINISTERIE VAN VOLK  
SGEZONDHEID, WELZIJ  
N EN SPORT  
オランダ、 エヌエル-2500 エージ  
エイ デン ハーグ、 パルナスプレイ  
ン 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乾燥された生物学的材料を安定化するための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオ薬物の乾燥製剤を製造するための方法であって、  
バイオ薬物と  
グルタメート、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、リシン、ロイシン、グリシン  
、及びそれらの混合物から選ばれるアミノ酸と  
ソルビトール、マンニトール、マンノース、マルチトール、及びそれらの混合物から選  
ばれるポリオールと

0.2 ~ 10% (w/v) の金属塩と  
水と

を含む溶液を乾燥させるステップを含み、

前記金属塩が、Mg<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>若しくはLi<sup>+</sup>の塩又はこれらの混合物である、方  
法。

【請求項 2】

溶液は、1ml 当たり 1pg ~ 10g のバイオ薬物と、0.01 ~ 20% (w/v) の  
アミノ酸と、0.5 ~ 20% (w/v) のポリオールと、0.2 ~ 10% (w/v) の金  
属塩と、水と、から本質的になる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

グルタメートはグルタミン酸ナトリウムの形態で溶液に溶解している、及び / 又はアル  
ギニンはポリ-L-アルギニンの形態である、及び / 又はリシンはポリ-L-リシンの

形態である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

溶液は、1 ml 当たり 1 pg ~ 10 g のバイオ薬物と、5 ~ 20 % (w/v) のソルビトールと、5 ~ 20 % (w/v) のグルタミン酸ナトリウムと、2 ~ 10 % (w/v) のマグネシウム塩と、任意選択で 5 ~ 20 % (w/v) のマンニトールと、から本質的になる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

金属塩は、 $\text{Cl}^-$  若しくは  $\text{SO}_4^{2-}$  塩又はそれらの混合物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

溶液は薬学的に許容される緩衝液を含み、中性 pH で緩衝される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

溶液は、空気乾燥、真空乾燥、噴霧乾燥又は凍結乾燥によって乾燥される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

バイオ薬物は、タンパク質性物質を含む薬物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

バイオ薬物は、ウイルスである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ウイルスは、エンテロウイルス又はニューモウイルスである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

バイオ薬物は、血清型 1 型、2 型及び 3 型のポリオウイルスを含むか、あるいは、バイオ薬物は、ヒト又はウシ RSV である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ポリオウイルスは、血清型 1 型、2 型及び 3 型の不活化ポリオウイルスである、又は、RSV は、G 付着タンパク質遺伝子が欠失又は不活化しているウイルスゲノムを含む RSV である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

乾燥製剤は、乾燥後に再構成された時に、乾燥前の溶液に存在したバイオ薬物の活性の少なくとも 50 % を保持する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

乾燥される溶液は 2 種以上の異なるバイオ薬物を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

乾燥製剤は、45 °C での少なくとも 1 週間の保存後に再構成された時に、乾燥前の溶液に存在したバイオ薬物の活性の少なくとも 50 % を保持する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

乾燥製剤は 2 種以上の異なるバイオ薬物を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記異なる薬物の活性の損失の差は、50 % 未満であり、活性の損失が最大の薬物の保持活性は、損失が最小の薬物の保持活性（これを 100 % とする。）に対するパーセントで表される、請求項 14 又は 16 に記載の方法。

【請求項 18】

バイオ薬物と

グルタメート、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、リシン、ロイシン、グリシン、及びそれらの混合物から選ばれるアミノ酸と

ソルビトール、マンニトール、マンノース、マルチトール、及びそれらの混合物から選ばれるポリオールと

10

20

30

40

50

0.2 ~ 10% (w/v) の金属塩と水と

を含む溶液の乾燥製品であるバイオ薬物の製剤であって、

前記金属塩が、 $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$  若しくは  $Li^{+}$  の塩又はこれらの混合物である、製剤。

【請求項 19】

感染症又は腫瘍に対する、個体における免疫応答を誘導するための、請求項 18 に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

10

【0001】

本発明は、乾燥された生物学的材料を安定化及び保存するための方法及び組成物に関する。これらの生物学的材料には、ワクチン（特にウイルスワクチン）などのバイオ薬物の凍結乾燥調製物又は真空乾燥調製物が含まれる。したがって、本発明は、バイオ薬物の製造及び製剤の分野並びにワクチン学の分野に関する。

【発明の背景】

【0002】

生物学的化合物の長期保存は、これらの化合物が通常脆く不安定であることを考慮すると独自の難題を提起する。単離・精製し、非冷蔵条件下、特に室温又はそれより高い温度で溶液として短期間を超えて保存することが可能な程度に、液体環境で、すなわち溶液又は懸濁液の形態で安定的である生物学的化合物はほとんどない。

20

【0003】

バイオ薬物の安定性を改善する 1 つの方法は、それらを乾燥状態に変化させることによるものである [17]。商業的にも実用的にも、乾燥形態の生物学的化合物の保存は大きな利点をもたらす。うまく乾燥された試薬、材料及び組織は、保存可能期間の増大にもかかわらず、重量が減少し、必要スペースが縮小する。これは、3 か月から 2 年以内に使用されるワクチンの最終ロットにおけるように最終製品のために使用されるだけでなく、シードロット、バルク又は最終ロットを備蓄する（1 ~ 5 0 年又はそれ以上の保存の）ためにも使用される。また、乾燥された材料の室温保存は、低温保存及びそれに伴う費用と比較して費用効果が高い。さらに、粉剤の肺送達、コーティング型若しくは溶解型マイクロニードルによる皮膚送達、粉剤若しくは溶解性ニードルによる非経口送達を含むいくつかの送達経路は洗練された製剤化の方法に依存する。噴霧乾燥、真空乾燥、空気乾燥、コーティング、泡沫乾燥など、乾燥された生物学的化合物を製造するためのいくつかの技術が存在する。最も古く、よく使用される技術の 1 つは、凍結乾燥とも呼ばれるフリーズドライである。長い間、フリーズドライは科学というよりむしろ技術として見られ、それにより科学的なアプローチ及び研究が遅れた。

30

【0004】

固体のバイオ薬物を製造するために最もよく使用される方法は凍結乾燥である。このプロセスは、凍結ステップ、それに続く 2 つの乾燥ステップ、すなわち、凍結した水分が昇華により除去される一次乾燥、及び凍結していない「結合した」水分が除去される二次乾燥からなる。凍結ストレス又は乾燥ストレスは、バイオ薬物の熱力学安定性を変化させる可能性があり、タンパク質アンフォールディングを誘導又は促進する可能性がある。アンフォールディングは、バイオ薬物の不可逆的変性をもたらす可能性があるが、乾燥状態での保存安定性を低下させる可能性もある [19]。安定な凍結乾燥物 (lyophilisate) のために、安定剤及び/又はバルク剤として働く賦形剤が使用される。種々の化合物（例えば、糖、ポリマー、アミノ酸、界面活性剤）は、凍結乾燥及びその後の保存中のバイオ薬物の安定性を改善することが示されている [18、20]。文献において、凍結、乾燥及びその後の保存中に賦形剤がどのようにタンパク質及びワクチンのようなバイオ薬物を保護すると考えられるか、いくつかの機構が記載されている。種々の安定剤の凍結保護及び凍結乾燥保護 (lyoprotection) 機構を理解することは、安定

40

50

な凍結乾燥ワクチンのための合理的な製剤及びプロセス設計の開発に重要である [ 2 1 ]  
。

【 0 0 0 5 】

凍結中、バイオ薬物の物理的環境は劇的に変化し、タンパク質性バイオ薬物の完全性に影響を与えるストレスが発生する。バイオ薬物が凍結中に曝される最も重大なストレスは低温、凍結濃縮、及び氷の形成である [ 1 8、1 9、2 1、2 2 ]。低温変性は、バイオ薬物が、温度降下の結果としてコンパクトな折りたたみ構造を失う現象である。低温変性についての現在受け入れられている説明は、疎水性相互作用を弱め、バイオ薬物の構造を壊すであろう、より低い温度での水と非極性基との間の接触自由エネルギーの変化に基づく [ 1 9、2 0、2 3 ]。氷の形成により、凍結中、すべての溶質の濃度が劇的に上昇する。濃度に関連するすべての変化（例えば、イオン強度、溶質の結晶化、相分離）はバイオ薬物を不安定にさせる可能性がある [ 2 1 ]。

10

【 0 0 0 6 】

製剤の初期の相対組成及び pH は、凍結ストレスによるバイオ薬物の変質を回避させることができる。例えば、凍結前に製剤におけるバイオ薬物の濃度を他の賦形剤よりも高めると凍結融解中のバイオ薬物の安定性が高まることが、多くのバイオ薬物で見出されている [ 2 4 ]。同様に、溶液中のバイオ薬物に最適な初期 pH により、凍結融解後のインタクトなバイオ薬物の復元性が最も高くなる [ 2 0 ]。

【 0 0 0 7 】

これらの因子をすべて最適化した後であっても多くのバイオ薬物は凍結融解中に依然として変性するので、タンパク質 / バイオ薬物の変性を最小限に抑えるために添加剤が必要となる。全く異なる化学物質クラスに由来する種々の賦形剤が凍結保護を与えることができる。「溶質排除仮説」によれば、凍結保護剤は、水溶液において、選択的に、バイオ薬物の表面と接触しないことが示されている [ 2 4 ]。種々のバイオ薬物の存在下での溶質排除の熱力学的現象は、種々の賦形剤（例えば、塩、アミノ酸、メチルアミン、ポリエチレングリコール、ポリオール、界面活性剤、糖）について決定されている [ 1 9、2 1、2 4、2 5 ]。

20

【 0 0 0 8 】

「ガラス化仮説」は広く知られた動力学機構である。この機構によれば、凍結濃縮及び温度降下は粘度を高め、運動性を低下させ、すべての動的プロセスを遅くする。系がガラス状態に達すると、ガラス内のすべての分子は物理的（例えば、変性、凝集）及び化学的（例えば、酸化、加水分解、脱アミド）に不動態化し、バイオ薬物の分解の速度定数は低下する [ 1 9、2 6 ]。

30

【 0 0 0 9 】

凍結中に形成される氷 - 水の境界面は表面変性を引き起こす可能性がある。界面活性剤の添加はバイオ薬物溶液の表面張力を低下させ、その結果、バイオ薬物の吸着及び凝集を減少させる [ 2 5、2 7 ]。

【 0 0 1 0 】

ポリマーは、製剤のガラス転移温度を上昇させること、及び二糖類のような小さな安定化添加剤の結晶化を抑制することによって、バイオ薬物を安定化させることができる [ 1 8、2 2 ]。アミノ酸は、緩衝塩の結晶化の割合及び拡大を低減させ、その結果、pH 変化を抑制することによって、バイオ薬物を凍結変性からも保護し得る [ 1 8 ]。

40

【 0 0 1 1 】

水溶液中でバイオ薬物は完全に水和し、そのことは、バイオ薬物が、水に覆われ、かつ（水素結合により）バイオ薬物の表面と相互作用する単一層を有することを意味する [ 2 8 ]。乾燥は水和殻の一部を除去し、その除去は、元の状態のバイオ薬物を壊し、変性をもたらす。乾燥中の変性を防ぐために保護剤が必要となる。そのような保護剤の重要な安定化機構は「水置換仮説」と呼ばれている [ 1 8 ~ 2 0、2 9 ]。糖（例えば、スクロース、トレハロース）、ポリオール [ 2 0、3 0 ] 及びアミノ酸 [ 3 1 ] は、乾燥されたバイオ薬物と水素結合を形成することができる。したがって、糖、ポリオール及びアミ

50

ノ酸は、水和殻が除去された場合に水の代用物として働くことができる。また、「ガラス化仮説」として前述した非晶質ガラスの形成は主要な保護機構である。

#### 【 0 0 1 2 】

水置換及びガラス形成に加えて、多くの賦形剤（特にポリマー）は、ガラス転移温度（ $T_g$ ）を上昇させることによってバイオ薬物を安定化させることができる。ガラス転移温度は、（液体様の）ゴム状態と（固体様の）ガラス状態との間の転移温度であると定義されている。一般に、 $T_g$ が高いほど、ガラス内の分子運動性（例えば、バイオ薬物、安定化化合物、酸素及び水の動き）はより低下し、バイオ薬物製剤は、乾燥及びその後の保存中、より安定する [ 1 8、2 2 ]。乾燥中のバイオ薬物の安定化に関わり、多糖類及び他のポリマーに適用できる別の機構は、乾燥中のバイオ薬物を安定化させる小さな賦形剤の溶質濃縮中の結晶化の抑制である。

10

#### 【 0 0 1 3 】

それらの賦形剤は、バイオ薬物の表面よりもバルク環境を選ぶ（先に「溶質排除」と名付けた。）ので、いくつかの賦形剤はバルク剤として働くことができ、このことは、それらの賦形剤が最終ケーキに力学的な支持を与え、製品の優雅さを高め、乾燥中の製品の崩壊を防ぐことを意味する。マンニトール及びグリシンは、非毒性で、溶解性が高く、共晶温度が高いため、バルク剤として使用されることが多い [ 1 8、2 5、3 2 ]。ほとんどのアミノ酸は、容易に結晶化するだけでなく、潜在的なバルク剤である [ 3 3 ]。

#### 【 0 0 1 4 】

バイオ薬物が乾燥プロセス中に安定である場合、乾燥状態での長期保存が実現可能であることが多い。一般に、乾燥プロセス自体がバイオ薬物に最も有害であるが、乾燥されたバイオ薬物は、適切に製剤化されていなければ、保存中にも依然として構造又は効力を失う可能性がある。凝集は、保存中のバイオ薬物の主要な物理的不安定要因である。種々の化学的分解（例えば、脱アミド、酸化、加水分解）も保存中に起こり得るが、これらの変化は、転化残基の位置によっては必ずしもバイオ薬物の活性に影響を与えるわけではない。グルコース及びスクロースなどの還元糖は、メイラード反応（褐変反応）によってバイオ薬物のリシン残基及びアルギニン残基と反応して、炭水化物付加物を形成し、その形成は、保存中の凍結乾燥されたバイオ薬物の活性の著しい損失をもたらす得る。

20

#### 【 0 0 1 5 】

保存温度は、固体状態のバイオ薬物の安定性に影響を与える最も重要な因子の1つである。長期保存の安定性に影響を与える他の因子は、製剤のガラス転移温度（ $T_g$ ）、製剤のpH、及び乾燥後の残留水分量である。乾燥された製剤の水分量は、栓の水分の放出、非晶質賦形剤の結晶化、及び水和賦形剤からの水分の放出を含むいくつかの因子によって保存中に著しく変化する可能性がある。乾燥中にバイオ薬物を安定化させるために使用される賦形剤は、それらが製剤において適切な量で使用されていない場合、固体状態のバイオ薬物を不安定化させる可能性がある。結晶状態はガラス状態より熱力学的に安定であるので、非晶質賦形剤の結晶化のリスクも保存中存在する [ 3 9 ]。多くの糖及びポリオールは結晶化する傾向があるが、この傾向は、製剤中の糖及びポリオールの相対量、保存温度及び相対湿度に強く影響される [ 1 8、4 0 ]。さらに、いくつかの賦形剤の相対組成及びポリマーなどの非結晶化安定剤の存在は賦形剤の結晶化を抑制し得る。

30

40

#### 【 0 0 1 6 】

長期保存中の乾燥状態のバイオ薬物のための安定化機構は、非晶質ガラス状態の形成、水置換、及び賦形剤とバイオ薬物との間の水素結合を含む、凍結乾燥保護のための安定化機構に類似する [ 4 1 ]。固体状態でのバイオ薬物を最大限安定化させるにはそれらの機構の組み合わせが必要となる [ 1 8、4 2 ]。凍結乾燥製品の最終的な品質は、緩衝剤、バルク剤及び安定剤を含む賦形剤の選択並びに凍結乾燥プロセスによって決定される。

#### 【 0 0 1 7 】

ポリオは、主に幼児が患う感染性の強い疾患である。この疾患は、3つの血清型のポリオウイルス（1型、2型又は3型）のいずれか1つによって引き起こされ、特定の治療法を有しないが、ワクチン接種によって予防することができる。現在、経口のポリオワクチ

50

ン (Sabin OPV) は、ポリオの世界的根絶を追求するために選択されるワクチンである。しかし、主要な懸念は、麻痺を引き起こし得る状態、いわゆるワクチン関連麻痺性ポリオ (VAPP) に戻る OPV の能力である。弱毒生ポリオウイルスの永久的使用の他のリスクは、ワクチン由来のポリオウイルス (VDPV) への逆戻りである [ 1 ]。西洋諸国では、Sal k 不活化ポリオワクチン (IPV) の使用が、VAPP 及び流行性 (circulating) VDPV のリスクを排除するための、現在の好ましい方法である。IPV は世界的根絶プログラムの継続に最も適していると考えられている [ 1 ~ 3 ]。

#### 【 0 0 1 8 】

世界的なポリオ根絶を実現するために、(改良された) IPV は、効果的かつ安価で、製造するのに安全であり、投与するのに簡単でなければならない [ 4 ]。IPV は、OPV よりも高価であり、注射でしか投与されないもので、発展途上国での現在の IPV の実現可能性は制限されている [ 1、3、5 ]。IPV の費用を抑えるために、WHO 及び RIVM は、発展途上国への技術移転のための非商業的な IPV を開発している。生産中、特に発展途上国において、野生型の Sal k ポリオウイルスの封じ込めが問題となり得ることから、新しいワクチンは、OPV 株すなわち Sabin (sIPV) (これは、生産コストがそれほど高くないと予想される。) をベースにしたものになろう。さらにコストを減少させるために、RIVM は、アジュバント及び/又は他の免疫化経路を使用することによって用量の節約を示す sIPV 製剤を開発している [ 6 ]。

#### 【 0 0 1 9 】

代替的な送達方法及び改良されたワクチン製剤がワクチンの送達をより容易及び安全にする可能性を有する [ 7、8 ] ことから、現在、いくつかの代替的なワクチン送達方法が開発されている。

#### 【 0 0 2 0 】

異なる血清型の不活化ポリオの間で熱安定性の相違が存在し、1 型が最も熱に弱いようである。保存剤の非存在下で、1 型は、4 で 2 年間保存した後、ゆっくり劣化するが、2 型及び 3 型は、何年もの間、効力を維持する。1 型の D 抗原含有量は、24 での 20 日間の期間後、大幅に減少し、同じ期間 32 にさらした後には検出できない。対照的に、2 型については、それらの温度のいずれにおいても D 抗原性の顕著な変化は観察されなかった。3 型は、24 で 20 日間安定したままであるが、32 で D 抗原含有量が大幅に減少する [ 9 ]。

#### 【 0 0 2 1 】

2 - フェノキシエタノールで保存され、水酸化アルミニウムに吸着させた DT - ポリオワクチンでなされた観察に基づいて、IPV の 3 つの血清型すべては、組み合わせワクチンに組み込まれ、4 で 1 年から 4 年超の期間保存された場合、効力の十分な維持を示す [ 9、10 ]。より長い保存の結果、特に 1 型について抗原性が低下した [ 9 ]。単独ワクチンとしての IPV は、4 では 4 年間、25 では 1 か月間安定している [ 10 ]。37 では、1 型の効力が 1 ~ 2 日後に、2 型及び 3 型の効力が 2 週間後に著しく損失されている [ 11、12 ]。凍結も、D 抗原の構造の喪失に関する悪影響を IPV の効力に与える [ 12 ]。

#### 【 0 0 2 2 】

ポリオ根絶の後、ポリオワクチンの備蓄は、(OPV の中止後であっても) 流行性 VDPV を原因とするポリオの新たな発生、又は生物テロ攻撃の潜在的リスクに備えるために必要となる [ 13 ~ 15 ]。ワクチンの最適な備蓄を実現するためには種々の問題を考慮する必要がある。期限の遅延は備蓄コストを減少させることから、保存可能期間は重要な項目である [ 16 ]。ワクチンの効力を何年もの間保証するためには、IPV などのワクチンの保存可能期間が延長される必要がある。したがって、バイオ薬物の保存可能期間を延長する改良された製剤、及び好ましくは乾燥形態のそのような製剤を製造するための改善された方法の必要性が存在する。

#### 【 発明の概要 】

## 【0023】

第1の態様において、本発明は、バイオ薬物の乾燥製剤を製造するための方法であって、バイオ薬物とアミノ酸とポリオールと金属塩と水とを含む溶液を乾燥させるステップを含む方法に関する。

## 【0024】

本発明の方法において、溶液は、1ml当たり1pg~10gのバイオ薬物と、0.01~20%(w/v)のアミノ酸と、0.5~20%(w/v)のポリオールと、0.005~10%(w/v)の金属塩と、水と、から本質的になることが好ましい。より好ましくは、アミノ酸は、グルタメート、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グリシン、又はそれらの混合物であり、ポリオールは、ソルビトール、マンニトール、マンノース、マルチトール、又はそれらの混合物であり、金属塩は、 $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 若しくは $Li^{+}$ の塩又はそれらの混合物(それらのうちでは、 $Cl^{-}$ 若しくは $SO_4^{2-}$ 塩又はそれらの混合物が好ましい。)である。

10

## 【0025】

本発明の方法において、グルタメートは、好ましくはグルタミン酸ナトリウムの形態で溶液に溶解している。

## 【0026】

本発明の方法の好ましい実施形態において、溶液は、1ml当たり1pg~10gのバイオ薬物と、5~20%(w/v)のソルビトールと、5~20%(w/v)のグルタミン酸ナトリウムと、2~10%(w/v)のマグネシウム塩(好ましくは $MgCl_2$ 及び/又は $MgSO_4$ )と、任意選択で5~20%(w/v)のマンニトールと、から本質的になる。

20

## 【0027】

本発明の方法において、溶液は、好ましくは、薬学的に許容される緩衝液を含み、中性pHで緩衝される。溶液は、真空乾燥又は凍結乾燥により乾燥されることも好ましい。

## 【0028】

本発明の方法において、バイオ薬物は、好ましくは、タンパク質性物質を含む薬物である。より好ましくは、バイオ薬物はウイルス、好ましくはエンテロウイルス(Enterovirus)又はニューモウイルス(Pneumovirus)である。最も好ましくは、バイオ薬物は、血清型1型、2型及び3型のポリオウイルス、好ましくは血清型1型、2型及び3型の不活化ポリオウイルスを含むか、あるいはヒト又はウシRSVである。

30

## 【0029】

本発明の方法の好ましい実施形態において、乾燥製剤は、乾燥後に再構成された時に、乾燥前の溶液に存在したバイオ薬物の活性の少なくとも50%を保持する。本発明の方法の別の好ましい実施形態において、乾燥される溶液は2種以上の異なるバイオ薬物を含み、前記異なる薬物の活性の損失の差は好ましくは50%未満であり、活性の損失が最大の薬物の保持活性は、損失が最小の薬物の保持活性(これを100%とする。)に対するパーセントで表される。

## 【0030】

本発明の方法の好ましい実施形態において、乾燥製剤は、45℃での少なくとも1週間の保存後に再構成された時に、乾燥前の溶液に存在したバイオ薬物の生物学的活性の少なくとも50%を保持する。本発明の方法の別の実施形態において、乾燥製剤は2種以上の異なるバイオ薬物を含み、前記異なる薬物の活性の損失の差は好ましくは50%未満であり、活性の損失が最大の薬物の保持活性は、損失が最小の薬物の保持活性(これを100%とする。)に対するパーセントで表される。

40

## 【0031】

第2の態様において、本発明は、本発明による方法で得られる、バイオ薬物の乾燥製剤に関する。

## 【0032】

第3の態様において、本発明は、医薬として使用するための、好ましくは感染症又は腫

50

瘍に対する（個体における）免疫応答を誘導するための本発明の製剤に関する。

【発明の説明】

【0033】

第1の態様において、本発明は、バイオ薬物の乾燥製剤を製造するための方法に関する。本発明の方法は、少なくとも2つの改善、すなわち、1) 製剤の乾燥時（及び好ましくは乾燥製剤を再構成した時）のバイオ薬物の活性の損失を最小限に抑えること、及び2) バイオ薬物の乾燥製剤の安定性すなわち保存可能期間を増大させること、すなわち乾燥製剤の保存時のバイオ薬物の活性の損失を最小限に抑えることを実現することを目的とする。該方法は、好ましくは、バイオ薬物と、アミノ酸、ポリオール及び金属塩のうちの1つ又は複数と、を含む水溶液を乾燥させることを含むステップを含む。

10

【0034】

本発明の方法において、乾燥される溶液は、a) 以下で特定される濃度の以下で特定されるバイオ薬物と、b) 以下で特定される濃度の以下で特定されるアミノ酸と、c) 以下で特定される濃度の以下で特定されるポリオールと、d) 以下で特定される濃度の以下で特定される金属塩と、e) 水と、任意選択でf) 以下で特定される濃度及び以下で特定されるpHの緩衝液と、任意選択でg) 以下で特定される濃度の以下で特定されるさらなる成分と、を含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。

【0035】

バイオ薬物：

本明細書において、「バイオ薬物」は、好ましくは、薬学的に許容される形態で哺乳類（特にヒト）の患者に適用した場合に生理活性を有する生物学的薬物を指すものとする。生物学的薬物という用語には、細胞から得ることができる薬物の合成コピー及び細胞から得ることができる化学修飾した薬物が含まれるが、生物学的薬物は、好ましくは、細胞により生産される又は細胞から得ることができる薬物である。生物学的薬物は、タンパク質ベースの薬物、すなわち、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどのタンパク質性物質を含む薬物であり得る。生物学的薬物は、核酸（例えば、DNA、RNA）又は核酸類似体をさらに含んでもよいし、核酸（例えば、DNA、RNA）又は核酸類似体からなってもよい。

20

【0036】

好ましいバイオ薬物はウイルス又はビリオン、好ましくは哺乳類に感染するウイルス、好ましくはヒトに感染するウイルスである。ウイルスはエンベロープウイルスであり得るが、好ましくは非エンベロープウイルスである。本明細書において、用語「ウイルス」は、自然に発生する野生型ウイルス（例えば自然分離株）、並びに「人工の」弱毒ウイルス、変異ウイルス及び欠損ウイルスが含まれるものとする。用語「ウイルス」はまた、組み換えウイルス（すなわち、組み換えDNA技術を用いて構築されたウイルス）（例えば、1つ又は複数のウイルス遺伝子（の一部）を欠く欠損ウイルス、ウイルスゲノムの一部が1つ又は複数の目的遺伝子で置き換えられた遺伝子治療ベクター）を含む。好ましいウイルスはピコルナウイルスであり、より好ましくはエンテロウイルス（例えば、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス）である。最も好ましくは、ウイルスはポリオウイルスである。ポリオウイルスは弱毒ポリオウイルスであり得るが、好ましくは不活化ポリオウイルス（IPV）である。また、ポリオウイルスは不活化弱毒ポリオウイルスであり得る。バイオ薬物は、ポリオウイルス血清型1型、2型及び3型のうちの1つ又は複数を含み得るが、ポリオウイルス血清型1型、2型及び3型のすべてを含むことが好ましい。ポリオウイルス血清型1型の適切な株としては、Sabin 1株、Mahoney株、Brunhilde株、CHAT株及びCox株のうちの1つ又は複数が挙げられる（これらに限定されない）。ポリオウイルス血清型2型の適切な株としては、Sabin 2株、MEF-1株及びLansing株のうちの1つ又は複数が挙げられる（これらに限定されない）。ポリオウイルス血清型3型の適切な株としては、Sabin 3株、Saukett H及びG株、及びLeon株が挙げられる。好ましい実施形態において、バイオ薬物は3価の不活化ポリオワクチン、例えば、Salik-IPV

30

40

50

(これは、不活化ポリオウイルス1型のMahoney株、不活化ポリオウイルス2型のMEF-1及び不活化ポリオウイルス3型のSaukett株を含有する。)又はsIPV(これは、不活化ポリオウイルスのSabin1株、Sabin2株及びSabin3株を含有する。)である。ワクチンに安全に使用するためにポリオウイルス株を不活化する方法は当分野で周知であり、例えば、ホルマリン又は $\beta$ -プロピオラクトンを使用する不活化を含む(例えば、Jongesら, 2010, J. Clin. Microbiol. 48: 928~940を参照されたい)。

#### 【0037】

別の実施形態において、バイオ薬物はニューモウイルス又はニューモウイルスのビリオンである。ニューモウイルスは、好ましくは呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、より好ましくはヒト又はウシRSVである。ヒトRSVはサブグループA又はBウイルスであり得、好ましくは臨床分離株、より好ましくは、インビトロで大規模な継代培養されていない(好ましくは、10回未満、8回未満、6回未満、又は5回未満、継代培養された)分離株である。ヒト又はウシRSVは、G付着タンパク質遺伝子が欠失又は不活化しているウイルスゲノムを含むウイルス、例えば、ウイルスゲノムに突然変異を有し、それにより、ウイルスゲノムが機能的なG付着タンパク質をコードしないウイルス、例えば、国際公開第2005/061698号及びWidjojotmodjoら(2010, Virology, 7: 114)に記載されているRSV $\Delta$ G及びRSV $\Delta$ G+Gビリオンが好ましい。

#### 【0038】

バイオ薬物は、好ましくは、生きた及び/又は死んだ若しくは不活化した粒子の数が1ml当たり $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{25}$ 個である量で、乾燥される溶液中に存在する。生きた粒子の数は、例えば、プラーク形成単位、50%細胞培養感染量(CCID<sub>50</sub>)又は50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)によって、あるいは薬物の力価を決定するための他の適切なウイルス学的アッセイによって決定することができる。死んだ又は不活化した粒子の数は、例えば、抗原を定量するアッセイ(例えばタンパク質アッセイ)又は血球凝集単位若しくはポリオD抗原単位を決定するアッセイを用いて決定することができる。バイオ薬物は、生きた及び/又は死んだ若しくは不活化した粒子の数が1ml当たり少なくとも $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 若しくは $1 \times 10^{10}$ 個である量で、及び/又は生きた及び/又は死んだ若しくは不活化した粒子の数が1ml当たり最大で $1 \times 10^{24}$ 、 $1 \times 10^{23}$ 、 $1 \times 10^{22}$ 、 $1 \times 10^{21}$ 、 $1 \times 10^{20}$ 、 $1 \times 10^{19}$ 、 $1 \times 10^{18}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 若しくは $1 \times 10^{14}$ 個である量で、乾燥される溶液中に存在することが好ましい。

#### 【0039】

乾燥される溶液中のバイオ薬物の量は溶液1ml当たりのバイオ薬物の重量として表すこともできる。好ましくは、バイオ薬物は溶液中に1pg/ml~10g/mlの重量/mlで存在する。バイオ薬物は、溶液中に、少なくとも $10^{-11}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 若しくは $10^{-4}$ g/mlの量で、及び/又は最大で $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 若しくは $10^0$ g/mlの量で存在する。溶液中のバイオ薬物の重量は、それ自体当分野で既知の手段(例えばタンパク質アッセイ)によって決定することができる。したがって、バイオ薬物の前述の重量は、適切なタンパク質アッセイ(例えば、Bradfordアッセイ; Zor及びSelling, 1996, Anal. Biochem. 236: 302~308)において決定された1ml当たりのタンパク質のグラム数として表すこともできる。

#### 【0040】

バイオ薬物がポリオウイルスである好ましい実施形態において、溶液中のポリオウイルスの量は、好ましくは、少なくとも0.01、0.1、1.0若しくは10DU/ml及び最大で10000、1000若しくは100DU/mlであり、ここで、1DUは、Westdijkら[6]により説明されているようにQC-EISAを用いて定義及び

決定される。バイオ薬物が多価のポリオウイルス（ワクチン）を含む実施形態において、各血清型のポリオウイルスは、少なくとも0.01、0.1、1.0若しくは10 DU/ml及び最大で10000、1000若しくは100 DU/mlの量で存在することが理解される。

#### 【0041】

バイオ薬物がRSVである好ましい実施形態において、溶液中のRSVの量は、好ましくは、少なくとも $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^3$ 若しくは $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml及び最大で $1 \times 10^{2.5}$ 、 $1 \times 10^{2.0}$ 、 $1 \times 10^{1.5}$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^{1.0}$ 若しくは $1 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/mlであり、ここで、RSVのTCID<sub>50</sub>は、Widjojoatmodjora (2010, Virol. J., 7: 114) により説明されているように定義及び決定される。

10

#### 【0042】

アミノ酸：

乾燥される溶液中のアミノ酸は、薬学的に許容される任意のD-又はL-アミノ酸である。そのようなアミノ酸としては、標準的な20種の「タンパク質構成」若しくは「天然」アミノ酸（ヒスチジン、アラニン、イソロイシン、アルギニン、ロイシン、アスパラギン、リシン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、チロシン、セリン）並びに非天然アミノ酸（例えば、オルニチン、シトルリン、セレノシステイン、タウリン、ピロリシン）が挙げられる。好ましくは、乾燥される溶液中のアミノ酸は、グルタメート、グルタミン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、リシン、ロイシン及びグリシンのうちの1つ又は複数、より好ましくは、グルタメート、アルギニン及びヒスチジンのうちの1つ又は複数である。したがって、乾燥される溶液はアミノ酸の混合物を含むことができる。乾燥される溶液中のアミノ酸はD-若しくはL-光学異性体又はその混合物であり得るが、好ましくはL-異性体である。

20

#### 【0043】

好ましい実施形態において、乾燥される溶液中のアミノ酸は、L-グルタメート、L-アルギニン及びL-ヒスチジンのうちの1つ又は複数である。L-グルタメートは、グルタミン酸Na、ペプトン、非動物性ペプトン、植物性ペプトンの形態であってもよい。L-アルギニンは、ポリ-L-アルギニン、ペプトン、非動物性ペプトン、植物性ペプトンの形態であってもよい。L-ヒスチジンはヒスチジンNaの形態であってもよい。L-リシンはポリ-L-リシンの形態であってもよい。

30

#### 【0044】

特に好ましい実施形態において、乾燥される溶液中のアミノ酸はグルタメートを含む。グルタメートは、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸カルシウム、グルタミン酸マグネシウム、及びグルタミン酸のうちの1つ又は複数であり得る。より好ましくは、グルタメートは、グルタミン酸ナトリウム（MSG）の形態で溶液に溶解している。

#### 【0045】

アミノ酸は、好ましくは、乾燥される溶液中に0.01~20%（w/v）（重量/溶液体積パーセント）の濃度で存在する。したがって、好ましくは、アミノ酸は、乾燥される溶液中に、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、9.0若しくは9.5%（w/v）以上若しくはそれを超える濃度で、及び/又は、20.0、17.5、15.0、12.5、11.0若しくは10.5%（w/v）以下若しくは未満の濃度で存在する。最も好ましくは、アミノ酸は、乾燥される溶液中に約10%（w/v）の濃度で存在する。

40

#### 【0046】

ポリオール：

乾燥される溶液中のポリオールは、好ましくは糖又は糖アルコールである。好ましい糖としては、スクロース、トレハロース、マンノース、及びデキストランが挙げられる。好

50

ましい糖アルコールとしては、ソルビトール、マンニトール、及びマルチトールが挙げられる。好ましくは、乾燥される溶液は、ソルビトール、マンノース、マンニトール及びマルチトールのうちの少なくとも1つ又は複数、より好ましくは、ソルビトール、マンノース及びマンニトールのうちの少なくとも1つ又は複数、より好ましくは、ソルビトール及びマンニトールの少なくとも1つ又は両方を含む。最も好ましくは、乾燥される溶液はポリオールとして少なくともソルビトールを含み、任意選択でマンニトールとの組み合わせで含む。

#### 【0047】

一実施形態においては、ポリオールは、好ましくは、乾燥される溶液中に0.1~20% (w/v) (重量/溶液体積パーセント) の濃度で存在する。したがって、好ましくは、ポリオールは、乾燥される溶液中に、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、9.0若しくは9.5% (w/v) 以上若しくはそれを超える濃度で、及び/又は20.0、17.5、15.0、12.5、11.0若しくは10.5% (w/v) 以下若しくは未満の濃度で存在する。最も好ましくは、ポリオールは、乾燥される溶液中に約10% (w/v) の濃度で存在する。この実施形態における濃度は、例えば、ソルビトールがポリオールとして使用される場合に適切である。

10

#### 【0048】

別の実施形態においては、ポリオールは、好ましくは、乾燥される溶液中に0.1~40% (w/v) (重量/溶液体積パーセント) の濃度で存在する。したがって、好ましくは、ポリオールは、乾燥される溶液中に、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、12.5、15.0、18.0、19.0若しくは19.5% (w/v) 以上若しくはそれを超える濃度で、及び/又は50.0、40.0、35.0、30.0、25.0、22.5、21.0若しくは20.5% (w/v) 以下若しくは未満の濃度で存在する。最も好ましくは、この実施形態において、ポリオールは、乾燥される溶液中に約40% (w/v) の濃度で存在する。この実施形態における濃度は、例えば、2つの異なるポリオール (例えば、ソルビトールとマンニトール) が使用される場合に適切である。その場合、2つのポリオール間の重量比は1:100~1:1 (例えば、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2) にすることができる。

20

#### 【0049】

金属塩：

30

乾燥される溶液に溶解する金属塩は、二価又は一価金属カチオンの薬学的に許容される任意の塩であり得る。好ましい二価カチオンは $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 及び $\text{Zn}^{++}$ であり、 $\text{Ca}^{++}$ 及び $\text{Mg}^{++}$ がより好ましく、 $\text{Mg}^{++}$ が最も好ましい。好ましい一価カチオンは $\text{Li}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 及び $\text{K}^{+}$ であり、 $\text{Li}^{+}$ 及び $\text{Na}^{+}$ がより好ましく、 $\text{Li}^{+}$ が最も好ましい。金属塩の対アニオンは、好ましくはアミノ酸ではなく、好ましくはグルタメート又はアスパルテートではない。より好ましくは、金属塩の対アニオンは無機アニオンである。好ましい (無機) アニオン性対イオンは $\text{Cl}^{-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 及び $\text{CO}_3^{2-}$ であり、 $\text{Cl}^{-}$ 及び $\text{SO}_4^{2-}$ がより好ましく、 $\text{Cl}^{-}$ が最も好ましい。溶液は、上述の金属塩のうちの1つ又は複数の混合物を含むことができる。

#### 【0050】

40

金属塩は、好ましくは、乾燥される溶液中に0.005~10% (w/v) (重量/溶液体積パーセント) の濃度で存在する。したがって、好ましくは、金属塩は、乾燥される溶液中に、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0若しくは4.5% (w/v) 以上若しくはそれを超える濃度で、及び/又は10.0、8.0、7.0、6.0若しくは5.5% (w/v) 以下若しくは未満の濃度で存在する。最も好ましくは、金属塩は、乾燥される溶液中に約5% (w/v) の濃度で存在する。

#### 【0051】

乾燥される溶液中のアミノ酸がアミノ酸の金属塩 (例えばMSG) の形態で溶解している場合、アミノ酸金属塩は、金属塩の重量パーセンテージにではなくアミノ酸の重量パー

50

センテージに含まれ、それにより、金属対イオンの重量はアミノ酸の重量に含まれることが理解される。

【0052】

緩衝液：

乾燥される溶液は、好ましくは中性pH、例えば、6.0～8.0の範囲若しくは6.5～7.5の範囲のpH又は約7.0のpHを有する。乾燥される溶液は、好ましくは、上記の値にpHを維持するための緩衝液を含む。原則として、（好ましくは上記のpH値の範囲で効果的な緩衝能を有する）薬学的に許容される任意の緩衝液を、乾燥される溶液に使用することができる。緩衝液は、好ましくは0.5～100mM、より好ましくは1～50mM、最も好ましくは2～20mM、例えば約10mMの濃度で存在する。

10

【0053】

乾燥される溶液での使用に適した緩衝液としては、McIlvaine緩衝液（実施例を参照されたい）、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、及びヒスチジン緩衝液が挙げられる。

【0054】

水：

乾燥される溶液を調製するために使用する水は、好ましくは、注射用水のような超高純度で、好ましくは発熱性物質を含まない水である。

【0055】

本発明の乾燥される溶液中の成分（例えば賦形剤）の濃度を、本明細書では、一般に、重量/溶液体積（w/v）パーセントとして表す。これは、全溶液1リットル当たりの溶質のグラム数として表される、溶媒（例えば水）に対する溶質（例えば賦形剤）の関係であると理解される。例えば、50gのグルコースが溶けた1Lの溶液は5%w/v溶液と考えられる。

20

【0056】

好ましい実施形態においては、乾燥される溶液は、前述の量のバイオ薬物と、5～20%（w/v）のソルビトールと、5～20%（w/v）のグルタミン酸ナトリウムと、2～10%（w/v）のマグネシウム塩（好ましくはMgCl<sub>2</sub>及び/又はMgSO<sub>4</sub>）と、任意選択で5～20%（w/v）のマニトールと、任意選択で2～50mMの薬学的に許容される緩衝液（これは、本明細書に記載の中性pHで溶液を緩衝する。）と、から本質的になる。

30

【0057】

乾燥：

本発明の方法において、バイオ薬物を含む水溶液は乾燥される。任意の既知の乾燥方法を使用することができる。乾燥方法は、例えば、噴霧乾燥、空気乾燥、コーティング、泡沫乾燥、脱水、真空乾燥、真空/フリーズドライ、又はフリーズドライ（これらは、それ自体は当業者に既知である。）であり得る。好ましい実施形態において、乾燥方法は真空乾燥又はフリーズドライであり、フリーズドライ又は凍結乾燥がより好ましい。

【0058】

フリーズドライプロセスの一実施形態において、乾燥される溶液は、好ましくは、まず、-50℃以下、-40℃以下、-30℃以下、-20℃以下、又は-10℃以下の初期のフリーズドライ温度又は棚温度に凍結される。好ましい初期の棚温度は-50℃以下又は-40℃以下である。乾燥される溶液は、上記の初期の棚温度を有する棚に溶液（を含む容器/バイアル）をすぐに置くことによって急速凍結にかけることができる。あるいは、乾燥される溶液は、0℃を超える温度（例えば、2℃、4℃又は6℃）の温度を有する棚に溶液（を含む容器/バイアル）を置き、次いで、溶液を、好ましくは1分につき0.5℃、1℃又は2℃の割合で温度を低下させていくことにより、上記の初期のフリーズドライ温度にゆっくり凍結することによって緩慢凍結にかけることができる。乾燥される溶液には100マイクロバール以下の圧力をかけることができる。設定圧力に達したら棚温度をより高い温度に上昇させることができる。棚温度は、例えば、1分につき0.05℃

40

50

、 0.1 または 0.2 の割合で、初期のフリーズドライ温度よりも高い 5、10 または 15 に上昇させることができる。好ましくは、チャンバー内で圧力上昇が測定されなくなった時に一次乾燥ステップを終了する。好ましくはその時に、棚温度を、例えば 1 分につき 0.01、0.02 または 0.05 の割合で、任意選択で 1 つ又は複数のステップで、例えば 5、10、15、20 または 25 に上昇させることができる。二次乾燥段階の間、温度は、好ましくは、圧力上昇が検出できなくなるまでこの値に維持される。好ましいフリーズドライプロセスは本明細書の実施例に記載されている。

#### 【0059】

真空乾燥プロセスの一実施形態において、乾燥される溶液は、好ましくは約 5 ~ 25 の温度（例えば室温）、より好ましくは約 10 ~ 20 の温度（例えば約 15）である。次いで、圧力を、1 mbar 未満、0.5 mbar 未満、0.2 mbar 未満、0.1 mbar 未満、又は 0.05 mbar 未満に低下させる。減圧下で、乾燥される溶液の温度は、溶液を凍結させないために溶液の共融温度を（わずかに）超える温度（これは 0 以下であり得る。）に低下させることができる。チャンバー内で圧力上昇が測定されなくなったら、溶液の温度を、例えば 1 分につき 0.01、0.02 または 0.05 の割合で、任意選択で 1 つ又は複数のステップで、例えば 5、10、15、20 または 25 に上昇させることができる。温度は、好ましくは、圧力上昇が検出できなくなるまでこの値に維持される。好ましい真空乾燥プロセスは本明細書の実施例に記載されている。

#### 【0060】

第 2 の態様において、本発明は、前述の本発明の方法で得ることができる又は得られる、バイオ薬物の乾燥した又は乾燥された製剤に関する。

#### 【0061】

バイオ薬物の乾燥製剤を製造するための本発明の方法は、好ましくは、製剤の乾燥時のバイオ薬物の活性の損失を最小限に抑えることを目的とする。また、本発明の方法及び製剤は、好ましくは、本発明で得ることができる乾燥製剤の保存時のバイオ薬物の活性の損失を最小限に抑えることを目的とする。したがって、本発明の方法は、好ましくは、安定なバイオ薬物製剤すなわち保存可能期間が長い若しくは延長された製剤（好ましくは、冷蔵条件下（例えば 2 ~ 10）、室温（例えば 18 ~ 25）、又は熱帯地域で発生し得るような高温（例えば 32 ~ 45）におけるそのような製剤）を製造するための方法である。

#### 【0062】

バイオ薬物の活性の損失又は不活性化は、化学的経路（例えば、酸化、加水分解又は酵素作用）による活性の損失並びに物理的経路（例えば、変性、凝集、ゲル化）による活性の損失を含むと理解される。バイオ薬物の活性の損失は許容レベルを超えないことが好ましい。換言すると、乾燥及び／又はその後の保存の後に、少なくとも、バイオ薬物の意図される商業的な治療的及び／又は診断的適用に十分な生物学的活性若しくは生存性のレベル及び／又は本来の機能若しくは構造のレベルが保持されている。

#### 【0063】

バイオ薬物の特性に応じて、当業者は、前記バイオ薬物の活性を評価するためにどのアッセイを使用すべきか分かるであろう。バイオ薬物の活性は、例えば、活性な生ウイルスの場合、その生存性として表すことができ、あるいは、活性は、当業者に既知の適切なアッセイで決定できる酵素活性又は生物学的活性として表すことができる。他の例では、バイオ薬物の活性は、むしろ、バイオ薬物の物理的及び化学的完全性に関係する可能性がある。前記のバイオ薬物の構造及び／又は機能を評価することにより決定することができる。抗原の構造は、好ましくは E L I S A 又は B i a c o r 分析によって評価される。二次及び三次構造は、好ましくは、UV 分光法、蛍光分光法、フーリエ変換赤外（F T I R）分光法、及び／又は円偏光二色性（C D）分光法により評価される。免疫原性は、好ましくは、動物モデル（例えば、マウス、ラット、コットンラット、フェレット、ウサギ）を使用するインビボ分析により評価される。例えば、ラットはポリオウイルスについて好ま

しいモデルであり、コットンラットはR S Vについて好ましいモデルである。

【0064】

本発明の方法の好ましい実施形態において、(乾燥される)溶液を乾燥させることにより、乾燥製剤は、乾燥後(好ましくは直後)に再水和された時に、乾燥前の溶液に存在した生物学的活性の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%を保持する。2種以上のバイオ薬物が製剤中に存在する場合、異なる薬物の活性の損失の差は、好ましくは、50%未満、60%未満、70%未満、75%未満、80%未満、85%未満、90%未満、又は95%未満であり、活性の損失が最大の薬物の保持活性は、損失が最小の薬物の保持活性(これを100%とする。)に対するパーセントで表される。

10

【0065】

本発明の別の好ましい実施形態において、乾燥製剤は、45 での少なくとも1週間の保存後に再水和された時に、乾燥前の溶液に存在したバイオ薬物の生物学的活性の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%を保持する。2種以上のバイオ薬物が製剤中に存在する場合、異なる薬物の活性の損失の差は、好ましくは、50%未満、60%未満、70%未満、75%未満、80%未満、85%未満、90%未満、又は95%未満であり、活性の損失が最大の薬物の保持活性は、損失が最小の薬物の保持活性(これを100%とする。)に対するパーセントで表される。上記の保存後に保持される活性のパーセンテージは、37 又は45 で2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間又はそれ以上保存した後も保持されることが好ましい。

20

【0066】

第3の態様において、本発明は、医薬として使用するための、前述の本発明の方法により得ることができる又は得られる、バイオ薬物の製剤に関する。医薬として使用するために、該製剤は、乾燥製剤として使用することもできるし、例えば先に定義された水を用いて乾燥製剤を溶解することによって再構成することもできる。製剤は、好ましくは、元の体積すなわち乾燥前の体積に再構成される。該製剤は、感染症又は腫瘍に対する(個体における)免疫応答を誘導するための製剤であることが好ましい。本発明の製剤が投与される個体又は対象は、ヒトだけでなく、農用動物、愛玩動物などの動物(例えば、哺乳類、鳥、家畜類、家禽、ウシ、ウシ亜科の動物を含む。)であり得ることが理解される。該製剤は、感染症又は腫瘍に対するワクチン接種のための製剤であることがより好ましい。したがって、該製剤は、好ましくは、感染症又は腫瘍を予防又は治療するための製剤である。別の実施形態においては、本発明は、免疫応答を誘導するための、ワクチン接種のための、及び/又は感染症若しくは腫瘍を予防若しくは治療するための医薬を製造するための、前述の本発明の方法で得ることができる又は得られる製剤の使用に関する。さらに別の実施形態において、本発明は、有効量の該製剤を、それを必要とする対象に投与することによって、感染症又は腫瘍に対する免疫応答を誘導するための方法に関する。免疫応答は、好ましくはバイオ薬物中の抗原に対して誘導される。抗原は、好ましくは、感染症を引き起こす病原体の抗原、腫瘍の抗原、又は病原体若しくは腫瘍に対する免疫応答を誘導する抗原である。病原体は、好ましくは先に定義されたウイルスである。本発明の製剤は、再構成して又は再構成することなく、鼻腔内、非経口、筋肉内、皮下及び/又は経皮経路を介して投与することができる。

30

40

【0067】

本明細書及び特許請求の範囲において、動詞「含む」及びその活用形は非限定的な意味で使用され、その単語に続く事項が含まれるが、具体的に言及されていない事項が排除されないことを意味する。加えた、不定冠詞(“a”又は“an”)による要素への言及は、文脈上該要素の1つ又はただ1つが存在すると解釈すべき場合を除いて、2つ以上の要素が存在する可能性を排除しない。したがって、不定冠詞(“a”又は“an”)は通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0068】

50

本明細書で引用したすべての特許及び参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0069】

以下の実施例は例示目的のために示されるものにすぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】Fig. 1: 1型、2型及び3型IPV製剤(実験A)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。スクロース(SUC)、トレハロース(TREH)、マンニトール(MAN)、デキストラン(DEX)、及び塩化ナトリウム(NaCl)の安定化効果を試験した。

10

【図2】Fig. 2: 10%のマンニトール及び0%のデキストランを含有するIPV製剤の凍結乾燥直後の、3つの血清型のD抗原復元のパーセンテージを表す応答表面プロットである。

【図3】Fig. 3: 1型、2型及び3型IPV製剤(実験B)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。スクロース(SUC)、トレハロース(TREH)、グルタミン酸ナトリウム(MSG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、及び塩化ナトリウムの安定化効果を試験した。

【図4】Fig. 4: 真空乾燥(V)、遅い凍結速度の凍結乾燥(L)、及び速い凍結速度の凍結乾燥(S)直後のD抗原還元率。スクロース及びトレハロースの安定化効果を、安定剤を添加していないIPVワクチン(陰性対照)と比較して調査した。

20

【図5】Fig. 5: 図に示された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験C)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。

【図6】Fig. 6: 血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験D)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。すべての製剤は、5%のソルビトール、125mMのNaCl、及び(D11~D16を除いて)5%のペプトンを含有し、さらに図に示されている通りである。

【図7】Fig. 7: 45での1週間のインキュベーション後の、D抗原還元率により決定される、図に示された凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験D)の加速安定性試験。

【図8-1】Fig. 8: 図に示された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験E)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。速い凍結速度(パネルa)及び遅い凍結速度(パネルb)を使用して、ソルビトール(SOR)、スクロース(SUC)、マンニトール(MAN)、グルタミン酸ナトリウム(MSG)、ペプトン(PEP)、及びMgCl<sub>2</sub>の安定化効果を試験した。

30

【図8-2】Fig. 8: 図に示された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験E)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。速い凍結速度(パネルa)及び遅い凍結速度(パネルb)を使用して、ソルビトール(SOR)、スクロース(SUC)、マンニトール(MAN)、グルタミン酸ナトリウム(MSG)、ペプトン(PEP)、及びMgCl<sub>2</sub>の安定化効果を試験した。

【図9-1】Fig. 9: 45での1週間のインキュベーション後の、及び速い凍結速度(パネルa)及び遅い凍結速度(パネルb)を使用した、図に示された凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験E)の安定性。凍結乾燥直後の最も有望な製剤のみを示す。

40

【図9-2】Fig. 9: 45での1週間のインキュベーション後の、及び速い凍結速度(パネルa)及び遅い凍結速度(パネルb)を使用した、図に示された凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験E)の安定性。凍結乾燥直後の最も有望な製剤のみを示す。

【図10】Fig. 10: 血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験F, n=3)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。ペプトンの安定化効果を、10%のソルビトール、10%のMSG及び5%のMgCl<sub>2</sub>を含有し、10%のマンニトールを含有する又は含有しな

50

いIPV製剤において調査した。すべての製剤を凍結乾燥プロセスの乾燥段階の前に急凍した。

【図11】Fig. 11: 45 での1週間のインキュベーション後の、凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験F,  $n = 3$ )の安定性。この実験は、ペプトン又は単一アミノ酸の添加により、加速安定性試験の間、10%のソルビトール、10%のMSG及び5%の $MgCl_2$ を含有し、10%のマニトールを含有する又は含有しないIPV製剤を改善することができるかどうかを調査した。

【図12-1】Fig. 12: 図に示された種々の緩衝液成分を含有する血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験G)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。すべて10%のソルビトール、10%のMSGを含む、パネルa、b、c及びdに示された4つの製剤を、10mMのMcIlvaine緩衝液、10mMのクエン酸緩衝液、10mMのヒスチジン緩衝液、10mMのHEPES緩衝液、及び10mMのリン酸緩衝液で試験した。対照の製剤は透析しなかった。

10

【図12-2】Fig. 12: 図に示された種々の緩衝液成分を含有する血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験G)の凍結乾燥直後のD抗原還元率。すべて10%のソルビトール、10%のMSGを含む、パネルa、b、c及びdに示された4つの製剤を、10mMのMcIlvaine緩衝液、10mMのクエン酸緩衝液、10mMのヒスチジン緩衝液、10mMのHEPES緩衝液、及び10mMのリン酸緩衝液で試験した。対照の製剤は透析しなかった。

【図13-1】Fig. 13: 凍結乾燥及びその後の45 での1週間の保存後の、図に示された種々の緩衝液成分を含有する凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験G)の安定性。10%のソルビトール、10%のMSG及び $MgCl_2$ を含有し、マニトールを含有する若しくは含有しない、及びペプトンを含有する若しくは含有しない4つの製剤を、10mMのMcIlvaine緩衝液、10mMのクエン酸緩衝液、10mMのヒスチジン緩衝液、10mMのHEPES緩衝液、及び10mMのリン酸緩衝液と組み合わせて試験した。対照の製剤は透析せず、図に示された賦形剤を含有するMcIlvaine緩衝液で1:1希釈した。

20

【図13-2】Fig. 13: 凍結乾燥及びその後の45 での1週間の保存後の、図に示された種々の緩衝液成分を含有する凍結乾燥された血清型1型、2型及び3型IPV製剤(実験G)の安定性。10%のソルビトール、10%のMSG及び $MgCl_2$ を含有し、マニトールを含有する若しくは含有しない、及びペプトンを含有する若しくは含有しない4つの製剤を、10mMのMcIlvaine緩衝液、10mMのクエン酸緩衝液、10mMのヒスチジン緩衝液、10mMのHEPES緩衝液、及び10mMのリン酸緩衝液と組み合わせて試験した。対照の製剤は透析せず、図に示された賦形剤を含有するMcIlvaine緩衝液で1:1希釈した。

30

【図14】Fig. 14: 真空乾燥(V)、遅い凍結速度の凍結乾燥(L)、及び速い凍結速度の凍結乾燥(S)直後のD抗原還元率。種々の製剤の安定化効果を、安定剤の添加なしのIPVワクチン(陰性対照)、及びスクロース若しくはトレハロースを配合したIPVと比較した。

【図15】Fig. 15: 図に示された血清型1型、2型及び3型IPV製剤の凍結乾燥直後のD抗原還元率。

40

【図16】Fig. 16: 凍結乾燥及びその後の45 での1週間の保存後の、D抗原還元率により決定される、図に示された血清型1型、2型及び3型IPV製剤の安定性。

#### 【実施例】

##### 【0071】

##### 1. 材料及び方法

##### 1.1 材料

1型の不活化Mahoney株、2型のMEF及び3型のSaukettを含有する3価の不活化ポリオワクチン(Salk-IPV)を、RIVM-Vaccinologyのプロセス開発部門(Bilthoven, The Netherlands)から得た

50

。3価のSalik-IPVバルク(10×)を、10倍濃度の40-8-32DU/ヒト単回用量(1ml)として製剤化した。この試験で使用したIPV05-126Bバルクの濃度を、Westdijkら[6]により説明されているようにQC-ELISAで411-90-314DU/mlに決定した。

#### 【0072】

賦形剤、すなわち、スクロース、D-ソルビトール、D-トレハロース二水和物、D-グルコース一水和物、マンニトール、L-グルタミン酸ナトリウム一水和物(本明細書で、グルタメート、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、又はMSGと呼ぶ)、ミオイノシトール、D-ラフィノース、ヒドロキシエチルデンプン、グリシン、L-プロリン、L-ロイシン、塩化カルシウム二水和物、マルチトール、塩化マグネシウム六水和物、塩化リチウム、及びオボアルブミンは、すべてSigma(St. Louis, MO)から購入した。ペプトン(植物)、デキストラン(リューコノストック(Leuconostoc)属の種由来、6kDa)、L-ヒスチジン、L-アラニン、塩化亜鉛、及びラクチピオン酸カルシウム一水和物は、Fluka(Buchs, Switzerland)製であった。ラクチトール(ラクティ(Lacty)登録商標-M)はPurac Biochem(Gorinchem, The Netherlands)製であり、L-アルギニン(EP, 非動物起源)及びTween 80はMerck(Darmstadt, Germany)製であり、ポリビニルピロリドン25(PVP, 29kDa)はServa Feinbiochemica GmbH(Heidelberg, Germany)製であり、加水分解ブタゼラチンであるSol-U-ProはDyna gel Inc.(Calumet City, IL)製であり、フィコール(Ficoll)はPharmacia(Uppsala, Sweden)製であった。緩衝液成分として、リン酸二水素ナトリウム二水和物( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )、塩化ナトリウム( $\text{NaCl}$ )、リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )及びEDTA(Merck製)を使用した。クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸及びHEPESはSigma-Aldrich(St. Louis, MO)製であり、リン酸水素二ナトリウム二水和物( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )はFluka(Buchs, Switzerland)製であった。使用したすべての賦形剤は試薬グレード又はより高いグレードのものであった。

#### 【0073】

10mMのMcIlvaine緩衝液を調製するために、10mMのクエン酸を10mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ に1:6の比率で添加し、pH値を7.0にした。10mMのクエン酸緩衝液については、構成成分であるクエン酸三ナトリウム二水和物(10mM)及びクエン酸(10mM)をpH7.0に達するまで一緒に混合した。pH7.0の10mMのリン酸緩衝液は10mMの $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 及び10mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ からなるものであった。10mMのHEPES緩衝液及び10mMのヒスチジン緩衝液は、緩衝液の構成成分を秤量し、溶解した後、HCl及び/又はNaOHを用いてpH値を7.0に調整することによって調製した。

#### 【0074】

##### 1.2 方法

##### 1.2.1 透析

特に断らない限り、3価のIPVバルク材料を、分画分子量10kDaの低結合再生セルロース膜の透析カセット(スライド-A-ライザー(Slide-A-Lyzer(登録商標), Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL))を使用して、10mMのMcIlvaine緩衝液に対して透析し、IPVバルク(M199培地)の緩衝液成分を交換した。

#### 【0075】

##### 1.2.2 乾燥される溶液

すべての賦形剤を、示された最終濃度の2倍の濃度でMcIlvaine緩衝液に溶解した。透析したIPVを、試験する製剤と均一に混合した。その後、2mlのガラスの注射バイアル(Muller+Muller, Holzminden, Germany)を

0.2 ml の I P V - 賦形剤混合物で満たし、予め ( 9 0 ℃ で一晩 ) 乾燥させた 13 mm のゴム栓 ( Helvoet Pharma , Alken , Belgium 製の V 9 2 5 0 タイプ ) で蓋をした。

#### 【 0 0 7 6 】

##### 1 . 2 . 3 凍結乾燥及び真空乾燥プロセス

凍結乾燥については、満たされ、栓が半分閉まったバイアルを、 - 5 0 ℃ の棚温度又は 4 ℃ の棚温度の Leybold の G T 4 フリーズドライヤー又は Zirbus の試験用 / 実験室用フリーズドライユニット昇華装置 2 - 3 - 3 に入れ、次いで 1 ℃ / 分の割合で温度を低下させていくことによって - 5 0 ℃ に凍結させる ( それぞれ、急速凍結及び緩慢凍結と表す ) 。バイアルを 2 時間、 - 5 0 ℃ に維持した。一次乾燥段階については、棚温度を 0 . 1 ℃ / 1 分で - 4 5 ℃ に上昇させ、次いで 0 . 0 2 ℃ / 分で - 4 0 ℃ に上昇させ、その後、42 時間インキュベーションした。二次乾燥段階を、棚温度をさらに 0 . 0 2 ℃ / 1 分で 1 0 ℃ に上昇させ、その後、1 0 ℃ で 8 時間インキュベーションすることによって行った。その後、棚温度を 0 . 0 2 ℃ / 分で 2 5 ℃ に上昇させた。

#### 【 0 0 7 7 】

真空乾燥については、満たされ、栓が半分閉まったバイアルを、15 ℃ の棚温度の Zirbus のフリーズドライユニット昇華装置 2 - 3 - 3 に入れ、10 分間、その温度に維持した。チャンバーの圧力を、15 分の降下ステップにおいて、異なる速度 ( 1 mbar / 分、0 . 3 mbar / 分、0 . 1 mbar / 分 ) 、25 mbar のチャンバー圧力で開始して 1 mbar まで低下させた。温度を、0 . 0 5 mbar で 1 時間、及び 0 . 0 3 mbar で 1 時間、- 1 0 ℃ まで低下させた ( その結果、製剤は凍結しなかった。 ) ( 製剤の共晶温度を超えた製品温度 ) 。その後、棚温度を 0 . 0 5 ℃ / 分で 3 0 ℃ に上昇させた。そのサイクルの最後に、バイアルを、真空下でバイアルを閉じ、alu - キャップで密閉して、分析まで 4 ℃ に維持した。真空乾燥プロセス中の棚温度 ( shelf temperature ) 及びチャンバーの圧力の例を表 1 に示す。

#### 【 0 0 7 8 】

表 1 :

|      | T <sub>shelf</sub><br>(°C) | 時間<br>(分) | 圧力<br>(mbar) |
|------|----------------------------|-----------|--------------|
| FT01 | 15                         | 10        | —            |
|      |                            |           |              |
| D01  | 15                         | 15        | 25           |
| D02  | 15                         | 15        | 10           |
| D03  | 15                         | 15        | 5            |
| D04  | 15                         | 15        | 3            |
| D05  | 15                         | 15        | 1            |
| D06  | -10                        | 60        | 0.05         |
| D07  | -10                        | 60        | 0.03         |
| D08  | -5                         | 120       | 0.03         |
| D09  | 5                          | 120       | 0.03         |
| D10  | 10                         | 120       | 0.03         |
|      |                            |           |              |
| P01  | 20                         | 240       | —            |
| P02  | 30                         | 240       | —            |
| P03  | 4                          | 60        | —            |

#### 【 0 0 7 9 】

##### 1 . 2 . 4 D 抗原 E L I S A

ポリスチレンの96ウェルのマイクロタイタープレートを、室温で一晩、血清型に特異的なウシ抗ポリオ血清(RIVM, Bilthoven, The Netherlands)で被覆した。0.1% Tween 20のPBS溶液(洗浄緩衝液)で洗浄した後、IPV標準試料の2倍希釈物、及びアッセイ緩衝液(0.5%のProtifar及び0.1%のTween 20を含有するPBS)で希釈したIPV製剤の希釈物を添加した(100 $\mu$ /ウェル, 二連)。プレートを、穏やかな振動下、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、広範囲で洗浄し、血清型に特異的なマウスモノクローナル抗体(mab 3-4-E4(1型)、3-14-4(2型)、1-12-9(3型)、すべてRIVM, Bilthoven, The Netherlands製)及びHRP標識抗マウスIgG(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)の混合物を添加した。その後、プレートを、穏やかな振動下、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。プレートを広範囲で洗浄し、ELISAハイライト(HighLight)シグナル試薬(Zomerbloemen BV, Zeist, The Netherlands)を添加し、ルミノメーター(Bertholdのセントロ(Centro) LB960)を用いて、10~15分間、化学発光を測定した。

10

#### 【0080】

##### 1.2.5 水分量分析

水分量を、カールフィッシャー電量滴定装置(モデルCA-6水分計, Mitsubishi)を用いて決定した。カールフィッシャー法による水分残留決定の原理は、ヨウ素及び二酸化硫黄のみが水の存在下で反応するという事実に基づく。試料を秤量し、カールフィッシャー試薬であるヒドラナルクーロマト(Hydranal Coulomat) A(Fluka, Buchs, Switzerland)で再構築した。再構築した試料を注射器に採取し、滴定容器に注入した。各バイアルを三連で測定した。空のバイアルを秤量し、滴定装置によって測定した水分量、バイアル中の凍結乾燥された生成物の重量、試薬の再構築体積、滴定体積、及び空試験の水分量に基づいて水分量を算出した。

20

#### 【0081】

##### 1.2.6 示差走査熱量測定(DSC)

製剤の熱力学的振る舞いを、示差走査熱量測定(DSC)、すなわち、物質の相転移と関連する温度及び熱流量を時間及び温度の関数として測定する方法によって決定した。フリーズドライされた製剤をアルミニウムのDSCパンに入れ、示差走査熱量測定装置(DSC Q100, TA Instruments)の制御温度プログラムにかけた。試料を20 $^{\circ}$ C/分の加熱速度で0 $^{\circ}$ Cから150 $^{\circ}$ Cに加熱し、試料チャンバーを窒素ガスでパージした(50ml/分)。ガラス転移温度( $T_g$ )を、ソフトウェア(Universal Analysis 2000, TA Instruments)を使用して、熱流量曲線における不連続部分の midpoint として決定した。

30

#### 【0082】

##### 2. 結果

##### 2.1 凍結乾燥中の異なる血清型のIPVの安定化

最初の実験(実験A)において、4つの周知の糖/ポリオール(スクロース、トレハロース、マンニトール、デキストリン)及び塩化ナトリウムを安定化の潜在能力について評価した(Fig. 1)。この試験は、IPVの凍結乾燥に最適な製剤を得るために実験法の設計により始めた。

40

#### 【0083】

異なるIPV製剤を前述(セクション1.2.3)のように凍結乾燥した。凍結乾燥ケーキを、最初の体積と等量の水を添加することによって再構成し、D抗原復元率をELISA(セクション1.2.4)によって決定した。復元率を、凍結乾燥前に測定した液体製剤のD抗原含有量に対するパーセンテージで示した。

#### 【0084】

いかなる添加剤も含有せず、IPVがMcIlvaine緩衝液で1:1希釈された3価のIPV製剤は、凍結乾燥の後、すべての血清型について10%未満の復元率を示した

50

(Fig. 1: A1)。IPV2型は、すべての製剤の中で、 $\pm 80\%$ という最大の復元率を有する最も安定な血清型であることを示した。デキストランは、凍結乾燥されたIPV製剤、特に1型及び3型のD抗原復元にマイナスの影響を与えたようであった。血清型1型、2型及び3型について最大の復元率がそれぞれ $\pm 55\%$ 、 $\pm 85\%$ 及び $\pm 50\%$ という最良の結果は、マンニトールとの組み合わせでスクロース及び/又はトレハロースを含有する製剤によって得られた(Fig. 1: 製剤A3, A4, A12, A16)。NaClの添加は、凍結乾燥後のIPVの復元にプラスの影響を与えなかった。

#### 【0085】

この最初の試験的実験は、各IPV血清型が各々の安定剤を好む3価のポリオワクチンを凍結乾燥することの複雑さを明確に示している。10%のマンニトールを有する製剤において、1型及び3型は、トレハロースなしの高濃度のスクロースの存在を好んだが、2型は、スクロースなしの高濃度のトレハロースを好んだ(Fig. 2)。

#### 【0086】

次の実験(実験B)においては、グルタメート、糖類及びポリマーの混合物の安定化の潜在能力を調査した。賦形剤であるスクロース、トレハロース、グルタミン酸ナトリウム(MSG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)及びNaClの異なる組み合わせを調査した。MSGと共に二糖類、スクロース及び/又はトレハロースをベースにした製剤を有する3価のIPVの凍結乾燥は、3つの血清型について、それぞれ、50~60%、70~95%、及び50~65%というD抗原復元率を示した(Fig. 3: 製剤B4, B7, B9, B12, B13)。8%のHES又は63mMのNaClのみをベースにした製剤は、凍結乾燥中、IPVを保護しなかった(Fig. 3: B5及びB10)。スクロースを有する製剤へのNaClの添加は、凍結乾燥後のD抗原復元率の5~10%の増加を示した(Fig. 3: B2及びB16)。

#### 【0087】

### 2.2 乾燥プロセスの影響と製剤

次の試験において、乾燥プロセスに関する、バイオ薬物の乾燥に使用される典型的な製剤の結果を示す。3価のIPVを含有する製剤を、真空乾燥(凍結を含まない方法)、急速凍結ステップを使用するフリーズドライ(予め冷却した-50℃の棚に製品を直接置く方法)、及び緩慢凍結ステップを使用するフリーズドライ(4℃の棚に製品を置き、-50℃に冷却して凍結させる方法)によって乾燥した。Fig. 4に示されるように、例えば、スクロース又はトレハロースをベースにした標準的な製剤は、真空乾燥時にはIPVを一部保護する。しかし、これらの製剤はフリーズドライ時には保護しない。

#### 【0088】

### 2.3 賦形剤のスクリーニング

次の実験(実験C)において、いくつかのアミノ酸、タンパク質/ペプチド又は他の安定剤と組み合わせられたソルビトール、マンニトール、スクロース及び/又はMSGを試験した(表2)。凍結乾燥されたIPV製剤における塩の効果を検査するために、125mMのNaClを添加したC-製剤も試験した。D抗原復元率に対するNaClの明白な効果は観察されなかった(データは示さず)。凍結乾燥直後の抗原性の結果をまず見ると、5%のソルビトール、5%のペプトン及び1%の塩化リチウム(LiCl)を含有する製剤C13が、すべての血清型について最も高い復元率、すなわち、1型、2型及び3型についてそれぞれ $\pm 85\%$ 、 $\pm 100\%$ 及び $\pm 85\%$ を示したことが明らかであった(Fig. 5)。LiCl化合物を1.8%のMgCl<sub>2</sub>に置き換えた結果、3つの血清型について、D抗原復元率が $\pm 5\%$ 、 $\pm 20\%$ 、及び15%減少した。しかし、これらの製剤は、比較的高い残留水分量(MgCl<sub>2</sub>含有製剤について2.1%、及びLiClを含有する製剤について6.2%)を示した。非常に少量の界面活性剤、Tween 80を、スクロース、トレハロース、並びにアミノ酸のグリシン及びリシンを含有する製剤に添加すると、D抗原復元率は5~15%増加した(Fig. 5: C8, C9)。ソルビトール、マンニトール及びMSGをベースにした製剤(C2, C3, C4, C7)は、1型、2型及び3型について、それぞれ65%超、80%超及び70%超の復元率を示した。

## 【 0 0 8 9 】

この試験において、ソルビトール、ペプトン、及び塩  $\text{LiCl}$  若しくは  $\text{MgCl}_2$  の組み合わせは、I P V の凍結乾燥直後の D 抗原復元にプラスの効果を与えたようであった。別の注目すべき製剤はソルビトール、マンニトール及び M S G の混合物であり、その混合物は、M S G と組み合わせたポリオールが存在により、凍結乾燥中、I P V が安定することを示した。

## 【 0 0 9 0 】

凍結乾燥された製剤のガラス転移温度を測定した（表 2）が、ガラス転移温度は D 抗原復元率との明白な関係を示さなかった。オボアルブミン及びペプトンを含有する製剤は最も高いガラス転移温度を示した。

## 【 0 0 9 1 】

表 2：

凍結乾燥された I P V 製剤の組成（実験 C）。残留水分量（R M C）をカールフィッシャー法によって決定し、乾燥ケーキの  $T_g$  を D S C によって決定した。

|     | SOR | MAN | SUC | MSG | 糖／ポリオール                  | アミノ酸                          | タンパク質      | 他                    | RMC (%) | $T_g$ (°C) |
|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-------------------------------|------------|----------------------|---------|------------|
| C1  | —   | —   | —   | —   | —                        | —                             | —          | —                    | 3.6     | n.d.       |
| C2  | 7%  | 7%  | —   | 2%  | —                        | 2% グリシン                       | 7% オボアルブミン | —                    | 0.3     | 37.2       |
| C3  | 7%  | 7%  | —   | 2%  | —                        | 2% グリシン                       | 7% オボアルブミン | 1mM EDTA             | n.d.    | 38.3       |
| C4  | 7%  | 7%  | —   | 2%  | —                        | 2% グリシン                       | —          | —                    | 1.9     | 53.5       |
| C5  | —   | —   | 3%  | —   | 3% デキストラン<br>3% ミオイノシトール | —                             | 3% オボアルブミン | —                    | 1.1     | 54.9       |
| C6  | 5%  | 5%  | 5%  | —   | —                        | 2% グリシン<br>3% リシン<br>3% L-Arg | —          | —                    | 1.0     | 37.1       |
| C7  | 5%  | 5%  | 5%  | 3%  | —                        | 2% グリシン<br>3% リシン             | —          | —                    | 3.3     | 37.2       |
| C8  | —   | —   | 5%  | —   | 5% テレハロース                | 3% リシン<br>3% アラニン             | —          | —                    | 0.5     | 32.3       |
| C9  | —   | —   | 5%  | —   | 5% テレハロース                | 3% リシン<br>3% アラニン             | —          | 0.01% Tween 80       | 0.5     | 34.1       |
| C10 | —   | —   | 5%  | —   | —                        | 3% リシン<br>3% アラニン             | —          | 3% ラクトビオン酸Ca         | 1.0     | 31.2       |
| C11 | —   | —   | 5%  | —   | —                        | 3% リシン<br>3% アラニン             | 3% 組換えゼラチン | —                    | 0.3     | 35.7       |
| C12 | 5%  | —   | —   | —   | —                        | —                             | 5% ペプトン    | 1.8% $\text{MgCl}_2$ | 2.1     | 44.7       |
| C13 | 5%  | —   | —   | —   | —                        | —                             | 5% ペプトン    | 1% $\text{LiCl}$     | 6.2     | n.d.       |
| C14 | —   | —   | 5%  | —   | 5% テレハロース                | —                             | 5% ペプトン    | —                    | 0.5     | 35.6       |

## 【 0 0 9 2 】

これらの発見に基づいて新たなスクリーニング実験（実験 D）を設計した。最も有望な復元率は、ソルビトール、ペプトン及び塩化  $\text{Mg}$  若しくは塩化  $\text{Li}$  をベースにした製剤で得られたので、本発明者らは、10%のソルビトール、5%のペプトン及び125 mMの  $\text{NaCl}$  をベースにした実験を設計した。オボアルブミンは動物由来であり、したがって、ヒトに使用するワクチンには望ましくない賦形剤であるので、オボアルブミンを除いた。いくつかの賦形剤の I P V 安定化機構をより理解するために、10%のソルビトール、5%のペプトン及び125 mMの  $\text{NaCl}$  を含有する製剤を、糖／ポリオール、（5%のペプトンの代わりに）アミノ酸、塩、又は他の安定剤（例えば、界面活性剤又はタンパク質）と組み合わせた。ソルビトール、 $\text{NaCl}$  及び1%のヒスチジンを有する製剤は、フリーズドライプロセスの直後、90～100%の復元率を示した（Fig. 6：D11）

。先に観察されたように、 $MgCl_2$  含有製剤は、凍結乾燥中、有望な安定化能力を示し、塩化カルシウム ( $CaCl_2$ ) を含有する IPV 製剤及び塩化リチウム ( $LiCl$ ) を含有する IPV 製剤についても同様であった (Fig. 6 : D17 ~ 19)。凍結乾燥後の高温での保存後も、安定した凍結乾燥製品を同様に与え能力で賦形剤を選択するために、スクリーニング段階の間、加速安定性を評価した。

#### 【0093】

##### 2.4 加速安定性試験

いくつかの製剤は、凍結乾燥直後、許容される D 抗原還元率を示したが、45 での 1 週間のインキュベーション後、これらの 4 つの製剤の D 抗原還元率は、1 型、2 型及び 3 型について、それぞれ、30%、60% 及び 10% を下回るパーセンテージまで低下した (Fig. 7)。5% のミオイノシトールは、45 でのインキュベーション後、最も高い D 抗原還元率を示したが、それでも、3 つの血清型について  $\pm 40\%$ 、10% 及び 30% の減少が観察され、IPV 2 型が最も安定な血清型であることが再度示された (Fig. 7 : D5)。45 での 1 週間の保存時に、1% のラクチトールを含有する製剤は、2 型について D 抗原還元率の 10% 未満の減少を示したが、残念なことに、1 型及び 3 型は 30% 超の減少を示した (Fig. 7 : D7)。

#### 【0094】

ソルビトール、マンニトール及び MSG との組み合わせ、並びにペプトン及び  $MgCl_2$  の安定化潜在能力をさらに調査するために、種々の賦形剤と凍結乾燥後の D 抗原還元との関係を決定するための実験設定の新たな設計を行った。実験 E には、以下の変数、すなわち、0 / 10% のソルビトール、0 / 10% のスクロース、0 / 10% のマンニトール、0 / 10% の MSG、0 / 5% のペプトン、及び / 又は 0 / 5% の  $MgCl_2$  が含まれ、この実験において凍結速度を調査した。緩慢凍結は、バイアルを 4 の棚に置き、その後、0.1 / 分の割合で -50 まで冷却することを意味し、急速凍結は、予め -50 に冷却した棚にバイアルを直接置くことを意味する。その結果を、速い凍結速度については Fig. 8a に、遅い凍結速度については Fig. 8b に示した。

#### 【0095】

凍結乾燥後の D 抗原還元率をまず見ると、糖 / ポリオールとの組み合わせで MSG 及び  $MgCl_2$  を含有する急速凍結製剤は、すべての血清型について  $\pm 80 \sim 90\%$  という最も高い還元率を示した (Fig. 8a : E22 ~ 24, E29 ~ 32)。ゆっくり凍結された試料に関しては、 $MgCl_2$  含有製剤が 1 型及び 3 型について 75 ~ 90% の還元率を示した (Fig. 8b : E54 ~ 57, E63 ~ 66)。しかし、2 型については、ペプトンと組み合わせた糖の製剤のみが  $\pm 70\%$  という還元率を示した (Fig. 8b : E43 ~ 48)。実験の再現性を示すために、製剤 H33 及び H66 を三連で試験し、製剤 H33 及び H66 はすべての血清型について 10% 未満の標準偏差を示した。凍結乾燥直後 (Fig. 8)、又は 45 での 1 週間のインキュベーション後 (Fig. 9) のこれら 2 つの製剤の D 抗原還元率から、凍結速度はこれらの IPV 製剤の D 抗原還元率に大きく影響しなかったことが明らかである。

#### 【0096】

実験 E を、Umetrics 製の「Modde」ソフトウェアを使用する「実験の設計 (Design of Experiment)」に基づいて設定した。凍結乾燥後の D 抗原還元率に加えて、凍結乾燥及びその後の 37 又は 45 での保存後の還元率も、設計におけるアウトプットとして使用した。製剤の関数としてのアウトプットを調整し、Modde を用いてモデルに入れた。これは、どの製剤パラメーターが凍結乾燥及び保存後の還元率に影響を与えるかを明らかにした (データは示さず)。

#### 【0097】

各ウイルス血清型についての最も重要な製剤パラメーターを表 3 ~ 表 5 にまとめる。

【表 3】

| 表 3                    | 1型のD抗原復元率  |                |                |
|------------------------|------------|----------------|----------------|
| 製剤パラメーター               | 凍結乾燥後<br>% | 37°Cでの保存後<br>% | 45°Cでの保存後<br>% |
| MSG                    | 9          | 10             | 7              |
| ソルビトール                 | 8          | 6              | 4              |
| MgCl <sub>2</sub>      | 7          | 6              | 3              |
| ペプトン                   |            | 6              | 4              |
| マンニトール                 | 4          | 6              |                |
| MSG* MgCl <sub>2</sub> |            |                | 4              |

10

【表 4】

| 表 4               | 2型のD抗原復元率  |                |                |
|-------------------|------------|----------------|----------------|
| 製剤パラメーター          | 凍結乾燥後<br>% | 37°Cでの保存後<br>% | 45°Cでの保存後<br>% |
| MSG               | 7          | 9              | 9              |
| ソルビトール            | 7          | 7              | 5              |
| MgCl <sub>2</sub> |            |                |                |
| ペプトン              |            | 10             | 10             |
| マンニトール            | 3          | 4              | 4              |
| スクロース             |            |                | 2              |

20

【表 5】

| 表 5                    | 3型のD抗原復元率  |                |                |
|------------------------|------------|----------------|----------------|
| 製剤パラメーター               | 凍結乾燥後<br>% | 37°Cでの保存後<br>% | 45°Cでの保存後<br>% |
| MSG                    | 14         | 10             | 10             |
| ソルビトール                 | 8          | 7              | 7              |
| MgCl <sub>2</sub>      | 4          | 4              | 4              |
| ペプトン                   | 4          | 12             | 12             |
| マンニトール                 | 6          | 5              | 5              |
| スクロース                  | 4          | 1              | 1              |
| MSG* MgCl <sub>2</sub> |            | 5              | 5              |

30

## 【 0 0 9 8 】

40

## 2 . 5 ペプトンの代替

ペプトンは、凍結乾燥されたIPVの45°Cでのその後の保存を安定化させたようであったので、本発明者らは、10%のソルビトール、5%のMSG及び5%のMgCl<sub>2</sub>を有する製剤並びにその製剤に10%のマンニトールを組み合わせた製剤におけるペプトンの役割を調査する実験を行った。ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>を含有する製剤への10%のマンニトールの添加による大きな差異は見出されなかった。5%のペプトンの添加はいずれの製剤の抗原性にも影響を与えなかった(Fig. 10)。

## 【 0 0 9 9 】

単一アミノ酸の添加が、凍結乾燥されたIPVのその後の保存中のペプトンの安定化の役割を担うことができるかどうかを確かめるために、アミノ酸を、ソルビトール、MSG

50

及び  $\text{MgCl}_2$  を含有し、マンニトールを含有する又は含有しない製剤に添加した。45 での1週間のインキュベーション後、ペプトンも、添加したアミノ酸も、10%のソルビトール、10%のMSG及び10%の  $\text{MgCl}_2$  を含有する対照製剤と比較してD抗原復元の安定性の改善を示さなかった (Fig. 11: F1.0 ~ F1.5)。マンニトールの存在下で、ペプトンの安定化能力は3型について示されたにすぎないが、そのD抗原復元率は対照試料と比較して $\pm 15\%$ 改善した。しかし、1型について大幅な復元率の減少 ( $p < 0.001$ ) が見出され、それほど大幅ではないが、2型も $\pm 10\%$ 低い復元率を示した (Fig. 11: F2.0, F2.1)。ソルビトール、MSG及び  $\text{MgCl}_2$  を含有するすべての製剤について、45 での1週間の期間後、D抗原含有量の $\pm 10\%$ の減少が示されたが、マンニトールの添加は、加速安定性試験の間、2型について安定にすることが見出された。アルギニンは、ソルビトール、MSG、 $\text{MgCl}_2$  及びマンニトールを含有する製剤において安定化の潜在能力を有したようであり (Fig. 11: F2.3)、45 でのインキュベーション後、1型及び3型のD抗原復元率について、それぞれ $\pm 15\%$ 及び $\pm 30\%$ の減少を示したにすぎなかった。これは、アルギニンの代わりにペプトンを有するほぼ同じ製剤による安定性に匹敵した (Fig. 11: F2.1)。

#### 【0100】

ペプトンなどの不確定な賦形剤はヒトのワクチンに好まれないという事実により、IPVを安定化させ得る、ペプトンの可能な代替物を調査した。質量分析法及びHPLCによる分析は、ペプトンに存在する最も豊富なアミノ酸を示した (データは示さず)。ソルビトール、MSG及び  $\text{MgCl}_2$  を含有する製剤へのいくつかの単一アミノ酸の添加は、対照製剤と比較して45 での安定性を改善しなかった。ペプトンは、ソルビトール、MSG、 $\text{MgCl}_2$  及びマンニトールを含有する製剤において3型を安定化させたようであったが、アルギニンは1型及び3型両方の安定性を改善することができる。2型は、対照製剤において、加速安定性試験の間、D抗原復元の十分な維持を示していた。ペプトンの正確な組成を決定することは困難であるが、加水分解されていないペプトン対化学的に加水分解されたペプトンによる逆相HPLCによるアミノ酸の定量は、ペプトンが単一アミノ酸及びペプチドの両方からなることを示した (但し、90% w/w超のペプトンは不確定なままである)。ペプトンは、試験対象のIPV製剤のガラス転移温度を上昇させたようであるので、ペプトンを、スクロース又はトレハロースのように高い  $T_g$  を有する賦形剤で代替することは可能かもしれない。

#### 【0101】

表7:

ソルビトール、MSG及び  $\text{MgCl}_2$  を含有し、マンニトールを含有する又は含有しないIPV製剤のガラス転移温度 ( $T_g'$  及び  $T_g$ ) をDSCによって決定した。これらの製剤のガラス転移温度へのペプトンの影響を調査した。単一の測定値を示した。

|          | 10%ソルビトール+10%MSG +<br>5% $\text{MgCl}_2$ |            | 10%ソルビトール+10%MSG +<br>5% $\text{MgCl}_2$<br>+10%マンニトール |            |
|----------|------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|------------|
|          | $T_g'$ (°C)                              | $T_g$ (°C) | $T_g'$ (°C)                                            | $T_g$ (°C) |
| 対照       | -47.9                                    | 35.2       | -44.4                                                  | 38.8       |
| +5% ペプトン | -44.1                                    | 39.8       | -42.8                                                  | 48.7       |

#### 【0102】

先の実験は、ペプトンに値する代替物を与えず、ソルビトール、MSG及び  $\text{MgCl}_2$  を含有し、マンニトールを含有する又は含有しない製剤が、加速安定性試験の後でも最適な結果をもたらすことを示した。この試験の間、すべての製剤を、IPVの凍結乾燥に適した緩衝液として知られる [52] McIlvaine 緩衝液で調製した。製剤をさらに最適化するために、緩衝液のスクリーニングを、バイオ薬物の凍結乾燥に頻繁に使用される [18] 緩衝液で行った。各緩衝液におけるIPVバッチを透析によって調製し、透析

されていないIPVが対照としての役割を果たした。

#### 【0103】

ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>を含有する製剤は、凍結乾燥直後、3つの血清型について、±95%、±85%及び±90%の復元率を示した(Fig. 12a: G1. 0 ~ G1. 5)。ペプトンの添加後、1型及び3型のD抗原復元率は10 ~ 15%低下したが、2型は、ペプトンを含有しない製剤と比較して同様の復元率を示した(Fig. 12b)。McIlvaine緩衝液は、他の緩衝液成分と比較して2型について10 ~ 15%低い復元率を示した。ヒストン緩衝液は、ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>を含有するIPV製剤の凍結乾燥後、IPVのD抗原収率を増加させたようであった(1型及び3型について95%超の復元率; Fig. 12a: G1. 3)。凍結乾燥後、リン酸緩衝液では、2型についてD抗原復元率が88%に達した一方で、McIlvaine緩衝液は、2型について73%の復元率を示した(Fig. 12a: G1. 5)。

10

#### 【0104】

ペプトンなしのソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>の製剤へのマンニトールの添加は、2型について85 ~ 100%の復元率が見出された(Fig. 12c)ことから、2型が、凍結乾燥中、製剤におけるマンニトールの存在を好むことを明らかにした。ソルビトール、MSG、MgCl<sub>2</sub>及びマンニトールを含有するIPV製剤の場合、1型では80 ~ 90%の復元率、3型では±80%の復元率が見出された。ペプトンの添加は、凍結乾燥後、1型及び3型の復元率の±10%の減少を示し、2型についても同様のD抗原含有量を示した(Fig. 12d)。

20

#### 【0105】

##### 2.6 緩衝液の影響

加速安定性実験は、使用した緩衝液間で製剤に応じた違いを示した。対照製剤は、凍結乾燥直後、高い復元率を示したが、ペプトンのない対照製剤については、45 °Cでの1週間のインキュベーション後、1型、2型及び3型について、それぞれ±40%、±50%及び<15%の復元率が見出された(Fig. 13: G1. 0及びG3. 0)。対照製剤については、ペプトンは1型及び2型の安定性の明白な改善を示したが、3型は、マンニトールを含有しない製剤及びマンニトールを含有する製剤について、それぞれ90%超及び80%のD抗原復元率に対して、45 °Cでの保存後、±25%及び±15%のD抗原復元率の減少を示した(Fig. 13: G2. 0及びG4. 0)。ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>を含有する製剤について、凍結乾燥及び保存後、HEPES緩衝液では、3つの血清型について、±80%、±85%及び±60%のD抗原含有量という最も高い復元率が観察された。これは、加速安定性試験の間、1型、2型及び3型について、D抗原復元率がそれぞれ10%、0%及び±30%しか減少しなかったことを意味する。クエン酸緩衝液では、3型のみについて、より良好な結果、すなわち±20%の減少が観察され、79%の復元率のままであった(Fig. 13a: G1. 2)。ペプトンの添加は、ペプトンを含有しない同じ製剤及び緩衝液と比較して、すべての血清型について全体的に15 ~ 25%の復元率の減少を示した(Fig. 13a)。ソルビトール、MSG、MgCl<sub>2</sub>及びマンニトールを含有する製剤にペプトンを添加した場合、安定性の明らかな改善が示された。ペプトンを含有しない異なる緩衝液の製剤は、±55%、±75%及び±45%という最大復元率を示した一方で、ペプトンを含有する同様の緩衝液製剤は±50%、±80%及び±55%の復元率を示した(Fig. 13b)。賦形剤であるソルビトール、MSG、MgCl<sub>2</sub>、マンニトール及びペプトンと共にリン酸緩衝液をベースにした製剤は、45 °Cでのインキュベーション後、復元率の減少が、1型について±30%、2型及び3型について±10%にすぎない最も安定な製剤であることを示した。

30

40

#### 【0106】

##### 2.7 乾燥方法と無関係に安定性に適した製剤

Fig. 14は、ソルビトールを含有する製剤のみが、異なる乾燥方法によって引き起こされるストレスに抵抗できることを示す。これは、MSG及びMgCl<sub>2</sub>を含むことによってさらに高めることができ(特に3型)、その結果、トレハロース又はスクロースの

50

場合の真空乾燥に匹敵する又はそれより高い復元率を与える製剤がもたらされた。先の結果（実験E）から、本発明者らは、ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>をベースにした製剤が、加速安定性試験の後、最良の復元率を有すると結論付けた。

【0107】

## 2.8 ペプトンを含むしない製剤

本発明者らが先の実験で見出した、ペプトンを含むしないより優れた製剤の1つは、10%のソルビトール+10%MSG+5%のMgCl<sub>2</sub>を含む製剤である。さらなる実験において、本発明者らは、この製剤における主要な賦形剤の影響を評価した。その結果を、スクロース及びトレハロースをベースにした2つの標準的な製剤と比較した。凍結乾燥後の結果をFig. 15に示す。Fig. 15から、本発明者らは、主としてソルビトールが、特に1型及び2型について凍結乾燥後のIPVの復元率に関与すると結論付けた。MSGとMgCl<sub>2</sub>との組み合わせは3つのIPV血清型の大きな安定化を示す。ソルビトールのみと比較して、ソルビトール、MSG及びMgCl<sub>2</sub>は、凍結乾燥後、特に3型について最良の復元率を示した。

【0108】

Fig. 16に示される加速安定性評価時に、製剤のほとんどが、ソルビトールのみを含む製剤と同様に復元率の非常に大きな減少を示した。しかし、10%のソルビトール+10%MSG+5%のMgCl<sub>2</sub>を含む製剤（マンニトール含有/非含有）は、45 での1週間の保存後、高い復元率を示した。

【0109】

## 参考文献：

1. Bonnet, M. C. and A. Dutta, World wide experience with inactivated poliovirus vaccine. Vaccine, 2008. 26(4978): p. 4983.
2. Minor, P., Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. Vaccine, 2009. 27(20): p. 2649-2652.
3. Shahzad, A. and G. Kohler, Inactivated Polio Vaccine (IPV): A strong candidate vaccine for achieving global polio eradication program. Vaccine, 2009. 27: p. 5293-5294.
4. Ehrenfeld, E., J. Modlin, and K. Chumakov, Future of polio vaccines. Expert Rev Vaccines, 2009. 8(7): p. 899-905.
5. John, J., Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication. Expert Rev Vaccines, 2009. 8(1): p. 5-8.
6. Westdijk, J., et al., Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. Vaccine, 2011. 29(18): p. 3390-7.
7. Clements, C. J., G. Larsen, and L. Jodar, Technologies that make administration of vaccines safer. Vaccine, 2004. 22(15-16): p. 2054-2058.
8. Friede, M. and M. T. Aguado, Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery sy

10

20

30

40

50

systems. Adv Drug Deliv Rev, 2005.57(3): p.325-331.

9. Moynihan, M. and I. Petersen, The durability of inactivated poliovirus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. J Biol Stand, 1982.10(3): p.261-8.

10. WHO, Temperature sensitivity of vaccines. 2006.

11. Sawyer, L.A., et al., Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine. Vaccine, 1994.12(9): p.851-6.

12. Vidor, The place of DTP/eIPV vaccine in routine paediatric vaccination. Rev Med Virol, 1994.4: p.261-77.

13. Bruce Aylward, R., et al., Risk management in a polio-free world. Risk Anal, 2006.26(6): p.1441-8.

14. Sutter, R.W., V.M. Caceres, and P. Mas Lago, The role of routine polio immunization in the post-certification era. Bull World Health Organ, 2004.82(1): p.31-9.

15. Thompson, K.M. and R.J. Duintjer Tebbens, The case for cooperation in managing and maintaining the end of poliomyelitis: stockpile needs and coordinated OPV cessation. Medscape J Med, 2008.10(8): p.190.

16. Tebbens, R.J., et al., Optimal vaccine stockpile design for an eradicated disease: application to polio. Vaccine, 2010.28(26): p.4312-27.

17. Amorij, J.P., et al., Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. Pharm Res, 2008.25(6): p.1256-73.

18. Wang, W., Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. Int J of Pharm, 2000.203: p.1-60.

19. Chang, L. and M.J. Pikal, Mechanisms of protein stabilization in the solid state. J of Pharm Sc, 2009.98(9): p.2886-2908.

20. Arakawa, T., et al., Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. Adv Drug Deliv Rev, 2001.46(1-3): p.307-26.

21. Bhatnagar, B.S., R.H. Bogner, and M.J

10

20

30

40

50

. Pikal, Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. Pharm Dev Technol, 2007.12(5): p.505-23.

22. Skrabanja, A.T., et al., Lyophilization of biotechnology products. PDA J Pharm Sci Technol, 1994.48(6): p.311-7.

23. Dias, C.L., et al., The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. Cryobiology, 2010.60(1): p.91-9.

24. Carpenter, J.F. and J.H.Crowe, The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. Cryobiology, 1988.25(3): p.244-55.

25. Chang, B.S., B.S.Kendrick, and J.F.Carpenter, Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. J Pharm Sci, 1996.85: p.1325-1330.

26. Tang, X.C. and M.J.Pikal, Measurement of the kinetics of protein unfolding in viscous systems and implications for protein stability in freeze-drying. Pharm Res, 2005.22(7): p.1176-85.

27. Webb, S.D., et al., A new mechanism for decreasing aggregation of recombinant human interferon-gamma by a surfactant: Slowed dissolution of lyophilized formulations in a solution containing 0.03% polysorbate 20. J Pharm Sci, 2002.91: p.543-558.

28. Rupley, J.A. and G.Careri, Protein hydration and function. Adv Protein Chem, 1991.41: p.37-172.

29. Carpenter, J.F., T.Arakawa, and J.H.Crowe, Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. Dev Biol Stand, 1992.74: p.225-38; discussion 238-9.

30. Carpenter, J.F. and J.H.Crowe, An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. Biochemistry, 1989.28(9): p.3916-22.

31. Tian, F., S.Sane, and J.H.Rytting, Calorimetric investigation of protein/amino acid interactions in the solid state. Int J Pharm, 2006.310: p.175-186.

32. Akers, M.J., et al., Glycine crystallization during freezing: the effects of

10

20

30

40

50

salt form, pH, and ionic strength. Pharm Res, 1995.12(10): p.1457-61.

33. Mattern, M., et al., Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. II. Process and storage stability in sugar-free amino acid systems. Pharm Dev Technol, 1999.4(2): p.199-208.

34. Costantino, H.R., et al., Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins. Biochemistry (Mosc), 1998.63(3): p.357-63.

10

35. Kadoya, S., et al., Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols. Int J Pharm, 2010.389(1-2): p.107-13.

36. Li, S., et al., Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. J Pharm Sci, 1996.85(8): p.873-7.

37. Franks, F., Long-term stabilization of biologicals. Biotechnology (NY), 1994.12(3): p.253-6.

20

38. Yu, L., et al., Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. J Pharm Sci, 1999.88(2): p.196-8.

39. Hancock, B.C. and G.Zografi, Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. J Pharm Sci, 1997.86(1): p.1-12.

30

40. Schmitt, E.A., D.Law, and G.G.Zhang, Nucleation and crystallization kinetics of hydrated amorphous lactose above the glass transition temperature. J Pharm Sci, 1999.88(3): p.291-6.

41. Fox, K.C., Biopreservation. Putting proteins under glass. Science, 1995.267(5206): p.1922-3.

42. Crowe, J.H., J.F.Carpenter, and L.M.Crowe, The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu Rev Physiol, 1998.60: p.73-103.

40

43. van Ingen, C. and C.S.Tan, Preservation mixture and use thereof, W.I.P.Organizati on, Editor. 2010, De Staat Der Nederlanden, vert. door de minister van VWS.

44. Bam, N.B., et al., Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. J Pharm Sci, 1998.87(12): p

50

. 1554 - 9 .

45. Christensen, D., et al., Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1768(9): p. 2120 - 2129 .

46. Izutsu, K., S. Yoshioka, and T. Terao, Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1994. 42(1): p. 5 - 8 .

47. Kim, A.I., M.J. Akers, and S.L. Nail, The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J Pharm Sci*, 1998. 87(8): p. 931 - 5 .

48. Kreilgaard, L., et al., Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid. *Arch Biochem Biophys*, 1998. 360(1): p. 121 - 34 .

49. Leal, M.L., et al., Study on thermostabilizers for trivalent oral poliomyelitis vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1990. 85(3): p. 329 - 38 .

50. Liska, V., et al., Evaluation of a recombinant human gelatin as a substitute for a hydrolyzed porcine gelatin in a refrigerator-stable Oka/Merck live varicella vaccine. *J Immune Based Ther Vaccines*, 2007. 5: p. 4 .

51. Melnick, J.L., Thermostability of poliovirus and measles vaccines. *Dev Biol Stand*, 1996. 87: p. 155 - 60 .

52. Nagel, J., et al., Some experiments on freeze-drying of inactivated poliomyelitis-vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1963. 12: p. 718 - 20 .

53. Ohtake, S., et al., Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine*, 2010. 28(5): p. 1275 - 84 .

54. Sood, D.K., et al., Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. *Vaccine*, 1993. 11(11): p. 1124 - 8 .

55. Ungar, J., et al., Preparation and properties of a freeze-dried B.C.G. vaccine of increased stability. *Br Med J*, 1962. 2(5312): p. 1086 - 9 .

10

20

30

40

50

56. Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 1999. 185(2): p. 129-88.

57. Wright, D., P.W. Muggleton, and M.I. Griffiths, Evaluation of the stability of dried BCG vaccine. *Tubercle*, 1972. 53(2): p. 92-9.

58. Izutsu, K., C. Yomota, and N. Aoyagi, Inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium phosphates and citrates. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2007. 55(4): p. 565-70.

59. Shiomi, H., T. Urasawa, and S. Urasawa, Heat stability of the lyophilized Sabin poliovaccine. *Jpn J Infect Dis*, 2003. 56(2): p. 70-2.

60. Burke, C.J., et al., The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992. 86(1): p. 89-93.

61. Kersten, G., T. Hazendonk, and C. Beuvery, Antigenic and immunogenic properties of inactivated polio vaccine made from Sabin strains. *Vaccine*, 1999. 17(15-16): p. 2059-2066.

62. Doel, T.R., et al., The evaluation of a physical method for the quantification of inactivated poliovirus particles and its relationship to D-antigenicity and potency testing in rats. *J Biol Stand*, 1984. 12(1): p. 93-9.

63. Ivanov, A.P. and E.M. Dragunsky, ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2005. 4(2): p. 167-72.

64. van Steenis, G., A.L. van Wezel, and V.M. Sekhuis, Potency testing of killed polio vaccine in rats. *Dev Biol Stand*, 1981. 47: p. 119-28.

65. Wood, D.J. and A.B. Heath, A WHO collaborative study of immunogenicity assays of inactivated poliovirus vaccines. *Biologicals*, 1995. 23(4): p. 301-11.

#### 【0110】

略語:

BCG: カルメットگران桿菌 (*Bacillus Calmette-Guerin*)

DoE: 実験の設計

10

20

30

40

50

D S C : 示差走査熱量測定  
 D U / D - A g : Dユニット / D抗原性  
 E L I S A : 酵素結合免疫吸着法 ( E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o  
 r b e n t A s s a y )  
 H E S : ヒドロキシエチルデンブレン  
 H R P : セイヨウワサビペルオキシダーゼ  
 I g G : 免疫グロブリン G  
 I P V : 不活化ポリオワクチン  
 M A N : マンニトール  
 M S : 質量分析法  
 M S G : グルタミン酸ナトリウム  
 O P V : 経口ポリオワクチン  
 P E P : ペプトン  
 Q C : 品質管理 ( R I V M での部門 )  
 R I V M : オランダ国立公衆衛生環境研究所  
 R M C : 残留水分量  
 R P - H P L C : 逆相高速液体クロマトグラフィー  
 s I P V : S a b i n 不活化ポリオワクチン ( S a b i n 株をベースにしている )  
 S O R : ソルビトール  
 S U C : スクロース  
 T <sub>g</sub> : ガラス転移温度  
 T R E H : トレハロース  
 V A P P : ワクチン関連麻痺性ポリオ  
 V D P V : ワクチン由来ポリオウイルス  
 W H O : 世界保健機関

10

20

【図 1】

【図 2】

Fig. 1

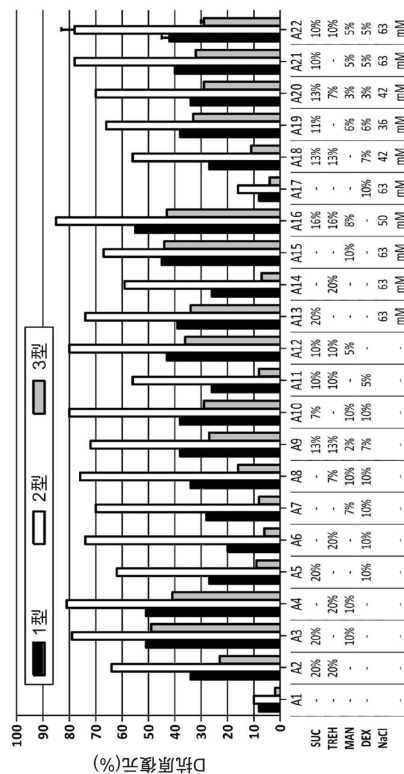
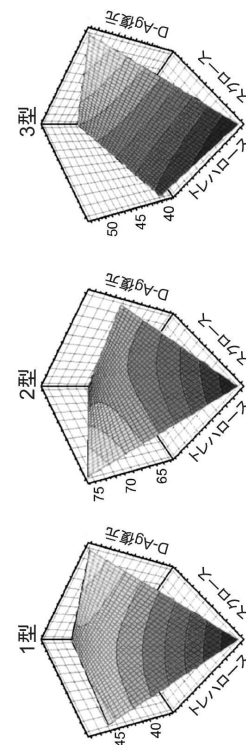
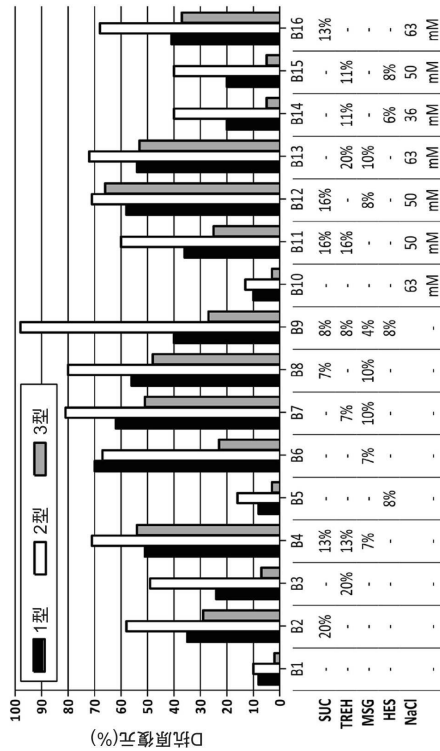


Fig. 2



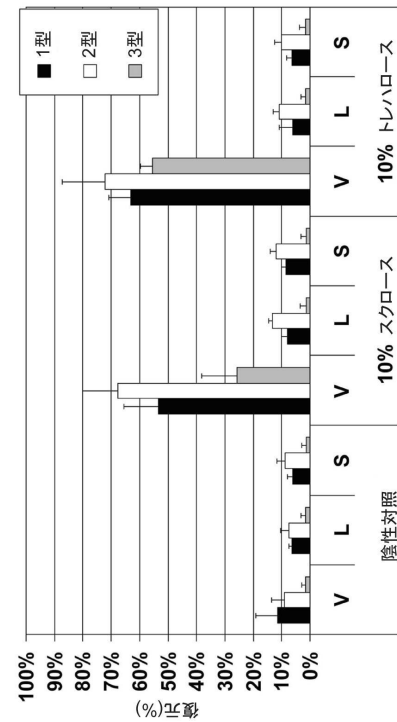
【図3】

Fig. 3



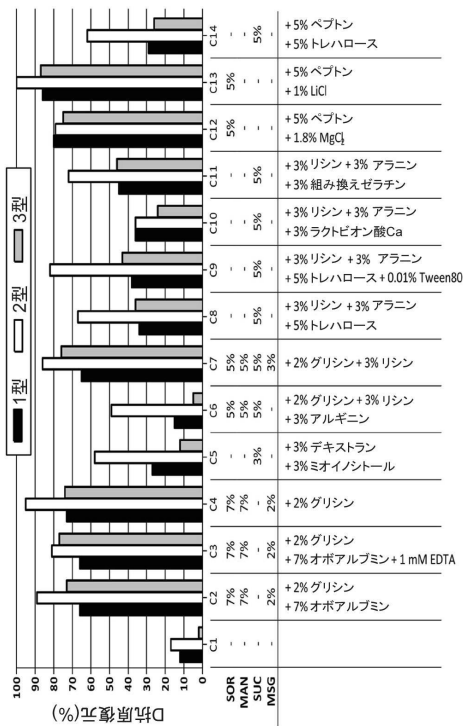
【図4】

Fig. 4



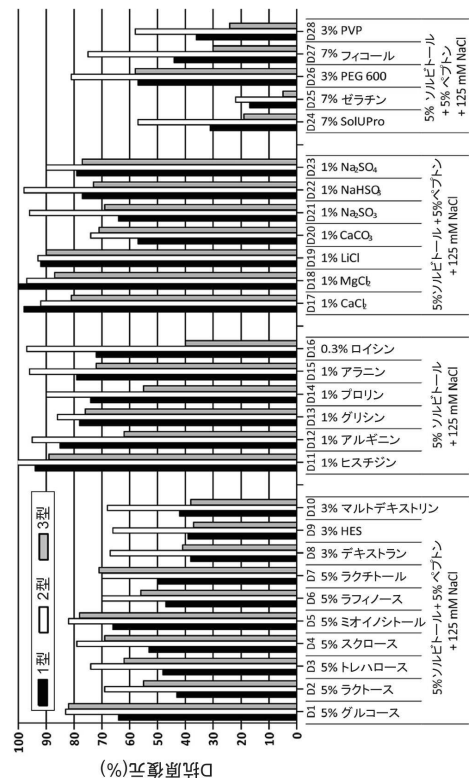
【図5】

Fig. 5

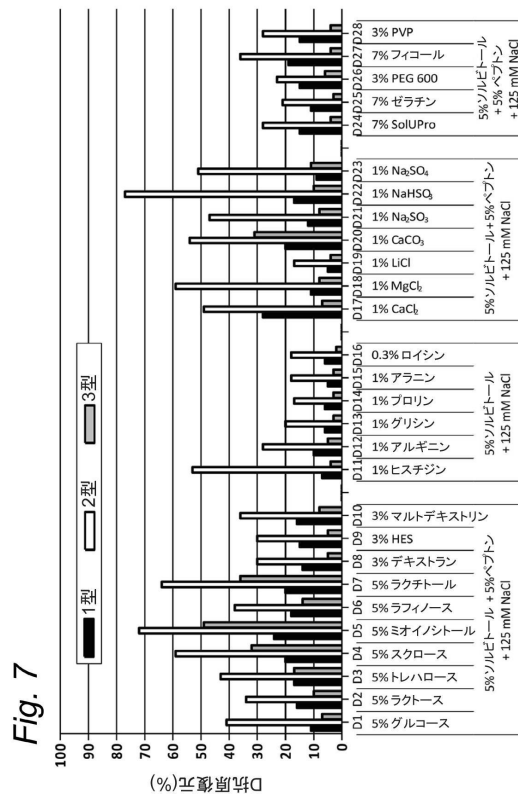


【図6】

Fig. 6

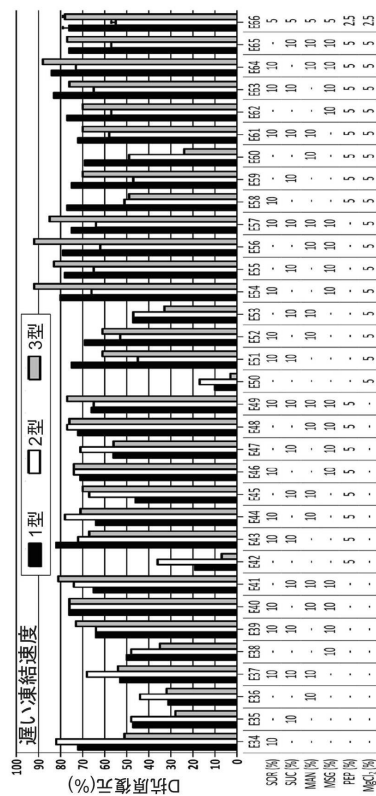


【図 7】



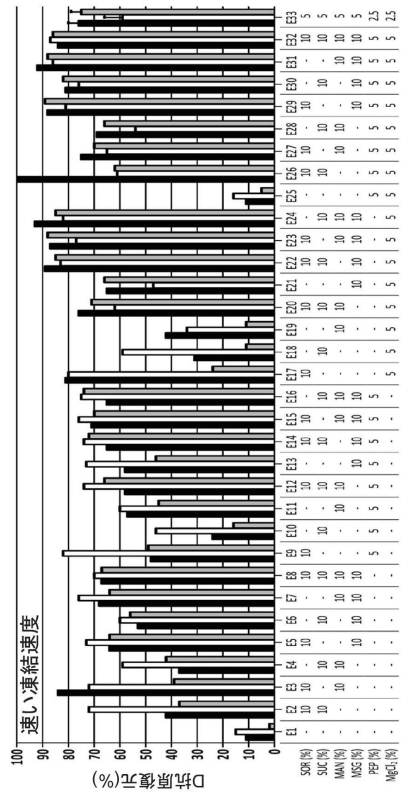
【図 8 - 2】

Fig. 8b



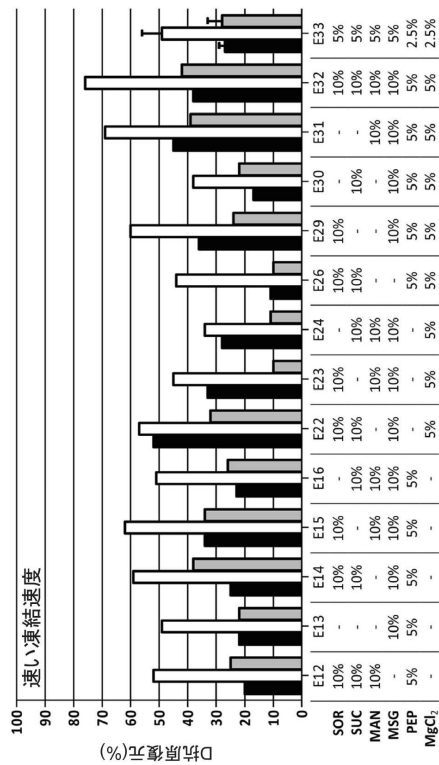
【図 8 - 1】

Fig. 8a

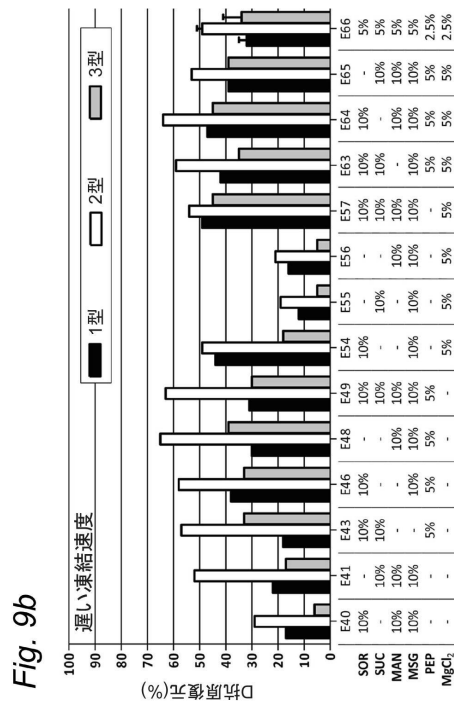


【図 9 - 1】

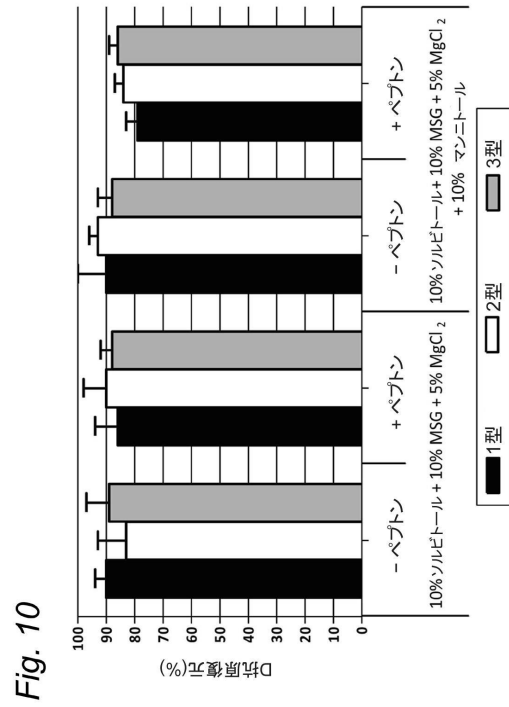
Fig. 9a



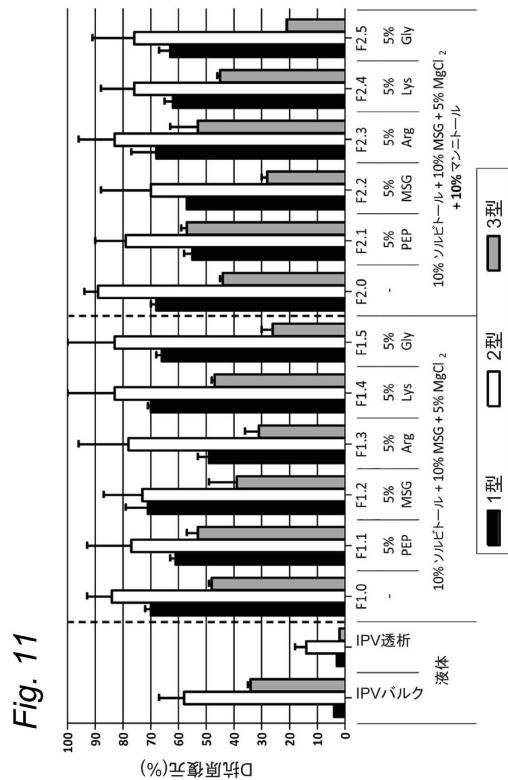
【 図 9 - 2 】



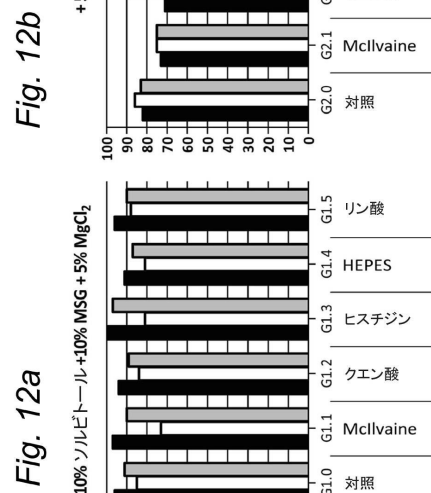
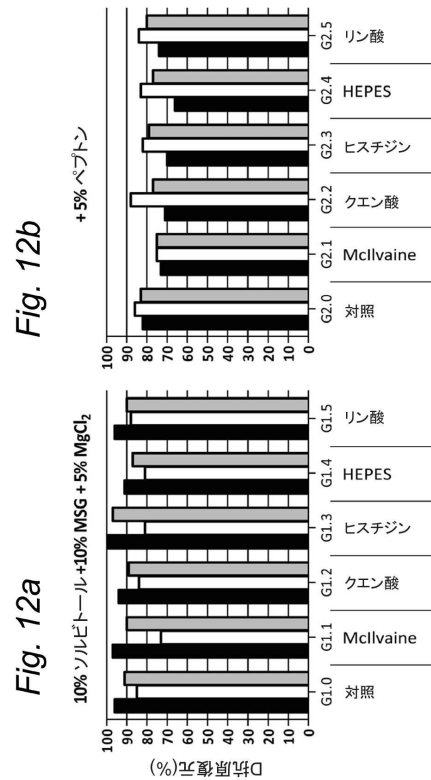
【 図 1 0 】



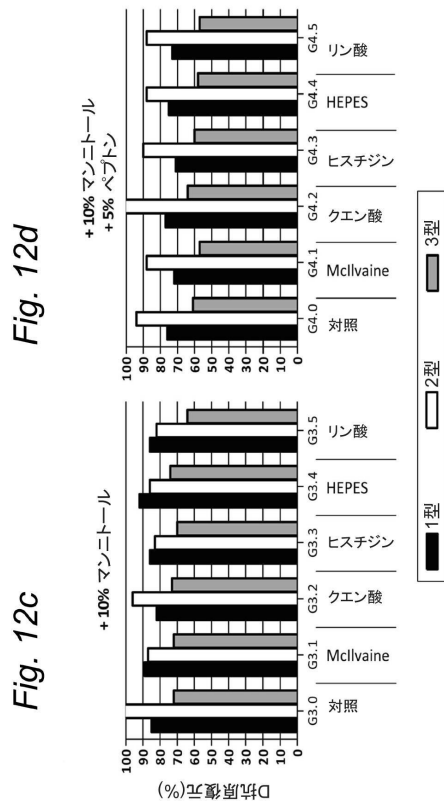
【 図 1 1 】



【 図 1 2 - 1 】



【図 12 - 2】



【図 13 - 2】

Fig. 13c

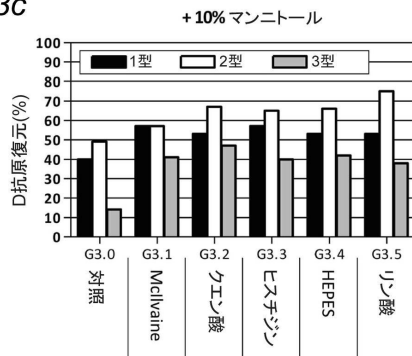
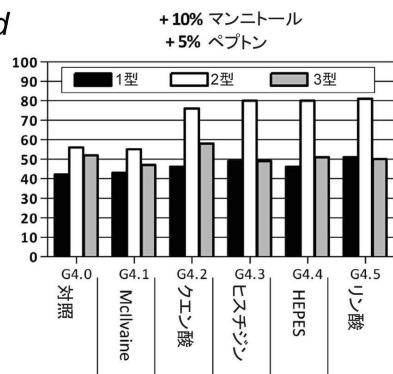


Fig. 13d



【図 13 - 1】

Fig. 13a

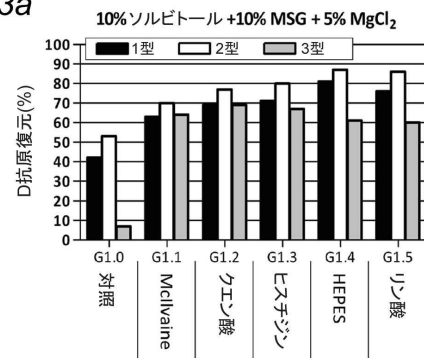
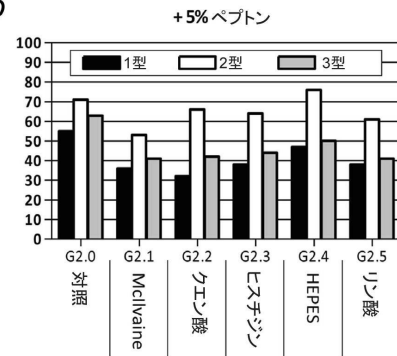
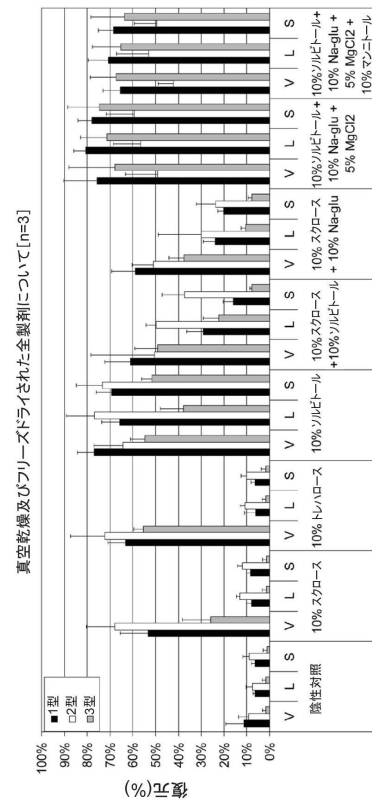


Fig. 13b



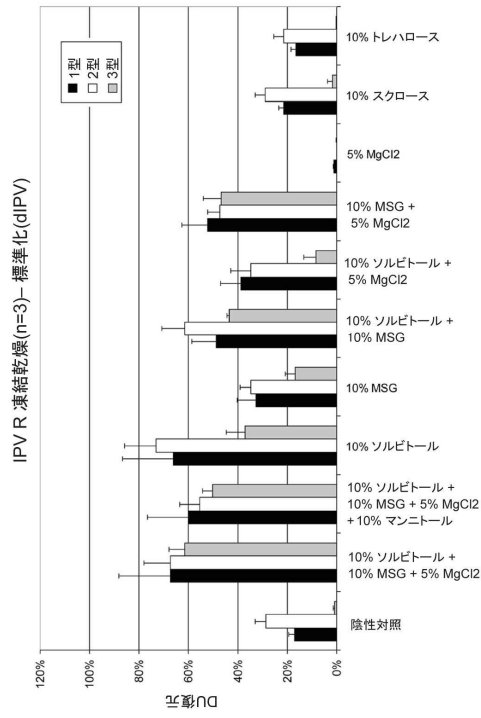
【図 14】

Fig. 14



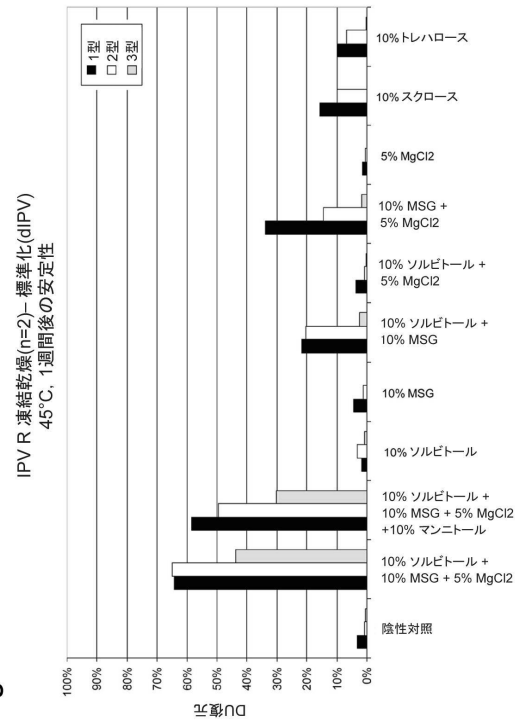
【図 15】

Fig. 15



【図 16】

Fig. 16



## フロントページの続き

- (74)代理人 100107456  
弁理士 池田 成人
- (74)代理人 100162352  
弁理士 酒巻 順一郎
- (74)代理人 100123995  
弁理士 野田 雅一
- (74)代理人 100148596  
弁理士 山口 和弘
- (72)発明者 クラーン, ヘレーン  
オランダ, エヌエル - 3 4 2 1 シーダブリュー アウデワール, ボンテ パールデンステ  
ーグ 1
- (72)発明者 アモリ, ジャン - ピエール  
オランダ, エヌエル - 1 3 9 1 エスゼット アップカウデ, スポールラン 7 1

審査官 常見 優

- (56)参考文献 特開平06 - 065096 (JP, A)  
特表2004 - 506020 (JP, A)  
特表2007 - 514450 (JP, A)  
国際公開第2011/072218 (WO, A1)  
特表2001 - 518447 (JP, A)  
特表2008 - 532977 (JP, A)  
特表2003 - 525909 (JP, A)  
特表2004 - 526667 (JP, A)  
特表2008 - 530165 (JP, A)  
特表2002 - 500622 (JP, A)  
特表2003 - 535119 (JP, A)  
特開平01 - 279843 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 9/00 - 9/72  
47/00 - 47/69  
A61K31/00 - 33/44  
A61K38/00 - 51/12  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)