

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5138601号
(P5138601)

(45) 発行日 平成25年2月6日(2013.2.6)

(24) 登録日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(51) Int.Cl. F I

C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00

A 6 1 K 39/215 (2006.01) A 6 1 K 39/215

A 6 1 K 39/29 (2006.01) A 6 1 K 39/29

A 6 1 K 39/245 (2006.01) A 6 1 K 39/245

A 6 1 K 39/145 (2006.01) A 6 1 K 39/145

請求項の数 21 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-541555 (P2008-541555)	(73) 特許権者	506076695
(86) (22) 出願日	平成18年11月15日 (2006.11.15)		サノフィ パストゥール リミテッド
(65) 公表番号	特表2009-516519 (P2009-516519A)		SANOFI PASTEUR LIMITED
(43) 公表日	平成21年4月23日 (2009.4.23)		カナダ国 エム2アール 3ティー4 オンタリオ州 トロント スティールズ Avenue West 1755
(86) 国際出願番号	PCT/CA2006/001855		
(87) 国際公開番号	W02007/056847	(74) 代理人	100073184
(87) 国際公開日	平成19年5月24日 (2007.5.24)		弁理士 柳田 征史
審査請求日	平成21年11月16日 (2009.11.16)	(74) 代理人	100090468
(31) 優先権主張番号	60/597,280		弁理士 佐久間 剛
(32) 優先日	平成17年11月21日 (2005.11.21)	(72) 発明者	シガリニ, サンドリーヌ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国 エム2アール 3ティー4 オンタリオ州 トロント スティールズ Avenue West 1755
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えウイルス安定化製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

凍結乾燥した組換えウイルスを安定な形態で維持するための製剤であって、該製剤が、糖、保存料、分散剤、熱安定剤、緩衝剤、ならびにアルギニン、セリン及びグリシンよりなる群から選択される 1 種類のアミノ酸を含み、前記分散剤がポリビニルピロリドン 40 であり、感染価により特定して前記組換えウイルスの少なくとも 80% の活性を維持することを特徴とする製剤。

【請求項 2】

前記糖がしよ糖および／またはソルビトールであることを特徴とする請求項 1 記載の製剤。

【請求項 3】

前記緩衝剤がトリスであることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の製剤。

【請求項 4】

前記アミノ酸が約 100 mg / ml 未満の濃度で製剤中に存在することを特徴とする請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項記載の製剤。

【請求項 5】

前記アミノ酸が約 80 mg / ml の濃度で製剤中に存在することを特徴とする請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項記載の製剤。

【請求項 6】

5℃での溶解時間が 15 秒以下であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項記載

の製剤。

【請求項 7】

約－20℃で約52週間保存後の凍結乾燥物の外観が滑らかな白層を呈することを特徴とする請求項1～6いずれか1項記載の製剤。

【請求項 8】

前記組換えウイルスがアデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポックスウイルス、及びレトロウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項7記載の製剤。

【請求項 9】

前記組換えウイルスがポックスウイルスであることを特徴とする請求項8記載の製剤。

【請求項 10】

前記ポックスウイルスが、オルトポックスウイルスまたはアビポックスウイルスであることを特徴とする請求項9記載の製剤。

【請求項 11】

前記オルトポックスウイルスが、痘疹、MVAおよびNYVACからなる群より選択されることを特徴とする請求項10記載の製剤。

【請求項 12】

前記アビポックスウイルスが、カナリア痘瘡、鶏痘、TROVAC、ALVACおよびALVAC(2)からなる群より選択されることを特徴とする請求項10記載の製剤。

【請求項 13】

前記組換えウイルスが、そのゲノム内に、感染体または癌に関係する抗原をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むことを特徴とする請求項1～12いずれか1項記載の製剤。

【請求項 14】

前記感染体が、コロナウイルス、CMV、デングウイルス、エボラウイルス、EBV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプス・ウイルス、パピローマウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、RSV、西ナイルウイルス、および黄熱病ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項13記載の製剤。

【請求項 15】

前記癌が、結腸、直腸、乳、皮膚、肺、脳、および血液からなる群より選択されることを特徴とする請求項13記載の製剤。

【請求項 16】

前記核酸配列が腫瘍抗原をコードすることを特徴とする請求項15記載の製剤。

【請求項 17】

請求項1～16いずれか1項記載の製剤を含む免疫製剤。

【請求項 18】

アジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項17記載の免疫製剤。

【請求項 19】

請求項1～16いずれか1項記載の製剤を含む、ヒトまたは動物用のワクチン製剤。

【請求項 20】

アジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項19記載のワクチン製剤。

【請求項 21】

凍結乾燥した組換えウイルスを安定な形態で維持するための製剤の使用であって、該製剤が、糖、保存料、分散剤、熱安定剤、緩衝剤、ならびにアルギニン、セリン及びグリシンよりなる群から選択される1種類のアミノ酸を含み、前記分散剤がポリビニルピロリドン40であることを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、ワクチン、または他の医薬品もしくはは研究用途でのウイルスの調製

10

20

30

40

50

、それらの安定化、及び、そのような製剤の製造方法、さらには、例えばワクチンとして、またはウイルスベクターとしてなどのそれらの利用に関する。

【背景技術】

【0002】

ワクチンまたは他の目的のための生ウイルス製剤の製造について、様々な方法が知られている。ウイルス活性を保つことを目的とした研究もしくはワクチン用途での冷凍、凍結乾燥、または他の保存方法による生存ウイルスの調剤に有用な製剤及び方法もまた知られている。

【0003】

典型的には、組換えウイルスは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中のしょ糖、カゼイン加水分解物及び／またはコラーゲンを含む凍結乾燥された小丸薬の形態で保存される。これらの小丸薬は、0.4～0.9% NaClなどの医薬として許容される溶液中で戻される(re-hydrated)。しかしながら、こういった製剤には重大な欠点が存在し、そのことは当技術分野で知られている。中でも、動物由来の物質の利用、不完全に定義された成分、複雑な調製工程、高コスト、およびウイルスの特定の所望される特性が維持できないことが挙げられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

免疫製剤及びワクチンに利用する安定化ウイルスの調製に適した製剤が、当技術分野には依然として必要とされている。ウイルスの生存能力及び伝染力を含めた、ウイルス、免疫製剤またはワクチンの所望の特性を保持する安定化製剤の提供が望まれている。さらには、動物を媒体とする伝染病に関する懸念から、動物性の製品に由来しない安定化製剤が、当技術分野で必要とされている。急速凍結乾燥処理がし易い、高力価低用量(high-titer low volume)の製剤を提供することもまた、望まれている。本願は、こういった製剤、およびこれらの利用方法について記載する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、免疫製剤及びワクチンを含めた様々な用途を目的とする、ウイルスベクターなどのウイルスを保存するための安定化製剤（「安定剤」）を提供する。ある実施の形態では、製剤は、糖、保存料、分散剤、熱安定剤(thermal stability agent)、緩衝剤、及び3種類までの異なる種類のアミノ酸（すなわち、1、2または3種類のアミノ酸）を含む。ある実施の形態では、製剤は、3種類のアミノ酸を含む。別の実施の形態では、製剤は2種類のアミノ酸を含む。別の実施の形態では、製剤は1種類のアミノ酸を含む。アミノ酸は、アルギニン、アラニン、セリンまたはグリシンが好ましい。アミノ酸は、アルギニン、セリンまたはグリシンであることがさらに好ましい。ウイルスを安定化製剤に加え、所望の時間、測定可能な特性（すなわち、生存能力、感染力）を特に保持する。好ましい製剤は、以下に記載のウイルスが存在する特定の条件下、好ましい外観及び溶解時間などの特定の所望の測定可能な特性を保持する。本発明の他の実施の形態は、以下に示す説明、実施例、及び、添付の特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0006】

典型的には、アビポックスウイルスであるALVACなどの組換えウイルスは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中のしょ糖、カゼインの加水分解物、及び／またはコラーゲンを含む凍結乾燥された小丸薬の形態で保存されている。これらの小丸薬は、次に、0.4～0.9% NaClなどの医薬として許容される溶液中で戻される。しかしながら、こういった製剤に関連し、対処するのが難しいことが当該技術分野で知られている重大な欠点がある。したがって、本願は、以下に記載する新規な安定化製剤を提供する。

【0007】

本発明は、発現ベクター、免疫製剤、及び／またはワクチンの用途として、組換えウイルスを含めたウイルスを安定に保管及び保存することを目的とした製剤を提供する。本製

10

20

30

40

50

剤は、非常に簡便で、低コスト、かつ、現在市販されている製剤と比較してウイルス活性が大幅に低下しない、該ウイルスを調製し、保管し、使用方法として有用である。こういった製剤は「安定化製剤」と称されることがあり、典型的には、糖（すなわち、ショ糖(sucrose)またはソルビトール、トレハロース、白糖(saccharose)、マンニトール、ラクトース）、保存料（糖、アミノ酸、他の成分であってよい）、分散剤（すなわち、ポリビニルピロリドン 40、デキストラン、PEG）、熱安定剤（すなわち、尿素）、緩衝剤（すなわち、トリス、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、リン酸ナトリウム、酢酸塩、ホウ酸塩、HEPES、MOPS、PEG）および 1 種類以上のアミノ酸を含んでいる。

【0008】

製剤中に、1、2、3、または 4 種類以下のアミノ酸が含まれることが好ましい。当然ながら、成分の説明において言及されるアミノ酸は、調製後の製剤に加えられるウイルス、アジュバントまたは他の成分に由来する、製剤中に認められる、または製剤中に放たれるアミノ酸を含めないことは、当業者に理解されよう。よって、製剤の一部として記載されるアミノ酸は、製剤にウイルスまたはアジュバントを加える前に存在しているものである。

10

【0009】

最も好ましい実施の形態では、製剤中には、1 種類のみアミノ酸が含まれる。好ましい実施の形態では、製剤は、アルギニン、セリンまたはグリシンのうちの少なくとも 1 つを含む。さらに好ましい実施の形態では、製剤はアルギニン、セリンまたはグリシンである、1 種類のアミノ酸を含む。アミノ酸は、約 100 mg/ml 以下で製剤中に存在することが好ましい。アミノ酸は、約 90~95 mg/ml、約 85~90 mg/ml、約 80~85 mg/ml、または約 80 mg/ml の濃度で製剤中に存在することがさらに好ましい。個々のアミノ酸は、当業者にとって広く入手可能なものである。

20

【0010】

安定化製剤は、液体、凍結乾燥製剤(freeze-dried preparation, lyophilized preparation)、または他の形態での保管に利用するのが好ましい。液体に関しては、液体製剤は調合薬であることが好ましい。凍結乾燥製剤は、典型的には医薬として許容される担体などの液体を使用して再構成することにより、液体の形態に転化される。医薬として許容される担体は、例えば、緩衝剤及び塩（すなわち PBS）を含む液体担体であって構わない。適切な緩衝剤及び塩、さらには、他の種類の医薬として許容される担体の例については、当業者に周知である。

30

【0011】

ウイルス製剤を保存するための特定の製剤についての適合性の評価では、製剤のウイルスの外観が適合性の重要な指標として測定されている。例えば、最も適当な製剤は、凍結乾燥し、約 -20℃ で 52 週間保存した後のバイアルの側面に後退のみられない、滑らかな、白層または「ケーキ」を与える。あまり適切ではない製剤では、「溶けた」、「煮沸された」、あるいは奇形の外観が見られ、保存後のバイアルの側面から後退している。以下の実験結果が示すように、滑らかな白層は、溶解時間の速さと関係しており、これは、本明細書に記載する製剤の別の所望の特性である。滑らかな白層ケーキは、ウイルスを安定に保存するのに有用な製剤と強く相関している。

40

【0012】

上述のように、溶解時間は適切な製剤の非常に重要な特性である。ウイルス製剤の凍結乾燥に続いて、該製剤を約 5℃ で約 52 週間保存後の PBS などの医薬として許容される担体への溶解時間は、約 20~25 秒、約 15~20 秒、または、好ましくは約 15 秒以下である。これにより、当技術分野への即時の使用に適した製剤が当業者に提供される。

【0013】

ウイルスが安定化製剤中で維持される温度は、保存期間中（すなわち、約 52 週間まで）、所望の状態（すなわち、外観の観察、溶解時間、感染価または製剤の他の特性）で、ウイルス／製剤を維持するのに適した温度である。製剤は、典型的および最も好都合には、約 10℃ 未満（すなわち、約 5℃）の温度で維持される。特定の状況では、製剤は約一

50

20℃で維持されるであろう。

【0014】

再構成後の製剤の適切なpHは、ウイルスが、保存期間中（すなわち、約52週間まで）、所望の状態（すなわち、生存能力、感染価、溶解時間）で維持されるのに適した任意のpHである。例えば、液体製剤のpHは、約6～9、6～8.5、6.5～8.5、7～8.5、7.5～8.5、6～8、6.5～8、7～8、7.5～8、または7～7.5が望ましい。製剤は、pH約7.5であることが好ましい。液体製剤は、任意の適切な容器内に入れる（例えば、維持する、または保存する）ことができる。典型的には、容器は、バイアルまたは他の保存容器の形態のガラスまたはプラスチックを含む、それらから実質的に成る、またはそれらから成るであろう。

10

【0015】

非常に様々なウイルスが本発明の実施に利用可能であろう。適切なウイルスとしては、例えば、アデノウイルス、アルボウイルス、アストロウイルス、バクテリオファージ、エンテロウイルス、胃腸炎ウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、EBウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）及び単純ヘルペスウイルス（HSV））、インフルエンザウイルス、ノーウォークウイルス、ポリオウイルス、コルドポックスウイルス(Chordopoxviridae)（すなわち、5オルトポックスウイルス、痘疹、MVA、NYVAC、アビポックスウイルス、カナリア痘瘡、ALVAC、ALVAC（2）、鶏痘、ラブドウイルス、レオウイルス、ライノウイルス、ロタウイルス、レトロウイルス、バキ
キュロウイルス、カルシウイルス、カリモウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、フラビウイルス、ヘパドナウイルス、ノダウイルス、オルトミクスウイルス、パラミクソウイルス、パポバウイルス、パルボウイルス、フィコドナウイルス、ピコマウイルス(Picomaviridae)、及びトガウイルス、ならびに、前記または他の適切なウイルスのいずれかに由来する、これらを基礎とした、または、これらと実質的に同様の修飾ウイルスが挙げられる。本発明の実施に使用する好ましいウイルスは、ボックスウイルス、特に、ALVACである。他の適切なウイルスについては、例えば、FieldsらのVirology (34th ed., Lippincott Williams & Wilkins (2001))に記載されているなど、当技術分野で公知である。

20

【0016】

ある実施の形態では、組換えウイルスには、そのゲノム内に抗原または免疫原をコードした核酸配列が含まれることから、ウイルスを免疫製剤またはワクチンとして用いて差し支えない。「組換えウイルス」という用語は、天然ではないウイルスゲノムである異種遺伝子がウイルスゲノム内に組み込まれた任意のウイルスのことをいう。免疫製剤は、宿主に投与すると、ウイルスによってコードされた抗原または免疫原を対象とする、またはそれらに反応性の免疫反応を有するものである。この免疫反応が、宿主に対する免疫を保護または提供するかどうかは不明である。ワクチンは、宿主にコードされた抗原または免疫原を対象とした、またはそれらに反応性の防御免疫反応を、宿主に発現させるような製剤である。免疫反応は、限定はしないが、ELISA、BIACORE、DOT-BLOT、免疫拡散法を含む、当業者に知られている利用可能な多くの技法のいずれかによって測定して差し支えない。

30

40

【0017】

場合によっては、組換えウイルスには1種類以上の腫瘍抗原（「TA」）がコードされていて構わない。TAには腫瘍関連抗原（TAA）と腫瘍特異性抗原（TSA）の両方が含まれ、癌細胞が抗原の供給源である。TAAは正常細胞に見られるよりも腫瘍細胞の表面に多く発現される抗原、もしくは胎児の発育期に正常細胞に発現される抗原である。TSAは、腫瘍細胞に特有の抗原であり、正常細胞では発現しない。TAには、さらに、TAAまたはTSA、それらの抗原断片、及び、それらの抗原性を保持する修飾されたものが含まれる。TAは、典型的には、その発現型、機能、または遺伝的原因によって5種類に分類される：癌-精巢（CT）抗原（すなわち、MAGE、NY-ESO-1）；メラ

50

ニン細胞分化抗原（すなわち、M e l a n A / M A R T - 1、チロシナーゼ、g p 1 0 0）；変異抗原（すなわち、M U M - 1、p 5 3、C D K - 4）；過剰発現された「自己」抗原（すなわち、H E R - 2 / n e u、p 5 3）；および、ウイルス抗原（すなわち、H P V、E B V）。本発明を実施する目的に適したT Aは、T Aが投与される宿主における抗腫瘍免疫反応を誘起または促進する任意のT Aである。適切なT Aとしては、「野生型」（すなわち、通常はゲノムによってコードされ、天然に存在している）、修飾された、変異したもの、さらには、他の断片、及びそれらの誘導体を含む、g p 1 0 0 (Cox et al., Science, 264:716-719 (1994))、M A R T - 1 / M e l a n A (Kawakami et al., J. Exp. Med., 180:347-352 (1994))、g p 7 5 (T R P - 1) (Wang et al., J. Exp. Med., 186:1131-1140 (1996))、チロシナーゼ (Wolfel et al., Eur. J. Immunol., 24:759-764 (1994))；国際公開第 2 0 0 1 / 0 7 5 1 1 7 号、同第 2 0 0 1 / 0 7 5 0 1 6 号、同第 2 0 0 1 / 0 7 5 0 0 7 号の各パンフレット)、N Y - E S O - 1 (国際公開第 9 8 / 0 1 4 4 6 4 号、同第 9 9 / 0 1 8 2 0 6 号の各パンフレット)、黒色腫プロテオグリカン (Hellstrom et al., J. Immunol., 130:1467-1472 (1983))、M A G E 系の抗原（すなわち、M A G E - 1、2、3、4、6 および 1 2 ; Van der Bruggen et al., Science, 254:1643-1647 (1991))；米国特許第 6, 2 3 5, 5 2 5 号明細書)、B A G E 系の抗原 (Boel et al., Immunity, 2:167-175 (1995))、G A G E 系の抗原（すなわち、G A G E - 1、2 ; Van den Eynde et al., J. Exp. Med., 182:689-698 (1995))；米国特許第 6, 0 1 3, 7 6 5 号明細書)、R A G E 系の抗原（すなわち、R A G E - 1 ; Gaugler et al., Immunogenetics, 44:323-330 (1996))；米国特許第 5, 9 3 9, 5 2 6 号明細書)、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (Guilloux et al., J. Exp. Med., 183:1173-1183 (1996))、p 1 5 (Robbins et al., J. Immunol. 154:5944-5950 (1995))、 β - カテニン (Robbins et al., J. Exp. Med., 183:1185-1192 (1996))、M U M - 1 (Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980 (1995))、サイクリン依存性キナーゼ 4 (C D K 4) (Wolfel et al., Science, 269:1281-1284 (1995))、p 2 1 - r a s (Fossum et al., Int. J. Cancer, 56:40-45 (1994))、B C R - a b 1 (Bocchia et al., Blood, 85:2680-2684 (1995))、p 5 3 (Theobald et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11993-11997 (1995))、p 1 8 5 H E R 2 / n e u (e r b - B 1 ; Fisk et al., J. Exp. Med., 181:2109-2117 (1995))、上皮細胞増殖因子受容体 (E G F R) (Harris et al., Breast Cancer Res. Treat, 29:1-2 (1994))、癌胎児性抗原 (C E A) (Kwong et al., J. Natl. Cancer Inst., 85:982-990 (1995))；米国特許第 5, 7 5 6, 1 0 3 号、同第 5, 2 7 4, 0 8 7 号、同第 5, 5 7 1, 7 1 0 号、同第 6, 0 7 1, 7 1 6 号、同第 5, 6 9 8, 5 3 0 号、同第 6, 0 4 5, 8 0 2 号の各明細書；欧州特許第 2 6 3 9 3 3 号、同第 3 4 6 7 1 0 号および同第 7 8 4 4 8 3 号の各明細書)；癌関連変異化ムチン (carcinoma-associated mutated mucins) (すなわち、M U C - 1 遺伝子産物 ; Jerome et al., J. Immunol., 151:1654-1662 (1993))、E B V の E B N A 遺伝子産物 (すなわち、E B N A - 1 ; Rickinson et al., Cancer Surveys, 13:53-80 (1992))、ヒトパピローマウイルスの E 7、E 6 タンパク質 (Ressing et al., J. Immunol., 154:5934-5943 (1995))、前立腺特異抗原 (P S A ; Xue et al., The Prostate, 30:73-78 (1997))、前立腺特異的膜抗原 (P S M A ; Israeli, et al., Cancer Res., 54:1807-1811 (1994))、例えば免疫グロブリンイディオタイプまたはT細胞受容体イディオタイプなどのイディオタイプのエピトープまたは抗原 (Chen et al., J. Immunol., 153:4775-4787 (1994))、K S A (米国特許第 5, 3 4 8, 8 8 7 号明細書)、キネシン 2 (Dietz, et al., Biochem Biophys Res Commun 2000 Sep 7;275(3):731-8)、H I P - 5 5、T G F β - 1 抗アポトーシス因子 (Toomey, et al., Br J Biomed Sci 2001;58(3):177-83)、腫瘍タンパク質 D 5 2 (Bryne J.A., et al., Genomics, 35:523-532 (1996))、H 1 F T、N Y - B R - 1 (国際公開第 0 1 / 4 7 9 5 9 号パンフレット)、N Y - B R - 6 2、N Y - B R - 7 5、N Y - B R - 8 5、N Y - B R - 8 7、N Y - B R - 9 6 (Scanlan, M. Serologic and Bioinformatic Approaches to the Identification of Human Tumor Antigens, in Cancer Vaccines 2000, Cancer Research Institu

10

20

30

40

50

te, New York, NY)、BCY 1、BFA 4、BCA 4、およびBFY 3が挙げられる。

【0018】

他の事例では、組換えウイルスは、病原体に由来する抗原または免疫原をコードしていて差し支えない。典型的な感染体として、バクテリア、ウイルス、菌、寄生生物などが挙げられる。特に典型的な感染体としては、数ある中でも、とりわけ、バチルス属（すなわち炭疽菌）、ボルデテラ属（すなわち、気管支敗血症菌、パラ百日咳菌、百日咳菌）、ボレリア属（すなわちライム病ボレリア）、ブルセラ属、カンピロバクター属、クラミジア属（すなわち、クラミジア・トラコマチス）、クロストリジウム属（すなわちボツリヌス菌）、コリネバクテリウム属（すなわちジフテリア菌）、エンテロバクター属、エシェリキア属（すなわち大腸菌）、ヘモフィルス属（すなわちインフルエンザ菌）、ヘリコバク
10
ター属（すなわちピロリ菌）、クレブシエラ属、レジオネラ属、リステリア属、マイコバクテリウム属（すなわち結核菌）、マイコプラズマ属、ナイセリア属（すなわち、髄膜炎菌、淋菌）、ノカルジア属、パスツレラ属、プロテウス属、リケッチア属、サルモネラ属（すなわち、腸炎菌、チフス菌）、シゲラ属（すなわち赤痢菌）、ブドウ球菌属（すなわち黄色ブドウ球菌）、連鎖球菌属（すなわち肺炎連鎖球菌）、ビブリオ属（すなわちコレラ菌）、コロナウイルス、CMV、デングウイルス、エボラウイルス、EBV、肝炎ウイルス（すなわち、A、B、C、D、及びE型肝炎）、ヘルペスウイルス、HIV、インフ
20
ルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプス・ウイルス、パピローマウイルス（ヒト）、ポックスウイルス（すなわち、痘疹、天然痘）、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、RSV、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、アスペルギルス属、ブラストミセス属、カンジダ属、コクシジオイデス属、クリプトコッカス属、ヒストプラズマ属、コクシジウム属、クリプトスポリジウム属、エントアメーバ属（すなわち赤痢アメーバ）、ジアルジア属（すなわちランブル鞭毛虫）、リーシュマニア属、プラスモジウム属、住血吸虫属、トキソプラズマ属（すなわちトキソプラズマ）、旋毛虫属、及びトリパノソーマ属などが挙げられる。

【0019】

ある実施の形態では、免疫反応を高めるために、本発明の免疫製剤またはワクチンを1種類以上のアジュバントと共投与してもよい。典型的なアジュバントを表1に示す。

【表 1】

表 1 - 免疫アジュバントの種類

アジュバントの種類	一般例	具体例／参考文献
1 ゲルタイプ	水酸化アルミニウム／リン酸アルミニウム (「アラムアジュバント」)	(Aggerbeck and Heron, 1995)
2 細菌性	リン酸カルシウム ムラミールジペプチド(MDP) 細菌外毒素 内毒素系アジュバント その他の細菌	(Relyveld, 1986) (Chedid et al., 1986) Cholera toxin (CT), E.coli labile toxin (LT) (Freytag and Clements, 1999) Monophosphoryl lipid A (MPL) (Ulrich and Myers, 1995) CpG oligonucleotides (Corral and Petray, 2000), BCG sequences (Krieg, et al., Nature, 374:576), tetanus toxoid (Rice, et al., J. Immunol., 2001, 167: 1558-1565) (Gupta et al., 1998) (Morein and Bengtsson, 1999) (Wassef et al., 1994) (Jensen et al., 1998) MF59 (Ott et al., 1995) SAF (Allison and Byars, 1992) (Allison, 1999) QS-21 (Kensil, 1996) Murabutide (Lederer, 1986) Threony-MDP (Allison, 1997) L121 (Allison, 1999) (Payne et al., 1995) Poly A:U, Poly I:C (Johnson, 1994)
3 粒子状物質	生分解性高分子ミクロスフィア 免疫刺激性複合体 (ISCOMs) リポソーム	
4 油乳剤系及び界面活性剤系 アジュバント	フロイント不完全アジュバント マイクロ流動化エマルジョン	
5 合成物質	サポニン ムラミールペプチド誘導体 非イオン性ブロック共重合体 ポリホスファゼン(PCPP) 合成ポリヌクレオチド	

本発明は、以下の実施例にさらに記載される。実施例は、本発明を単に説明する役割をするものであって、多少なりとも本発明の範囲を限定することは意図されていない。

【実施例】

【0021】

ウイルス安定化製剤－材料

以下の化学物質、フィルタ、及びバイアルを下記の実験に使用した：尿素（ロット番号 101K0040、シグマ社製）、粉末L-アラニン（ロット番号042K0900、シグマ社製）、MSG（ロット番号91K0096、シグマ社製）、粉末L-アルギニン（ロット番号42K0183、シグマ社製）、EAA（ロット番号3065605、Gibco社製）、粉末グリシン（ロット番号32K2502、シグマ社製）、トリス（ロット番号 73378B、BioRad社製）、粉末L-セリン（ロット番号111K0883、シグマ社製）、D-マンニトール（ロット番号22K0111、シグマ社製）、NEAA（ロット番号3065603、Gibco社製）、NaCl（BDH社ロット番号12833/MO89160）、濃HCl（ロット番号299102、BDH社製）、しょ糖（ロット番号51K0026）、しょ糖（ロット番号022K0065、シグマ社製；ロット番号K27819853/0076535B、メルク社製）、PVP₄₀（ロット番号120K0117、ロット番号71K0064、シグマ社製）、ソルビトール（ロット番号51K0005、シグマ社製；ロット番号042K01351シグマ社製）、グルタミン酸（ロット番号91K0096、シグマ社製）、バイアル（BV0030、3ml管状の透明ガラスバイアル）、バイアル用ストッパー（3101820、13mm V-32 4432/50 Gray Butyl Serum Stopper Latex free）、シール材（CS0001、13mmワンピース型アルミニウムシール）、フィルタ0.2μm（ロット番号476291、ナルゲン（登録商標）社製；ロット番号M2MN00586、ZapCap（登録商標）社製）。下記の実験用の典型的なウイルスとして、HIV抗原gp120をコードするALVACウイルスvCP307、ロット番号PX-0246及びロット番号PX-0230を使用した。

【0022】

方法－pH

凍結乾燥及び保存などの取り扱いによってpHが変化することから、凍結乾燥されたALVAC製剤のpHの測定は、安定性の重要な指標である。pHメーター（VWR Scientific Products社製SB301シンフォニー）を、試料の予想pH範囲にわたる標準pH緩衝液（Orion Application Solutions社製、pH緩衝液7.00、10.01及び4.01）で調整する。生(fresh portion)の試料を試験管に入れ、そこに電極を浸し、デジタル表示が一定になってから、測定値を小数点以下2桁まで記録する。

【0023】

オスモル濃度

オスモル濃度は、水溶液の総溶質濃度である。浸透圧計は、分子量またはイオン交換に関係なく、溶質粒子の数を測定する。この研究には、凝固点降下を利用してオスモル濃度を測定するAdvanced Micro-Osmometer Model 3300を使用した。浸透圧計は、製造仕様書に従い、113.5kPa(50mOsm/kg)及び1929.5kPa(850mOsm/kg)の校正基準を用いて調整した。20μLの試料をプランジャに充填し、浸透圧計の測定用試料投入口に挿入した。デジタル表示が一定になってから表示を記録する。

【0024】

残留水分

残留水分(RM)は、最初に乾燥した後の凍結乾燥生成物中に残る結合水の量である。この研究に使用する、残留水分の試験に用いるカール・フィッシャー法は、容量滴定によって水分含量を決定する。これは、乾燥生成物の総重量と比較した残留水分の重量%として測定される。RMは、保存中の水分曝露についての安定性の指標となる。欧州薬局方(第5版)では、3%未満のRMを推奨している。このRMは、化学分解及び物理的劣化を防ぐと同時に、微生物の繁殖を回避する手助けとなる。カール・フィッシャー電量法では、電流測定で終点を決定する、三菱化学製の全自動滴定装置CA-06モデルを使用する

。該装置は、五酸化リン、及び20～25℃の範囲の温度の5ml／分以下の一定流量の乾燥した空気をと共に、少なくとも相対湿度15%未満に維持された乾燥ボックス内で稼動させる。重量は、乾燥ボックス内に設置された天秤で量る。

【0025】

感染価（CCID₅₀）

CCID₅₀は、ウイルスの力価（感染力）、本事例においては凍結乾燥させたALVAC製剤の溶解後の力価を決定するのに用いられる技法である。力価は、接種された細胞培養の所定の一群のうち50%感染させるのに必要とされるウイルスの希釈を示す。測定法は、細胞を破壊するウイルス粒子（細胞変性効果（CPE）を生じさせる能力のあるもの）の存在及び測定に基づいている。宿主細胞は、等量に分けたウイルス希釈液が加えられた、融合性の正常な単層内、典型的には、96ウェルプレート内で生長させる。培養によりウイルスが複製され、子孫ウイルス粒子が放出され、順々に健康な細胞を感染させる。CPEを一定期間増殖させ、ウェルについてCPEの有無を記録する。本方法は、希釈ごとのウェル数を増加させることにより、より正確なものとなる。この試験は、保存期間中に弱力化したALVACウイルスの活性の損失の測定に欠かせないものである。

10

【0026】

ALVACウイルスを凍結乾燥させた生成物試料を、標準作業手順書（SOP）Number 22 PD-039 v.1.0に従って96ウェルプレートに連続的に滴下した。QT35（ウズラ）細胞の懸濁液を各ウェルプレートに加えた。36℃±1℃で6日間培養後、細胞変性効果（CPE）を示したウェル数を数えた。生成物中のウイルスの濃度は、最小二乗法を利用して算出し、生成物1mlあたりの50%感染用量として表した。

20

【0027】

凍結乾燥サイクル

凍結乾燥とは、湿った物質を凍結させ、真空下、得られた凍結物を蒸発させることによって、凝華過程を経て（融解させずに）乾燥状態を達成する脱水法である。この方法は、通常、3つの工程に分けられる。すなわち、凍結前、第一のまたは凝華による乾燥、及び、第2のまたは脱離乾燥（desorption drying）である。以下の表2にまとめたとおり、ALVAC系発現ベクターを24時間凍結乾燥サイクルに供した。

【表 2】

表2ー凍結乾燥サイクル

工程	変数	プログラム可能な数値
凍結(3時間)	充填温度	5°C
	凍結終了時の温度	−40°C
凝華(初乾) (16時間30分)	圧力	7Pa(70μBar)
	保存棚の温度の上昇までの時間	1時間
	保存棚の温度	−17°C
	継続時間	13時間
	保存棚の温度の上昇までの時間	2時間30分
脱離(再乾)(4時間)	保存棚の温度	45°C
	有効な真空状態を回復した生成物温度	25°C
閉栓(Stoppering)	窒素雰囲気下	窒素雰囲気下

10

20

【0028】

安定化製剤の様々な成分、例えば、アミノ酸、糖（しょ糖、ソルビトール、マンニトール）およびポリマー（ポリビニルピロリドン（PVP））などの定性的及び定量的寄与を、異なる安定剤を用いた製剤について評価した。成分及び濃度を表3に示す。製剤の安定性は、以下の測定法を利用して評価した：外観、溶解時間、溶解後の外観、pH値、残留水分、および感染価（CCID₅₀）。

30

【表 3】

表3 定性的および定量的製剤

製剤	EAA	NEAA	しょ糖	ソルビ トール	MSG	PVP40	トリス	尿素	マンニ トール	L-Arg	L-Ara	L-Ser	Gly	52 週後の 溶解時間 5℃	外観	
															-20℃	5℃
対照	40	40	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	0	0	5-12	白層、 滑らかな ケーキ	後退 または 白層、 滑らかな ケーキ
F9	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	80	0	0	29	白層、 滑らかな ケーキ	白層、 滑らかな ケーキ
F10	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	80	0	0	0	15	白層、 滑らかな ケーキ	白層、 滑らかな ケーキ
F11	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	80	0	15	白層、 滑らかな ケーキ	後退
F12	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	0	80	15	白層、 滑らかな ケーキ	白層、 滑らかな ケーキ

層流条件下、各安定化製剤を調製した。各製剤のpHを、製剤ごとに約7.2～約7.4に合わせた。各製剤を0.2μmポリフッ化ビニリデン(PVDF)使い捨てフィルタに通し、ラベルし、ロット番号を指定し、凍結乾燥されるまで5℃で保存した。

【0030】

凍結乾燥の1日前に、ALVACウイルスの粗採取物(crude harvest)(10mMトリス(pH9.0)緩衝液中)を、30℃±2℃の湯浴で溶解させた。粗採取物から2種類の希釈物(1/2及び1/6)を作製し、120mlの大量の最終生成物(FBP)を調製した。第1の希釈物は濃縮された安定剤を使用して調製し、第2希釈物は注射用蒸留水(WFI)で安定剤を1:2に希釈したものを使用して調製した。

【0031】

凍結乾燥法の開始には、多くの工程が含まれた。まず、各製剤につき400本のバイアルを、3mlのUSガラスバイアルを用い、アイソレーター中のFBP0.3mlで満たした。第2に、すべてのバイアルを4種類の保存棚上のトレイに詰め、また、対照として、現行の凍結乾燥用安定剤であるPO6及びPO7についても行った。倒壊を避けるため、各トレイを各保存棚の中央に置き、また、保存棚との直接の接触を避けるため、内側に置いた。チャンバーの前に熱電対を供えたバイアルを置き、生成物の温度をモニタできるようにした。最後に、適合している、24時間のALVAC凍結乾燥サイクルを行った(材料及び方法を参照のこと)。

【0032】

実施後、バイアルを取り出し、ポリビニルカーボン(PVC)ストッパーで栓をするとともに、Alu-Aluキャップで密封した。凍結乾燥器のグラフを分析し、サイクルが、不慮の事態を経ることなく、各工程を行ったことが保証された。次に、バイアルを-20℃に保存し、さらなるサンプリング及び試験に備えた。

【0033】

凍結乾燥されたタンパク質の安定性における製剤の効果を、実時間安定性試験および促進安定性試験の両方を用いて調べた。様々な時点および様々な温度で(1～6、8、12、26および52週目のそれぞれについて、-20℃、2～8℃、35～39℃)、5試料からなる各セットについて各測定を行った。次に、各試料の以下の特性を記録した：凍結乾燥物の外観、溶解時間、溶解後の外観、pH及び感染価(CCDI₅₀)。

【0034】

次に、さらなる安定性の研究を、最も所望される特性を有する製剤を使用して行った。各測定法は、様々な時点および様々な温度で(0、3、7、11、14、21、25、28、35、56、84、182、及び364日目のそれぞれについて、-20℃、2～8℃、37℃、及び45℃)、4～6の試料からなる各セットについて行った。次に、各試料の以下の特性を記録した：凍結乾燥物の外観、溶解時間、溶解後の外観、pH、残余水分、及び感染価(CCDI₅₀)。対照及びF12(n=6)には、45週目に追加の観察点を加えた。

【0035】

凍結乾燥されたALVAC製剤F12(先の研究からさらに期間が延長された試料)の最終的な安定性の研究を、1、3、5、8及び12週目に(n=6)、バイアルのセットについて、23～27℃で行った。次に、感染価(CCDI₅₀)、pH、再構成時間、外観及びオスモル濃度について、製剤を評価した。

【0036】

安定化製剤

いくつかの新規な安定化製剤を開発し、試験した。こういった各製剤中に含まれる成分を表3に示す。PVP40を製剤に加える際には、特別な注意が必要とされることに注意されたい。ある程度の時間は攪拌速度を上げ、PVP40が溶解したら速度を下げるべきである。速度を上げない場合には、通常、望ましくない凝集物が現れるであろう。当然のことながら当業者に理解されるように、混合時間及び速度は調製量によって異なる。

【0037】

実験結果

凍結乾燥物の外観

－20℃及び5℃で52週間保存後の、種々の製剤について、凍結乾燥物の外観を評価した。最初の実験における製剤F9、F10、F11及びF12のケーキの外観は、要求仕様書を満たした（バイアルの縁から後退していない滑らかな白層）。これらの所要の「ケーキ」の外観規格は、該製剤が、終局的崩壊または融解からウイルス及び周囲環境を保護することにより、該ウイルスの物理化学的インテグリティを維持可能であることを示唆している。ケーキの崩壊の原因は、長期間の保存または高温など、攻撃的な凍結乾燥工程または保存状態にあるかもしれない。ケーキの適切な外観が、ウイルスの安定化に適した環境を提供することがわかっている。以前に使用された20種類の必須アミノ酸および非必須アミノ酸の混合物は、凍結乾燥による構造的な外観に影響を与えることなく、高濃度のL-アルギニン、L-アラニン、セリン、及び／またはグリシンに置き換え可能であろうこともわかった。

10

【0038】

他の数種類の製剤は、バイアルの縁から沸騰／融解し、後退した外観を有し、不均一な外観を呈した（すなわち、滑らかではない、白層）。したがって、これらが外観の基準を満たしていないことから、不合格とした。以下に論ずるように、この外観は、望ましくない溶解時間の遅延と関係があった。これらの不合格となった製剤のそれぞれは、分散剤（すなわち、ポリビニルピロリドン（PVP40）、ソルビトール）が使用されておらず、よって、ケーキの構造におけるこれらの成分の影響が重大であることが実証された。バイアルの縁から崩れ、または後退した外観を呈するこれらの製剤のケーキもまた、外観基準に基づいて不合格とした。

20

【0039】

溶解時間、溶解後の外観、pH、およびオスモル濃度

－20℃及び5℃での52週間の保存後の製剤F9の溶解時間は、他の安定剤（F10～12）が15秒未満で溶解したのに比べて、わずかに増加した。各バイアルを1mlの0.4%NaClで再構成し、ケーキ全体が溶解するまで手動でかき混ぜた。PVP40を含有させることにより、最終製品の溶解時間に好ましい効果をもたらすことが結論付けられた。ストレスがかかった条件下（35～37℃）で保存された試料では、溶解時間は、すべての製剤で、15秒～1分を超えるまでに大幅に増加した。さらには、ケーキの外観が融解している場合、バイアル中に保存されていた製品は、凍結乾燥物を再構成することが困難であった。

30

【0040】

試験したすべての条件下のすべての製剤において、pHは7.5±0.5の安定した状態が保たれた。

【0041】

製剤F12では、オスモル濃度は794.5±227kPa（350±100mOsm/kg）であった。

【0042】

残留水分

40

製剤F12では、残留水分は<3%であり、欧州薬局方（第5版）の勧告に準拠していた。他の製剤については試験を行なわなかった。

【表 4】

表4 製剤 F12の残留水分

製剤	試料	水分		
		1回目 CA-03-031	2回目 CA-03-044	3回目 CA-03-059
F12	1	1.47	1.19	.99
	2	1.34	1.20	1.08
	3	1.48	1.25	1.02

10

【0043】

感染価

ウイルス活性の著しい減少は、約10～20%を超える活性の降下と考えられている。すべての製剤が、-20℃および2～8℃での52週間の保存後において、その感染価を維持しているように思われた。試験されたすべての製剤が、対照と同様の結果を有し、このことから、本方法の正確性（ $\pm 0.3 \log_{10} \text{CCID}_{50} / \text{ml}$ ）が確認された。ストレス条件では、対照の感染価と試験された製剤の感染価は、35～37℃で丸8週間、維持された。

20

【0044】

液体と凍結乾燥製剤の安定性

上記の結果を踏まえて、F12（凍結乾燥物）を液体製剤（10mM トリス-HCl 中のALVAC、0.9%NaCl、pH9.0）との比較用に選択した。これらの製剤を、「実時間」（2～8℃）及びストレスまたは促進条件下（23～25℃及び35～39℃）の両方において感染価の安定性を比較し、また、対照条件（-70℃及び-20℃）とも比較した。両製剤とも、等容積、等量のALVAC精製採取物を用いて調製した。感染価を、 CCID_{50} 測定法を用いて測定した。図1に示すように、凍結乾燥したF12は、2～8℃の液体製剤（及び-20℃及び-70℃の対照温度）と同様の結果を示し、25℃及び37℃では、液体製剤よりも優れた感染価を示した。F12が凍結乾燥された製剤であり、当業者にとって好ましい製剤の形式であることから、F12が、現在利用可能な液体製剤よりも優れていると結論付けることができる。

30

【0045】

PVP40及び／またはソルビトールなどの分散剤を含めた本明細書に記載の研究は、凍結乾燥製剤の外観（すなわち、「ケーキ」）の維持に不可欠であり、所望の溶解特性を機能的に予測するものである。さらには、20種類の必須アミノ酸および非必須アミノ酸の以前に使用した混合物を、感染価を維持しつつ、凍結乾燥物の構造的な外観に影響を与えることなく、高濃度のL-アルギニン、L-アラニン、セリン、及び／またはグリシンと置換して差し支えないことは、明白である。これは、製剤の調製工程の単純化およびそれに関連して費用を低減できるという点において特に有意義である。感染価のデータに基づく結果は、様々な製剤において有意な差異は示されなかった。すべての製剤で、2～8℃で52週間、感染価を維持することができた。

40

【0046】

本発明は、好ましい実施の形態に関して述べてきたが、当業者が変更及び／または修正を行ないうることは理解されよう。したがって、添付の特許請求の範囲が、請求する本発明の範囲内に入るであろうこういった等価的变化のすべてを包含することが意図されてい

50

る。

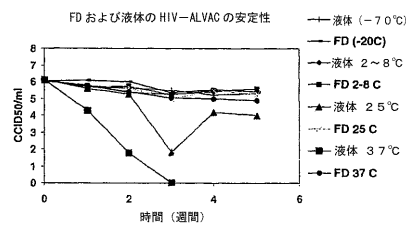
【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】液体製剤と、本発明の一実施形態である新規の凍結乾燥製剤F12（FD）についての、様々な温度における組換えウイルス製剤の安定性の比較。表示されている時間ごとに各ウイルス製剤の感染価（ $CCID_{50}$ ）を測定した。

【図1】

FD = 凍結乾燥した製剤F12
液体 = 液体製剤



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/165</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/165</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/12</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/205</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/205</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/012</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/012</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/015</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/015</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/12</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 国際公開第00／029024 (WO, A1)
特表2002-531119 (JP, A)
特表2004-526667 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 7/00
A61K 39/12 - 39/295