

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-509302

(P2019-509302A)

(43) 公表日 平成31年4月4日 (2019. 4. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-549454 (P2018-549454)	(71) 出願人	510000976
(86) (22) 出願日	平成29年3月22日 (2017. 3. 22)		インターベット インターナショナル ベー. フェー.
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月13日 (2018. 11. 13)		オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/056801	(74) 代理人	100114188
(87) 国際公開番号	W02017/162727		弁理士 小野 誠
(87) 国際公開日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)	(74) 代理人	100119253
(31) 優先権主張番号	16161982.0		弁理士 金山 賢敦
(32) 優先日	平成28年3月23日 (2016. 3. 23)	(74) 代理人	100124855
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 坪倉 道明
		(74) 代理人	100129713
			弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルブミンを含むPCV2及びPRRSウイルス感染症に対する混合ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ブタサーコウイルス2型 (PCV2) による感染症及びPRRSウイルスによる感染症に対する動物の予防的治療に使用するためのワクチンであって、ブタサーコウイルス2型の非複製的免疫原及び弱毒生PRRSウイルスを組み合わせる含み、アルブミンをさらに含むワクチンに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ブタサーコウイルス 2 型の非複製的免疫原及び弱毒生 PRRS ウイルスを組み合わせて含むワクチンであって、アルブミンをさらに含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 2】

卵アルブミンを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記アルブミン濃度が 0.1 ~ 10 % (w/w) であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のワクチン。

【請求項 4】

PCV2 の前記非複製的免疫原が、PCV2 の組換え発現 ORF2 タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 5】

PCV2 の前記非複製的免疫原が、PCV2 のバキュロウイルス発現 ORF2 タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 6】

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの非複製的免疫原をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 7】

ブタサーコウイルス 2 型の非複製的免疫原及び弱毒生 PRRS ウイルスを組み合わせて含む、ブタサーコウイルス 2 型 (PCV2) による感染症及び PRRS ウイルスによる感染症に対する動物の予防的治療における使用のためのワクチンであって、該ワクチンが、アルブミンを含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 8】

前記動物の真皮への投与のためのものであることを特徴とする、請求項 7 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 9】

単一用量によって投与されることを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 10】

無針ワクチン接種装置で投与されることを特徴とする、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 11】

PCV2 の免疫原及び前記弱毒生 PRRS ウイルスが、投与前 24 時間以内に、前記ワクチンに組み合わされることを特徴とする、請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 12】

PCV2 の免疫原及び前記弱毒生 PRRS ウイルスが、投与前 6 時間以内に、前記ワクチンに組み合わされることを特徴とする、請求項 7 から 11 のいずれか一項に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 13】

前記免疫原を組み合わせる前に、前記アルブミンが PRRS ウイルスの前記免疫原と組み合わせて存在することを特徴とする、請求項 11 又は 12 に記載の使用のためのワクチン。

【請求項 14】

ブタサーコウイルス 2 型 (PCV2) の非複製的免疫原と弱毒生 PRRS ウイルスとアルブミンとを組み合わせることで含むワクチンを動物に投与することによって、PCV2 による感染症及び PRRS ウイルスによる感染症に対して動物を予防的に治療する方法。

【請求項 15】

ブタサーコウイルス 2 型 (PCV2) による感染症及び PRRS ウイルスによる感染症

10

20

30

40

50

に対して動物を予防的に治療するための前記動物に投与用の、PCV2の非複製的免疫原と弱毒生PRRSウイルスとアルブミンとを組み合わせる含むワクチンを製造するための、PCV2の非複製的免疫原及び弱毒生PRRSウイルスの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、ブタの健康の分野に関する。ブタは多くの病原性微生物にかかりやすい。感染の制御は、一般的に、安定した飼料管理、抗ウイルス薬及び抗生物質などの医薬品による治療、又はワクチンを用いた予防的治療によって行われる。特に、本発明は、ブタサーコウイルス2型(PCV-2)及びPRRS(ブタ生殖器呼吸器症候群)ウイルスに対するワクチン、並びにワクチンを用いて動物をこのような感染症から保護する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

PCV2及びPRRSウイルスは、養豚業において重大な経済的損失をもたらす2つのウイルスである。PCV-2は、子ブタで観察される離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)と関連している。この病気は1991年にカナダで初めて生じた。臨床徴候及び病理学が1996年に公開され、進行性の衰弱、呼吸困難、頻呼吸、時には黄疸(icterus)及び黄疸(jaundice)が含まれる。

20

【0003】

Nayar et al., Can. Vet. J. Volume 38, June 1997は、PMWSの臨床症状を有するブタでブタサーコウイルスを検出し、PK-15細胞の自然の存在として認識される公知のPCV以外のPCVがPMWSと関連し得ると結論づけた。後の刊行物(Hamel et al., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998; Meehan et al., J. gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998)がこれらの知見を裏付け、新たな病原性PCVをPCV-2と呼び(Meehanら、上記)、元のPK-15細胞培養物単離物(Tischer et al., Nature 295, 64-66, 1982)をPCV-1と呼ぶべきであることが提案された。PCV-2は、環状一本鎖DNAゲノムを含む小型(17~22nm)正二十面体非エンベロープウイルスである。PCV-2ゲノムの長さは約1768bpである。世界中の異なる領域に由来するPCV-2単離株は互いに密接に関連しており、95~99%のヌクレオチド配列同一性を示す(Fenaux et al., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000)。PCVのORF-2はウイルスのカプシドタンパク質をコードする。PCV2のORF2は約233アミノ酸のタンパク質をコードする。全てのPCV-2単離株のORF2は、91~100%のヌクレオチド配列同一性及び90~100%の推定アミノ酸配列同一性を共有する。

30

【0004】

PRRSウイルスは、1987年に北米及び中央ヨーロッパで初めて報告された。PRRSウイルスは、小型のエンベロープRNAウイルスである。これは、約15キロベースのサイズを有する一本鎖、プラス鎖RNAゲノムを含む。ゲノムは9個のオープンリーディングフレームを含む。ウイルスは、ニドウイルス(Nidovirales)目、アルテリウイルス(Artteriviridae)科、アルテリウイルス(Artterivirus)属のメンバーである。PRRSVの2つのプロトタイプ株は、北米株、VR-2332、及び欧州株、レリスタッドウイルス(Lelystad virus)(LV)である。欧州及び北米のPRRSV株は、同様の臨床症状を引き起こす。2000年代前半に、北米遺伝子型の高病原性株が中国で出現した。この株、HP-PRRSVは他の全ての株より毒性が強く、世界的にアジア諸国で大きな損失を引き起こしている。PRRSウイルスについては、不顕性感染が一般的であり、その臨床徴候は群れで散発的にしか起こらない。臨床徴候には、流産及び死産又はミイラ変性胎児の出産などの雌ブタの生殖障

40

50

害、並びに耳及び外陰部のチアノーゼが含まれる。新生児ブタでは、この病気は呼吸困難を引き起こし、グレーサー病などの呼吸器感染症に対する感受性が高まる。

【0005】

上で同定された病原体に対するワクチンは、一般的に公知である。PCV2による感染症に対して動物、特にブタを予防的に治療するための慣用的なワクチンは、（非複製的）免疫原としての全不活性化PCV-2ウイルスに基づき得る。また、当技術分野では、ORF2にコードされたカプシドタンパク質（例えば、組換え発現される場合）が、十分なワクチンに使用するためのブタサーコウイルス2型のサブユニット免疫原として適していることが示されている。DNA及び非構造タンパク質がカプシドの内側に存在しないという事実が本質的に異なるが、このサブユニットは循環系においてウイルス自体と同じ様式を示すので、これが理解され得る。当技術分野では、PCV2に対するいくつかのワクチンが商業的に入手可能である。Porcilis（登録商標）PCV（MSD Animal Health、Boxmeer、オランダから入手可能）は、3週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。2回接種（2回投与）ワクチンとして投与する場合、免疫持続期間（DOI）は22週間であり、ブタの肥育期間をほぼ完全にカバーする。Ingelvac CircroFlex（登録商標）（Boehringer Ingelheim、Ingelheimから入手可能）は、2週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。これは1回接種（1回投与）ワクチンとしてのみ登録されている。Circovac（登録商標）（Merrial、Lyon、フランスから入手可能）は、3週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。Suvaxyn（登録商標）PCV（Zoeitis、Capelle a/d IJssel、オランダから入手可能）は、3週齢以上のブタに使用するための、ブタをブタサーコウイルス2型から保護するためのワクチンである。他のPCV2ワクチンは、例えば国際公開第2007/028823号、国際公開第2007/094893号及び国際公開第2008/076915号に記載されている。

【0006】

PRRSウイルスに関しては、不活化ウイルスワクチンが記載され商業的に入手可能であるが、弱毒生形態の欧州型（I型）又は北米型（II型）のいずれかを含む修飾生ワクチン（MLV）ワクチンが、その制御のための主要な免疫学的ツールである。いくつかのワクチンが当技術分野で商業的に入手可能である。Porcilis（登録商標）PRRS（MSD Animal Health、Boxmeer、オランダから入手可能）は、弱毒生PRRSウイルスI型を含むワクチンであり、PRRSウイルスによる感染によって引き起こされる感染症（ウイルス血症）を軽減するために登録されている。Ingelvac PRRS（登録商標）MLV（Boehringer Ingelheim、Ingelheimから入手可能）は、PRRSウイルスによって引き起こされる病気の軽減を助けるワクチンであり、このワクチンは異なる種類の株に対する交差防御を提供する。Fosteria（登録商標）PRRS（Zoeitis、Florham Park、New Jersey、米国から入手可能）もMLVワクチンであり、PRRSウイルスによって引き起こされる呼吸器と生殖の両方の形態の病気に対する防御のために登録されている。他のPRRSワクチンは、例えば国際公開第2006/074986号、米国特許第8728487号明細書及び国際公開第2014/048955号に記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2007/028823号

【特許文献2】国際公開第2007/094893号

【特許文献3】国際公開第2008/076915号

【特許文献4】国際公開第2006/074986号

10

20

30

40

50

【特許文献 5】米国特許第 8 7 2 8 4 8 7 号明細書

【特許文献 6】国際公開第 2 0 1 4 / 0 4 8 9 5 5 号。

【非特許文献】

【0 0 0 8】

【非特許文献 1】N a y a r e t a l . , C a n . V e t . J . V o l u m e 3 8 , J u n e 1 9 9 7

【非特許文献 2】H a m e l e t a l . , J . V i r o l . , 7 2 (6) , 5 2 6 2 - 5 2 6 7 , 1 9 9 8

【非特許文献 3】M e e h a n e t a l . , J . g e n . V i r o l . , 7 9 , 2 1 7 1 - 2 1 7 9 , 1 9 9 8

10

【非特許文献 4】T i s c h e r e t a l . , N a t u r e 2 9 5 , 6 4 - 6 6 , 1 9 8 2

【非特許文献 5】F e n a u x e t a l . , J . C l i n . M i c r o b i o l . , 3 8 (7) , 2 4 9 4 - 2 5 0 3 , 2 0 0 0 。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 9】

ブタの健康管理のための、簡便で安全で効果的な手段が絶えず必要とされている。本発明の目的は、この必要性、特に新規な PCV2 / PRRS ウイルス混合ワクチンの必要性を満たすワクチンを提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

本発明の目的を達成するために、ブタサーコウイルス 2 型の非複製的免疫原と弱毒生 PRRS ウイルスとを組み合わせる含む新規なワクチンであって、免疫原に加えて、アルブミン（すなわち、任意の水溶性、熱変性、非グリコシル化球状タンパク質、とりわけ、血清及び卵白中に見られる）を含むワクチンが考案された。

【0 0 1 1】

両ウイルスについて、ワクチンが知られておりそして商業的に入手可能であり、これらの免疫原の組み合わせさえ当該技術分野で示されているが、特に若い動物で使用するのに効果的であり同時に安全であるワクチンをもたらし改善が絶えず必要とされている。PCV サブユニットワクチンは、生 PRRS ウイルスに干渉してその生存率を抑制し得るという出願人の認識があった。このことは、混合ワクチンにおいて、PRRS ウイルス成分の有効性低下をもたらし得る。アルブミンを混合ワクチンに添加することによって、PRRS ウイルス生存率の抑制が減少するようである。

30

【0 0 1 2】

一般に公知であるように、企図された又は示唆された抗原の全ての組み合わせが安全で最適に有効な混合ワクチンをもたらしことができるわけではない。実際、単一（一価）ワクチンが安全且つ効果的である場合でさえ、混合ワクチンの安全性及び有効性に関しては、高レベルの不確実性が存在する。

【0 0 1 3】

40

欧州医薬品審査庁（EMA）の獣医用医薬品委員会が、その刊行物「混合獣医製品の要件に関するガイダンス（Note for guidance: requirements for combined veterinary products）」（EMA, 2000, CVMP / IWP / 52 / 97 - FINAL）で、以下のように言及している（2 / 6 頁）：「混合ワクチンの開発は容易ではない。各組み合わせは、品質、安全性及び有効性の点で個別に開発及び試験されるべきである」。委員会はさらに、優れた混合ワクチンの探索には、典型的には、例えば、保存剤、賦形剤及び安定剤、不活性化剤及びアジュバントを含む混合ワクチン中の個々の成分間の適合性が含まれることを示している。3 頁、一番上の段落には、「混合ワクチンでは、2 種以上の成分の存在がしばしば相互作用を引き起こし、（1 又は複数の）特定の成分を単独で投与した場合と比較して、

50

個々の成分に対する減少又は増加した応答をもたらし得る。このような相互作用はしばしば免疫学的な性質であるが、免疫系に対するあまり直接的でない効果を有する他の因子によっても引き起こされ得る」及び「アジュバントを使用して混合ワクチンに対する免疫応答を増大させる場合、特別な問題が生じ得る」とも述べられている。

【0014】

アメリカ保健福祉省、食品医薬品局、生物学的製剤評価研究センターは、1997年4月に、「予防可能な疾患のための混合ワクチンを評価するための業界ガイダンス：製造、試験及び臨床研究（Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies）」を公開し、このガイダンスの中で、（3頁、「成分の適合性」）「一価ワクチンを組み合わせると、望ましいものより安全性又は有効性が低い新たな組み合わせがもたらされることが経験から明らかになった。時には、不活化ワクチンの成分が、活性成分の1種又は複数に対して有害に作用することがある。」と述べられており、特に、不活化ワクチンが生ワクチンの有効性に悪影響を及ぼし得、例えば生百日咳ワクチンと不活化ポリオウイルスワクチンを組み合わせると、百日咳の効力が低下したワクチンが得られるということが起こったことを示している。個々のワクチンと比較して、ワクチン中の任意の追加の成分が最終製品の安全性及び効力を複雑にすることが示されている。

10

【0015】

世界保健機関（WHO）は、「ワクチン安全性の基礎」と呼ばれるeラーニングコースを公開し、履修単位2では混合ワクチンを意図している。この履修単位は、「認可された混合ワクチンは、製品が安全で、有効で、許容可能な品質であることを保証するために、国家当局によって承認される前に広範な試験を受けている」で始まっている。「そのため、全ての組み合わせで、製造業者は各抗原成分の効力、免疫を誘導するために組み合わせた場合のワクチン成分の有効性、毒性への復帰の可能性のリスク、及び他のワクチン成分との反応を評価しなければならない」とも述べられている。

20

【0016】

概して、混合ワクチンの開発は容易ではなく、安全性及び有効性を決定するための実験を必要とすることが一般に知られている。

30

【0017】

本発明はまた、ブタサーコウイルス2型（PCV2）による感染症及びPRRSウイルスによる感染症に対する動物の予防的治療における使用のためのワクチンであって、ブタサーコウイルス2型の非複製的免疫原及び弱毒生PRRSウイルスを組み合わせる含み、アルブミンを含むワクチンに関する。

【0018】

さらに、本発明は、ブタサーコウイルス2型（PCV2）の非複製的免疫原と弱毒生PRRSウイルスとアルブミンとを組み合わせる含みワクチンを動物に投与することによって、PCV2による感染症及びPRRSウイルスによる感染症に対して動物を予防的に治療する方法に関する。本発明はまた、ブタサーコウイルス2型（PCV2）による感染症及びPRRSウイルスによる感染症に対して動物を予防的に治療するために動物に投与するための、PCV2の非複製的免疫原と弱毒生PRRSウイルスとアルブミンとを組み合わせる含みワクチンを製造するためのPCV2の非複製的免疫原及び弱毒生PRRSウイルスの使用に関する。

40

【0019】

ワクチンにおいて、免疫原（抗原とも呼ばれる）は、典型的には、薬学的に許容される担体、すなわち生体適合性媒体、すなわち、投与後に対象動物において有意な有害反応を誘導せず、ワクチンの投与後に宿主動物の免疫系に免疫原を提示することができる媒体、例えば水を含む液体及び／又は任意の他の生体適合性溶媒、或いは凍結乾燥ワクチン（糖及び／又はタンパク質に基づく）を得るために一般的に使用されるような固体担体、と組

50

み合わされ、場合により、野生型微生物による感染症に対して動物を治療するため、すなわちこのような感染症又はそこから生じる障害を予防、改善又は治癒するのを補助するための、動物に投与すると免疫応答を誘導する免疫刺激剤（アジュバント）を含んでもよい。場合により、安定剤、粘度調整剤又は他の成分などの他の物質を、ワクチンの意図される用途又は要求される特性に応じて添加してもよい。

【0020】

定義

ワクチンは、対象動物に投与することが安全であり、その動物において病原性微生物に対する防御免疫を誘導する、すなわち、以下に定義される成功した予防的治療を誘導することができる医薬組成物である。

10

【0021】

病原体の非複製的免疫原は、（弱毒形態の野生型における）全体として生きた複製病原体以外の病原体に相当する任意の物質又は化合物であり、この病原体に対して免疫学的応答が誘発され、対応する病原性病原体又はその病原性因子の1つもしくは複数、それらの免疫応答の結果として宿主の免疫系によって認識され、最終的には少なくとも部分的に中和されるものである。非複製的免疫原の典型的な例は、死滅した全病原体及びこれらの病原体のサブユニット、例えばカプシドタンパク質、及び、表面発現タンパク質、例えば組換え発現タンパク質である。

【0022】

病原体による感染症に対する予防的治療は、治療後の病原性病原体による曝露から生じる病原体による感染症又はその感染症から生じる障害を予防又は改善するのを補助し、特にこのような曝露後の宿主中のその量を減少させるのを補助し、場合により病原体による感染からの治療後に生じる1つ又は複数の臨床症状を予防又は改善するのを補助する。

20

【0023】

弱毒生病原体は、減少した病原性を有する病原体の、生存可能な、複製可能な（生存可能な）形態である。弱毒化の過程は、感染性病原体をとり典型的には細胞系を通した病原体の複数回継代によって又は病原体を遺伝子組換えすることによって、それが無害又は弱毒性になるように変える。

【0024】

予防的治療における使用のためのワクチンの単一用量投与は、防御免疫に到達するために、ワクチンの第2の投与でワクチン接種を追加する必要がないことを意味する。2回接種レジメンでは、第1の（プライム）ワクチン接種が、典型的には第1の投与から6週間以内、一般的には第1の投与から3週間以内又は2週間以内にさらに追加され、第2の（ブースト）投与後にのみ、防御免疫、すなわち上に定義される成功した予防的治療を得ることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】PCV2血清学的応答の結果を示す図である。

【図2】PRRS血清学的応答の結果を示す図である。

【図3】ウイルス血症データを示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明それ自体によるワクチンの第1の実施形態では、ワクチンは卵アルブミンを含む。卵アルブミン（すなわち、卵白に由来するアルブミン）は、PRRSウイルス生存率の低下を抑制するのに適しているようであり、例えば、ウシアルブミンとは対照的に、伴う安全性の問題が少ない（特に、ウシ海綿状脳症に関連するプリオンタンパク質が存在しない）。

【0027】

第2の実施形態では、アルブミン濃度が1～10%（w/w）である。実験的に、0.3%、1%及び3%の量のアルブミンが実用的に実現可能であることが分かった。注目す

50

べき効果及びアルブミンの溶解度に基づいて、最適濃度は0.1～10%（全ワクチン重量に対するアルブミンの重量）であると考えられる。特に、0.1、0.2、0.3、0.4、.....1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10%w/w（及び任意の介在量）の任意の量が、この実施形態で使用される。

【0028】

別の実施形態では、PCV2の非複製的免疫原は、PCV2の組換え発現ORF2タンパク質である。この組換えタンパク質は、本発明に適用するのに適していることが判明している。特に、ORF2タンパク質は、国際公開第2007/028823号、国際公開第2007/094893号又は国際公開第2008/076915号に記載されるようなバキュロウイルス発現系で発現され得る。

10

【0029】

さらに別の実施形態では、ワクチンは、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ（M. hyo）の非複製的免疫原をさらに含む。この実施形態では、ワクチンは、ただ1種のワクチンを使用することによって3つの主要なブタ病原体に対する防御を提供することができる。M. hyoに対する多くの商業的ワクチンが存在し、これらは商業的養豚業務の大部分において日常的に使用されている。一般に、これらのワクチンは、典型的には非経口注射によって投与され、サブユニットタンパク質及び/又はバクテリア（すなわち、全細胞、（部分）溶解、均質化、フレンチプレス、この組み合わせとして死細胞を含むか又は組成物が死細菌培養物から得られる限り別の形態の死細胞を含む組成物）などの非複製的免疫原を含む。いくつかの例は、RespiSure（登録商標）（Zoetis）、Ingelvac（登録商標）M. hyo及びMycofLEX（登録商標）（Boehringer Ingelheim）、Hyoresp（登録商標）（Merial）、Stellamune（登録商標）Mycoplasma（Elanco Animal Health）、Fostera（登録商標）PCV MH（Zoetis）及びM+Pac（登録商標）（MSD Animal Health）である。

20

【0030】

本発明によるワクチンの特定の使用の第1の実施形態では、ワクチンは、動物の真皮への投与用である。新しい混合ワクチンそれ自体を考案することは既に容易ではないが、特定の投与部位用の混合ワクチンを考案することは一層容易ではない。例えば、世界保健機関（WHO）は、「ワクチン安全性の基礎」と呼ばれるeラーニングコースを公開し、このコースの53頁では、「投与経路は、ワクチン（又は薬物）を身体と接触させる経路である。これは予防接種が成功するための重要な因子である。物質は、侵入部位から、その作用が起こることが望まれる身体の部分まで輸送されなければならない。しかしながら、この目的のために身体の輸送機構を使用することは単純なことではない。」と報告されている。

30

【0031】

この点で、カリフォルニア州保健局の予防接種部は、正しい予防接種のためのガイドラインを公開している（http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/d/vaccine_admin.pdf）。投与部位に関しては、7頁の最初の全段落に、「各ワクチンの推奨経路及び部位は、臨床試験、実際の経験及び理論的考察に基づく。この情報は、各ワクチンの製造業者の製品情報に含まれている。ワクチンの投与に使用される5つの経路が存在する。推奨経路からの逸脱は、ワクチン有効性を低下させる、又は局所的有害反応を増加させる可能性がある。」と言及されている。14頁には、唯一の米国で認可された皮内ワクチンが記載されている：「Fluzone Intradermalは、皮内経路によって投与される唯一の米国で認可されたワクチンである。これは18歳～64歳の人への使用のみが承認されている。このFluzone製剤は、不活化インフルエンザワクチン（TIV）の筋肉内製剤と同じではない。他のTIV製剤は、皮内経路によって投与すべきではない。」。

40

皮内投与に関しては、IDAL（登録商標）ワクチン接種装置（オランダのBoxme

50

erのMSD Animal Healthから入手可能)などの無針ワクチン接種装置を用いて皮内投与がしばしば行われるが、「皮内」投与自体を「無針」投与と同一視すべきではない。世界保健機関は、2009年8月27日の「ワクチンの皮内送達；低及び中所得国で使用するための開発に関する文献及び可能性の概説」と題された論文で、実際に明らかに、「無針」ワクチン接種が、必ずしも「皮内」ワクチン接種を意味するわけではないことを示している(表1、概説の3頁参照)。無針装置が「皮内ワクチン接種用に構成されている」場合にのみ、ワクチンは実際に(少なくとも部分的に)真皮内に送達され得る。そうでなければ、ワクチンは、その全体が皮下又は筋肉内に送達され得る。

【0032】

本発明によるワクチンの特定の使用の第2の実施形態では、ワクチンは、単一用量によって投与される。単一用量投与が有効なワクチンをもたらすことが分かった。これは、両病原性ウイルスに対して動物を保護するための非常に簡便で経済的な方法を提供する。

10

【0033】

本発明によるワクチンの特定の使用の次の実施形態では、ワクチンは、動物の皮膚を通して真皮に到達するためにワクチンの噴射を使用して、無針ワクチン接種装置で投与される。この実施形態では、真皮へのワクチン接種は、典型的には0.05~0.2mlの範囲の非常に低容量のワクチンを使用して、ワクチンの液体噴射(高加圧流体流)を使用する無針ワクチン接種装置によって提供される。これによって、ワクチンの安全性及び投与方法がさらに増加する。

【0034】

20

本発明によるワクチンの特定の使用のさらに別の実施形態では、PCV2の免疫原及び弱毒生PRRSウイルスは、投与前24時間以内、好ましくは6時間以内にワクチンに組み合わせられる。ワクチンの安定性は、少なくともいずれの薬理的に許容される担体組成物についても達成するのが依然として容易ではないので、投与直前に抗原を組み合わせることによって、賦形剤を選択する自由度が増す。

【0035】

本発明によるワクチンの特定の使用のさらに別の実施形態では、免疫原を組み合わせる前に、アルブミンはPRRSウイルスの免疫原と組み合わせ存在する。

【0036】

30

本発明を、以下の実施例を用いてさらに説明する。

【0037】

[実施例]

実験1

第1の実験では、弱毒生PRRSウイルスワクチンの生存率に対するPCV2 ORF2サブユニットワクチンの添加の効果を、最終ワクチン中のウシ血清アルブミンの存在下又は非存在下で確立した。このために、PRRSウイルス力価を、ワクチンを組み合わせた1時間後にMA-104細胞(アフリカミドリザル腎臓細胞)で希釈して測定した(log10 TCID50/ml)。対照として、PCV2ワクチンを添加することなく、同じPRRSウイルスワクチンの生存率を測定した。PRRSウイルスの(目指した)開始力価が4(log10)であったワクチンについて、結果を以下の表1に示す。混合ワクチンにおいて、0.3%(3g/Lワクチン)血清アルブミンを添加した。表2は、PRRSウイルスの(目指した)開始力価が5(log10)であったワクチンについての同じ結果を示す。この後者の混合ワクチンにおいても、0.3%(3g/Lワクチン)血清アルブミンを添加した。結果は、アルブミンが混合ワクチン中のPRRSウイルス生存率に有意な効果を有することを示している。

40

【表 1】

表1 PRRSウイルス生存率に対するPCV2ワクチンの効果

試料 (PRRS 開始力価 4 log10)	PRRS ウイルス生存率
対照 (PRRS ウイルスワクチン)	3.3
PCV/PRRS, アルブミンなし	0
PCV/PRRS, 0.3% アルブミン	3.0

【表 2】

10

表2 PRRSウイルス生存率に対するPCV2ワクチンの効果

試料 (PRRS 開始力価 5 log10)	PRRS ウイルス生存率
対照 (PRRS ウイルスワクチン)	4.5
PCV/PRRS, アルブミンなし	2.2
PCV/PRRS, 0.3% アルブミン	4.8

【 0 0 3 8 】

実験 2

20

第 2 の実験では、異なるタンパク質について、PCV2 / PRRS ウイルス混合ワクチン中の PRRS ウイルスの生存率に対するそれらの効果を試験した。この実験では、1 % (w / w) の (未確認の) PRRS ウイルス安定剤の最終濃度を有する組み合わせ PCV2 / PRRS ウイルス試料を、実験 1 に記載されるように PRRS 生存率 (開始力価 5 log 10) について試験した。このために、安定剤を PRRS ウイルスワクチンと混合し、その後、PCV2 ワクチンを添加した。以下のタンパク質性ウイルス安定剤 (ウシ血清アルブミンの次に) を試験した：

- 植物性ペプトン (Sigma Aldrich 18332 - 500 G - F)
- 植物性ペプトン 1 番 (Sigma Aldrich 61854 - 500 G - F)
- 植物性ペプトン 2 番 (Sigma Aldrich 19942 - 500 G - F)
- ダイズペプトン (Sigma Aldrich 70178 - 100 G)
- 脱脂乳 (Campina、オランダ)
- 卵アルブミン (Sigma Aldrich、A5253 - 250 G)
- NZ - アミン (カゼイン加水分解物；実験室製品)。

30

【 0 0 3 9 】

結果を表 3 で以下に示す。

【表 3】

表3 PRRSウイルス生存率に対するPCV2ワクチンの効果

試料	PRRS ウイルス力価
対照 (PRRS ウイルスワクチン)	6.4
ウシ血清アルブミン	6.4
植物性ペプトン	4.2
植物性ペプトン1番	4.3
植物性ペプトン2番	4.0
ダイズペプトン	4.0
脱脂乳	4.8
オボアルブミン	6.1
NZ- アミン	4.3

10

【0040】

アルブミン（ウシ又は鶏卵源のいずれか）のみで、PRRS ウイルス力価の低下を（ほぼ完全に）防止することができるようであった。

【0041】

20

実験 3

目的

この試験の目的は、PCV2 / Mhyo / PRRS 混合ワクチンの有効性及び安全性を評価すること、特に、PRRS 有効性に対するアルブミンの添加の効果を示すことであった。抗ORF2血清学を評価することによって、PCV2 による感染に対する防御有効性を評価した。マイコプラズマ・ハイオニューモニエによる感染に対する有効性を、血清学的応答を商業的に入手可能なMhyoワクチンPorcilis（登録商標）Mhyo（MSD Animal Health、Boxmeer、オランダ）のそれと比較することによって評価した。PRRS ウイルスによる感染に対する有効性を、ワクチン接種4週間後の病原性PRRS株での曝露時の血清学及びPRRウイルス血症を評価することによって評価した。

30

【0042】

実験設計

この試験では10匹の雌ブタの子孫が利用可能であった。合計40匹の動物をそれぞれ10匹の子ブタからなる4つの群に割り当てた。全ての動物を、約4週齢の時に、動物施設に移した。1～4群に、首の右側にIDAL（登録商標）ワクチン接種装置を用いて皮内ワクチン接種した。1群及び2群それぞれに、さらにMhyoバクテリア（商業的に入手可能な製品Porcilis（登録商標）Mhyoと同じ抗原）を含み、3%卵アルブミン（1群）を含む又はアルブミンを含まない（2群）ORF2タンパク質ベースのPCV2ワクチンを受けさせた。これらの混合ワクチンでは、生PRRSウイルスワクチン（Porcilis PRRS）を再構成した。ワクチンは、アジュバントとして、フランスのSEPPICから入手可能なMontanide IMS251を使用した。各ワクチンは、9µg / 用量のORF2タンパク質、及び商業的に入手可能なワクチンPorcilis（登録商標）Mhyo ID ONCE中のMhyo抗原の濃度の1～2倍のMhyo抗原を含んでいた。PRRSワクチンは凍結乾燥ワクチンであり、投与直前に、適切なPCV2ワクチン又は希釈剤を用いて200µlの1用量当たり $10^{4.5}$ TCID₅₀のウイルスを含むように再構成した。3群はPRRSワクチンのみを受け、4群は未ワクチン接種のままであり、（曝露）対照として役立った。全ての子ブタを臨床徴候について毎日観察した。これらの動物に、約8週齢（28日目）の時に、病原性PRRSウイルス（I型）を曝露感染させた。曝露材料は、2ml中（計算用量）5.3log

40

50

10 TCID₅₀のウイルスを含んでいた。材料を、鼻孔1つ当たり1ml、鼻腔内投与した。観察期間の終了時（曝露21日後に相当するワクチン接種49日後）に、全てのブタを屠殺した。0日目、14日目、28日目（曝露直前）、31日目、35日目、38日目、42日目及び49日目に、血液試料（頸静脈を介して）を全ての動物から個別に採取し、PRRSV、PCV2及びMhyoに対する抗体についてPRRSウイルスの存在を試験した。

【0043】

結果

いずれの動物もワクチン接種による臨床徴候を示さず、直腸温度は対照から1.5以内のままであった。したがって、ワクチンは安全とみなされる。

10

【0044】

Mhyoに関しては、混合ワクチンの血清学的応答は、商業的に入手可能なワクチンPorcilis Mhyo（図に数値的結果は示されていない）で得られるものに匹敵するようである。したがって、ワクチンは、Mhyoによる感染から保護すると推定され得る。

【0045】

PCV2血清学的応答の結果を図1に示す。2つの混合ワクチンは陽性抗ORF2抗体応答を誘導するようであり、これは、ワクチンが野生型PCV2による感染に対する防御を誘導することを意味する。

【0046】

20

PRRS血清学的応答の結果を図2に示す。商業的に入手可能なPRRSワクチンと同様に、2つの混合ワクチンは、曝露前に陽性抗PRRS抗体応答を誘導するようである。これは、ワクチンがPRRSウイルス感染に対する防御を提供することの指標である。アルブミンを含むワクチンにおいて血清学が改善されたことも認められ得る。図3に、ウイルス血症データを示す。これらの結果は図2の結果と一致する。ウイルス血症レベルが、各時点で対照動物（4群）のレベルよりも低いので、3種全てのワクチンがPRRSウイルス感染に対する防御を提供すると思われる。さらに、アルブミンを含む混合ワクチンは、アルブミンを含まない混合ワクチンよりも曝露に対する優れた保護を提供する。

【図 1】

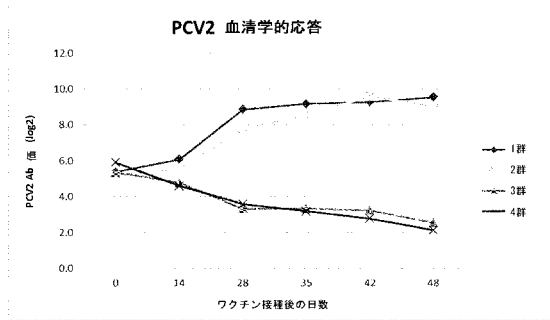


FIGURE 1

【図 2】

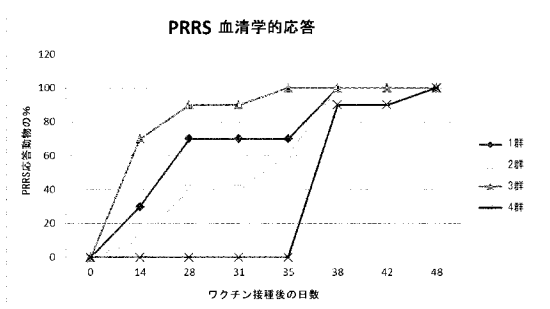


FIGURE 2

【図 3】

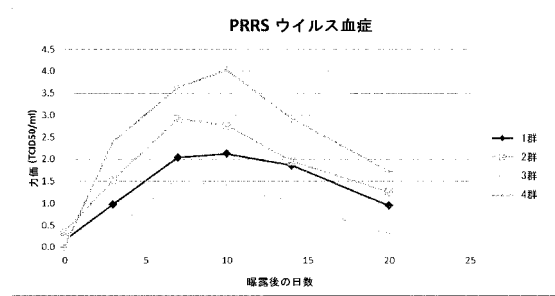


FIGURE 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/056801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 A61K39/02 A61P31/04 A61P31/14 A61P31/20
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/266601 A1 (GALVIN JEFFREY E [US] ET AL) 10 October 2013 (2013-10-10)	1,4-9, 11,12, 14,15
Y	paragraphs [0008], [0009], [0053], [0069], [0086] - [0088], [0103] - [0115], [0118], [0120]	2,3,10, 13
X	WO 2015/124594 A1 (INTERVET INT BV [NL]; INTERVET INC [US]) 27 August 2015 (2015-08-27) page 7, last paragraph - page 8, paragraph 1 page 10, paragraph 1 ----- -/--	1,7,14, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 June 2017

Date of mailing of the international search report

12/06/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, Veerle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/056801

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/322267 A1 (HAIWICK GREGORY [US] ET AL) 30 October 2014 (2014-10-30) abstract paragraphs [0048], [0078], [0108], [0109] - [0111], [0175] -----	1,4-7,9, 14,15
Y	MORIOKA K ET AL: "Effect of the serum albumin on replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a cell culture", ACTA VIROLOGICA, vol. 51, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 289-290, XP008181578, ACADEMIA PRAGUE, PRAGUE, CS ISSN: 0001-723X the whole document -----	2,3,13
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 2013 (2013-03), HIMMLER CORNELIA ET AL: "Comparison of reproductive parameters in sows vaccinated intradermally or intramuscularly with a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine, in consideration of parity and season", XP002761605, Database accession no. PREV201300457784 abstract & HIMMLER CORNELIA ET AL: "Comparison of reproductive parameters in sows vaccinated intradermally or intramuscularly with a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine, in consideration of parity and season", TIERAERZTLICHE UMSCHAU, vol. 68, no. 3, March 2013 (2013-03), pages 61-65, ISSN: 0049-3864 -----	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/056801

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013266601 A1	10-10-2013	AR 090611 A1	26-11-2014
		AU 2013243535 A1	09-10-2014
		CA 2869603 A1	10-10-2013
		CL 2014002674 A1	12-12-2014
		CN 104271154 A	07-01-2015
		CO 7160026 A2	15-01-2015
		CR 20140436 A	12-11-2014
		EP 2833908 A1	11-02-2015
		GT 201400210 A	02-06-2015
		HK 1207284 A1	29-01-2016
		HR P20140957 A2	27-02-2015
		JP 2015512448 A	27-04-2015
		KR 20150003257 A	08-01-2015
		MX 336504 B	21-01-2016
		PH 12014502250 A1	15-12-2014
		RU 2014140107 A	27-05-2016
		TW 201345550 A	16-11-2013
		US 2013266601 A1	10-10-2013
		US 2015284677 A1	08-10-2015
		WO 2013152081 A1	10-10-2013
WO 2015124594 A1	27-08-2015	CN 106061503 A	26-10-2016
		EP 3107572 A1	28-12-2016
		JP 2017506643 A	09-03-2017
		TW 201613556 A	16-04-2016
		US 2017014513 A1	19-01-2017
		WO 2015124594 A1	27-08-2015
US 2014322267 A1	30-10-2014	CN 105246505 A	13-01-2016
		EP 2991676 A1	09-03-2016
		US 2014322267 A1	30-10-2014
		US 2016206727 A1	21-07-2016
		WO 2014179200 A1	06-11-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12 1 7 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74)代理人 100137213
 弁理士 安藤 健司
 (74)代理人 100143823
 弁理士 市川 英彦
 (74)代理人 100151448
 弁理士 青木 孝博
 (74)代理人 100183519
 弁理士 櫻田 芳恵
 (74)代理人 100196483
 弁理士 川崎 洋祐
 (74)代理人 100203035
 弁理士 五味渕 琢也
 (74)代理人 100185959
 弁理士 今藤 敏和
 (74)代理人 100160749
 弁理士 飯野 陽一
 (74)代理人 100160255
 弁理士 市川 祐輔
 (74)代理人 100202267
 弁理士 森山 正浩
 (74)代理人 100146318
 弁理士 岩瀬 吉和
 (74)代理人 100127812
 弁理士 城山 康文
 (72)発明者 スノ, メラニエ
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5
 (72)発明者 ヘルダー・ヴァン, ピーター
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5
 (72)発明者 ファヒンガー, ヴィッキー
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5
 (72)発明者 タン, チェン・シュー・ホイ
 オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5
 Fターム(参考) 4C085 AA04 AA38 BA51 BA57 EE06 FF13 GG04