

(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2014-515367  
(P2014-515367A)

(43) 公表日 平成26年6月30日(2014.6.30)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 39/12</b> (2006.01)	A 61 K 39/12	4 C 076
<b>A61K 47/34</b> (2006.01)	A 61 K 47/34	4 C 085
<b>A61K 39/39</b> (2006.01)	A 61 K 39/39	
<b>A61K 47/10</b> (2006.01)	A 61 K 47/10	
<b>A61K 47/26</b> (2006.01)	A 61 K 47/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-511908 (P2014-511908)	(71) 出願人	305060279 グラクソsmithkline バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベーー1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89
(86) (22) 出願日	平成24年5月25日 (2012.5.25)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月21日 (2014.1.21)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/059879	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開番号	W02012/160199	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成24年11月29日 (2012.11.29)	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(31) 優先権主張番号	61/490, 205		
(32) 優先日	平成23年5月26日 (2011.5.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/570, 966		
(32) 優先日	平成23年12月15日 (2011.12.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】不活性化デング熱ウイルスワクチン

## (57) 【要約】

本発明は、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の製剤、及びそれらを製造する方法を提供する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルス；  
緩衝剤；及び  
ポロキサマー界面活性剤

を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項 2】**

さらにアジュバントを含む、請求項 1 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 3】**

アジュバントがアルミニウム塩を含む、請求項 2 に記載の免疫原組成物。 10

**【請求項 4】**

アジュバントが水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムの少なくとも一つを含む、請求項 3 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 5】**

少なくとも一つの追加の免疫刺激成分をさらに含む、請求項 3 又は 4 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 6】**

少なくとも一つの追加の免疫刺激成分が、油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの一以上を含む、請求項 5 に記載の免疫原組成物。 20

**【請求項 7】**

アジュバントがアルミニウムを含まないアジュバントである、請求項 2 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 8】**

アルミニウムを含まないアジュバントが、油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドからなる群より選択される一以上の免疫刺激成分を含む、請求項 7 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 9】**

アルミニウム塩に吸着された少なくとも一つの不活性化デング熱ウイルス；  
緩衝剤；及び  
界面活性剤

を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項 10】**

少なくとも一つの追加の免疫刺激成分をさらに含む、請求項 9 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 11】**

免疫刺激成分が、油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの一以上を含む、請求項 10 に記載の免疫原組成物。

**【請求項 12】**

—以上の免疫刺激成分が、3-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)含む、請求項 6、8、及び 11 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。 40

**【請求項 13】**

—以上の免疫刺激成分が、QS21を含む、請求項 5、6、7、8、10、11、及び 12 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。

**【請求項 14】**

免疫刺激成分が、少なくとも一つの非メチル化CpGを含むDNAオリゴヌクレオチドを含む、請求項 6、8、10、11、12、及び 13 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。

**【請求項 15】**

免疫刺激成分がリポソームを含む、請求項 6、8、10、11、12、13、及び 14 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。

**【請求項 16】**

10

20

30

40

50

界面活性剤が筋肉内、皮下、経皮、又は皮内投与に適している、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。

【請求項 17】

界面活性剤が、ポロキサマー、ヒドロキシステアリン酸マクロゴール15、ポリソルベート、オクトキシノール、ポリドカノール、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシルヒマシ油、N-オクチル-グルコシド、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 18】

界面活性剤がポロキサマーである、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。 10

【請求項 19】

ポロキサマー界面活性剤が、少なくとも4500kDの分子量を有する、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 20】

ポロキサマー界面活性剤が、15000kD以下の分子量を有する、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 21】

界面活性剤が、少なくとも0.001% (w/v) の量で存在する、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。 20

【請求項 22】

界面活性剤が、1.0% (wt/v) 以下の量で存在する、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 23】

免疫原組成物が、複数の精製された不活性化デング熱ウイルスを含む、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 24】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、異なる血清型である、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 25】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、DEN-1、DEN-2、DEN-3、及びDEN-4のそれぞれに対する免疫応答を惹起する複数のウイルスを含む、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。 30

【請求項 26】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、弱毒化デング熱ウイルスである、請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 27】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、組み換えデング熱ウイルスである、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。 40

【請求項 28】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、第一のデング熱ウイルス核酸及び第二のフラビウイルス核酸を含むキメラウイルスである、請求項 1～27 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 29】

第二のフラビウイルスが：第二のデング核酸、黄熱ウイルス、及び日本脳炎ウイルスから選択される、請求項 28 に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

精製された不活性化デング熱キメラウイルスが、デングM及びデングEタンパク質のいずれか又は両方をコードする核酸を含む、請求項28又は29に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項31】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、野生型デング熱ウイルスである、請求項1～25のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項32】

一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、ヒトの一回用量あたり、それぞれ少なくとも0.1μ及び100μg以下の量で存在する、請求項1～31のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

10

【請求項33】

一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、ヒトの用量あたり、それぞれ少なくとも0.25μg及び10μg以下の量で存在する、請求項1～32のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項34】

緩衝剤が、リン酸ナトリウム及びリン酸カリウムのいずれか又は両方を含む、請求項1～33のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

20

【請求項35】

緩衝剤が、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む、請求項1～34のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項36】

緩衝剤が、液体組成物のpHを、pH6.4以上に保つ、請求項1～35のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項37】

緩衝剤が、液体組成物のpHを、pH6.8以上に保つ、請求項1～36のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項38】

緩衝剤が、液体組成物を、pH7.0以上に保つ、請求項1～37のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

30

【請求項39】

ガラス形成糖及びガラス形成ポリオールの少なくとも一つをさらに含む、請求項1～38のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項40】

ガラス形成糖又はポリオールが：スクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1～39のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

40

【請求項41】

ガラス形成糖又はポリオールがスクロースを含む、請求項1～40のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項42】

組成物が凍結乾燥された固体である、請求項1～41のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項43】

組成物が液体である、請求項1～42のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

50

**【請求項 4 4】**

組成物が等張の溶液である、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項 4 5】**

免疫原組成物が、ヒト被験者への投与のために製剤化される、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項 4 6】**

免疫原組成物が、少なくとも 0.05ml 及び 2ml 以下のヒト一回用量で製剤化される、請求項 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

10

**【請求項 4 7】**

免疫原組成物が 0.5ml ~ 1.5ml のヒト一回用量で製剤化される、請求項 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原組成物。

**【請求項 4 8】**

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、化学的不活性化剤、物理的不活性化剤、及び照射による不活性化剤の少なくとも一つによって不活性化される、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項 4 9】**

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、ホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン (BPL)、過酸化水素、紫外線照射、及びガンマ線照射の少なくとも一つへの曝露によって不活性化される、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

20

**【請求項 5 0】**

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルス；及び  
ポロキサマー界面活性剤  
を含む、不活性化デング熱ウイルスの凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 1】**

アルミニウム塩をさらに含む、請求項 5 0 に記載の凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 2】**

水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムの少なくとも一つを含む、請求項 5 1 に記載の凍結乾燥調製物。

30

**【請求項 5 3】**

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスがアルミニウム塩に吸着される、請求項 5 1 又は 5 2 に記載の凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 4】**

界面活性剤が、ポロキサマー、ヒドロキシステアリン酸マクロゴール 15、ポリソルベート、オクトキシノール、ポリドカノール、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシルヒマシ油、N-オクチル-グルコシド、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 5 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

40

**【請求項 5 5】**

界面活性剤がポロキサマー (polyoxamer) である、請求項 5 0 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 6】**

ポロキサマー界面活性剤が少なくとも 4500kD の分子量を有する、請求項 5 5 に記載の凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 7】**

ポロキサマー界面活性剤が 15000kD 以下の分子量を有する、請求項 5 5 に記載の凍結乾燥調製物。

**【請求項 5 8】**

界面活性剤が、少なくとも 0.001% (w/v) の量で存在する、請求項 5 0 ~ 5 7 のいずれ

50

か 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 5 9】

界面活性剤が、1.0% (wt/v) 以下の量で存在する、請求項 5 0 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 0】

免疫原組成物が、複数の精製された不活性化デング熱ウイルスを含む、請求項 5 0 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 1】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、異なる血清型である、請求項 6 0 に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 2】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、DEN-1、DEN-2、DEN-3、及びDEN-4のそれぞれに対する免疫応答を惹起する複数のウイルスを含む、請求項 6 0 又は 6 1 に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 3】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、ヒトの一回用量あたり、少なくとも0.1 μg 及び100 μg以下の量で存在する、請求項 5 0 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 4】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、ヒトの一回用量あたり、少なくとも0.25 μg 及び10 μg以下の量で存在する、請求項 5 0 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 5】

緩衝剤として作用する少なくとも一つの成分をさらに含む、請求項 5 0 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 6】

ガラス形成糖及びガラス形成ポリオールの少なくとも一つをさらに含む、請求項 5 0 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 7】

ガラス形成糖又はポリオールが：スクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 6 6 に記載の凍結乾燥調製物。

【請求項 6 8】

緩衝剤及び界面活性剤を含む溶液を準備するステップ；及び  
該溶液を一以上の精製された不活性化デング熱ウイルス混合するステップ  
を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物の製剤化法。

【請求項 6 9】

溶液と混合する前に、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスをアルミニウム塩に吸着させるステップを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

アルミニウム塩が、水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムの少なくとも一つを含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスのそれぞれをアルミニウム塩に吸着させて事前吸着モノバルクを製造するステップ、及び複数の事前吸着モノバルクを溶液と混合するステップを含む、請求項 6 8 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

溶液が、非経口投与に適している、請求項 6 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 3】

溶液が等張である、請求項 6 8 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7 4】

溶液が、ガラス形成糖；ガラス形成ポリオール；及び塩の一以上をさらに含む、請求項 6 8 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7 5】

溶液を準備するステップが、エンドトキシンを含まない水に：

ガラス形成糖又はポリオール；

緩衝剤；

塩；及び

界面活性剤

10

を添加するステップを含む、請求項 6 8 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7 6】

各成分が順番に添加される、請求項 7 5 に記載の方法。

## 【請求項 7 7】

緩衝剤が、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及びトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンから選択される少なくとも一つの成分を含む、請求項 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7 8】

緩衝剤が表 1 から選択される、請求項 6 8 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 7 9】

緩衝剤が、バルク調製物又は免疫原組成物の pH を、pH 6.4 以上に保つ、請求項 6 8 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 0】

緩衝剤が、バルク調製物又は免疫原組成物の pH を、pH 6.8 以上に保つ、請求項 6 8 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 1】

緩衝剤が、バルク調製物又は免疫原組成物の pH を、pH 7.0 以上に保つ、請求項 6 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 2】

界面活性剤が筋肉内、皮下、経皮、又は皮内投与に適している、請求項 6 8 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 8 3】

界面活性剤が、ポロキサマー、ヒドロキシステアリン酸マクロゴール 15、ポリソルベート、オクトキシノール、ポリドカノール、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシルヒマシ油、N-オクチル-グルコシド、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 6 8 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 4】

界面活性剤がポロキサマーである、請求項 6 8 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 5】

ポロキサマー界面活性剤が、少なくとも 4500kD の分子量を有する、請求項 6 8 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 8 6】

ポロキサマー界面活性剤が、15000kD 以下の分子量を有する、請求項 5 0 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 7】

界面活性剤が、バルク調製物又は免疫原組成物中に少なくとも 0.001% (w/v) の量で存在する、請求項 6 8 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8 8】

界面活性剤が、バルク調製物又は免疫原組成物中に 1.0% (wt/v) 以下の量で存在する、

50

請求項 6 8 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 9】

ガラス形成糖又はポリオールが：スクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 7 4 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

ガラス形成糖又はポリオールがスクロースを含む、請求項 7 4 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 9 1】

塩が無機塩を含む、請求項 7 4 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 2】

無機塩が塩化ナトリウムを含む、請求項 7 4 ~ 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 3】

バルク調製物又は免疫原組成物が、複数の精製された不活性化デング熱ウイルスを含む、請求項 6 8 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 4】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、異なる血清型である、請求項 6 8 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 9 5】

複数の精製された不活性化デング熱ウイルスが、DEN-1、DEN-2、DEN-3、及びDEN-4のそれぞれに対する免疫応答を惹起する複数のウイルスを含む、請求項 6 8 ~ 9 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 6】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、弱毒化デング熱ウイルスである、請求項 6 8 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 7】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、組み換えデング熱ウイルスである、請求項 6 8 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 9 8】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、第一のデング熱ウイルス核酸及び第二のフラビウイルス核酸を含むキメラウイルスである、請求項 6 8 ~ 9 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 9】

第二のフラビウイルスが：第二のデング核酸、黄熱ウイルス、及び日本脳炎ウイルスから選択される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

精製された不活性化デング熱キメラウイルスが、デング M 及びデング E タンパク質のいずれか又は両方をコードする核酸を含む、請求項 9 8 又は 9 9 に記載の方法。 40

【請求項 1 0 1】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが野生型デング熱ウイルスである、請求項 6 8 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、それぞれ少なくとも 0.1  $\mu$  及び 100  $\mu$  g 以下の量で存在する、請求項 6 8 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが、それぞれ少なくとも 0.25  $\mu$  g 及び 10  $\mu$  g 以下の量で存在する、請求項 6 8 ~ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

**【請求項 104】**

精製された不活性化デング熱ウイルスが、化学的不活性化剤、物理的不活性化剤、及び照射による不活性化剤の少なくとも一つによって不活性化される、請求項 68～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 105】**

精製された不活性化デング熱ウイルスが、ホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン (BPL)、過酸化水素、紫外線照射、及びガンマ線照射の少なくとも一つへの曝露によって不活性化される、請求項 68～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 106】**

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスを含む溶液を凍結乾燥して凍結乾燥組成物を製造するステップをさらに含む、請求項 68～105 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

**【請求項 107】**

凍結乾燥組成物を、薬学的に許容可能な溶液に再懸濁するステップをさらに含む、請求項 106 に記載の方法。

**【請求項 108】**

薬学的に許容可能な溶液が注射用水である、請求項 107 に記載の方法。

**【請求項 109】**

薬学的に許容可能な溶液が少なくとも一つのアジュバントを含む、請求項 107 に記載の方法。 20

**【請求項 110】**

アジュバントが、アルミニウム塩、油と水のエマルション、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの一以上を含む、請求項 109 に記載の方法。

**【請求項 111】**

リポ多糖が、3-脱アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) 含む、請求項 110 に記載の方法。

**【請求項 112】**

サポニンがQS21を含む、請求項 110 又は 111 に記載の方法。

**【請求項 113】**

オリゴヌクレオチドが、少なくとも一つの非メチル化CpGを含むDNAオリゴヌクレオチドである、請求項 110～112 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

**【請求項 114】**

アジュバントがリポソームを含む、請求項 110～113 のいずれか 1 項に記載の方法。 。

**【請求項 115】**

免疫原組成物が、ヒト被験者への投与に適している、請求項 68～113 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 116】**

免疫原組成物が少なくとも0.05ml及び2ml以下のヒト一回用量で製剤化される、請求項 68～115 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

**【請求項 117】**

免疫原組成物が少なくとも0.5ml～1.5mlのヒト一回用量で製剤化される、請求項 68～116 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 118】**

請求項 68～117 のいずれか 1 項に記載の方法に従って不活性化デング熱ウイルスを製剤化するステップを含む、精製された不活性化デング熱ウイルスの非特異的吸着及び/又は凝集の少なくとも一つを減少させる方法。

**【請求項 119】**

請求項 68～118 のいずれか 1 項に記載の方法に従って不活性化デング熱ウイルスを製剤化するステップを含む、抗原的に保存された不活性化デング熱ウイルスの回収率を高 50

める方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の開示内容は、デング熱ウイルスに対する免疫応答を惹起する組成物の製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

デング熱は、蚊によって伝染されるヒトの急性ウイルス病である。デング熱は、推定で100,000,000の症例が毎年生じる、熱帯及び亜熱帯における世界的な風土病である。比較的まれではあるが、デング出血熱（DHF）及びデングショック症候群（DSS）は、子供の重要な死因である。現在、デング熱から保護するワクチンは存在せず、媒介生物である蚊を制御することによって病気を防ぐ試みは、ほとんど効果がないことが証明されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

従って、デング熱ウイルスに起因する病気から保護する安全で効果的なワクチンに対する需要が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、デング熱ウイルスに対する免疫応答を惹起する組成物の製剤に関する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】図1は、ポロキサマー界面活性剤：-ヒドロ- -ヒドロキシポリ（オキシエチレン）ポリ（オキシプロピレン）ポリ（オキシエチレン）トリブロックコポリマーの一般式の模式図である。

【図2A】図2Aは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の代表的な精製及び不活性化工程を示すフローチャートである。

【図2B】図2Bは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の代表的な精製及び不活性化工程を示すフローチャートである。

【図2C】図2Cは、代替的な精製及び不活性化工程を示すフローチャートである。

【図2D】図2Dは、代替的な精製及び不活性化工程を示すフローチャートである。

【図3A】図3Aは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の、代表的な製剤化工程を示すフローチャートである。

【図3B】図3Bは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の、代表的な製剤化工程を示すフローチャートである。

【図4A】図4Aは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の製剤化後の産物の特徴の代表的な結果を示す表である。

【図4B】図4Bは、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の製剤化後の産物の特徴の代表的な結果を示す表である。

【図5A】図5Aは、凍結乾燥及び再構成後の産物の特徴の代表的な結果を示す表である。

【図5B】図5Bは、凍結乾燥及び再構成後の産物の特徴の代表的な結果を示す表である。

【図5C】図5Cは、凍結乾燥及び再構成後の産物の特徴の代表的な結果を示す表である。

【図6A】図6Aは、安定特性の画像表示である（内部蛍光 280/320）。

【図6B】図6Bは、安定特性の画像表示である（ELISA）。

【発明を実施するための形態】

【0006】

10

20

30

40

50

本開示は、免疫原組成物の製剤に関する。特に、本開示は、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルス株を含む、バルクワクチン調製物及び免疫原組成物等の組成物の製剤に関する。本明細書で開示される製剤は、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の回収率及び安定性を増加させ、その生産、保管、及び流通を容易にする。

【0007】

本開示の第一の側面は、緩衝剤及び界面活性剤と共に一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスを含む組成物に関する。好適には、かかる組成物は、免疫原組成物（例えば、デング熱ウイルスの感染及び／又はデング熱ウイルスに起因する病気を防ぐためのワクチン）への製剤化に好適な不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物である。選択された界面活性剤の添加は、例えば界面活性剤を含まない製剤と比べて、抗原性を維持した不活性化デング熱ウイルスの回収率を高める。界面活性剤を含む精製された不活性化デング熱ウイルスの製剤は、例えば凍結乾燥、保管、及び再構成の間、不活性化ウイルスの非特異的な吸着及び／又は凝集を減少させるという好適な特徴を有する。

【0008】

本明細書で開示される組成物は、デング熱ウイルスの一以上の血清型を含み得る。通常、組成物は一以上の血清型、すなわちデング熱血清型1、デング熱血清型2、デング熱血清型3及び／又はデング熱血清型4（それぞれ、DEN-1、DEN-2、DEN-3及び／又はDEN-4）に由来する複数のデング熱ウイルスを含む。例えば、組成物は、異なるデング熱ウイルスの血清型に由来する二、三又は四の異なるウイルスを含み得る。特定の実施形態では、組成物は、それぞれ異なる血清型の（又はデング熱ウイルスの異なる血清型のそれぞれに対して特異的な免疫応答を惹起することができる）四つの異なる精製された不活性化デング熱ウイルスを含む。従って、組成物は、好適には、DEN-1、DEN-2、DEN-3及びDEN-4の全てに対する免疫応答を惹起する四つの異なる精製された不活性化デング熱ウイルスを含む。ウイルスは、野生型のウイルス（すなわち、天然の分離株に由来する病原性ウイルスから増殖させるか又はそれに対応する）から選択され得、又はウイルスは弱毒化ウイルスから選択され得る。選択されるウイルスは、組み換えウイルスであり得る。例えば、組み換えウイルスはキメラウイルス、例えばデング熱ウイルス由来の核酸、及び他のフラビウイルス、例えば異なるデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、又は日本脳炎ウイルス由来の核酸を有するウイルスであり得る。典型的には、キメラウイルスはデングM及びデングEタンパク質の一方又は両方を含む。単一の組成物は、一以上の野生型ウイルス、一以上の弱毒化ウイルス、一以上の組み換えウイルス、及び／又は一以上のキメラウイルスを、任意の組み合わせで含み得る。

【0009】

精製された不活性化デング熱ウイルスは、化学的、物理的及び／若しくは照射による不活性化を単独又は任意の組み合わせで用いて不活性化され得る。精製された不活性化デング熱ウイルスは、ホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン（BPL）、過酸化水素、紫外線照射、及びガンマ線照射への曝露、又はこれら技術の任意の組み合わせによって不活性化され得る。

【0010】

典型的に、免疫原組成物のヒトの一回用量は、ウイルスの各血清型を少なくとも0.1 μg、0.2 μg、少なくとも0.25 μg、少なくとも0.3 μg、少なくとも0.33 μg、少なくとも0.4 μg、少なくとも0.5 μg、少なくとも1.0 μg、若しくは少なくとも2.0 μg、若しくは少なくとも3.0 μg、若しくは少なくとも5.0 μg、若しくは少なくとも10.0 μg、（又は0.1～10.0 μgの任意の量）含む。典型的に、免疫原組成物のヒトの一回用量は、ウイルスの各血清型を100 μg以下、例えば、90 μg以下、若しくは80 μg以下、若しくは75 μg以下、若しくは70 μg以下、若しくは60 μg以下、若しくは50 μg以下、若しくは40 μg以下、若しくは30 μg以下、若しくは20 μg以下、若しくは10 μg以下（又は10～100 μgの任意の量）のウイルスの各血清型を含む。例えば、免疫原組成物のヒトの一回用量は、0.1～10 μg、又は0.25～5 μgを含み得、例えば0.05～2mlの容量、例えば0.5～1.5mlの容量で投与される。

【0011】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、精製された不活性化デング熱ウイルスは、アルミニウム塩（「ミョウバン」）、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、又はヒドロキシリノ酸アルミニウムに吸着される。複数のデング熱ウイルスが含まれる場合には、それぞれが同じアルミニウム塩に吸着されてもよいし、又は異なるウイルスが異なるアルミニウム塩に吸着されてもよい。従って、一つの側面では、本開示は、緩衝剤及び界面活性剤と共に、アルミニウム塩に吸着された（例えば事前吸着された）少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物に関する。

【0012】

本明細書に開示される免疫原組成物（及び最終免疫原組成物に製剤化されるバルク調製物）の文脈において、界面活性剤は被験者、特にヒト被験者への投与に適するように選択される。幾つかの実施形態では、界面活性剤は非経口投与、例えば筋肉内、皮下、経皮、又は皮内投与に適するように選択される。

10

【0013】

本明細書に開示されるデング組成物に好適な代表的な界面活性剤として、ポロキサマー界面活性剤、並びにヒト被験者への投与に好適な他の界面活性剤が挙げられる。従って、（ポロキサマー界面活性剤に加えて）好適な界面活性剤は：ポリソルベート界面活性剤、オクトキシノール界面活性剤、ポリドカノール界面活性剤、ステアリン酸ポリオキシル界面活性剤、ポリオキシルヒマシ油界面活性剤、N-オクチル-グルコシド界面活性剤、15-ヒドロキシステアリン酸マクロゴール、及びそれらの組み合わせからなる群より選択され得る。幾つかの実施形態では、精製された不活性化デング熱ウイルスがアルミニウム塩に吸着されていない製剤にとって、ポロキサマー界面活性剤が特に好適である。

20

【0014】

ポロキサマー界面活性剤は、ポリエチレン-ポリプロピレングリコールの直鎖コポリマーである。商業上、これらはしばしばフルロニック界面活性剤と呼ばれる。幾つかの実施形態では、ポロキサマー界面活性剤は、少なくとも約1000kDの平均分子量、及び約15000kD以下の平均分子量を有するポリエチレン-ポリプロピレングリコールのコポリマーから選択される。特定の一実施形態では、免疫原組成物は、商標フルロニック（Pluronic）<sup>TM</sup> F 68、ルトロール（Lutrol）<sup>TM</sup> F 68、及びコリフォール（Kolliphor）<sup>TM</sup> P188として市販されている、8600kDの平均分子量を有し、1800g/molの分子量のポリオキシプロピレン及び80%のポリオキシエチレン含量を有する、ポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーであるポロキサマー188を用いて製剤化される。

30

【0015】

組成物（バルク調製物及び免疫原組成物）は、一以上の緩衝剤もまた含む。デング熱ウイルスは酸性条件下で免疫原性を失うので、緩衝剤はpHを中性付近または中性より高く保つように選択される。緩衝剤は、典型的に、組成物のpHをpH6.4以上、好適にはpH6.8より高く、及び最も好適にはpH7.0より高く、例えばpH7.4以上に保つように選択される。緩衝剤は、幾つかの追加成分（例えば幾つかのアジュvant）が、緩衝剤の量の調整又は選択を必要とし得ることを考慮に入れて、製剤化される免疫原組成物の他の成分の文脈において、所望のpHを保つように選択される。一実施形態では、緩衝剤はリン酸ナトリウム及びリン酸カリウムの一方又は両方を含む。他の実施形態では、緩衝剤はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（「トリス」）を含む。

40

【0016】

バルク調製物及び免疫原組成物は、例えば浸透圧（張度tonicity）を所望の範囲に調整するか又は保つための追加の成分、例えば一以上の無機塩もまた含み得る。最も一般に、塩は塩化ナトリウム等の無機塩である。かかる塩は、好適には製剤化された組成物を等張又はほぼ等張に保つのに必要な量添加される。正確な量は、製剤の他の成分、特に緩衝剤の選択によって異なるが、当業者であれば過度な実験を伴わずに決定し得る。

【0017】

本明細書で開示されるバルク調製物及び免疫原組成物は、溶液中の及び／又は処理工程、例えば凍結乾燥の間の精製された不活性化デング熱ウイルスの、構造的及び／又は免疫

50

学的安定性を高めるための（若しくは製剤の他の特性、例えば浸透圧を調整するための）一以上の賦形剤もまた含み得る。幾つかの実施形態では、賦形剤はガラス形成性の糖又はポリオールを含む。幾つかの実施形態では、ガラス形成糖又はポリオールは：スクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される。特定の一実施形態では、賦形剤はスクロースを含む。任意に、糖又はポリオールは、アミノ酸、例えばグリシン、アラニン、アルギニン、リシン、及び／又はグルタミンと併せて用いられ得る。

10

## 【0018】

幾つかの実施形態では、組成物は液体製剤、例えば溶液又は懸濁液である。他の実施形態では、組成物は凍結乾燥されて調製され、投与前に再懸濁される。例えば、免疫原組成物は、注射による投与のための等張の液体製剤に製剤化され得る。

## 【0019】

幾つかの実施形態では、免疫原組成物は、ヒト被験者への投与のために製剤化される。ヒト被験者への投与のために、免疫原組成物は少なくとも0.05mlかつ2ml以下の一回用量、例えば0.5～1.5mlの一回用量で製剤化され得る。

## 【0020】

任意に、本明細書で開示される免疫原組成物は、アジュバントを含み得る。幾つかの実施形態、例えば精製された不活性化デング熱ウイルスがミョウバンに吸着される実施形態では、アルミニウム塩がアジュバントとして作用する。他の実施形態では、アジュバントはアルミニウムを含まないアジュバントである。ミョウバンと組み合わせ、例えば吸着させるか否かを問わず、アジュバントは一以上の免疫刺激成分を含み得る。免疫刺激成分は、一以上の：以下でより詳細に記載する油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、並びにオリゴヌクレオチドを含み得る。

20

## 【0021】

本開示の別の側面は、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスを含むバルク抗原調製物及び免疫原組成物の製剤化法に関する。かかる方法は：緩衝剤及び界面活性剤を含む溶液の提供；並びに該溶液と一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスとの混合を含む。幾つかの実施形態では、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスは、溶液との混合の前に（例えば、不活性化デング熱ウイルスの事前吸着バルク調製物を生産するために）アルミニウム塩に吸着される。典型的に、事前吸着モノバルクを生産するために、精製された不活性化デング熱ウイルスの一つの株がアルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、又はヒドロキシリン酸アルミニウム）に吸着される。その後、多価の免疫原組成物を生産するためには、各モノバルクは所望の割合（例えば、重量で、又は相対的な免疫原性に基づいて調整された1:1:1:1）で、緩衝剤及び界面活性剤を含む溶液と共に混合される。

30

## 【0022】

典型的に、精製された不活性化デング熱ウイルスは、（最終製剤において）非経口投与に好適な溶液に添加される。幾つかの実施形態では、溶液は等張溶液である。幾つかの実施形態では、溶液は一以上の賦形剤、例えば塩及び／又はガラス形成糖若しくはポリオールもまた含む。

40

## 【0023】

一実施形態では、注射用水（例えば、エンドトキシンを含まない滅菌水）に、ガラス形成糖又はポリオール、緩衝剤、塩及び（上記）界面活性剤が、例えば順番に添加される。上記の精製された不活性化デング熱ウイルスが調製された溶液に添加される。

## 【0024】

幾つかの実施形態では、その後本発明の方法は、凍結乾燥組成物を生産するための、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む溶液（例えば、バルク調製物）の凍結乾燥を含

50

む。例えば保管及び／又は流通のための免疫原組成物の凍結乾燥を含む実施形態では、凍結乾燥した組成物は、通常投与前に好適な量、例えば0.05～2ml、典型的には0.5～1.5ml、例えば0.5又は1.0又は1.5mlの薬学的に許容可能な溶液、例えば注射用水に再懸濁される。任意に、薬学的に許容可能な溶液は、少なくとも一つの上記免疫刺激成分を含む。

## 【0025】

別の側面では、本開示は、上記不活性化デング熱ウイルスの製剤化による、（一以上の）精製された不活性化デング熱ウイルス、又はそれらを含む組成物の非特異的な吸着及び／又は凝集を減少させるための方法に関する。

## 【0026】

さらに別の側面では、本開示は、上記不活性化デング熱ウイルスの製剤化による、抗原性を維持した（一以上の）不活性化デング熱ウイルス、又はそれらを含む組成物の回収率を高める方法に関する。

10

## 【0027】

用語

他に明記しない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9) ; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) ; 及びRobert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) に見出される。

20

## 【0028】

単数形の用語は、文脈が他に明確に示さない限り、複数の対象を含む。同様に、用語「又は」及び「若しくは」は、文脈が他に明確に示さない限り、「及び」を含むことが意図される。用語「複数」は、二以上を意味する。さらに、核酸又はポリペプチドについての全ての塩基サイズ若しくはアミノ酸サイズ、及び全ての分子量値はおおよその値であり、説明のために記載されていると理解されたい。さらに、物質、例えば抗原の濃度又はレベルに関する数字の限定が、おおよそであることが意図される。従って、濃度が少なくとも（例えば）20μgであると示される場合、濃度は少なくともおおよそ（又は「約」若しくは「～」）20μgであると理解されることが意図される。

30

## 【0029】

本明細書で記載するのと類似又は同等な方法及び物質が本開示を実施し若しくは試験するのに用いられ得るが、好適な方法及び物質が以下に記載される。用語「含む」は「有する」及び「からなる」を含めて意味する。従って、文脈が他に必要としない限り、用語「含む」及び変化形は、記載された化合物又は組成物（例えば、核酸、ポリペプチド、抗原）又は工程、又は化合物若しくは工程の群の包含を意味するが、他のあらゆる化合物、組成物、工程又はそれらの群の排除を意味しないと理解される。「例えば」は、本明細書では非限定例を示すのに用いられる。

40

## 【0030】

本開示の様々な実施形態の検討を容易にするために、以下の用語の説明が提供される。さらなる用語及び説明は、本開示の文脈において提供され得る。

## 【0031】

本明細書において、不活性化デング熱ウイルスの「バルク調製物」は、精製及び不活性化について、被験者への投与が意図される最終抗原性形態のデング熱ウイルスを表すのに用いられる。バルク調製物又はバルク製剤は、例えば凍結乾燥及び再懸濁等による希釈、濃縮によってさらに処理され得、並びに／又は免疫原組成物若しくはワクチンとしての投与のための、複数回投与若しくは一回投与バイアル若しくはシリンジに包装され得る。

## 【0032】

（例えば、病原菌又はデング熱ウイルス等の病原体を含む組成物についての）用語「精

50

製」は、組成物から、その存在が望ましくない成分を除去する工程を意味する。「精製」は相対的な用語であり、望ましくない成分の全ての痕跡が組成物から除去されることを必要としない。ワクチン生産の文脈において、精製は遠心分離、透析、イオン交換クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティー精製又は沈殿のような工程を含む。従って、用語「精製された」は、完全な純度は必要としない；むしろ、相対的な用語として理解される。従って、例えば、精製されたウイルス調製物は、その発生環境中、例えば自然又は人工的な環境で複製される細胞又は細胞集団中よりも、より濃縮された調製物である。実質的に純粋なウイルスの調製物は、所望のウイルス又はウイルス成分が、調製物の総タンパク質含量の少なくとも50%に相当するように精製され得る。幾つかの実施形態では、実質的に純粋なウイルスは、調製物の総タンパク質含量の少なくとも60%又は少なくとも70%、例えば少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、若しくは少なくとも95%以上に相当する。あるいは、ウイルス調製物の精製は、調製物質中の汚染物質、例えば宿主細胞タンパク質の減少によって評価され得る。従って、実質的に純粋なウイルス（例えば、精製された不活性化デング熱ウイルス）の調製物は、典型的に30%未満又は25%未満の残余の宿主細胞タンパク質を含む。例えば、精製された不活性化デング熱ウイルスを含むバルク調製物又は免疫原組成物は、（例えば、重量／重量に基づく測定で）20%未満の、又はさらに15%未満若しくは10%以下の残余の宿主細胞タンパク質を含み得る。

10

## 【0033】

20

デング熱ウイルスワクチンの文脈における用語「不活性化」は、抗原性の成分（例えば、ウイルス）が *in vivo* 又は *in vitro* で複製できないことを意味する。例えば、用語「不活性化」は、例えば、*in vitro* で複製され、その後もはや複製できないように、化学的又は物理的手段により殺されたウイルスを包含する。この用語は、さらなる処理（例えば、分割及び分画等）により生産される抗原、並びに例えば細胞培養における組み換え手段により生産される成分もまた意味し得る。

## 【0034】

30

「アジュバント」は、剤の非存在下における抗原の投与と比べて、抗原特異的免疫応答の生産を高める剤である。一般的なアジュバントとして、抗原が吸着される無機物（又は無機塩、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ヒドロキシリン酸アルミニウム）の懸濁液を含む、アルミニウムを含むアジュバントが挙げられる。他のアジュバントとして、高められた抗原特異的免疫応答の生産に寄与する一以上の免疫刺激成分が挙げられる。免疫刺激成分として、油と水のエマルション、例えば油中水及び水中油（並びにそれらの変種、例えばダブルエマルションおよびリバーシブルエマルション）、リポ糖（*liposaccharides*）、リポ多糖、免疫刺激核酸（例えばCpGオリゴヌクレオチド）、リポソーム、Toll様受容体アゴニスト（特に、TLR2、TLR4、TLR7/8、及びTLR9アゴニスト）、並びにこれらの成分の様々な組合わせが挙げられる。アジュバントは、免疫刺激成分の組み合わせを含み得る。

## 【0035】

40

「免疫原組成物」は、例えば、デング熱ウイルス等の病原菌に対する特異的な免疫応答を惹起することができる、（例えば、実験的設定において）ヒト又は動物の被験者への投与に好適な物質の組成物である。従って、免疫原組成物は一以上の抗原（例えば、精製されたウイルスの全て又はその抗原性サブユニット、例えばポリペプチド）又は抗原性エピトープを含む。免疫原組成物は、免疫応答を惹起又は亢進することができる一以上の追加の成分、例えば賦形剤、担体、及び／又はアジュバントもまた含み得る。幾つかの場合では、免疫原組成物は、病原菌によって誘導される症状又は状態から被験者を保護する免疫応答を惹起するために投与される。幾つかの場合では、病原菌によって引き起こされる症状又は疾患は、被験者の病原菌（例えば、デング熱ウイルス）への暴露の後の病原菌の複製を阻害することで防がれる（か又は治療される、例えば減少若しくは改善される）。本開示の文脈において、用語「免疫原組成物」は、デング熱に対する保護的若しくは緩和的免疫応答を惹起する目的で、被験者又は被験者集団に投与することが意図される組成物（

50

すなわちワクチン組成物又はワクチン)を包含すると理解される。

【0036】

「免疫応答」は、免疫系の細胞、例えばB細胞、T細胞、又は単球の刺激に対する応答である。免疫応答は、特異的抗体、例えば抗原特異的中和抗体の生産を引き起こすB細胞応答であり得る。免疫応答はT細胞応答、例えばCD4+応答又はCD8+応答でもあり得る。幾つかの場合では、応答は特定の抗原に対して特異的(すなわち、「抗原特異的応答」)である。抗原が病原菌に由来する場合は、抗原特異的応答は、「病原菌特異的応答」である。「保護的免疫応答」は、病原菌の有害な機能または活性を阻害し、病原菌による感染を減少させ、又は病原菌の感染に起因する(死亡を含む)症状を減少させる免疫応答である。保護的免疫応答は、例えば、plaque減少アッセイ若しくはELISA中和アッセイにおけるウイルスの複製若しくはplaque形成の阻害によって、又はin vivoでの病原菌感染に対する抵抗性を測定することによって、測定され得る。

10

【0037】

「被験者」は、生きた多細胞脊椎生物である。本開示の文脈において、被験者は実験の被験者、例えば非ヒト動物、例えばマウス、コットンラット、又は非ヒト靈長類であり得る。あるいは、被験者はヒト被験者であり得る。

【0038】

「緩衝剤」は、酸又はアルカリが添加される際に、pHを保ち、若しくはpHの変化に対する溶液の能力を単独若しくは組み合わせにより増加させる化合物又は組成物である。用語「緩衝剤」は、多様な化合物及び組成物、典型的には、それぞれ溶液中に塩基又は酸の複合体と共に存在する場合に、pHを所望の値又は所望の範囲に保つのに用いられ得る弱酸又は弱塩基を包含する。

20

【0039】

「界面活性剤」は、親水性の頭部及び疎水性の尾部によって特徴づけられる両親媒性の分子である。液体の表面に吸着された際に、界面活性剤は液体の表面張力、二つの液体の界面張力、又は液体と固体の間の張力を低下させるように作用する。界面活性剤は、洗剤、湿潤剤、乳化剤、発泡剤、及び/又は分散剤として作用し得る。

【0040】

本明細書で開示される組成物は、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルス抗原を含む。様々な側面において、組成物は、製造された不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物、例えば選択されたスケールの液体製剤、(例えば凍結乾燥された) 固形調製物、又は被験者(典型的にヒト被験者)への投与のために製剤化された免疫原組成物である。例えば、(液体であろうと固体であろうと)バルク調製物及び/又は免疫原組成物は、デング熱ウイルスの単一の株を含み得(すなわち一価の組成物、例えば一価のバルク調製物又は一価の免疫原組成物)、或いはそれらはデング熱ウイルスの一より多い株を含み得る(すなわち多価の組成物、例えば多価のバルク調製物又は多価の免疫原組成物)。典型的には、多価の組成物は異なる血清型から選択される株を含む。疾患を引き起こし得るデング熱ウイルスには4つの血清型、すなわち、1型デング熱(DEN-1)、2型デング熱(DEN-2)、3型デング熱(DEN-3)、及び4型デング熱(DEN-4)が存在するので、並びに交差反応性の非中和抗体はデング熱疾患のより重篤な型への素因となるので、四つの血清型の全てに由来する疾患に対する保護を保証するために、各血清型の代表的なものがバルク調製物及び最終ワクチンへ包含するのに選択され得る。従って、一実施形態では、免疫原組成物は、デング熱ウイルスの四つの血清型のそれから選択される株を含む四価の組成物である。

30

【0041】

抗原として使用されるウイルスは、基本的にデング熱ウイルスの任意の株から選択され得る。例えば、ウイルス株は、血清型についての既定の(例えば、コンセンサス)配列、例えばDEN-1コンセンサス配列、DEN-2コンセンサス配列、DEN-3コンセンサス配列、又はDEN-4コンセンサス配列との適合性に基づいて選ばれる各血清型から選択され得る。かかるウイルスは、天然又は人工であり得る。例えば、ウイルス株はワクチンを投与することが

40

50

意図される地域又は集団において流行している株（例えば、天然又は「野生型」株）と相関するように選択され得る。任意に、入手可能性又は先行経験の便宜の点で、各血清型について株を選択し得る。例えば、代表的な株は米国特許第6,254,873号に記載されており、その内容を参照により明細書に組み込む。さらなる好適な株は、例えば米国特許第7,226,602号に開示されており、その内容を参照により明細書に組み込む。さらなる株は、例えば、VBRCウイルスゲノムデータベース（[http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated\\_genes](http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated_genes)）及びデング熱ウイルスデータベース（<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/ProjectInfo.html>）に見出される。

#### 【0042】

精製された不活性化デング熱ウイルスワクチンの文脈では、病原性又は弱毒化株のいずれかが用いられ得る。典型的に、病原性株は宿主細胞で高力価まで増殖し、商業規模での生産が容易である。しかしながら、病原性株は、製造に関わる職員の感染を防ぐために、取扱いに特別な注意を必要とする。例えば培養細胞での生産への順応及び減少した病原性、及び／又はデング熱の媒介生物である蚊における減少した複製の選択により開発された弱毒化ウイルスは、取扱いにあまり用心を必要としないが、生産するのは難しい場合がある。不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物の文脈における使用に好適な、代表的な弱毒化株は、WO 2000/057907及び米国特許第6,638,514号、及びWO 2000/058444及び米国特許第6,613,556号、WO 2002/066621（米国特許出願公開第2004052818号）、WO 2000/057904（米国特許第6,528,065号）、WO 2000/057908、WO 2000/057909（米国特許第6,511,667号）；WO 2000/057910（米国特許第6,537,557号）、WO 2002/095075（例えば、米国特許第7,226,602号）、及びWO 2002/102828（米国特許第7,569,383号）に記載されており、その内容を参照により本明細書に組み込む。

10

20

30

40

#### 【0043】

本明細書に開示される製剤の文脈において、キメラ「デング熱」ウイルスもまた好適である。かかるキメラウイルスは、典型的に、例えば異なるデング熱ウイルス又は異なるフラビウイルス、例えば黄熱病ウイルス若しくは日本脳炎ウイルスの核酸骨格を用いて、デング熱ウイルスエンベロープタンパク質を発現する。キメラデング熱ウイルスの例は、例えば、WO 98/37911（米国特許第6,696,281号；第6,962,708号）、WO 96/40933及びWO 2001060847（米国特許第7,094,411号；第7,641,909号；第8,025,887号）、並びにEP1159968に見出される。かかるキメラデング熱ウイルスを生産する方法は、WO 03/101397にも見出される。これらの公開された出願及び特許の開示内容を、本明細書に開示される製剤及び方法の文脈における使用に好適な代表的なキメラデング熱ウイルスを提供する目的で、参照により本明細書に組み込む。

#### 【0044】

従って、選択される株は典型的に、ヒトにおける使用が意図される物質の生産に好適な細胞（例えば、病原菌を含まないことが保証された細胞）における複製が可能な多数の株から選択される。例えば、株は最も高い力価、例えば選択された細胞株において少なくとも約 $5 \times 10^6$ pfu/mlから、好適には少なくとも $1 \times 10^7$ pfu/ml以上の力価まで増殖するウイルスを同定し、（ii）選択された細胞株において最も高い力価まで増殖するデング熱ウイルス株を選択し、及び（iii）選択された細胞株における一～数回の追加の継代によって、増殖亢進のために選択された株をさらに順応させることで選抜され得る。（例えば、デング熱ウイルスの四つの血清型から選ばれる）選択されたウイルスは、高力価のマスター及び製品シードロットを製造するために、さらなる細胞継代培養によって、又は遺伝子操作によって高力価まで増殖するためにさらに順応され得る。

#### 【0045】

デング熱ウイルスを生産する方法は、本技術分野において公知であり、例えば、公開されたPCT出願WO2010/094663、米国特許出願公開第2011318407号に、当業者に教示するのに十分詳細に記載されている。無血清条件でウイルスを生産する方法は、例えば米国特許出願公開第20060183224号にも見出される。これらの公開された特許出願の開示内容を、本明細書に開示されるバルク調製物及び免疫原組成物中に包含するためのデング熱ウイルス

50

の増殖及び精製についてのさらなる詳細を提供するために、参照により本明細書に組み込む。同様に、デング熱ウイルスを不活性化し、精製された不活性化デング熱ウイルスを生産する方法は本技術分野において公知であり、化学的剤、物理的、及び／又は照射への暴露を含む。好適な方法として、例えば、ホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン (BPL)、過酸化水素、紫外線照射及びガンマ線照射、又はそれらの組み合わせが挙げられる。かかる方法の詳細は、例えば、公開されたPCT出願WO2010/094663 (米国特許出願公開第2011318407号)、及び米国特許出願公開第20070031451号に見出され、代表的なデング熱ウイルスの不活性化方法を例示する目的で、それらを参照により本明細書に組み込む。

#### 【0046】

代表的なデング熱ウイルスの精製手順を、図2A～Dのフローチャートに示す。商業的な使用のために好適な量のデング熱ウイルスを生産するために、感受性細胞株を好適な培地におけるin vitroの培養において増殖させる。典型的に、細胞は哺乳類細胞、例えば腎臓又は肺上皮細胞である。幾つかの好適な細胞株、例えばVero細胞等のアフリカミドリザル腎臓細胞、MRC-5細胞、MDCK細胞、及びFRhL-2細胞が存在する。あるいは、昆虫細胞、特に蚊細胞、例えばヒトスジシマカ (Aedes albopictus) のC6/36株が用いられ得る。細胞は血清を含むか又は動物質を含まないか (AF培地) のいずれかにおいて培養され得る。任意に、培地は最初に又は定期的に添加物、例えばグルコース、アミノ酸、合成増殖因子又は他のタンパク質を補充される。細胞は、容器サイズを増加させる順序で (例えば、175cm<sup>2</sup> フラスコ ; CF<sub>2</sub> (1200cm<sup>2</sup>) ; CF<sub>10</sub> (6000cm<sup>2</sup>) ; CF<sub>40</sub> (50Lバイオリアクター) ; 200Lバイオリアクター)、典型的に増殖される。より大きな容器サイズでは、細胞の付着のために懸濁液においてマイクロキャリアを用いるのが一般的である。任意に、培地が灌流によって供給されるか、又は培養物が定期的に供給され得る。幾つかの実施形態では、細胞は商業規模のバイオリアクターにおいて培養され得るVero細胞である。

10

20

30

40

#### 【0047】

細胞は、所望の密度まで増殖させ、ウイルス (例えば、DEN-1、DEN-2、DEN-3及び／又はDEN-4の抗原決定基を提供するように選択される株) に感染させる。細胞は、選択される株に好適なMOI (例えば、0.01～0.1MOI、例えば0.05MOI) で感染させる。血清を含む培地を前培養及び／又は感染のために使用する場合は、培地は回収及び精製段階の間の外来性タンパク質含量を減らすためにAF培地に交換され得る。例えば、1～4日間、例えば約2日間の最初の感染段階の後、培地をAF培地に交換し得る。任意に、AF培地は、最初に又は定期的にグルコース又はアミノ酸等を補充される。ウイルスの増殖に好適な期間、例えば最短で6～8日の後、ウイルスは細胞から回収される。任意に、ウイルスは感染後約6日からはじめて、間隔をあけて (例えば2日間隔で) 追加的に回収され得る。回収は、好適には数日の間、例えば10日まで、例えば12日まで、又は14日以上まで続き得る。

#### 【0048】

ウイルスを含む培地は、典型的に、一連の次第に減少する孔サイズ (例えば、8μ、0.6μ、0.45μ、0.2μ) を通過させることによって浄化される。好適な市販のフィルター及び濾過装置は、本技術分野において公知であり、当業者により選択され得る。代表的な濾過装置として、例えばミリポア (Millipore) <sup>TM</sup>、ミリスタック (Millistak) <sup>TM</sup> D0HC、及びザルトプラン (Sartobran) <sup>TM</sup> P濾過装置が挙げられる。任意に、浄化されたウイルス回収物は、必要に応じて-70 で凍結保管され得る。

#### 【0049】

その後、ウイルス懸濁液は (例えば20～50倍以上、例えば30倍又は40倍に) 濃縮され、培地は、例えば限外濾過及び透析濾過により好適な緩衝液 (例えば、リン酸緩衝食塩水 (PBS)、125mMクエン酸、pH 7.6) に交換される。この段階で、かつ精製を通じて選択される緩衝液は、処理過程の間pHを保ち、凝集を減少させ、及びウイルスの抗原性を維持するように選択される。本明細書で記載される緩衝液は単に例であり、記載される目的のために代替の緩衝溶液が当業者に選択され得る。最初の濃縮及び緩衝液交換に続いて、例えば、セファクリルS-400NHR又はセファロース4FF樹脂を用いるさらなる濾過及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が行われる。任意に、さらなる処理の前に、浄化されたウイル

50

ス懸濁液は、濃縮ステップの前又は後のいずれかに、UV照射 (100 ~ 500、例えば200J/m<sup>2</sup>) への暴露によって不活性化される。

【0050】

任意に、サイズ排除クロマトグラフィーステップの後に、残余の核酸、例えば細胞DNAを除くための一以上のステップを行い得る。この目的のための一つの好適な方法は、メンブレンクロマトグラフィー、例えば(ネガティブモードにおける)サルトバインド(Sartobind)-Qメンブレンクロマトグラフィー及び濾過である。残余のDNAが  $\mu$ gタンパク質あたり100pg DNA以下まで(又は100pg / 用量未満まで)減少されるのが、一般に好ましい。

【0051】

好適には、この段階で、不活性化の前に、界面活性剤、例えば本明細書に開示され、並びにバルク調製物及び/又は免疫原組成物中への包含のために選択されるポロキサマー界面活性剤が、緩衝液に加えられ得る。あるいは、界面活性剤は、不活性化後に緩衝液に加えられ得る。その後、ウイルスは、本技術分野で公知の方法のいずれか一以上、例えば化学的不活性化によって及び/又は照射によって不活性化される。例えばホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン(BPL)、又は過酸化水素による化学的不活性化がデング熱ウイルスの不活性化のために本技術分野において記載されており、本明細書に開示される製剤の文脈において精製された不活性化デング熱ウイルスを提供するのに用いられ得る。例えば、ウイルスは、典型的に7~10日間の室温での(約100  $\mu$ g/mlの)ホルムアルデヒドへの暴露により不活性化され得る。任意に、懸濁液は不活性化工程の中間時点で、凝集物を除き、ホルムアルデヒドへの暴露を改善するために、例えば2日目、3日目、4日目、又は5日目に(例えば0.22  $\mu$ で)濾過される。化学的な不活性化手段は、単独で又は組み合わせて用いられ得る。あるいは、又は一以上の化学的手段と組み合わせて、ウイルスは、照射(例えば、UV又はガンマ線照射)によって不活性化され得る。その後、ホルムアルデヒド又は他の化学的不活性化用化合物は、取り除かれるか又は(例えば、ホルムアルデヒドの場合には、亜硫酸水素ナトリウムにより)中和される。限外濾過/透析濾過は、化学的不活性化剤を取り除くため、及び精製されたウイルスを後の製剤化に好適な緩衝液中に配置するために行われ得る。その後、精製された不活性化デング熱ウイルスは最終的に滅菌濾過されて不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物が生じる。任意に、スクロースがバルク調製物の最終製剤に添加される。必要に応じて、最終バルク調製物は、例えば-70度凍結保管され得る。

【0052】

選択された精製された不活性化ウイルスは、本明細書で記載したように製剤化され、安定で免疫原性のあるバルク調製物及び免疫原組成物が生じ、それは現在可能な方法及び製剤において見られる凍結乾燥及び再構成の間の実質的な損失を伴わずに、商業規模で生産され得る。上記の方法は、少なくとも70%、典型的には少なくとも80%がデング熱ウイルス物質である精製された不活性化デング熱ウイルス調製物を生じ得る。調製物は、25%未満、及び典型的に20%未満の宿主細胞タンパク質を含む。さらに、上記の方法に従えば、精製された不活性化デング熱ウイルスの回収率は、90%より多い(又は95%より多い)ウイルス物質が、最終調製物に回収される程度まで実質的に高められる。すなわち、精製された不活性化バルクの最後の0.2  $\mu$ 濾過の後に、10%未満又は5%未満のウイルス物質の損失が見られる。従って、本開示は特に、精製された不活性化デング熱ウイルスの非特異的吸着及び/又は凝集の少なくとも一つを低減する方法、並びに開示される方法に従う不活性化デング熱ウイルスの製剤化による抗原性が維持された不活性化デング熱ウイルスの回収率を高める方法を提供する。

【0053】

幾つかの実施形態では、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスは、溶液と混合する前にアルミニウム塩に吸着されて、不活性化デング熱ウイルスの事前吸着バルク調製物が生じる。デング熱ウイルスは、溶液中でアルミニウム塩と混合され、不活性化ウイルスのアルミニウム粒子への吸着が可能な程度の時間、アルミニウム粒子と接触させられる。好適なアルミニウム塩として、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ヒドロキシ

10

20

30

40

50

リン酸アルミニウム、及び硫酸アルミニウムカリウムが挙げられる。典型的に、選択された各ウイルスは、ウイルス：アルミニウムの経験的最適比となるように、独立にアルミニウムに吸着される。好適な一実施形態では、選択された各デング熱ウイルスは、後の免疫原組成物の他の成分との製剤化の前に、単独で水酸化アルミニウムに吸着されてアルミニウム吸着モノバルクを生じる。あるいは、選択された各デング熱ウイルスは、リン酸アルミニウム又は他の薬学的に許容可能なアルミニウム塩に吸着され得る。必要に応じて、精製された不活性化デング熱ウイルスは所望の割合で組み合され、その後選択されたアルミニウム塩に混合物として吸着され得る。あるいは、アルミニウム塩への事前吸着の代わりに、精製された不活性化デング熱ウイルスは、選択されたアルミニウム塩を含む溶液中に、以下に記載するように再懸濁され得る。

10

#### 【0054】

本明細書に開示される製剤の文脈において、（任意にアルミニウム塩に事前吸着された）精製された不活性化デング熱ウイルスが混合される溶液は、緩衝剤を含む。すなわち、溶液は、以下に記載するように、緩衝剤を含まなければ、投与のための免疫原組成物の製剤又は最終調製物への他の成分の添加によって引き起こされ得るpHの変化に対抗することができる緩衝液である。

20

#### 【0055】

デング熱ウイルスは酸性pHに感受性であり、酸性pHでは重要な免疫学的エピトープが失われ得、精製された不活性化ウイルス抗原が免疫応答を惹起する能力が減少する。従って、緩衝剤はpHを中性若しくは中性付近、又はわずかに塩基性pHに保つように選択される。幾つかの製剤における最終pHを改善するために、緩衝剤は最初の製剤（例えば、酸性pHを有し得るアジュバント等の幾つかの成分の添加前）におけるpHを、被験者に投与される最終組成物において望まれるよりも高いpHに促すように選択される。従って、緩衝剤（又は剤の組み合わせ）は、pHを6.4以上に保つように選択される。より好適には、緩衝剤はpHを6.8以上に保つように選択され、最も好適には、緩衝剤はpHを中性以上、例えば生理的pHの7.4又は7.4付近、及びある場合にはpH7.5以上、例えばpH8.0以上、さらにはpH8.5に保つように選択される。

20

#### 【0056】

好適な緩衝剤として、炭酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、グルコン酸塩、及び酒石酸塩緩衝剤、並びにより複雑な有機系緩衝剤が挙げられる。幾つかの例では、緩衝剤としてリン酸ナトリウム及び／又はリン酸カリウムを含むリン酸塩緩衝剤が挙げられる。典型的に、かかる緩衝剤又は系は、所望のpHを達成するために選択される割合でリン酸ナトリウム及びリン酸カリウムの両方を含む。他の実施形態では、緩衝剤は、所望のpHを達成するために配合されるトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、又は「トリス」を含む。緩衝液を所望のpHに製剤化する方法は当業者に公知であり、好適な組成物は所望のpHに基づいて、過度の実験を伴わずに決定され得る。

30

#### 【0057】

本明細書に開示されるバルク調製物及び免疫原組成物の製剤において、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む溶液は、界面活性剤もまた含む。多数の界面活性剤が本分野で公知であり、医薬製剤に用いられ得る。本明細書に開示される製剤の文脈における界面活性剤は、精製された不活性化デング熱ウイルスの免疫原特性（例えば、コンフォメーション及び免疫学的エピトープ）を保持しながら、例えばウイルスの非特異的吸着及び／又は凝集を減少させることによって、製剤の安定性を増加させ、回収率を高めるように選択される。

40

#### 【0058】

界面活性剤は、主に親水性の「頭部」及び疎水性の「尾部」を有する両親媒性分子である。界面活性剤は、その頭部及び尾部の組成に従って分類され得る。その頭部の特徴に従って、界面活性剤は非イオン性（非荷電）又はイオン性（荷電）に分類され得る。イオン性界面活性剤は、（負に荷電した）陰イオン性、（正に荷電した）陽イオン性、及び両性、例えば双性イオン性（2つの逆荷電した官能基）に分けられる。界面活性剤は、その尾

50

部の組成によっても分類され得る。好適な界面活性剤として、炭化水素（例えば、アレン、アルカン、アルケン、シクロアルカン、及びアルキン）尾部；アルキルエーテル尾部；エトキシ化（ポリエチレンオキシド）尾部；プロポキシ化（ポリプロピレンオキシド）尾部を有するものが挙げられる。

【0059】

幾つかの実施形態では、選択される界面活性剤は双性イオン性界面活性剤である。一実施形態では、界面活性剤は注射可能な界面活性剤である。本製剤の文脈において、好適な界面活性剤の一種として、ポロキサマー界面活性剤が挙げられる。ポロキサマーは、図1に模式的に示されるように、ポリオキシエチレン（ポリエチレンオキシド）である二つの親水性鎖に隣接される、ポリオキシプロピレン（ポリプロピレンオキシド）である中心の疎水性鎖で構成される非イオン性トリプロックコポリマーである。ポロキサマーは、商品名プルロニック（Pluronics）<sup>TM</sup>としても知られ、そのうち幾つかは商品名ルトルール（Lutrol）<sup>TM</sup>、及びコリフォール（Kolliphor）<sup>TM</sup>で販売されている。ポロキサマー界面活性剤は、精製された不活性化デング熱ウイルスがアルミニウム塩に吸着されていない製剤にとって特に好適である。

10

【0060】

幾つかの実施形態では、ポロキサマー界面活性剤は、室温では固形であり、例えば少なくとも約4500kDの平均分子量、及び約15000kD以下の平均分子量を有するポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーから選択される。例えば、ポロキサマー界面活性剤は、Pluronic<sup>TM</sup> F108, Pluronic<sup>TM</sup> F127, Pluronic<sup>TM</sup> F188, Pluronic<sup>TM</sup> F38, Pluronic<sup>TM</sup> F68, Pluronic<sup>TM</sup> F77, Pluronic<sup>TM</sup> F87, Pluronic<sup>TM</sup> F88, and Pluronic<sup>TM</sup> F98の群から選択され得る。様々なPluronic<sup>TM</sup>界面活性剤が、商品名Lutrol<sup>TM</sup>（現在はKolliphor<sup>TM</sup>）としても販売されている。一実施形態では、免疫原組成物はPluronic<sup>TM</sup> F 68又はLutrol<sup>TM</sup> F 68（Kolliphor<sup>TM</sup> P188）という名前の、8600kDの平均分子量を有し、1800g/molのポリオキシプロピレン分子量及び80%のポリオキシエチレン含量を有するポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーにより製剤化される。あるいは、室温でペースト又は液体形態である、例えば少なくとも約1000kDの平均分子量を有するポロキサマー界面活性剤、例えば、Pluronic<sup>TM</sup> L 10, Pluronic<sup>TM</sup> L 101, Pluronic<sup>TM</sup> L 121, Pluronic<sup>TM</sup> L 31, Pluronic<sup>TM</sup> L 35, Pluronic<sup>TM</sup> L 43, Pluronic<sup>TM</sup> L 44, Pluronic<sup>TM</sup> L 61, Pluronic<sup>TM</sup> L 62, Pluronic<sup>TM</sup> L 64, Pluronic<sup>TM</sup> L 81, Pluronic<sup>TM</sup> L 92, Pluronic<sup>TM</sup> P 103, Pluronic<sup>TM</sup> P 104, Pluronic<sup>TM</sup> P 105, Pluronic<sup>TM</sup> P 123, Pluronic<sup>TM</sup> P 65, Pluronic<sup>TM</sup> P 84、又はPluronic<sup>TM</sup> P 85が用いられ得る。

20

【0061】

上記のポロキサマー界面活性剤に加えて、本明細書に開示される製剤の文脈における他の好適な界面活性剤の例として、ポロキサマー、15-ヒドロキシステアリン酸マクロゴール、ポリソルベート、オクトキシノール、ポリドカノール、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシルヒマシ油、N-オクチル-グルコシド、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される界面活性剤が挙げられる。

30

【0062】

界面活性剤は、製剤に少なくとも0.0001%及び1.0%までの量で添加され得る。例えば、界面活性剤は、少なくとも0.0005%及び0.5%までの量で、例えば0.001～0.2%、0.0005%、若しくは0.001%、若しくは0.005%、若しくは0.01%、若しくは0.025%、若しくは0.05%、若しくは0.1%、若しくは0.2%、若しくは0.3%、若しくは0.4%、若しくは0.5%、又は1.0%までの濃度で（又は任意の中間値で）添加され得る。これらの濃度は、最初の製剤における重量／容量として示される。組成物が凍結乾燥並びに／又は凍結乾燥及び再懸濁される、以下で記載される実施形態においては、正確な量は重量／重量比で（固形成分について）再計算され得、及び／又は被験者に投与される最終製剤の濃度若しくは希釈率に基づいて調整され得る。

40

【0063】

典型的に、終濃度は1日に許容される摂取量（permissible daily exposure:PDE）の範

50

圏内で算出される。例えば、Pluronic<sup>TM</sup> F68については、認められているPDEは注射単位用量あたり150 µgである。従って、最終製剤における濃度は、許容されるPDEを達成するために、投与される容量に基づいて変化し得る。

#### 【0064】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される製剤は、溶液の浸透圧、粘度、安定性、均一性等を調整するさらなる薬学的に許容可能な成分を含む。

#### 【0065】

例えば、溶液（従って製剤）は、一以上の塩を含み得る。最も一般的には、塩は塩化ナトリウムである。しかしながら、他の薬学的に許容可能な塩及びイオンと同じように、他の無機塩及びイオン、例えばカリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン、亜鉛の塩もまた用いられ得る。薬学的に許容可能な塩及びその選択は、例えば、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 2nd Revised Edition, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), Wiley, 2011に詳細に記載されている。

10

#### 【0066】

幾つかの実施形態では、溶液は少なくとも一つの追加の賦形剤又は担体を含む。例えば、溶液（従って製剤）は、少なくとも一つの糖又はポリオール（又はその組み合わせ）、例えば炭水化物及び非炭水化物ポリオール、例えばガラス形成糖及びポリオールを含み得る。賦形剤は、典型的に不活性化デング熱ウイルスが免疫学的に重要なエピトープの実質的な損失を伴わないので保管できるように選択される。好適な賦形剤の例として、糖、糖アルコール及び炭水化物誘導体が挙げられる。

20

#### 【0067】

炭水化物として、限定されるものではないが、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、およびそれらの対応糖アルコール、ポリヒドロキシル化合物、例えば炭水化物誘導体及び化学的に修飾された炭水化物、ヒドロキシエチルデンプン及び糖コポリマーが挙げられる。天然及び合成炭水化物の両方が使用に好適である。合成炭水化物として、限定されるものではないが、チオール又は炭素結合によって置換されたグリコシド結合を有するものが挙げられる。D体及びL体の両方の炭水化物が用いられ得る。炭水化物は、非還元性でも還元性でもよい。還元性炭水化物が用いられる場合は、メイラード反応の阻害剤を添加するのが好ましい。

30

#### 【0068】

本発明における使用に好適な還元性炭水化物は、本分野において公知であり、限定されるものではないが、グルコース、マルトース、ラクトース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、マルツロース及びラクツロースが挙げられる。非還元性炭水化物として、限定されるものではないが、糖アルコール及び他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシル化合物の非還元性グリコシドが挙げられる。他の有用な炭水化物として、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、スクロース、セロビオース、マンノビオース及び糖アルコールが挙げられる。糖アルコールグリコシドは、好適には、モノグリコシド、特に二糖、例えばラクトース、マルトース、ラクツロース及びマルツロースの還元によって得られる化合物である。

40

#### 【0069】

典型的に、賦形剤は、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、ラクトビオン酸、スクロース、マルトース、ラクトース、グルコース、イソ-マルトース、マンニトール、マルチトール、ラクチトール、ソルビトール、パラチニット、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、マンノース、若しくはデキストラン、又はそれらの組み合わせを含む炭水化物（又はその誘導体）の群から選択される。幾つかの例では、ガラス形成糖又はポリオールは：スクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン、又はそれらの組み合わせからなる群より選択される。特定の一実施形態では、賦

50

形剤はスクロースである。

【0070】

溶液に含まれる糖又はポリオールの濃度は、1重量/容量%～50重量/容量%、例えば1～10%（例えば、1～5%、3～7%、5～10%、又は任意の中間値）、又は10～15%、15～20%、20～25%、又は25～50%、最も好適には5%以下又は10%以下（w/v）であり得る。

【0071】

あるいは、又はさらに、賦形剤は、アミノ酸、例えばグリシン、アラニン、アルギニン、リシン、及びグルタミンを含み得るが、任意のアミノ酸、又はアミノ酸の組み合わせ、ペプチド、加水分解されたタンパク質又は血清アルブミン等のタンパク質を含み得る。

【0072】

代表的な製剤組成を表1に示す。

【表1】

緩衝液	pH (+/-0.1)
5mM Na/K2PO4、50mM NaCl	7.6
5mM Na/K2PO4、50mM NaCl、0.1%ポロキサマー188、3%スクロース	7.6
10mM Na/K2PO4、0.1%ポロキサマー188、3%スクロース	7.6
5mM K/K2PO4、10mM クエン酸、0.1%ポロキサマー188、3%スクロース	7.6
PBS、125 mM クエン酸	7.6
5mM Tris、5mM マレイン酸、0.1%ポロキサマー188、3%スクロース	7.5
5mM Tris、50mM NaCl、0.1%ポロキサマー 88、3%スクロース	8.0
5mM Tris、5mM マレイン酸、50mM NaCl0.1% ポロキサマー188、 3%スクロース	7.5
10mM Na/K2PO4、0.1%ポロキサマー 188、1%ソルビトール	7.6
10mM K/K2PO4、0.4%ヒスチジン、0.1%ポロキサマー188、1%ソルビトール	7.6

【0073】

好適な一実施形態では、緩衝液は5mM Tris、50mM NaCl、任意に界面活性剤、例えばポロキサマー188及び糖、例えばスクロースを含む。それでもなお、本明細書に記載される緩衝液の例は、特定の成分によって、又は例として記載される特定の組み合わせによって限定する事を意図するものではないと理解されたい。

【0074】

典型的に、精製された不活性化デング熱ウイルスが製剤化される溶液は、エンドトキシンを含まない水（例えば、滅菌水）に様々な成分を添加することによって調製される。例えば、精製された不活性化デング熱ウイルスが添加される溶液は、エンドトキシンを含まない水に：ガラス形成糖又はポリオール；緩衝剤；塩；及び界面活性剤を添加することで調製され得る。一実施形態では、成分はガラス形成糖又はポリオール；緩衝剤；塩；及び界面活性剤の順番で添加される。成分は無菌であり得、及び／又は溶液は例えば濾過若しくは他の簡便な方法によって滅菌され得る。精製された不活性化ウイルスが、最終製剤に含まれる一以上の成分を含む溶液中に存在する場合、その量は、最終バルク調製物又は免疫原組成物の選択される濃度にあわせて調節され得る。

【0075】

さらなる薬学的に許容可能な担体及び賦形剤も製剤に含まれ得、かかる担体及び賦形剤は本分野において公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton PA, 5th Edに記載されている。

【0076】

幾つかの実施形態では、上記の様に緩衝剤及び界面活性剤（並びに任意に、さらなる成分）を含む溶液への、精製された不活性化デング熱ウイルスの添加の後に、製剤化された免疫原組成物が液体として、例えば室温で、0～4 で、又は0 未満で、例えば-20 若しくは-20 付近、又は-70 ～ -80 若しくは-70 ～ -80 付近で保管される。

10

20

30

40

50

## 【0077】

あるいは、製剤化された組成物は、例えば、凍結乾燥によって乾燥され、乾燥された又は凍結乾燥された組成物が生じる。（製剤からの溶媒の蒸発による）乾燥は、凍結乾燥によって達成され得る。凍結乾燥は、溶媒 / 溶質混合物において、真空条件で行われ、溶媒の昇華が起こり、精製された不活性化デング熱ウイルス及び製剤の他の成分を含む乾燥した溶質が生じる。100  $\mu$ bar未満の任意の圧力が好適であろう。典型的に、少なくとも約500mBarの真空が、溶媒の効率的な蒸発を促進するのに十分であり、少なくとも約6mBarの真空が溶媒の効率的な昇華を促進するのに十分である。圧力はさらに減少させ得るが、そうすることは乾燥率にほとんど効果がなく、非常に低い圧力条件下では、昇華の効率は減少する。溶媒の除去は単に液体サンプルを真空チャンバーに配置することによって行われ得るが、起泡又は発泡は産物の損失、並びに産物の均一性又は免疫原性の減少をもたらし得る。起泡又は発泡を防ぐために、製剤化された免疫原組成物は最初に凍結され得、その後溶媒は例えば凍結乾燥又はフリーズドライによって真空での昇華により除去され得る。代表的な手順は、実施例3で概説する。

10

## 【0078】

従って、幾つかの実施形態では、本開示は、少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルス及び界面活性剤、例えば上記界面活性剤、例えば、ポロキサマー界面活性剤等を含む、不活性化デング熱ウイルスの凍結乾燥調製物を提供する。幾つかの場合では、凍結乾燥調製物は、アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウムを含む。例えば、一又は一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスは、アルミニウム塩に吸着され得る。凍結乾燥調製物は、緩衝剤として作用する少なくとも一つの成分、及び / 又は少なくとも一つのガラス形成糖及びガラス形成ポリオールもまた含み得る。当業者は、上記開示に基づいて、さらなる実施形態及び代替物を理解するだろう。

20

## 【0079】

製剤化された組成物が乾燥される実施形態では、乾燥された組成物は、典型的に投与の前に薬学的に許容可能な溶媒、例えば注射用液体に再懸濁される。精製された不活性化デング熱ウイルスが混合される溶液は、ヒト被験者への薬剤投与に好適となるように選択される。典型的に、溶液は非経口投与、例えば筋肉内、皮下、経皮、又は皮内投与に許容可能となるように選択される。例えば、乾燥された組成物は注射用水、例えば滅菌されたエンドトキシンを含まない水に再懸濁され得る。あるいは、溶媒は水性溶媒及び有機溶媒の混合物であり得る。幾つかの実施形態では、再懸濁される免疫原組成物は等張である。あるいは、再懸濁される免疫原組成物が等張でない場合は、投与の前に、浸透圧は例えば塩又は他の賦形剤の添加によって、等張又は等張付近まで調整され得る。凍結乾燥の前及び任意に後に、場合により、便宜に基づいて容量が選択及び調製され得ることを、当業者は理解するだろう。例えば凍結乾燥の前及び再懸濁の後の免疫原組成物製剤の相対容量によって、投与のために調製される最終組成物が、より少ないか又はより多い量であり得、従って本明細書で例示される製剤よりもより濃く又はより薄く濃縮され得る。かかる濃度の調整は、好適にするために過度な実験を伴わずに簡単に計算され得る。

30

## 【0080】

典型的に、免疫原組成物の各用量におけるウイルスの量は、（一以上の投与後に）典型的な被験者において重大で有害な副作用を伴わずに免疫保護応答を誘導する量として選択される。この文脈における免疫保護は、必ずしも完全に感染から保護することを意味せず；症状又は疾患、特にウイルスに関連する深刻な疾患から保護することを意味する。抗原の量は、用いられる特定の免疫原に応じて変化し得る。抗原の量は、精製された又は部分的に精製されたウイルス抗原の総タンパク量  $\mu$ gの点で、又は免疫学的方法によって、例えばELISA若しくは定量的免疫沈降法、例えば放射免疫拡散によって測定され得る。一般に、ヒトの一回用量は0.01 ~ 100  $\mu$ gの不活性化ウイルス、例えば少なくとも約0.1  $\mu$ g（例えば、0.1、0.2、0.25、0.3、0.33、0.4、又は0.5  $\mu$ g）から約50  $\mu$ g以下、例えば約0.25  $\mu$ g ~ 約30  $\mu$ g、例えば約0.25  $\mu$ g、0.33  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g、約2  $\mu$ g、約2.5  $\mu$ g、約3  $\mu$ g、約4  $\mu$ g、約5  $\mu$ g、又は約10  $\mu$ g（又は0.1 ~ 10.0  $\mu$ gの任意の量）のウイルスの各血清型を

40

50

含むと予想される。典型的に、免疫原組成物のヒトの一回用量は、約100 μg以下、例えば、約90 μg以下、又は約80 μg以下、又は約75 μg以下、又は約70 μg以下、又は約60 μg以下、又は約50 μg以下、又は40 μg以下、又は30 μg以下、又は20 μg以下、又は10 μg以下（又は10～100 μgの任意の量）のウイルスの各血清型を含む。例えば、免疫原組成物のヒトの一回用量は、ヒトの用量あたり0.10～10 μg、又は0.25～5 μg、又は上記各パラメーターによって規定される任意の他の範囲を含み得る。

#### 【0081】

免疫原組成物で用いられる量は、被験者集団（例えば、乳幼児）に基づいて選択される。特定の組成物についての最適な量は、抗体力値及び被験者における他の応答の観察を含む標準的な研究によって確認され得る。最初のワクチン投与に続いて、好適な間隔（例えば、約4週間）の後、被験者は一以上のさらなる投与を受け得る。免疫保護は、典型的に本明細書に記載の免疫原組成物の少なくとも二回の投与の後に生じ得、幾つかの場合では、好適な間隔をあけた二又は三回以上の投与の後に生じ得る。

10

#### 【0082】

幾つかの実施形態では、免疫原組成物は、少なくとも一つの免疫刺激成分又はアジュvantを含む。幾つかの場合では、アジュvantは無機塩、例えばアルミニウム（ミョウバン）塩、例えば硫酸アルミニウムカリウム、リン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウムを含む。ミョウバンが存在する場合には、その量は典型的に約100 μg～1mg、例えば用量あたり約100 μg、又は約200 μg～約750 μg、又は約500 μgである。上記の通り、アルミニウム塩が用いられる製剤において、精製された不活性化デング熱ウイルスは、本明細書で開示される組成物における製剤化の前にアルミニウム塩に事前吸着され得る。あるいは、アルミニウム塩は、凍結乾燥された免疫原組成物が再懸濁される液体に含まれ得るか、又は液体組成物に添加され得る。アルミニウム塩に加え、カルシウム塩もまた、例えば微粒子アジュvantとして用いられ得る。

20

#### 【0083】

あるいは、又は（アルミニウム塩に）加えて、乾燥された製剤が再懸濁される液体は、免疫刺激成分を含み得る。免疫刺激成分もまた、投与の前に液体製剤に添加され得る（例えば、二つのバイアル及び／又はシリング又は他の容器に調製され、投与の前に混合される）。例えば、免疫原組成物が筋肉内投与のために製剤化される場合は、3D-MPL、スクアレン（例えばQS21）、リポソーム、及び／又は油と水のエマルションの一以上が、好適に選択される。

30

#### 【0084】

精製された不活性化デング熱ウイルス抗原とあわせて使用するための一つの好適なアジュvantは、非毒性の細菌性リポ多糖誘導体である。リピドAの非毒性誘導体の好適な例はモノホスホリルリピドA、又はより具体的には3-脱アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）である。3D-MPLは、MPLの名でGlaxoSmithKline Biologicals N.Aにより販売されており、本明細書を通してMPL又は3D-MPLと呼ばれる。例えば、米国特許第4,436,727号；第4,877,611号；第4,866,034号；及び第4,912,094号を参照されたい。3D-MPLは、主としてIFN- $\gamma$ （Th1）表現型を有するCD4+T細胞の応答を促進する。3D-MPLは、GB2220211 Aに記載される方法に従って調製され得る。化学的には、3D-MPLは、3、4、5、又は6のアシル化鎖を有する、3-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。本発明の組成物では、小さな粒子の3D-MPLが用いられ得る。小さな粒子の3D-MPLは、0.22 μmフィルターによって滅菌濾過し得るような粒子径を有する。かかる調製物は、WO94/21292に記載されている。

40

#### 【0085】

リポ多糖、例えば3D-MPLは、免疫原組成物のヒト用量あたり1～50 μgの量で用いられ得る。このような3D-MPLは、約25 μg、又は20～30 μg、好適には21～29 μg、又は22～28 μg、又は23～27 μg、又は24～26 μg、又は25 μgのレベルで用いられ得る。他の実施形態では、免疫原組成物のヒト用量は、約10 μg、又は5～15 μg、好適には6～14 μg、又は7～13 μg、又は8～12 μg、又は9～11 μg、又は10 μgのレベルで3D-MPLを含む。さらな

50

る実施形態では、免疫原組成物のヒト用量は、約5μg、例えは1~9μg、又は2~8μg、好適には3~7μg、又4は~6μg、又は5μgのレベルで3D-MPLを含む。

【0086】

他の実施形態では、米国特許6,005,099号及び欧州特許第EP 0 729 473 B1号に記載されているように、リポ多糖は (1-6) グルコサミン二糖であり得る。当業者は、これらの参考文献の教示に基づいて、様々にリポ多糖、例えは3D-MPLを生産することができる。それでもなお、これら各文献を参照により本明細書に組み込む。上記の (LPS又はMPL若しくは3D-MPLと構造的に類似する) 免疫刺激剤に加えて、MPLの上記構造のサブ部分であるアシル化单糖及び二糖誘導体もまた好適なアジュバントである。他の実施形態では、アジュバントはリビドAの合成誘導体であり、そのうちの幾つかはTLR-4アゴニストとして記載されており、限定されるものではないが：OM174 (2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ- -D-グルコピラノシリル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]- -D-グルコピラノシリルジヒドロゲンホスフェート) (WO 95/14026) ; OM 294 DP (3S, 9R) -3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール, 1,10-ビス(ジヒドロゲンホスフェート) (WO 99/64301及びWO 00/0462) ; 並びにOM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-(R) -ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ] デカン-1,10-ジオール, 1-ジヒドロゲンホスフェート 10-(6-アミノヘキサノエート) (WO 01/46127) が挙げられる。

10

20

30

40

【0087】

精製された不活性化デング熱ウイルスを有する免疫原組成物において、例えはそれのみで、又は3D-MPL若しくは本明細書に記載される他のアジュバントと組み合わせて用いられ得る他の免疫刺激成分はサポニン、例えはQS21である。

【0088】

サポニンは、Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386) に教示されている。サポニンは、植物界及び海洋動物界において広く分布するステロイド又はトリテルペングリコシドである。サポニンは、水において振盪により泡立つコロイド溶液を形成すること、及びコレステロールを沈降させることで知られている。サポニンは細胞膜に近づくと、膜に孔の様な構造を形成し、膜の破裂を引き起す。赤血球溶血はこの現象の例であり、全てではないがサポニンの幾つかの特徴の一つである。

30

【0089】

サポニンは、全身投与のためのワクチンにおけるアジュバントとして知られている。各サポニンのアジュバント及び溶血活性は、本分野において広範に研究がなされてきた (Lacaille-Dubois and Wagner、上掲)。例えは、(南アメリカの木であるシャボンノキ (Quillaja Saponaria Molina) に由来する) Quill A及びその断片が米国特許第5,057,540号及び "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55 ; 及び欧州特許第EP 0 362 279 B1号に記載されている。Quill Aの断片を含む、免疫刺激複合体 (Immune Stimulating Complexes (ISCOMS)) と呼ばれる微粒子構造は溶血性であり、ワクチンの製造に用いられてきた (Morein, B., 欧州特許第EP 0 109 942 B1号 ; WO 96/11711 ; WO 96/33739)。 (Quill AのHPLC精製画分である) 溶血性サポニンのQS21及びQS17は、強力な全身性アジュバントとして記載されており、その生産方法は、米国特許第5,057,540号及び欧州特許第EP 0 362 279 B1号に開示されており、その内容を参照により本明細書に組み込む。全身性ワクチンの研究において用いられる他のサポニンとして、ジソフィリア (Gypsophila) 属及びサポナリア (Saponaria) 属等の他の植物種に由来するものが挙げられる (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992)。

40

【0090】

QS21は、シャボンノキの樹皮に由来する、HPLC精製された非毒性画分である。QS21を生

50

産する方法は米国特許第5,057,540号に開示されている。QS21を含む非反応性アジュvant製剤は、WO 96/33739に記載されている。上記文献を、参照により本明細書に組み込む。前記免疫学的に活性なサポニン、例えばQS21は、免疫原組成物のヒト用量当たり1~50 µgの量で用いられ得る。有利には、QS21は約25 µg、例えば20~30 µg、好適には21~29 µg、又は22~28 µg、又は23~27 µg、又は24~26 µg、又は25 µgのレベルで用いられる。他の実施形態では、免疫原組成物のヒト用量は、約10 µg、例えば5~15 µg、好適には6~14 µg、例えば7~13 µg、又は8~12 µg、又は9~11 µg、又は10 µgのレベルでQS21を含む。さらなる実施形態では、免疫原組成物のヒト用量は、約5 µg、例えば1~9 µg、又は~8 µg、好適には3~7 µg、又は~6 µg、又は5 µgのレベルでQS21を含む。QS21及びコレステロールを含むかかる製剤は、抗原と共に製剤化された場合、良好なTh1刺激性アジュvantとなることが示されている。従って、例えば、精製された不活性化デング熱ウイルスは、好適には免疫原組成物において、QS21及びコレステロールの組み合わせを含むアジュvantと共に用いられる。

10

## 【0091】

用いられ得る他のTLR4リガンドは、アルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)、例えばWO 98/50399又は米国特許第6,303,347号(AGPの製造方法もまた開示されている)に開示されているものがあり、好適には米国特許第6,764,840号に開示されているRC527若しくはRC529又はAGPの薬学的に許容可能な塩である。幾つかのAGPはTLR4アゴニストであり、幾つかはTLR4アンタゴニストである。いずれもアジュvantとして有用であると考えられる。

20

## 【0092】

TLR4を介してシグナル応答を引き起こすことができる他の好適なTLR-4リガンドは、例えば、グラム陰性菌由来のリポ多糖及びその誘導体、又はその断片、特にLPSの非毒性誘導体(例えば3D-MPL)である((Sabroe et al, JI 2003 p1630-5))。他の好適なTLRアゴニストは:熱ショックタンパク質(Hsp)10、60、65、70、75、又は90;サーファクタントタンパク質A、ヒアルロナンオリゴ糖、ヘパラン硫酸の断片、フィブロネクチンの断片、フィブリノーゲンペプチド及びb-ディフェンシン-2、及びムラミルジペプチド(MDP)である。一実施形態では、TLRアゴニストはHSP60、70、又は90である。他の好適なTLR-4リガンドは、WO 2003/011223及びWO 2003/099195に記載されており、例えばWO2003/011223の4~5ページ又はWO2003/099195の3~4ページに開示されている化合物I、化合物II、及び化合物IIIであり、特にWO2003/011223にER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680、及びER804764として開示されている化合物である。例えば、好適なTLR-4リガンドの一つは、ER804057である。

30

## 【0093】

さらなるTLRアゴニストもまた、アジュvantとして有用である。用語「TLRアゴニスト」は、直接のリガンドとして、又は内因性の若しくは外因性のリガンドの生産を介して間接的に、TLRシグナリング経路を介してシグナル応答を引き起こすことができる剤である。かかる天然又は合成のTLRアゴニストは、代わりの又は追加のアジュvantとして用いられ得る。アジュvant受容体としてのTLRの役割の短いレビューは、Kaisho & Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589:1-13, 2002に記載されている。これらの潜在的アジュvantとして、限定されるものではないが、TLR2、TLR3、TLR7、TLR8、及びTLR9アゴニストが挙げられる。従って、一実施形態では、アジュvant及び免疫原組成物は:TLR-1アゴニスト、TLR-2アゴニスト、TLR-3アゴニスト、TLR-4アゴニスト、TLR-5アゴニスト、TLR-6アゴニスト、TLR-7アゴニスト、TLR-8アゴニスト、TLR-9アゴニスト、又はそれらの組み合わせからなる群より選択されるアジュvantをさらに含む。

40

## 【0094】

本発明の一実施形態では、TLR-1を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-1を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは:トリアシル化リポペプチド(LP);フェノール可溶性モジュリン;結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)LP;S-(2,3-ビス(パルミトイロキシ)-(2-RS)-

50

プロピル)-N-パルミトイル-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH、ボレリア・ブルグドルフェリ ( *Borrelia burgdorferi* ) 由来の細菌リポタンパク質及びOspA LPのアセチル化アミノ末端を模倣するトリヒドロクロリド(Pam3Cys)LPから選択される。

#### 【 0 0 9 5 】

別の実施形態では、TLR-2を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-2を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、結核菌、 *B. burgdorferi* 又は *T. pallidum* 由来のリポタンパク質、ペプチドグリカン、細菌リポペプチド；スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) を含む種由来のペプチドグリカン；リポテイコ酸、マンヌロン酸、ナイセリア (*Neisseria*) 属のポリン、細菌の線毛、エルシニア (*Yersina*) 属のウイルス因子、CMVビリオン、麻疹ヘマグルチニン、及び酵母のザイモサンの一以上である。

10

#### 【 0 0 9 6 】

別の実施形態では、TLR-3を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-3を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、二本鎖RNA (dsRNA)、又はポリイノシニック-ポリシチジル酸 (ポリIC)、ウイルスの感染に関連する分子核酸パターンである。

20

#### 【 0 0 9 7 】

別の実施形態では、TLR-5を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-5を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、細菌のフラジエリンである。

20

#### 【 0 0 9 8 】

別の実施形態では、TLR-6を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-6を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、マイコバクテリアリポタンパク質、ジアシル化LP、及びフェノール可溶性モジュリンである。さらなるTLR6アゴニストは、WO 2003/043572に記載されている。

30

#### 【 0 0 9 9 】

別の実施形態では、TLR-7を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-7を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、一本鎖RNA (ssRNA)、ロキソリビン、N7及びC8位におけるグアノシンアナログ、若しくはイミダゾキノリン化合物、又はそれらの誘導体である。一実施形態では、TLRアゴニストはイミキモドである。さらなるTLR7アゴニストはWO 2002/085905に記載されている。

30

#### 【 0 1 0 0 】

別の実施形態では、TLR-8を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。好適には、TLR-8を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、一本鎖RNA (ssRNA)、抗ウイルス活性を有するイミダゾキノリン分子、例えばレシキモド (R848) (レシキモドは、TLR-7によっても認識され得る) である。用いられ得る他のTLR-8アゴニストとして、WO 2004/071459に記載されているものが挙げられる。

40

#### 【 0 1 0 1 】

別の実施形態では、TLR-9を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストが用いられる。一実施形態では、TLR-9を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、HSP90である。あるいは、TLR-9を介するシグナル応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、細菌又はウイルスDNA、非メチル化CpGヌクレオチドを含むDNA、特にCpGモチーフとして知られる配列構成である。CpGを含むオリゴヌクレオチドは、主としてTh1応答を誘導する。かかるオリゴヌクレオチドは公知であり、例えばWO 96/02555、WO 99/33488、並びに米国特許第6,008,200号及び第5,856,462号に記載されている。好適には、CpGヌクレオチドはCpGオリゴヌクレオチドである。本発明の免疫原組成物において使用するための好適なオリゴヌクレオチドは、少なくとも3、好適には少なくとも6以上のヌクレオチドによって分けられる二以上のジヌクレオチドCpGモチーフを任意に

50

含む、CpGを含有するオリゴヌクレオチドである。CpGモチーフでは、シトシンヌクレオチドの後にグアニンヌクレオチドが続く。本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、典型的にデオキシヌクレオチドである。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間は、ホスホロジチオエート、又は好適にはホスホロチオエート結合であるが、ホスホジエステル及び他のヌクレオチド間結合も、本発明の範囲内である。混合したヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドもまた、本発明の範囲に含まれる。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド又はホスホロジチオエートを生産する方法は、米国特許第5,666,153号及び第5,278,302号、並びにWO 95/26204に記載されている。

#### 【0102】

精製された不活性化デング熱ウイルスを有する製剤において使用するためのアジュvantの他のクラスとして、OMPベースの免疫刺激組成物が挙げられる。OMPベースの免疫刺激組成物は、例えば鼻腔内投与のための粘膜アジュvantとして特に好適である。OMPベースの免疫刺激組成物は、グラム陰性細菌、例えば、限定されるものではないが、ナイセリア (*Neisseria*) 属の種由来の外膜タンパク質 (OMP、例えば幾つかのポリン) の調製物の一種であり (例えば、Lowell et al., *J. Exp. Med.* 167:658, 1988; Lowell et al., *Science* 240:800, 1988; Lynch et al., *Biophys. J.* 45:104, 1984; Lowell, in "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, page 193, 1997; 米国特許第No. 5,726,292号; 米国特許第4,707,543号を参照されたい)、抗体として、又は免疫原、例えば細菌又はウイルス抗原のための組成物において有用である。幾つかのOMPベースの免疫刺激組成物は、疎水性でヒトの使用にとって安全な「プロテオソーム」とも呼ばれ得る。プロテオソームは、約20nm ~ 約800nmの小胞又は小胞様OMPクラスターへの自己会合能力を有し、及びタンパク質抗原 (Ag) 、特に疎水性部分を有する抗原を (例えば静電気的又は疎水的に) 非共有結合的に取り込み、調和させ、結合させ、あるいは協同する能力を有する。多分子膜状構造若しくは一以上のOMPの溶融球状様OMP組成物を含む、小胞又は小胞様の形態の外膜タンパク質成分を生じる任意の調製方法が、プロテオソームの定義に含まれる。プロテオソームは、例えば本分野 (例えば、米国特許第5,726,292号又は米国特許第5,985,284号を参照されたい) に記載されているように調製され得る。プロテオソームは、通常は総OMP調製物の2%未満である、OMPポリンを生産するのに用いられる細菌 (例えば、ナイセリア属の種) に由来する内因性のリポ多糖又はリポオリゴ糖 (それぞれ、LPS又はLOS) もまた含み得る。

#### 【0103】

プロテオソームは、主として、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*) から化学的に抽出された外膜タンパク質 (OMP) (ほとんどはポリンA及びB並びにクラス4OMP) で構成され、界面活性剤によって溶液中に保持される (Lowell GH. *Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines*. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, *New Generation Vaccines*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。プロテオソームは、様々な抗原、例えばウイルス源に由来する、例えば透析濾過又は従来の透析工程によって精製された又は組み換えタンパク質、例えば本明細書に開示されるPreFポリペプチドと共に製剤化され得る。界面活性剤の段階的な除去は、直径約100 ~ 200nmの微粒子疎水性複合体の形成を可能にする (Lowell GH. *Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines*. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, *New Generation Vaccines*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。

#### 【0104】

本明細書で用いられる「プロテオソーム：LPS又はプロトリン (Protollin)」は、例えば、(免疫刺激成分として機能し得る) OMP-LPS組成物を提供するために少なくとも一種類のリポ多糖を有する、外因的な添加によって混合されたプロテオソームの調製物を意味する。従って、OMP-LPS組成物は、(1) グラム陰性菌、例えばナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*) から調製されるプロテオソーム (例えば、プロジュバント) の外膜タンパク質調製物及び(2) 一以上のリポ多糖の調製物、を含むプロトリン

10

20

30

40

50

の二つの基本的な成分で構成され得る。リポオリゴ糖は、内因性であり得（例えば、OMPプロテオソーム調製物に天然に含まれる）、あるいは外因的に調製された（例えば、異なる培養物から、又はOMP調製物ではなく微生物から調製された）リポオリゴ糖由来のOMP調製物と混合又は組み合され得るか、あるいはそれらの組み合わせであり得る。このように外因的に添加されるLPSは、OMP調製物を調製したのと同じグラム陰性細菌、又は異なるグラム陰性細菌に由来し得る。プロトリンは、任意に脂質、糖脂質、糖タンパク質、小分子等、及びそれらの組み合わせもまた含むと理解されるべきである。プロトリンは、例えば米国特許出願公開番号第2003/0044425号に記載されているように調製され得る。

#### 【0105】

上記のような異なるアジュバントの組み合わせもまた、精製された不活性化デング熱ウイルスを含む組成物において用いられ得る。例えば、上記の通り、QS21が3D-MPLと共に製剤化され得る。QS21：3D-MPLの比は、典型的に1:10～10:1、例えば1:5～5:1、及びしばしば実質的に1:1の比である。典型的に、3D-MPLのQS-21に対する比は2.5:1～1:1の範囲である。任意に、かかる組み合わせはリポソームの形態であり得る。

#### 【0106】

他の組み合わせアジュバント製剤は、3D-MPL及びアルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムを含む。組み合わせて製剤化される場合には、この組み合わせは抗原特異的Th1免疫応答を高め得る。

#### 【0107】

幾つかの実施形態では、アジュバントは、油と水のエマルション、例えば水中油エマルションを含む。水中油エマルションの一例は、代謝可能な油、例えばスクアレン及び界面活性剤、例えばソルビタントリオレエート(Span 85<sup>TM</sup>)又はポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween 80<sup>TM</sup>)、又はそれらの組み合わせを水性担体中に含む。水性担体は、例えばリン酸緩衝生理食塩水であり得る。幾つかの実施形態では、水中油エマルションは、いかなる追加の免疫刺激剤も含まない（特に、非毒性リビドA誘導体、例えば3D-MPL、又はサポニン、例えばQS21を含まない）。幾つかの実施形態では、水中油エマルションは、トコフェロール等のトコール、例えばアルファ-トコフェロールを含む。さらに、水中油エマルションは、レシチン及び/又はトリカプリリンを含み得る。

#### 【0108】

本発明の他の実施形態では、抗原又は抗原組成物、及び水中油エマルションを含むアジュバント組成物、並びに任意に一以上のさらなる免疫刺激剤を含むワクチン組成物であって、前記水中油エマルションが0.5～1.0mgの代謝可能な油（好適には、スクアレン）、0.4～4mgの乳化剤、及び任意に0.5～11mgのトコール（好適にはトコフェロール、例えばアルファ-トコフェロール）を含む、上記ワクチン組成物が提供される。

#### 【0109】

特定の一実施形態では、アジュバント製剤はエマルション、例えば水中油エマルションの形態で調製される3D-MPLを含む。幾つかの場合では、エマルションはWO 94/21292に開示されるように、直径0.2 μm未満の小さな粒子サイズを有する。例えば、3D-MPLの粒子は、（欧州特許第0 689 454号に記載されているように）0.22ミクロンの膜により滅菌濾過するのに十分に小さいものであり得る。あるいは、3D-MPLはリポソーム製剤として調製され得る。任意に、3D-MPL（又はその誘導体）を含むアジュバントは、さらなる免疫刺激成分もまた含む。

#### 【0110】

アジュバントは、免疫原組成物が投与される集団に安全かつ効果的であるように選択される。成人及び高齢者の集団においては、製剤は乳幼児製剤において典型的に見られるよりも多くのアジュバント成分を典型的に含む。精製された不活性化デング熱ウイルスを含む免疫原組成物が乳幼児への投与のために製剤化される場合は、アジュバントの投与量は乳幼児の被験者において、効果的かつ比較的非反応性であるように決定される。一般に、乳幼児製剤におけるアジュバントの投与量は、成人（例えば、65歳以上の成人）に投与されることが計画される製剤に用いられる投与量より低い（例えば、投与量は成人に投与さ

10

20

30

40

50

れる製剤において使用される投与量の一部であり得る)。例えば、3D-MPLの量は、典型的に用量あたり1 μg～200 μg、例えば10～100 μg、又は10 μg～50 μgである。乳幼児用量は、典型的にこの範囲の下端であり、例えば約1 μg～約50 μg、例えば約2 μg、又は約5 μg、又は約10 μgから約25 μgまで、又は約50 μgまでである。典型的に、QS21が製剤において用いられる場合は、範囲は同等(及び上記比に従う)である。油と水のエマルション(例えば、水中油エマルション)の場合には、子供又は乳幼児に提供されるアジュバントの用量は、成人の被験者に投与される用量の一部であり得る。

#### 【0111】

従って、(任意のアジュバントを含む)製剤化された免疫原組成物は、ヒト被験者への投与に好適であり、許容可能な安全性及び反応性と共に、所望の免疫原特性を有する。典型的に、製剤化される免疫原組成物は、少なくとも0.05ml及び2ml以下、例えば0.5～1.5mlの一回用量において製剤化される。例えば、一回用量は0.5～0.5ml、又は0.1～2ml、又は0.5～1.5ml、例えば0.05ml、0.06ml、0.07ml、0.075ml、0.08ml、0.09ml、0.1ml、0.2ml、0.25ml、0.3ml、0.33ml、0.4ml、0.5ml、0.6ml、0.66ml、0.7ml、0.75ml、0.8ml、0.9ml、1.0ml、1.25ml、1.33ml、1.5ml、若しくは2mlの量、又は任意の中間容量であり得る。

10

#### 【0112】

組成物は様々な経路で投与され得るが、最も一般的には、免疫原組成物は筋肉内、皮下、又は皮内投与経路によって送達される。一般に、ワクチンは、中和抗体の生産及び保護に有効な用量で皮下、皮内、又は筋肉内に投与され得る。ワクチンは、投与製剤に適合性のある方法で、予防及び/又は治療に有効な量で投与される。一般に用量あたりの各不活性化ウイルス株が0.05～100 μgの範囲内である投与量は、治療される被験者、被験者の抗体を合成する免疫系の能力、及び望ましい保護の程度に依存する。投与されるワクチンの正確な量は、開業医の判断に依存し、各被験者に特有であり得る。

20

#### 【0113】

ワクチンは、一回投与スケジュール、又は好適には、ワクチン投与の第一の過程が1～10のわかった投与であり、それに続いて免疫応答を維持及び/又は強化するための間隔をあけた他の投与、例えば1～4か月目に第二の投与、及び必要に応じて、数ヶ月又は数年後に後の投与を行う複数投与スケジュールで投与され得る。投与計画もまた、少なくとも部分的に、個人の必要によって決定され、開業医の判断に任される。好適な免疫処置スケジュールの例として:第一の投与、続いて7日～6か月の第二の投与、及び任意に最初の免疫処置後1か月～2年目の第三の投与、又は保護免疫を与えると考えられるウイルス中和抗体の力価を高めるのに十分な他のスケジュール、例えば確立された小児科ワクチンスケジュールに対応するように選択されるスケジュールが挙げられる。不活性化ウイルスによるデング熱に対する保護免疫の発生は、1～3の接種からなる第一の免疫処置過程後であることが、合理的に考えられる。これは、保護免疫の十分なレベルを維持するように設計された、間隔をあけた(例えば2年ごとの)追加免疫によって補充され得る。

30

#### 【実施例】

#### 【0114】

以下の実施例は、幾つかの特定の特徴及び/又は実施形態を記載するために提供される。これらの実施例は、本発明を記載される特定の特徴又は実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。量、例えば容量は、例としてのみ記載され、スケールは当業者の選択で修飾(増加又は減少)され得ると、当業者に理解されるだろう。同様に、精製で用いられる要素、例えばフィルター、カラムは、少しも限定又は排他的であることを意図せず、当業者の裁量により、同じ目的を達成する他の要素によって置換され得る。

40

#### 【0115】

#### 実施例1: 精製された不活性化デング熱ウイルスを生産するための精製工程

デング熱ウイルスを、本質的にWO 2010/094663に記載されているように、Vero細胞で増殖させ精製する。例えば、デング熱ウイルスを、例えば動物質を含まない培地でVero細胞で増殖させる。典型的に、細胞を(例えば、Tフラスコ又は細胞工場において)動物質を

50

含まない (AF) 培地、例えばInvitrogenから市販のVPSFM培地で定常前培養期に保つ。その後、細胞を、典型的にマイクロキャリア ( 例えばシトデックス (cytadex) 1 ) に付着させてバイオリアクターで増殖させ、灌流又はバッチモードのいずれかで、供給する。細胞が好適な密度に達したら、血清含有 ( 例えば1.5% ) 又はAF培地のいずれかにおいて、細胞を好適なMOI ( 例えば、0.01~0.1、例えば0.05 ) でウイルスに感染させる。血清含有培地を用いる場合は、( 典型的に約2日間の ) 最初の感染期の後、培地を典型的にAF培地へ交換する。任意に、AF培地には最初に又は定期的にグルコース、又はアミノ酸等を補充する。

【 0 1 1 6 】

ウイルス増殖に好適な期間、例えば最小で6~8日間の後、ウイルスを細胞から回収する。任意に、ウイルスを、感染後約6日から始めて、間隔 ( 例えば2日の間隔 ) をあけて徐々に回収してもよい。

【 0 1 1 7 】

代表的な精製工程を、図2Aに模式的に示す。改変した精製工程を、図2Bに模式的に示す。図2Aの工程と本質的には類似するが、図2Bのプロセスは以下の変更を含む。ホルムアルデヒドによる不活性化の後、亜硫酸水素ナトリウムの添加によるバルク内の遊離のホルマリンを中和するステップが除かれている。亜硫酸水素ナトリウム中和の排除は、後の濾過ステップにおける収率を有意に増加させる。遊離のホルマリンは、透析濾過ステップにより除かれる。

【 0 1 1 8 】

代替の精製工程を、図2C及び2Dに示す。回収後、ウイルスを含む培地を、典型的に、段階的に減少する孔サイズ ( 例えば、8 μ、0.6 μ、0.45 μ、0.2 μ ) を通過させることによって浄化する。その後、例えば限外濾過及び透析濾過によって、続いてさらなる濾過及び、例えばセファクリルS-400HR又はセファロース4FF樹脂を用いるサイズ排除クロマトグラフィー ( SEC ) によってウイルス懸濁液を濃縮し、培地を緩衝液に交換する。任意に、さらなる処理の前に、濃縮ステップの前又は後のいずれかに、浄化したウイルス懸濁液をUV照射 ( 100~500、例えば200J/m<sup>2</sup> ) への曝露により不活性化する。任意に、サイズ排除クロマトグラフィーステップの後に一以上のステップ、例えば残余のDNAを取り除くためのサルトバインド ( Sartobind ) -Qメンブレンクロマトグラフィー及び濾過が続き得る。一般に残余のDNAは、μgタンパク質あたり100pgDNA以下まで ( 又は100pg / 用量未満まで ) 減少させることが望ましい。

【 0 1 1 9 】

その後、ウイルスを、典型的に室温で7~10日間の ( 約100 μg/ml の ) ホルムアルデヒドへの曝露により不活性化する。任意に、懸濁液を中間時点、例えば2、3、4、又は5日目に、凝集物を除き、ホルムアルデヒドへの曝露を改善するために ( 例えば、0.22 μで ) 濾過する。不活性化の後、限外濾過 / 透析濾過の前に、ホルムアルデヒドを除き、精製された不活性化デング熱ウイルスを保管に好適な緩衝液に配置するために、ポロキサマー界面活性剤を緩衝液に添加してもよい。その後、精製された不活性化デング熱ウイルスは不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物として保管する前に最終的に滅菌濾過される。任意に、スクロースがバルク調製物の最終製剤に添加される。

【 0 1 2 0 】

実施例 2：代表的な免疫原組成物の製剤

精製された不活性化デング熱ウイルスの製剤を、保管、凍結乾燥、及び後の取扱いの間の製品の損失という問題を解決するために、様々な条件で評価した。不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物製剤 ( 株あたり3.3 μg/ml ) において、以下の変数を評価した：注射用水における、5%スクロース、25mM NaClの存在下でのリン酸緩衝液 ( pH 8.5 ) 濃度 ( ( 5、15、30mM ) 、ポロキサマー界面活性剤濃度 ( 0、0.001%、0.2% ) 。バルクを凍結乾燥し、0.625mlの再懸濁溶液において再構成した。製剤化工程を、図3Aに模式的に示す。リン酸緩衝液をトリス緩衝液に置換し、凍結乾燥前に0.5~1.0mlの一回用量を生じるために単位用量を減少させる代替の製剤化法を図3Bに示す。容量の調整及び緩衝液の変更は、独立

10

20

30

40

50

変数であり、いずれか又は両方の変更が、別々に、又は連続してなされ得ると理解されるだろう。

【0121】

乾燥させたケーキの安定性を、7日間の4 及び37 でのインキュベーションの後に評価した。ケーキの外観及び乾燥製品の残余湿度を評価した。その後、凍結乾燥したケーキをNaCl、又は他の緩衝液で再構成し、pHの安定性を評価した。0.625mlの再懸濁溶液による再構成の後に2.4倍の濃縮率を生じる1.5mlの凍結乾燥前容量を用いた。生じた再懸濁免疫原組成物を、ケーキの質について、内部蛍光280/320nm、窒素含量、ELISA、動的光散乱、比濁分析、pH、及び浸透圧により分析した。

【0122】

代表的な結果を図4A～Bに示す。

【0123】

これらの結果は、0.001%～0.2%の界面活性剤（ルトロール<sup>TM</sup>）濃度で、試験した全ての再懸濁溶液において、タンパク質の完全な回収が生じたことを証明している。これは、界面活性剤の非存在下のタンパク質含量の損失と対照をなす。理論によって拘束されるものではないが、界面活性剤の非存在下のタンパク質の損失は、バイアルへの非特異的吸着により、これが好適な界面活性剤の添加によって防がれたと考えられる。0.2%の濃度で、界面活性剤はウイルス粒子の凝集もまた防いだ。

【0124】

緩衝液濃度及び再懸濁溶液の組成は、最初の産物の回収率に全く影響を与えたなかった。

【0125】

ELISAによる免疫学的評価は、凍結乾燥及び再構成の後に不活性化デング熱ウイルスの免疫学的エピトープが維持されていたことを証明する。凍結乾燥及び再構成に関するさらなる詳細を、実施例3に記載する。

【0126】

実施例3：バルク調製物の凍結乾燥及び免疫原組成物への再構成

上記のように、及び図3Bに示すように、精製された不活性化デング熱ウイルスを、以下に従ってバルク調製物に製剤化した：5%スクロース、1～31mMトリス緩衝液、15mM NaCl、0.015～0.2%ポロキサマー188、及び4つの株のそれぞれについて1.25 μg / 株の精製された不活性化デング熱ウイルス。凍結乾燥のために、バルク調製物を0.5mlの一定分量に分配した。その後、バルク調製物を以下の74時間凍結乾燥サイクルにより凍結乾燥させた：1気圧(Atm)で1時間 -52 で凍結させ；45 μbarで以下の通り第一の乾燥：1) -52 ~ -32 で3時間冷却；2) 32 で32時間；3) 10分で1 ずつ低下の温度の連続的な減少とそれに続く2時間25分の維持期間（合計7時間55分）；4) -28 で9時間；以下の第二の乾燥：45 μbarでの9時間にわたる-28 から37 への温度上昇及びそれに続く27 μbarで37 12時間。その後、凍結乾燥させたサンプルを、2～8 に平衡化し、サイクルを終了させた。生じた凍結乾燥産物（「ケーキ」）を、再水和の後に室温で24時間若しくは37 で1か月若しくは-20 で3か月、又は凍結乾燥形態で4 で5か月インキュベートし、安定性を評価した。

【0127】

選択された緩衝液0.625mlに再構成する際に、免疫原組成物において生じる濃度は、以下の通りであった：4%スクロース、0.8～24.8mMリン酸、12mM NaCl、0.012-0.16%ポロキサマー188、2.0 μgの精製された不活性化デング熱ウイルス。生じた免疫原組成物を、質、安定性、及び免疫原性について以下の評価項目により評価した：内部蛍光、DLS、比濁分析、pH、浸透圧、及びELISA。代表的な結果を、図5A～Cに示す。図6A及び6Bは、界面活性剤の存在及び非存在下における凍結乾燥調製物の緩衝液における再構成の際の安定特性（それぞれ内部蛍光及びELISA）を図表的に示す。全てのデータは、界面活性剤を含まない製剤と比べて、界面活性剤を含む製剤において回収率の明瞭な増加があったと考えられる値である。試験した範囲において、緩衝液(Tris)濃度の影響は全く観察されなかった。同様の結果は、（様々なアジュvantを含む投与に好適な液体免疫原組成物を得るため

10

20

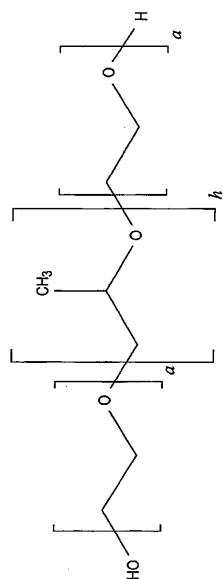
30

40

50

の)様々な再構成緩衝液において見られた。これらの結果は、ポロキサマー界面活性剤及びpHを中性以上に保つ緩衝液の存在下における凍結乾燥及び再構成が、様々な緩衝液組成物において好適な安定性及び免疫原性をもたらしたことを証明する。

【図1】



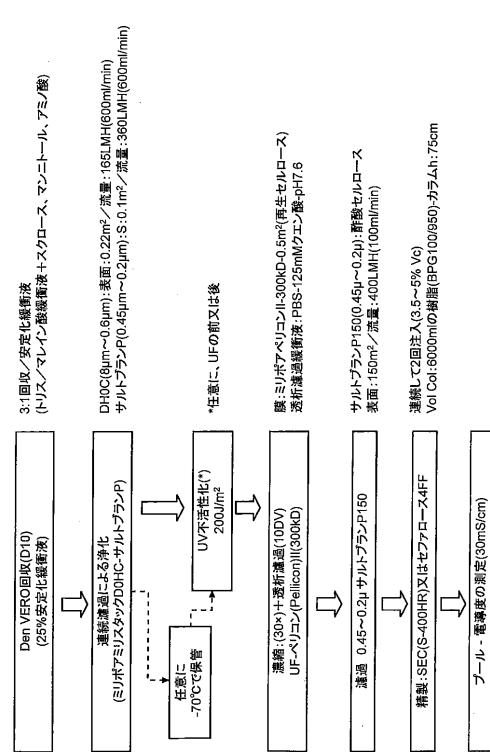
【図2 A】



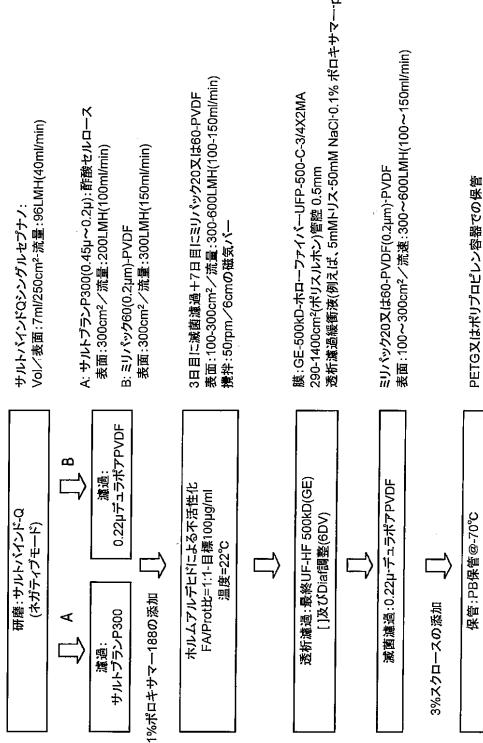
【 図 2 B 】



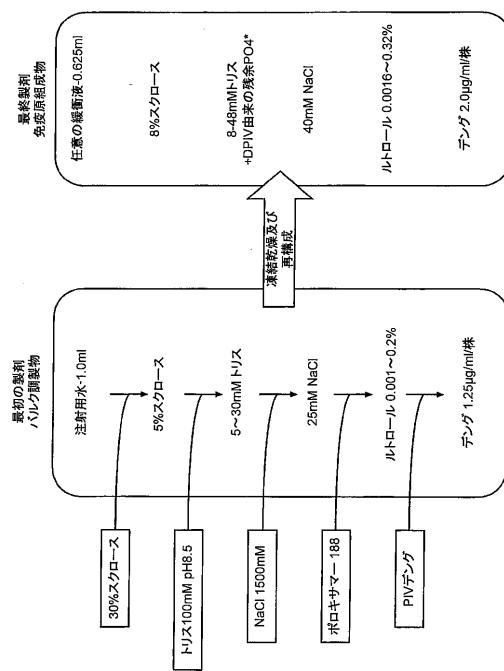
【図2C】



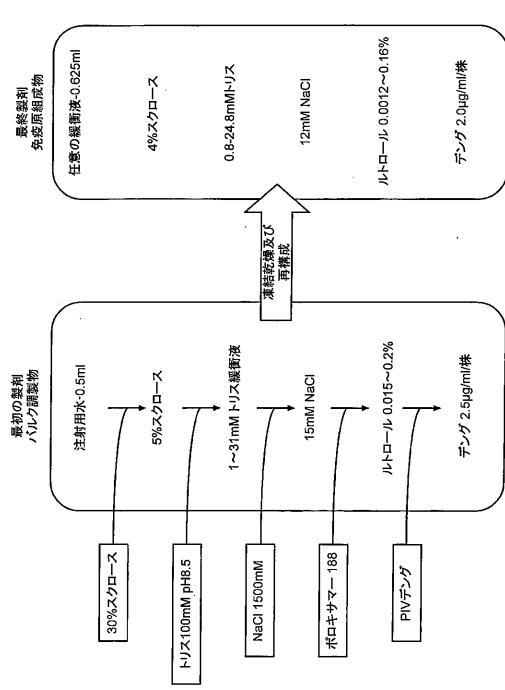
【 図 2 D 】



### 【図3A】



【 図 3 B 】



【 図 4 B 】

【図4A】

サンプル	再構成後の濃度(µg/ml)	ELISA回収率						ELISA回収率
		T74°C (NC)	T74°C (C)	T74°C (F)	T74°C (NC)	T74°C (C)	T74°C (F)	
625µlでの再構成	群	組成物	%	%	%	%	%	%
1. DEN-11-08-01	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.2%	To ASO	8	164	115	155	119	119
2. DEN-11-08-02	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.2%	NaCl 150µM	8	166	111	177	128	102
3. DEN-11-08-03	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.2%	NaCl 150µM	8	155	124	124	126	87
4. DEN-11-08-04	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.05%	To ASO-133	8	141	53	133	150	75
5. DEN-11-08-05	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.05%	To ASO	8	146	84	159	168	97
6. DEN-11-08-06	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.2%	To ASO	8	195	119	168	150	141
7. DEN-11-08-07	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.2%	NaCl 150µM	8	119	58	75	133	80
8. DEN-11-08-08	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.2%	To ASO-133	8	159	115	150	137	102
9. DEN-11-08-09	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.05%	NaCl 150µM	8	102	35	31	128	62
10. DEN-11-08-10	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.05%	To ASO-133	8	159	133	141	190	168
11. DEN-11-08-11	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.05%	To ASO	8	150	84	97	155	84
12. DEN-11-08-12	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.001%	To ASO	8	164	146	166	177	131
13. DEN-11-08-13	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.001%	To ASO-133	8	133	62	111	181	106
14. DEN-11-08-14	H2S 30µM, 小豆ローリー 0.12%	To ASO	8	155	133	146	153	109
15. DEN-11-08-15	H2S 5µM, 小豆ローリー 0.05%	To ASO-133	8	141	75	128	168	146
16. DEN-11-08-16	7-アミノ-7-アミノヘキサ	NaCl 150µM	8	4	4	4	4	4
17. CTx-TR-Fab	8P EDTA		30	77	30	77	87	87

【図5A】

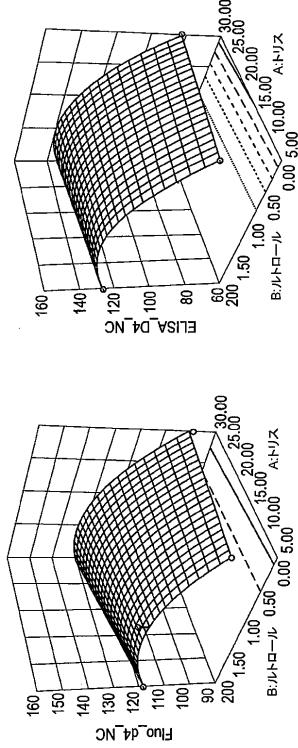
【図 5 B】

サンプル	組成物	DLS (Wett)									
		62.5%の 再構成	T0 (NF)	T0 (F)	T24h RT (NF)	T24h RT (F)	Tm37C (NF)	Tm37C (F)	Tm44C (NF)	Tm44C (F)	
		Ø mm	Ø mm	Ø mm	Ø mm	Ø mm	Ø mm	Ø mm	Ø mm		
1	NaCl	138	123	130	158	123	153	121	151	168	97
2	DEN1-1501 1.5% 15mM ルートル 0.15%	145	126	126	157	125	159	150	150	150	107
3	NaCl 25mM	106	126	126	158	122	157	151	151	151	108
4	亜硫酸水素ナトリウム 25mM	322	263	322	391	239	355	342	342	342	12
5	NaCl 10°C 50min	138	135	135	155	134	176	181	181	181	105
6	DEN1-1502 1.5% 20d-25mM NaCl	NaCl	2	2	2	2	2	2	2	2	
7	PBDEN1		115	141							117
8	PBDEN2		142	125							122
9	PBDEN3		121	112							132
10	PBDEN4		154	145							190
11	PBDENX		136	170							173
											152

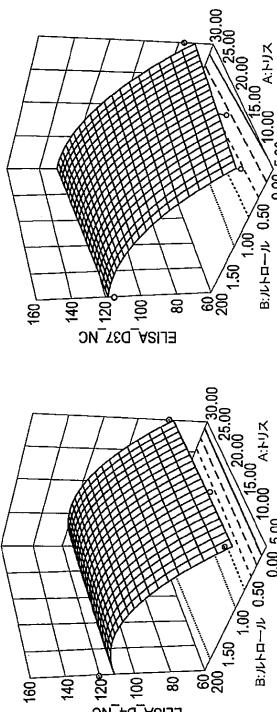
【図 5 C】

サンプル	組成物	RESULTS En (ml)								
		T0	T10	T24h RT	Tm37C	Tm44C	T24h RT	Tm37C	Tm44C	
1	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl	2.69	2.01	2.44	2.35	1.88	1.97	2.64	2.64	
2	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-5	2	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	
3	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-6	2	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19	
4	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-7	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
5	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-8	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
6	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-9	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
7	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-10	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
8	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-11	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
9	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-12	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
10	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-13	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
11	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-14	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
12	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-15	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
13	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-16	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
14	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-17	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
15	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-18	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
16	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-19	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
17	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-20	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
18	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-21	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
19	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-22	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
20	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-23	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	
21	1.5% 15mM NaCl + 0.15% 亜硫酸水素ナトリウム + 25mM NaCl + ASPE-24	2	1.41	2.07	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	

【図 6 A】



【図 6 B】



5-再構成前の  
インキュベーション  
15mA4Cケーブル

1-サンプル

6-再構成後の  
インキュベーション  
15mA4Cケーブル

4-再構成後の  
組成物  
1g/ml

3-再構成前の  
組成物  
1g/ml

2-再構成前の  
組成物  
1g/ml

7-サンプル

8-再構成後の  
組成物  
1g/ml

9-再構成前の  
組成物  
1g/ml

10-サンプル

11-サンプル

12-サンプル

13-サンプル

14-サンプル

15-サンプル

16-サンプル

17-サンプル

18-サンプル

19-サンプル

20-サンプル

21-サンプル

22-サンプル

23-サンプル

24-サンプル

25-サンプル

26-サンプル

27-サンプル

28-サンプル

29-サンプル

30-サンプル

31-サンプル

32-サンプル

33-サンプル

34-サンプル

35-サンプル

36-サンプル

37-サンプル

38-サンプル

39-サンプル

40-サンプル

41-サンプル

42-サンプル

43-サンプル

44-サンプル

45-サンプル

46-サンプル

47-サンプル

48-サンプル

49-サンプル

50-サンプル

51-サンプル

52-サンプル

53-サンプル

54-サンプル

55-サンプル

56-サンプル

57-サンプル

58-サンプル

59-サンプル

60-サンプル

61-サンプル

62-サンプル

63-サンプル

64-サンプル

65-サンプル

66-サンプル

67-サンプル

68-サンプル

69-サンプル

70-サンプル

71-サンプル

72-サンプル

73-サンプル

74-サンプル

75-サンプル

76-サンプル

77-サンプル

78-サンプル

79-サンプル

80-サンプル

81-サンプル

82-サンプル

83-サンプル

84-サンプル

85-サンプル

86-サンプル

87-サンプル

88-サンプル

89-サンプル

90-サンプル

91-サンプル

92-サンプル

93-サンプル

94-サンプル

95-サンプル

96-サンプル

97-サンプル

98-サンプル

99-サンプル

100-サンプル

101-サンプル

102-サンプル

103-サンプル

104-サンプル

105-サンプル

106-サンプル

107-サンプル

108-サンプル

109-サンプル

110-サンプル

111-サンプル

112-サンプル

113-サンプル

114-サンプル

115-サンプル

116-サンプル

117-サンプル

118-サンプル

119-サンプル

120-サンプル

121-サンプル

122-サンプル

123-サンプル

124-サンプル

125-サンプル

126-サンプル

127-サンプル

128-サンプル

129-サンプル

130-サンプル

131-サンプル

132-サンプル

133-サンプル

134-サンプ

**【手続補正書】**

【提出日】平成26年1月28日(2014.1.28)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

**【補正の内容】**

【特許請求の範囲】

**【請求項1】**

—以上の精製された不活性化デング熱ウイルス；

緩衝剤；及び

ポロキサマー界面活性剤

を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項2】**

アジュバントをさらに含む、請求項1に記載の免疫原組成物。

**【請求項3】**

アジュバントがアルミニウム塩、場合により水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムの少なくとも一つを含む、請求項2に記載の免疫原組成物。

**【請求項4】**

少なくとも一つの追加の免疫刺激成分をさらに含む請求項3に記載の免疫原組成物であって、場合により該少なくとも一つの追加の免疫刺激成分が、油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの一以上を含む、上記免疫原組成物。

**【請求項5】**

アジュバントが、場合により油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドからなる群より選択される一以上の免疫刺激成分を含む、アルミニウムを含まないアジュバントである、請求項2に記載の免疫原組成物。

**【請求項6】**

アルミニウム塩に吸着された少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルス；

緩衝剤；及び

界面活性剤

を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項7】**

場合により油と水のエマルション、リポソーム、リポ多糖、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの一以上を含む、少なくとも一つの追加の免疫刺激成分をさらに含む、請求項6に記載の免疫原組成物。

**【請求項8】**

—以上の免疫刺激成分が、3-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)、QS21、少なくとも一つの非メチル化CpGを含むDNAオリゴヌクレオチド、及び／又はリポソームを含む、請求項4、5、及び7のいずれか1項に記載の免疫原組成物。

**【請求項9】**

界面活性剤が筋肉内、皮下、経皮、又は皮内投与に適している、請求項1～8のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項10】**

界面活性剤が、ポロキサマー、15-ヒドロキシステアリン酸マクロゴール、ポリソルベート、オクトキシノール、ポリドカノール、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシルヒマシ油、N-オクチル-グルコシド、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1～9のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

**【請求項11】**

ポロキサマー界面活性剤が、少なくとも4500kD及び／又は15000kD以下の分子量を有する、請求項1～10のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項12】

界面活性剤が、少なくとも0.001% (w/v) 及び／又は1.0% (wt/v) 以下の量で存在する、請求項1～11のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項13】

異なる血清型の複数の精製された不活性化デング熱ウイルスを含み、場合によりDEN-1、DEN-2、DEN-3、及びDEN-4に対する免疫応答をそれぞれ惹起する複数のウイルスを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項14】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルスが、弱毒化デング熱ウイルス、組み換えデング熱ウイルス、又は第一のデング熱ウイルス核酸及び第二のフラビウイルス核酸を含むキメラウイルスである、請求項1～13のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項15】

緩衝剤が、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、及びトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの一以上を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項16】

緩衝剤が、液体組成物のpHをpH6.4以上に保つ、請求項1～15のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項17】

ガラス形成糖及びガラス形成ポリオールの少なくとも一つをさらに含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物であって、場合により該ガラス形成糖又はポリオールがスクロース、トレハロース、マンノース、マンニトール、ラフィノース、ラクチトール、ソルビトール及びラクトビオン酸、グルコース、マルツロース、イソ-マルツロース、ラクツロース、マルトース、ラクトース、イソ-マルトース、マルチトール、パラチニット、スタキオース、メレジトース、デキストラン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される、上記バルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項18】

ヒト被験者への投与のために製剤化されている、請求項1～17のいずれか1項に記載の免疫原組成物。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか1項に記載の不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物であって、一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスが化学的不活性化剤、物理的不活性化、及び照射による不活性化の少なくとも一つによって不活性化され、場合によりホルムアルデヒド、ベータプロピオラクトン(BPL)、過酸化水素、紫外線照射、及びガンマ線照射の少なくとも一つへの曝露によって不活性化されている、上記バルク調製物又は免疫原組成物。

【請求項20】

少なくとも一つの精製された不活性化デング熱ウイルス；及び  
ポロキサマー界面活性剤

を含む、不活性化デング熱ウイルスの凍結乾燥調製物。

【請求項21】

緩衝剤及び界面活性剤を含む溶液を準備するステップ；及び  
該溶液を一以上の精製された不活性化デング熱ウイルスと混合するステップ

を含む、不活性化デング熱ウイルスのバルク調製物又は免疫原組成物を製剤化する方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/059879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K39/12 A61K47/10  
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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/094663 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BARAS BENOIT [BE]; GHEYSEN DIRK [BE];) 26 August 2010 (2010-08-26) cited in the application paragraphs [0010], [0020], [0025], [0031], [0038], [0040] - [0044], [0048] - [0051], [0066], [0072]; examples 1-3 -----	1-119
Y	SULI J ET AL: "Experimental squalene adjuvant - I. Preparation and testing of its effectiveness", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 22, no. 25-26, 3 September 2004 (2004-09-03), pages 3464-3469, XP004526924, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2004.02.023 the whole document ----- -/-	1-119

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29 August 2012

06/09/2012

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/EP2012/059879

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 254 873 B1 (PUTNAK J ROBERT [US] ET AL) 3 July 2001 (2001-07-03) abstract column 5, line 56 - column 6, line 57 examples 3,4 -----	1-119
A	US 2008/248551 A1 (STINCHCOMB DAN T [US] ET AL) 9 October 2008 (2008-10-09) claims 1,8,12; examples 1-3 -----	1-119
Y	ROBERT PUTNAK J ET AL: "An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 23, no. 35, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 4442-4452, XP027651869, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2005-08-15] abstract page 4443, column 2, paragraph 1 page 4444, column 1, paragraph 4 -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	ASCARATEIL S ET AL: "Surfactants in vaccine adjuvants: description and perspectives", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 24, 12 April 2006 (2006-04-12), pages S83-S85, XP028010943, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.01.134 [retrieved on 2006-04-12] the whole document -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	NEWMAN M J ET AL: "USE OF NONIONIC BLOCK COPOLYMERS IN VACCINES AND THERAPEUTICS", CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US, vol. 15, no. 2, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 89-142, XP009002052, ISSN: 0743-4863 abstract page 101, paragraph 3 page 102, paragraph 3 - page 107 -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	US 2011/014233 A1 (KOCHEL TADEUSZ J [US] ET AL) 20 January 2011 (2011-01-20) paragraph [0043] -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2012/059879

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 059879

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8, 18-20, 50-67, 84-86(completely); 9-17, 21-49, 68-83, 87-119(partially)

immunogenic composition comprising one or more purified inactivated Dengue viruses, a buffering agent and a poloxamer surfactant.

---

2. claims: 9-17, 21-49, 68-83, 87-119(all partially)

immunogenic composition comprising one or more purified inactivated Dengue viruses adsorbed onto an aluminium salt , a buffering agent and a surfactant.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2012/059879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010094663 A1	26-08-2010	AR 075437 A1 AU 2010215595 A1 CA 2752809 A1 CN 102395600 A EP 2398821 A1 KR 20110132379 A PE 09922011 A1 SG 173194 A1 TW 201043245 A US 2011318407 A1 UY 32457 A WO 2010094663 A1	30-03-2011 25-08-2011 26-08-2010 28-03-2012 28-12-2011 07-12-2011 12-02-2012 29-09-2011 16-12-2010 29-12-2011 31-01-2011 26-08-2010
US 6254873 B1	03-07-2001	NONE	
US 2008248551 A1	09-10-2008	AU 2008279576 A1 CA 2720570 A1 CN 101679954 A CO 6260150 A2 CU 20090169 A7 EP 2144998 A1 JP 2010523127 A KR 20100016294 A US 2008248551 A1 WO 2009014774 A1	29-01-2009 29-01-2009 24-03-2010 22-03-2011 21-06-2012 20-01-2010 15-07-2010 12-02-2010 09-10-2008 29-01-2009
US 2011014233 A1	20-01-2011	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 47/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/02
<b>A 6 1 K 47/18</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/18
<b>A 6 1 K 47/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/12
<b>A 6 1 K 47/36</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 47/36
<b>A 6 1 P 31/14</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/14

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100125508

弁理士 藤井 愛

(72)発明者 ヘンドリックス, ヴェロニク

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ル ピュッシー, オリヴィエ

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ルモアーヌ, ドミニク, イングリッド

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 マトー, フレデリク

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4C076 AA11 BB11 BB15 BB16 BB31 CC35 DD26 DD37 DD38 DD50

DD51 DD67 DD69 EE17 EE23 FF61 FF70

4C085 AA03 AA38 BA51 BA99 CC08 DD02 DD03 DD10 DD62 EE01

FF01 FF02 FF11 FF14 GG03 GG04 GG05