

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-500873

(P2023-500873A)

(43)公表日 令和5年1月11日(2023.1.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	7/02 (2006.01)	C 1 2 N	7/02	4 C 0 8 5	
C 1 2 N	7/06 (2006.01)	C 1 2 N	7/06		
A 6 1 K	39/145(2006.01)	A 6 1 K	39/145		
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全34頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-525700(P2022-525700)				
(86)(22)出願日	令和2年11月6日(2020.11.6)				
(85)翻訳文提出日	令和4年6月10日(2022.6.10)				
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/000961				
(87)国際公開番号	WO2021/090067				
(87)国際公開日	令和3年5月14日(2021.5.14)				
(31)優先権主張番号	62/931,909				
(32)優先日	令和1年11月7日(2019.11.7)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	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, 最終頁に続く				
(71)出願人	517323533 セキラス ユーケー リミテッド Seqirus UK Limited イギリス国 SL 6 8AA バークシャー、メイデンヘッド、マーケット ストリート 29、レベル 3、ポイント Point, Level 3, 29 Market Street, Maidenhead, Berkshire, England SL 6 8AA				
(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策				
(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹				
(74)代理人	100181674 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 低減した粒度を有するウイルスワクチンを生成するための組成物および方法

(57)【要約】

低減した粒度を有するウイルスワクチンを生成する、特に、インフルエンザウイルスワクチンの生成における使用のための方法および組成物が、本明細書で開示される。上記方法は、a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびにc. 前記サブビリオンを精製する工程を包含し、前記工程bは、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程、

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

10

【請求項 2】

前記試薬は、塩をさらに含み、ここで前記塩は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サブビリオンの平均流体力学的半径は、150 nm～350 nm の範囲に及ぶ、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g/L ポリソルベート 80、例えば、少なくとも約 1.5 g/L、少なくとも約 2.0 g/L、または少なくとも約 2.5 g/L を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド (CTAB) を含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記イオン性界面活性剤は、約 1.25 g/L～3.0 g/L CTAB、例えば、約 1.5 g/L、約 2.0 g/L、約 2.5 g/L、または約 3.0 g/L を含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記塩は、0～200 mM NaCl、例えば、約 25 mM、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 125 mM、約 150 mM、または約 175 mM を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含み、前記イオン性界面活性剤は、CTAB を含み、前記塩は、塩化ナトリウム NaCl を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

工程 c の精製する工程は、吸着濾過を含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

吸着濾過スループットは、少なくとも約 50 L/m²、例えば、少なくとも約 100 L/m²、少なくとも約 150 L/m²、少なくとも約 200 L/m²、少なくとも約 200 L/m²、少なくとも約 300 L/m²、または少なくとも約 350 L/m² である、

50

請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サブビリオンの粒度は、約 500 nm 未満、例えば、約 400 nm 未満、約 300 nm 未満、約 200 nm 未満、または約 150 nm 未満である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記サブビリオンの粒度は、流体力学的半径である、請求項 1～13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サブビリオンのサイズは、動的光散乱法（DLS）によって測定される、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割する前に 0.3 g/L である、請求項 4～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0～2.2 g/L の範囲で増大する、請求項 4～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0.3 g/L、1.4 g/L、または 2.5 g/L である、請求項 4～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

0～25 mM の範囲に及ぶ NaCl の濃度は、増大した濾過スループットと関連する、請求項 8～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

ウイルス粒度を低減する方法であって、前記方法は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 23】

前記試薬は、塩をさらに含み、ここで前記塩は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含む、請求項 22～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g/L ポリソルベート 80、例えば、少なくとも約 1.5 g/L、少なくとも約 2.0 g/L、または少なくとも約 2.5 g/L を含む、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド（CTAB）を含む、請求項 22～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記イオン性界面活性剤は、約 1.25 g/L～3.0 g/L CTAB、例えば、約 1.5 g/L、約 2.0 g/L、約 2.5 g/L、または約 3.0 g/L を含む、請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む、請求項 22～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記塩は、25～200mM NaCl、例えば、約50mM、約75mM、約100mM、約125mM、約150mM、または約175mMを含む、請求項 22～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート80を含み、前記イオン性界面活性剤は、CTABを含み、前記塩は、塩化ナトリウム NaCl を含む、請求項 22～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記処理したウイルス粒子を、吸着フィルターを通して濾過する工程をさらに包含する、請求項 22～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記吸着フィルターのスループットは、少なくとも約50L/m²、例えば、少なくとも約100L/m²、少なくとも約150L/m²、少なくとも約200L/m²、少なくとも約250L/m²、少なくとも約300L/m²、または少なくとも約350L/m²である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ウイルス粒度は、約500nm未満、例えば、約400nm未満、約300nm未満、約200nm未満、または約150nm未満である、請求項 22～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記ウイルス粒度は、前記ウイルス粒子の流体力学的半径である、請求項 22～33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記ウイルス粒度は、動的光散乱法 (DLS) によって測定される、請求項 22～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する、請求項 22～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 37】

前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する、請求項 22～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

前記ポリソルベート80の濃度は、分割する前に0.3g/Lである、請求項 24～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

前記ポリソルベート80は、分割している間に0～2.2g/Lの範囲で増大する、請求項 24～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記ポリソルベート80の濃度は、分割している間に0.3g/L、1.4g/L、または2.5g/Lである、請求項 24～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

0～25mMの範囲に及ぶNaClの濃度は、増大した濾過スループットと関連する、請求項 28～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

インフルエンザウイルス精製プロセスにおいてウイルス粒度を低減する方法であって、前記方法は、

50

a. 細胞培養物から採取したウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 4 3】

サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 4 4】

サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. M D C K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 4 5】

前記試薬は、塩をさらに含み、前記塩は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、請求項 4 2 ～ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 を含む、請求項 4 2 ～ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g / L ポリソルベート 8 0、例えば、少なくとも約 1.5 g / L、少なくとも約 2.0 g / L、または少なくとも約 2.5 g / L を含む、請求項 4 2 ～ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む、請求項 4 2 ～ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記塩は、25 ～ 200 mM NaCl、例えば、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 125 mM、約 150 mM、または約 175 mM を含む、請求項 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ポリソルベート 8 0 の濃度は、分割する前に 0.3 g / L である、請求項 4 6 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0 ～ 2.2 g / L の範囲で増大する、請求項 4 6 ～ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0.3 g / L、1.4 g / L、または 2.5 g / L である、請求項 4 6 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

0 ～ 25 mM の範囲に及ぶ NaCl の濃度は、増大した濾過スループットと関連する、請求項 4 8 ～ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製して、精製ウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記塩は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 5 5】

精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで前記イオン性界面活性剤および前記塩は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 5 6】

精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記精製したウイルス粒子をアルキル化剤で処理して、前記ウイルス粒子を不活性化する工程；

c. 前記不活性化したウイルス粒子をイオン性界面活性剤で処理して、前記不活性化したウイルス粒子を分割し、サブビリオンを生成する工程；ならびに

d) 前記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで前記工程 b および／または c のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することをさらに包含し、ここで前記非イオン性界面活性剤および前記イオン性界面活性剤は、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法。

【請求項 5 7】

サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の C T A B、N a C l、およびポリソルベート 8 0 を含む試薬で処理することを包含する、方法。

【請求項 5 8】

前記ポリソルベート 8 0 の濃度は、分割する前に 0 . 3 g / L である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ポリソルベート 8 0 の濃度は、分割している間に 0 ~ 2 . 2 g / L の範囲で増大する、請求項 5 7 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記ポリソルベート 8 0 の濃度は、分割している間に 0 . 3 g / L、1 . 4 g / L、または 2 . 5 g / L である、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

0 ~ 2 5 m M の範囲に及ぶ N a C l の濃度は、増大した濾過スループットと関連する、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. M D C K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1 . 5 ~ 2 . 5 g / L C T A B、0 ~ 1 5 0 m M N a C l、および 0 ~ 2 . 2 g / L ポリソルベート 8 0 を含む試薬で処理することを包含する方法。

【請求項 6 3】

サブビリオン形態で製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. M D C K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、前記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1 . 5 ~ 2 . 5 g / L のイオン性界面活性剤、0 ~ 1 5 0 m M の塩、および 0 ~ 2 . 2 g / L の非イオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含する、方法。

【請求項 6 4】

前記イオン性界面活性剤は、C T A B である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記塩は、N a C l である、請求項 6 3 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 である、請求項 6 3 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記ポリソルベート 8 0 の濃度は、分割する前に 0 . 3 g / L である、請求項 6 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0 ～ 2.2 g / L の範囲で増大する、請求項 66 ～ 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

前記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0.3 g / L、1.4 g / L、または 2.5 g / L である、請求項 66 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

0 ～ 25 mM の範囲に及ぶ NaCl の濃度は、増大した濾過スループットと関連する、請求項 65 ～ 69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 71】

サブビリオン形態において製剤化されるインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、前記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 前記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 前記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで前記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、前記ウイルス粒子を、表 1 の条件 1 ～ 27 からなる群より選択される量の CTAB、NaCl、およびポリソルベート 80 を含む試薬で処理することを包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

開示の分野

低減した粒度を有するウイルスワクチンを生成するための組成物および方法が開示される。

【背景技術】

【0002】

背景

ウイルスワクチン中の抗原は、精製された構成要素（例えば、組換えウイルスタンパク質）またはそれらの毒性を喪失するように改変されたウイルス（例えば、不活性化ウイルス）のフラグメントを含み得る。例えば、いくつかのインフルエンザワクチンは、アルキル化剤での処理によって不可逆的に不活性化され、それによって、それらのウイルス核酸またはタンパク質が変化したインフルエンザウイルスを含む。抗原性構成要素にもかかわらず、全てのワクチンは、生成後であってそれらが患者に投与され得る前に、広範にわたる処理および精製を受けねばならない。精製はしばしば、上記抗原の生成から生じる不要な副生成物（例えば、宿主細胞の構成要素、またはその方法の間に添加される化学物質）を除去するために、クロマトグラフィーおよび濾過工程を要する。

【0003】

いくつかのインフルエンザワクチンは、生のウイルスを不活性化することによって生成される。ウイルスは、それらが採取され、それらの宿主細胞から精製される前に、病原体非含有の鶏卵または培養した細胞株中で増殖され得る。次いで、上記ウイルスは、熱または化学物質によって不活性化され得、その後、分割工程に供され得、その間に、上記ウイルス粒子は、より小さなサブビリオンを形成するために分解される。分割している間の条件に依存して、サブビリオンは、単分散性および／または所望のサイズを達成しなくてもよい。これらは、下流の精製プロセスに影響を及ぼし得る。例えば、分割している間の塩濃度は、静電荷（electrostatic charge）の不適切な遮蔽を提供し得、サブビリオンユニットが凝集し、より大きな粒子を形成することを引き起こす。次いで、これらの凝集物は、精製カラムを損なう可能性があり、フィルターを詰まらせ、低減したスループット、低い全体的な収率、およびワクチン製造不能をもたらす。従って、特に、季節性インフルエンザワクチンの生成の強化の間に、またはパンデミックの間にフィ

10

20

30

40

50

ルタースルーブットおよび収率を増大させ得る改善されたプロセスが必要とされる。

【0004】

本発明者らは驚くべきことに、分割サブビリオンのサイズが、その粒子を、非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤、および塩からなる群より選択される少なくとも1種の構成要素を含む試薬で処理することによって低減され得ること、およびその場合、上記少なくとも1種の構成要素が、上記サブビリオンの粒度を低減するために有効な量で存在することを見出した。本開示は、低減した粒度を有するウイルスワクチンを生成するために使用され得る方法および組成物を提供する。本開示はまた、ウイルス粒子を分割して、サブビリオンを形成するための方法および組成物を提供し、インフルエンザウイルスワクチンの生成におけるそれらの使用を企図する。

10

【0005】

本開示が示すように、サブビリオン粒子の使用は、フィルタースルーブットと逆に相関する。よって、ウイルスワクチン生成の間にフィルタースルーブットおよび収率を増大させる戦略は、分割を経てサブビリオン粒度を低減すること、またはサブビリオンの凝集を防止するために処理の間中理想的な条件を維持することを含み得る。これは、分割工程に関与する条件および試薬（例えば、塩、界面活性剤）の相対的な量を変動させることを含む、本発明の方法および組成物によって達成され得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、低減した粒度を有するウイルスワクチンを生成するための方法および組成物、ならびにウイルス粒子を分割してサブビリオンを形成するための方法および組成物を提供し、インフルエンザウイルスワクチンの生成におけるそれらの使用を企図する。

20

【0007】

本開示は、サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；
b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

30

c. 上記サブビリオンを精製する工程、
を包含し、ここで上記工程bのウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0008】

いくつかの実施形態において、上記試薬は、塩をさらに含み、ここで上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記サブビリオンの平均流体力学的半径は、150 nm ~ 350 nmの範囲に及ぶ。

40

【0010】

いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート80である。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約1.0 g/L ポリソルベート80、例えば、少なくとも約1.5 g/L、少なくとも約2.0 g/L、または少なくとも約2.5 g/Lを含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド（CTAB）を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、約1.25 g/L ~ 3.0 g/L CTAB、例えば、約1.5 g/L、約2.0 g/L、約2.5 g/L、または約3.0 g/Lを含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム（NaCl）を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、0 ~ 200 mM NaCl、例えば、約25 mM、約5

50

0 m M、約 7 5 m M、約 1 0 0 m M、約 1 2 5 m M、約 1 5 0 m M、または約 1 7 5 m M を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 を含み、上記イオン性界面活性剤は、C T A B を含み、上記塩は、塩化ナトリウム N a C l を含む。

【 0 0 1 1 】

方法のいくつかの実施形態において、工程 c の精製する工程は、吸着濾過を含む。いくつかのこのような実施形態において、吸着濾過スループットは、少なくとも約 5 0 L / m²、例えば、少なくとも約 1 0 0 L / m²、少なくとも約 1 5 0 L / m²、少なくとも約 2 0 0 L / m²、少なくとも約 2 0 0 L / m²、少なくとも約 3 0 0 L / m²、または少なくとも約 3 5 0 L / m² である。いくつかの他の実施形態において、上記サブビリオンの粒度は、約 5 0 0 n m 未満、例えば、約 4 0 0 n m 未満、約 3 0 0 n m 未満、約 2 0 0 n m 未満、または約 1 5 0 n m 未満である。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンの粒度は、流体力学的半径である。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンのサイズは、動的光散乱法 (D L S) によって測定される。

10

【 0 0 1 2 】

方法のいくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する。

【 0 0 1 3 】

本開示はまた、ウイルス粒度を低減する方法であって、上記方法は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記試薬は、塩をさらに含み、ここで上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。

20

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1 . 0 g / L ポリソルベート 8 0、例えば、少なくとも約 1 . 5 g / L、少なくとも約 2 . 0 g / L、または少なくとも約 2 . 5 g / L を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド (C T A B) を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、約 1 . 2 5 g / L ~ 3 . 0 g / L C T A B、例えば、約 1 . 5 g / L、約 2 . 0 g / L、約 2 . 5 g / L、または約 3 . 0 g / L を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム (N a C l) を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、2 5 ~ 2 0 0 m M N a C l、例えば、約 5 0 m M、約 7 5 m M、約 1 0 0 m M、約 1 2 5 m M、約 1 5 0 m M、または約 1 7 5 m M を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 を含み、上記イオン性界面活性剤は、C T A B を含み、上記塩は、塩化ナトリウム N a C l を含む。

30

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、方法は、上記処理したウイルス粒子を、吸着フィルターを通して濾過する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記吸着フィルターのスループットは、少なくとも約 5 0 L / m²、例えば、少なくとも約 1 0 0 L / m²、少なくとも約 1 5 0 L / m²、少なくとも約 2 0 0 L / m²、少なくとも約 2 5 0 L / m²、少なくとも約 3 0 0 L / m²、または少なくとも約 3 5 0 L / m² である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、約 5 0 0 n m 未満、例えば、約 4 0 0 n m 未満、約 3 0 0 n m 未満、約 2 0 0 n m 未満、または約 1 5 0 n m 未満である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、上記ウイルス粒子の流体力学的半径である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、動的光散乱法 (D L S) によって測定される。

40

50

【0016】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する。

【0017】

本開示はまた、インフルエンザウイルス精製プロセスにおいてウイルス粒度を低減する方法であって、上記方法は、

a. 細胞培養物から採取したウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0018】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0019】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0020】

いくつかの実施形態において、上記試薬は、塩をさらに含み、上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g/L ポリソルベート 80、例えば、少なくとも約 1.5 g/L、少なくとも約 2.0 g/L、または少なくとも約 2.5 g/L を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、25 ~ 200 mM NaCl、例えば、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 125 mM、約 150 mM、または約 175 mM を含む。

【0022】

特定の実施形態において、上記非イオン性界面活性剤中の上記ポリソルベート 80 の濃

10

20

30

40

50

度は、ウイルス粒子の不活性化後かつ分割する前に 0.3 g/L を含む。さらなる実施形態では、上記非イオン性界面活性剤中の上記ポリソルベート 80 の濃度は、分割している間に 0 ~ 2.2 g/L の範囲で増大する。従って、分割している間の可能性のある上記ポリソルベート 80 の濃度は、0.3 g/L、1.4 g/L、および 2.5 g/L を含む得る。

【0023】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製して、精製ウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0024】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記イオン性界面活性剤および上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0025】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記精製したウイルス粒子をアルキル化剤で処理して、上記ウイルス粒子を不活性化する工程；

c. 上記不活性化したウイルス粒子をイオン性界面活性剤で処理して、上記不活性化したウイルス粒子を分割し、サブビリオンを生成する工程；ならびに

d) 上記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで上記工程 b および／または c のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することをさらに包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0026】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の C T A B、N a C l、およびポリソルベート 8 0 を含む試薬で処理することを包含する、方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a . M D C K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b . 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c . 上記サブビリオンを精製する工程；

10

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1 . 5 ~ 2 . 5 g / L C T A B、0 ~ 1 5 0 m M N a C l、および 0 ~ 2 . 2 g / L ポリソルベート 8 0 を含む試薬で処理することを包含する方法を提供する。

【 0 0 2 8 】

本開示はまた、サブビリオン形態で製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a . M D C K 細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b . 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c . 上記サブビリオンを精製する工程；

20

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1 . 5 ~ 2 . 5 g / L のイオン性界面活性剤、0 ~ 1 5 0 m M の塩、および 0 ~ 2 . 2 g / L の非イオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含する、方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、C T A B である。いくつかの実施形態において、上記塩は、N a C l である。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 8 0 である。

【 図面の簡単な説明 】

30

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 図 1 A ~ C : D L S によって測定される場合の、種々の分割条件下で生成したインフルエンザ B / V i c t o r i a 系統サブビリオンの平均粒度。C T A B、ポリソルベート 8 0、および N a C l の相対的量を変化させた。

【 0 0 3 1 】

【 図 2 】 図 2 A ~ C : D L S によって測定される場合の、種々の分割条件下で生成したインフルエンザ A H 3 N 2 サブタイプサブビリオンの平均粒度。C T A B、ポリソルベート 8 0、および N a C l の相対的量を変化させた。

【 0 0 3 2 】

【 図 3 】 図 3 A ~ C : D L S によって測定される場合の、種々の分割条件下で生成したインフルエンザ A H 3 N 2 サブタイプサブビリオンの平均粒度。C T A B、ポリソルベート 8 0、および N a C l の相対的量を変化させた。

40

【 0 0 3 3 】

【 図 4 】 図 4 : サブビリオンの粒度の関数としての、サブビリオンの精製の間の吸着フィルターのフィルタースループット。I V R - 1 8 0 および T T 1 3 8 4 と称される H 1 N 1 株が示される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 4 】

詳細な説明

本開示のプロセスおよび組成物は、本開示の一部を形成する添付の図面とともに考慮す

50

れば、以下の詳細な説明を参照することによって、より容易に理解され得る。

【0035】

本文全体を通じて、この説明は、ウイルスワクチンを作製するためのプロセスおよび組成物に言及する。本開示が、ウイルスワクチンを作製するプロセスと関連する特徴または実施形態を開示または特許請求する場合、このような特徴または実施形態は、上記ウイルスワクチンに等しく適用可能である。同様に、本開示が、ウイルスワクチンと関連する特徴または実施形態を開示または特許請求する場合、このような特徴または実施形態は、上記ウイルスワクチンを作製するためのプロセスまたは組成物に等しく適用可能である。値の範囲が表される場合、それは、その範囲内の任意の特定の値を使用する実施形態を包含する。さらに、範囲の中で述べられる値への言及は、その範囲内の各々のおよびあらゆる値を含む。値が、先行詞「約 (a b o u t)」の使用によって近似値として表される場合、その特定の値が別の実施形態を形成することが理解される。「または (o r)」の使用は、その使用の特定の文脈が別段規定しなければ、「および／または (a n d / o r)」を意味する。本明細書で引用される全ての参考文献は、それらの全体において参考として援用される。参考文献および本明細書が矛盾する場合、本明細書が優先する。本開示のプロセスおよび組成物のある特定の特徴が、明瞭性が理由で、別個の実施形態の文脈において本明細書で開示されるが、単一の実施形態において組み合わせて提供されることもあることは、認識されるべきである。逆に、本開示のプロセスおよび組成物の種々の特徴は、簡潔さが理由で、単一の実施形態の文脈において開示されるが、別個にまたは任意の部分組み合わせにおいて提供されることもある。

【0036】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの、ある (a)」, 「1つの、ある (a n)」および「上記、この、その (t h e)」は、文脈が明らかに別段規定しなければ、複数形を含む。詳細な説明および／または特許請求の範囲のいずれかの中で使用される用語「含む、包含する、が挙げられる (i n c l u d i n g)」, 「含む、包含する、が挙げられる (i n c l u d e s)」, 「有する (h a v i n g)」, 「有する (h a s)」, 「有する、を伴う (w i t h)」またはこれらの変形は、用語「含む、包含する (c o m p r i s i n g)」と同じ様式で包括的であることが意図される。用語「約」または「およそ (a p p r o x i m a t e l y)」は、数値および範囲の文脈で使用される場合、その記載される値または範囲に近似または近い値または範囲に言及し、その結果、その実施形態は、本明細書に含まれる教示から当業者に明らかであるように、意図されるとおり、約±10%まで行われ得る。いくつかの実施形態において、約は、数量の±10%を意味する。

【0037】

用語「含む、包含する」、「有する」および「含む、包含する、が挙げられる」は、制限のない連結動詞である。これらの動詞のうちの1またはこれより多くの任意の形態または時制（例えば、「c o m p r i s e s」、「c o m p r i s i n g」、「h a s」、「h a v i n g」、「i n c l u d e s」および「i n c l u d i n g」）は、同様に制限がない。例えば、1またはこれより多くの工程を「含む」、「有する」または「包含する」任意の方法は、それら1またはこれより多くの工程のみを有することに限定されず、他の挙げられていない工程をも網羅し得る。同様に、1またはこれより多くの特徴を「含む」、「有する」または「包含する」任意の組成物は、それら1またはこれより多くの特徴のみを有することに限定されず、他の挙げられていない特徴をも網羅し得る。本明細書中のある特定の実施形態に関して提供される任意のおよび全ての例、または例示的な言語（例えば、「のような、例えば (s u c h a s)」）の使用は、本開示をよりよく明らかにするに過ぎないことが意図され、別段特許請求される本開示の範囲に対する限定を課すのではない。

【0038】

本開示は、サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

- a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤からなる群より選択される少なくとも 1 種の構成要素を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0039】

いくつかの実施形態において、上記試薬は、塩をさらに含み、ここで上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。

【0040】

いくつかの実施形態において、上記サブビリオンの平均流体力学的半径は、150 nm ~ 350 nm の範囲に及ぶ。

【0041】

いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 である。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g / L ポリソルベート 80、例えば、少なくとも約 1.5 g / L、少なくとも約 2.0 g / L、または少なくとも約 2.5 g / L を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド (CTAB) を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、約 1.25 g / L ~ 3.0 g / L CTAB、例えば、約 1.5 g / L、約 2.0 g / L、約 2.5 g / L、または約 3.0 g / L を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、0 ~ 200 mM NaCl、例えば、約 25 mM、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 125 mM、約 150 mM、または約 175 mM を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含み、上記イオン性界面活性剤は、CTAB を含み、上記塩は、塩化ナトリウム NaCl を含む。

【0042】

方法のいくつかの実施形態において、工程 c の精製する工程は、吸着濾過を含む。いくつかのこのような実施形態において、吸着濾過スループットは、少なくとも約 50 L / m²、例えば、少なくとも約 100 L / m²、少なくとも約 150 L / m²、少なくとも約 200 L / m²、少なくとも約 200 L / m²、少なくとも約 300 L / m²、または少なくとも約 350 L / m² である。いくつかの他の実施形態において、上記サブビリオンの粒度は、約 500 nm 未満、例えば、約 400 nm 未満、約 300 nm 未満、約 200 nm 未満、または約 150 nm 未満である。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンの粒度は、流体力学的半径である。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンのサイズは、動的光散乱法 (DLS) によって測定される。

【0043】

方法のいくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する。

【0044】

本開示はまた、ウイルス粒度を低減する方法であって、上記方法は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤からなる群より選択される少なくとも 1 種の構成要素を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0045】

いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含

10

20

30

40

50

む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約 1.0 g/L ポリソルベート 80、例えば、少なくとも約 1.5 g/L、少なくとも約 2.0 g/L、または少なくとも約 2.5 g/L を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、セトリモニウムブロミド (CTAB) を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、約 1.25 g/L ~ 3.0 g/L CTAB、例えば、約 1.5 g/L、約 2.0 g/L、約 2.5 g/L、または約 3.0 g/L を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム (NaCl) を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、25 ~ 200 mM NaCl、例えば、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 125 mM、約 150 mM、または約 175 mM を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 を含み、上記イオン性界面活性剤は、CTAB を含み、上記塩は、塩化ナトリウム NaCl を含む。

10

【0046】

いくつかの実施形態において、方法は、上記処理したウイルス粒子を、吸着フィルターを通して濾過する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記吸着フィルターのスループットは、少なくとも約 50 L/m²、例えば、少なくとも約 100 L/m²、少なくとも約 150 L/m²、少なくとも約 200 L/m²、少なくとも約 250 L/m²、少なくとも約 300 L/m²、または少なくとも約 350 L/m² である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、約 500 nm 未満、例えば、約 400 nm 未満、約 300 nm 未満、約 200 nm 未満、または約 150 nm 未満である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、上記ウイルス粒子の流体力学的半径である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒度は、動的光散乱法 (DLS) によって測定される。

20

【0047】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する。

【0048】

本開示はまた、インフルエンザウイルス精製プロセスにおいてウイルス粒度を低減する方法であって、上記方法は、

30

a. 細胞培養物から採取したウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理する工程を包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0049】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

40

a. 採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、試薬非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0050】

50

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；
b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；
を包含し、ここで上記工程bのウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

10

【0051】

いくつかの実施形態において、上記試薬は、塩をさらに含み、上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート80を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約1.0 g/L ポリソルベート80、例えば、少なくとも約1.5 g/L、少なくとも約2.0 g/L、または少なくとも約2.5 g/Lを含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、塩化ナトリウム（NaCl）を含む。いくつかの実施形態において、上記塩は、25～200 mM NaCl、例えば、約50 mM、約75 mM、約100 mM、約125 mM、約150 mM、または約175 mMを含む。

20

【0052】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；
b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製して、精製ウイルスタンパク質を生成する工程；
を包含し、ここで上記工程bのウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

30

【0053】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；
b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで上記工程bのウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、イオン性界面活性剤および塩を含む試薬で処理することを包含し、ここで上記イオン性界面活性剤および上記塩は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

40

【0054】

本開示はまた、精製ウイルスタンパク質を含む製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；
b. 上記精製したウイルス粒子をアルキル化剤で処理して、上記ウイルス粒子を不活性化する工程；

c. 上記不活性化したウイルス粒子をイオン性界面活性剤で処理して、上記不活性化し

50

たウイルス粒子を分割し、サブビリオンを生成する工程；ならびに

d) 上記サブビリオンを精製して、精製インフルエンザウイルスタンパク質を生成する工程；

を包含し、ここで上記工程 b および／または c のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤およびイオン性界面活性剤を含む試薬で処理することをさらに包含し、ここで上記非イオン性界面活性剤および上記イオン性界面活性剤は、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する、方法を提供する。

【0055】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の CTAB、NaCl、およびポリソルベート 80 を含む試薬で処理することを包含する、方法を提供する。

【0056】

本開示はまた、サブビリオン形態において製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1.5～2.5 g/L CTAB、0～150 mM NaCl、および 0～2.2 g/L ポリソルベート 80 を含む試薬で処理することを包含する方法を提供する。

【0057】

本開示はまた、サブビリオン形態で製剤化されたインフルエンザウイルスワクチンを生成する方法であって、上記方法は、

a. MDC K細胞の採取した細胞培養物からウイルス粒子を精製する工程；

b. 上記ウイルス粒子を不活性化および分割して、サブビリオンを生成する工程；ならびに

c. 上記サブビリオンを精製する工程；

を包含し、ここで上記工程 b のウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、上記ウイルス粒子を、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量の 1.5～2.5 g/L のイオン性界面活性剤、0～150 mM の塩、および 0～2.2 g/L の非イオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含する、方法を提供する。

【0058】

いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、CTABである。いくつかの実施形態において、上記塩は、NaClである。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 である。

【0059】

生成方法

【0060】

サブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを作製するためのプロセスが、本明細書で開示される。本明細書で使用される場合、用語「ウイルスワクチン (viral vaccine)」とは、ウイルスから作製され、被験体に投与された場合に、特

10

20

30

40

50

定の疾患に対する免疫を提供し得る生物学的調製物をいう。ワクチン組成物は、1またはこれより多くのウイルスまたはウイルス株に由来する1またはこれより多くの抗原を含んでいてもよく、被験体において免疫学的応答を生じるように、十分な量の上記抗原を含む。本明細書で使用される場合、用語「サブビリオン形態 (sub-virion form)」とは、本開示のワクチン組成物が一般に、(a) そのウイルス脂質エンベロープが、溶解もしくは破壊されている場合、分割ウイルスの形態において製剤化されるか、または(b) 1またはこれより多くの精製ウイルスタンパク質を含む、サブユニットウイルスの形態にある、ことを意味する。サブビリオンを形成する、すなわち「分割する (splitting)」プロセスは、本明細書で記載される。

【0061】

培養物中での増殖

【0062】

本明細書で開示されるウイルスワクチンは、鶏卵でまたは細胞培養物中で増殖させたウイルスから生成され得る。いくつかの実施形態において、本明細書で使用されたとおりのウイルスは、特定病原体非含有 (SPF) の胚形成鶏卵中で増殖され、鶏卵の内容物 (尿膜腔液) から精製される。理論によって拘束されないが、動物細胞培養物中で増殖させたウイルスから生成されるウイルスワクチンは、いくらかのアレルギー反応を生じ得る。本明細書で使用されるウイルスを生成するために使用され得る例示的な動物細胞株としては、ハムスター、ウシ、霊長類 (ヒトおよびサルを含む) およびイヌの細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で使用されたとおりのウイルスは、動物細胞培養物中で増殖される。いくつかの実施形態において、本明細書で使

用されたとおりのウイルスは、哺乳動物細胞培養物中で増殖される。本明細書で使

用されるウイルスを生成するために使用され得る例示的な哺乳動物細胞タイプとしては、腎臓細胞、線維芽細胞、網膜細胞、肺細胞が挙げられるが、これらに限定されない。本来の MDC K 細胞株 (CCL 34 として American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能) またはその派生細胞株のうちのいずれかが、使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書で使

用されるウイルスは、MDC K 細胞中で増殖される。細胞株 (例えば、MDC K 細胞) での増殖に関して、ウイルスは、懸濁培養物または接着培養物における細胞で増殖されてもよい。懸濁培養のための 1 つの適切な MDC K 細胞株は、MDC K 33016 (DSM ACC 2219 として受託されている) である。適切な細胞株のさらなる例、ならびに細胞培養法は、WO 2007/052055 (これは、その全体において本明細書に参考として援用される) において見出され得る。ウイルス (例えば、インフルエンザウイルス) を細胞培養物から精製する方法は、当該分野で周知である。

【0063】

本明細書で開示される方法および組成物は、当該分野で公知の任意のウイルスからウイルスワクチンを生成するために使用され得る。例示的なウイルスとしては、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、灰白脊髄炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス、風疹ウイルス、痘瘡ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、および黄熱ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス A 株に由来する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス B 株に由来する。

【0064】

ウイルスの不活性化および分割

【0065】

本明細書で使

用される場合、用語「不活性化する (inactivating)」とは、ウイルス構成要素の化学的または表面の変化によって、ウイルスを不活性にする、複製できなくする、および／または感染できなくするプロセスに言及する。ウイルス (例えば

、インフルエンザウイルス)を不活性化する方法は、当該分野で周知である(例えば、B u d o w s k y ら, V a c c i n e, (1999) 9(6):398-402; W O 2 0 1 1 / 1 3 8 2 2 9 ; および W O 2 0 1 1 / 1 3 8 6 8 2 を参照のこと)。ウイルスを不活性化する例示的な方法としては、低温殺菌、乾熱、蒸気熱、溶媒/洗剤、アルキル化剤および/または低pHでの処理が挙げられるが、これらに限定されない。理論によって拘束されないが、アルキル化剤は、ウイルスタンパク質を改変し得、それによって、ウイルスの細胞侵入またはウイルスゲノムの放出を阻害し得る。アルキル化剤はまた、ウイルスのタンパク質カプシドを透過性にし得、ウイルス核酸を化学的に不活性化し得る。本明細書での使用のためのウイルスを不活性化するために使用され得る例示的なアルキル化剤としては、ホルマリン、 β -プロピオラクトン(β -PL)、およびN-アセチル-アジリジンが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子の不活性化は、ウイルス粒子をアルキル化剤で処理することによって行われる。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子の不活性化は、ウイルス粒子を β -プロピオラクトンで処理することによって行われる。

10

20

30

40

50

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「分割する(splitting)」とは、感染性(野生型または弱毒化)であろうと非感染性(例えば、不活性化)であろうと、破壊濃度の分割薬剤(splitting agent)で、完全ウイルスを破壊またはフラグメント化することをいう。理論によって拘束されないが、分割薬剤は一般に、代表的には、親水性ヘッドに結合した疎水性テールを有する、脂質膜を分解および溶解する能力のある薬剤を含む。破壊は、ウイルスタンパク質の完全なまたは部分的な可溶化を生じ得、それによって、ウイルスの完全性を変化させ得る。

【0067】

ウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)を分割する方法は、当該分野で周知である(例えば、W O 0 2 / 2 8 4 2 2、W O 0 2 / 0 6 7 9 8 3、W O 0 2 / 0 7 4 3 3 6、W O 0 1 / 2 1 1 5 1などを参照のこと)。ウイルス粒子の分割は、ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤および/またはイオン性(例えば、カチオン性)界面活性剤のうちの1またはこれより多くで処理することを包含し得る。本明細書で使用される場合、「界面活性剤(surfactant)」とは、2相の間の表面張力(または界面張力)を下げ得る薬剤をいう。界面活性剤は、洗剤、湿潤剤、乳化剤、発泡剤、および分散剤として作用し得る。理論によって拘束されないが、界面活性剤は概して、疎水性「ヘッド(head)」および1個または2個の親水性「テール(tail)」を有する両親媒性である。本明細書で使用される場合、用語「非イオン性界面活性剤(non-ionic surfactant)」とは、荷電した基がそのヘッドにない界面活性剤をいう一方で、用語「イオン性界面活性剤(ionic surfactant)」とは、正味の正電荷(カチオン性)または正味の負電荷(アニオン性)をそのヘッドに有する界面活性剤をいう。例示的な非イオン性界面活性剤としては、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル糖、ポリオキシエチレンソルビタンエステル(例えば、ポリソルベート20またはTween(登録商標)20、ポリソルベート40、ポリソルベート60またはポリソルベート80)、オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール(例えば、Triton(登録商標)界面活性剤(例えば、Triton(登録商標)X-100またはTriton(登録商標)N101))、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、Hecameg、N,N-ジアルキル-グルカミド、およびアルキルフェノキシポリオキシエタノールが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なイオン性界面活性剤としては、スルホベタイン、ベタイン、サルコシル、4級アンモニウム化合物、例えば、CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)、Cetrimide(ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド)、リポフェクチン、リポフェクタミン、およびDOT-MAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子を分割する工程は、上記ウイルス粒子を、非イオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含する。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート80を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、約0.2g/L、約0.4g/L、約0.6g/L、約0.8g/L、約1.0g/L、約1.2g/L、約1.4g/L、約1.6g/L、約1.8g/L、約2.0g/L、約2.2g/L、約2.4g/L、約2.6g/L、約2.8g/L、または約3.0g/L ポリソルベート80を含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、少なくとも約1.0g/L ポリソルベート80、例えば、少なくとも約1.5g/L、少なくとも約2.0g/L、または少なくとも約2.5g/Lを含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤は、約0.0g/L~2.2g/L ポリソルベート80を含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子を分割する工程は、上記ウイルス粒子を、イオン性界面活性剤を含む試薬で処理することを包含する。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、セチルトリメチルアンモニウムブロミドまたはセトリモニウムブロミド（CTAB）を含む。いくつかの実施形態において、上記イオン性界面活性剤は、約1.25g/L~3.0g/L CTAB、例えば、約1.5~2.5g/L、約2.0g/L、約2.5g/L、または約3.0g/L CTABを含む。

10

【0069】

ウイルス粒子の分割はまた、上記ウイルス粒子を、1またはこれより多くの塩で処理することを包含し得る。理論によって拘束されないが、塩は、ウイルス粒子およびサブビリオンを安定化し得る。使用され得る例示的な塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子を分割する工程は、上記ウイルス粒子を、塩を含む試薬で処理することを包含する。いくつかの実施形態において、上記塩は、NaClである。いくつかの実施形態において、上記塩は、0~200mM NaCl、例えば、約25mM、約50mM、約75mM、約100mM、約125mM、約150mM、または約175mM NaClを含む。いくつかの実施形態において、上記非イオン性界面活性剤、上記イオン性界面活性剤および／または上記塩は各々、上記ウイルス粒子の粒度を低減するために有効な量で存在する。

20

【0070】

上記ウイルス粒子を不活性化および分割する工程はまた、有利なことには、マトリクスタンパク質を分解し、サブビリオン粒度を低減する酵素を添加することを包含し得る。例示的な酵素としては、プロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼK、トリプシン、ペプシン、エラスターゼ、トロンピン、キモトリプシン、パパイン（papain）など）およびヌクレアーゼ（例えば、ベンゾナーゼ、RNAse A、RNAse Hなど）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、プロテアーゼを添加することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記プロテアーゼは、トリプシンである。いくつかの実施形態において、上記プロテアーゼは、プロテイナーゼKである。いくつかの実施形態において、上記ウイルス粒子を不活性化および分割する工程は、ヌクレアーゼを添加することをさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記プロテアーゼは、ベンゾナーゼである。

30

40

【0071】

分割ビリオンの精製

【0072】

サブビリオン、個々のタンパク質または抗原を、ウイルスから精製する方法は、当業者に周知であり、例えば、濾過、クロマトグラフィー、遠心分離、限外濾過およびダイアフィльтраーションが挙げられる。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンは、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって精製される。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンは、超遠心分離によって精製される。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンは、吸着濾過によって精製される。いくつかの実施形態において、上

50

記サブビリオンは、ポリマー樹脂での吸着濾過によって精製される。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンは、限外濾過またはダイアフィルトレーションによって精製される。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンは、超遠心分離、吸着濾過、限外濾過、およびダイアフィルトレーションのうちの1またはこれより多くによって精製される。

【0073】

例えば、非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤および塩を伴う、本明細書で開示される方法および組成物は、有利なことには、界面活性剤または塩なしで生成されるものと比較して、低減した粒度を有するサブビリオン形態において製剤化されたウイルスワクチンを生成し得る。低減した粒度を有するウイルス粒子は、改善された濾過スループットおよびより高い収率を生じ得る。いくつかの実施形態において、吸着濾過スループットは、少なくとも約 5 L/m^2 、例えば、少なくとも約 10 L/m^2 、少なくとも約 15 L/m^2 、または少なくとも約 20 L/m^2 である。代わりの本開示の大規模生成実施形態において、吸着スループットは、少なくとも約 $50\text{ L/m}^2 \sim 350\text{ L/m}^2$ 、例えば、少なくとも約 50 L/m^2 、少なくとも約 100 L/m^2 、少なくとも約 200 L/m^2 、少なくとも約 300 L/m^2 、または少なくとも約 350 L/m^2 である。

【0074】

ウイルス粒度を測定する方法は、当業者に周知であり、X線小角散乱法 (SAXS)、動的光散乱法 (DLS)、共鳴式質量測定 (resonant mass measurement)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) およびレーザー回折法が挙げられるが、これらに限定されない。他の粒子サイジング技術 (例えば、液体クロマトグラフィー) は、妨害的な (intrusive) サンプル調製、試験サンプルと相互作用するカラム樹脂の望ましくない表面化学現象、または高次構造を潜在的に変化させ得る高いカラム圧に起因して不適切であり得るが、DLSは、高次構造の完全性を損なうことなく、それらの天然の状態において分析物を試験し得る、迅速で非接触性の妨害的でない粒子サイジング技術である。いくつかの実施形態において、ウイルス粒度は、動的光散乱法 (DLS) によって測定される。いくつかの実施形態において、ウイルスおよびサブビリオン粒度は、SAXSによって測定される。いくつかの実施形態において、ウイルスおよびサブビリオン粒度は、共鳴式質量測定によって測定される。いくつかの実施形態において、ウイルスおよびサブビリオン粒度は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定される。いくつかの実施形態において、粒度は、上記ウイルス粒子の流体力学的半径 (R_H) によって定義される。いくつかの実施形態において、粒度は、上記ウイルス粒子の回転半径 (radius of gyration) (R_G) によって定義される。いくつかの実施形態において、上記サブビリオンの粒度は、約 500 nm 未満、例えば、約 400 nm 未満、約 300 nm 未満、約 200 nm 未満、または約 150 nm 未満である。

【0075】

本開示は、以下の実施例によってさらに例証され、その実施例は、限定として解釈されるべきではない。本出願全体を通じて引用される全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図面は、全ての目的のためにそれらの全体において本明細書に参考として援用される。

【実施例】

【0076】

以下の実施例は、例証であって、上記で開示される本開示の範囲に対する限定ではないと解釈されるべきである。

【0077】

実施例1:

【0078】

方法: 採取した細胞培養物からのウイルス粒子の精製

【0079】

10

20

30

40

50

インフルエンザウイルスを含むMCDK細胞培養物から清澄にした採取物を、濃縮し、中空線維膜を使用してダイアフィルトレーションを行った。その清澄にした採取物を、限外濾過タンクの保持物容器 (retentate vessel) (UF0) へと充填し、目標容積へと濃縮し、次いで、塩含有Tris緩衝液に対してダイアフィルトレーションを行った。ダイアフィルトレーションの後、その保持物を再び濃縮し、次いで、同じ緩衝液でフラッシュして、生成物を回収した。次いで、その生成物をクロマトグラフィー工程において処理して、宿主細胞タンパク質 (HCPs) を除去し、ウイルス粒子を精製した。その濃縮し、ダイアフィルトレーションを行った細胞採取物を、予備平衡化したフィルターを通してカラムへと装填した。その生成物を、フロースルー中に集め、中空線維膜を有する限外濾過タンクの保持物容器 (UF1) へと添加した。その生成物を目標容積へと濃縮し、次いで、MgCl₂を含む緩衝化物質とともに一定容積でダイアフィルトレーションを行った。ベンゾナーゼ溶液を添加し、次いで、その生成物を、ウルトラフィルターを通して再循環させて、DNAの消化を可能にした。消化後に、第2のダイアフィルトレーションを、リン酸ナトリウムとともに一定容積で行って、その生成物を、不活性化のための適した緩衝液へと交換した。

10

【0080】

方法： ウイルス粒子の不活性化および分割

【0081】

リン酸ナトリウム中のポリソルベート80 (PS80) を、UF1からの生成物に添加し、その混合物を室温でインキュベートした。次いで、インフルエンザウイルスを、b-プロピオラクトン (BPL) を使用して不活性化した。簡潔には、ウイルスおよびPS80混合物を5℃へと冷却し、その後、BPLをインフルエンザウイルスの不活性化のために添加した。不活性化後、その混合物を、37℃へと加温して、BPLを加水分解した。次いで、その混合物を、以下で考察されるように、PS80を添加する前に室温へともたらしした。

20

【0082】

次いで、さらなるPS80を、表1に示されるとおりの濃度でその混合物に添加した。次いで、塩化ナトリウムを、表1に示されるとおりの濃度で添加した。最後に、CTABを、表1に示されるとおりの濃度で添加し、次いで、室温でインキュベートし、次いで、超遠心分離機に移した。

30

【0083】

方法： サブビリオンの精製

【0084】

可溶化した表面抗原を、連続超遠心分離によってウイルスコアから分離した。その超遠心分離をリン酸ナトリウムでフラッシュして、生成物回収を強化した。ウイルス抗原を含むフロースルーを、吸着容器中に回収した。PS80を添加して、最終濃度2.5 g/Lにした。次いで、リン酸ナトリウム中のポリマー樹脂を添加し、CTABの吸着が起こるために十分な時間にわたってその混合物とともにインキュベートした。インキュベーションの後、その生成物を樹脂から取り出し、限外濾過の前に、0.5 / 0.2 μmフィルターを通して濾過した。上記吸着フィルターからの全体的な生成物回収の収率を、図4に示されるとおりのスループットによって測定した。

40

【表 1】

表1: 分割のために使用されるPS80、NaClおよびCTABの濃度

条件	PS80 (g/L)	NaCl (mM)	CTAB (g/L)	示される図
1	0	0	1.5	1A, 2A, 3A
2	0	0	2.0	1B, 2B, 3B
3	0	0	2.5	1C, 2C, 3C
4	0	75	1.5	1A, 2A, 3A
5	0	75	2.0	1B, 2B, 3B
6	0	75	2.5	1C, 2C, 3C
7	0	150	1.5	1A, 2A, 3A
8	0	150	2.0	1B, 2B, 3B
9	0	150	2.5	1C, 2C, 3C
10	1.1	0	1.5	1A, 2A, 3A
11	1.1	0	2.0	1B, 2B, 3B
12	1.1	0	2.5	1C, 2C, 3C
13	1.1	75	1.5	1A, 2A, 3A
14	1.1	75	2.0	1B, 2B, 3B
15	1.1	75	2.5	1C, 2C, 3C
16	1.1	150	1.5	1A, 2A, 3A
17	1.1	150	2.0	1B, 2B, 3B
18	1.1	150	2.5	1C, 2C, 3C
19	2.2	0	1.5	1A, 2A, 3A
20	2.2	0	2.0	1B, 2B, 3B
21	2.2	0	2.5	1C, 2C, 3C
22	2.2	75	1.5	1A, 2A, 3A
23	2.2	75	2.0	1B, 2B, 3B
24	2.2	75	2.5	1C, 2C, 3C
25	2.2	150	1.5	1A, 2A, 3A
26	2.2	150	2.0	1B, 2B, 3B
27	2.2	150	2.5	1C, 2C, 3C

【0085】

結果

【0086】

試験を、上記の方法の節で詳述したように、3つの異なるインフルエンザウイルスサンプルに対して行った：（1）インフルエンザB/Victoria系統（図1A～Cに示される）、（2）MaineからのインフルエンザA H3N2（図2A～Cに示される）、および（3）South CarolinaからのインフルエンザA H3N2（図3A～Cに示される）。3つのサンプルに関して異なる条件においてDLSによって測定される平均粒度は、それぞれ、図1A～C、2A～C、および3A～Cに示される。エラーバーは、反復測定における範囲を示す。図1A～C、2A～Cおよび3A～Cに示されるように、CTABのレベルが低いほど、およびポリソルベート80のレベルが高いほど、概して、より小さな粒度を有するサブビリオンを生成する。

【0087】

実施例2： 動的光散乱法による粒度決定

【0088】

サブビリオン形態にあるウイルス粒子の粒度を、Wyatt Technologies DynaPro Plate Reader II機器で動的光散乱法（DLS）を

使用して測定した。測定前および測定中に、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ アノトップシリンジフィルター (anotop syringe filter) でまたは $3,000\text{ rpm}$ で 10 分間、固定角卓上型遠心分離機においてコニカルチューブ中でサンプルを遠心分離することによって、塵を除去した。水性溶液中 0.25 mg/mL の 14 kDa リゾチームの参照標準物質を、ベンチマークとして使用した。上記サンプルおよび参照標準物質を、 384 ウェルガラス底マイクロプレート (Greiner P/N 781892) に載せ、そのマイクロプレートを、 $2,000\times g$ で 2 分間、スイングバケット式遠心分離機の中で遠心分離して、気泡を消した。そのマイクロプレートを、DLS 機器のへと装填し、各々 25 秒間の獲得時間での 14 回のデータ獲得を、 25°C で行った。

【0089】

データ分析を、DYNAMICSソフトウェアパッケージによって行って、Gaussianキュムラント結果から差分の二乗和 (sum-of-squares difference) を生成し、調整した結果を報告した。相関率 (correlation rates) のうちの1つのガウス分布を、曲線のあてはめの間に使用して、 $\leq 57\%$ 多分散性を有する結果に関して単一モード分析 (monomodal analyses) を行った。低い二乗和値 (≤ 20) を示す結果は、測定した相関曲線とキュムラントあてはめ曲線 (cumulants fitted curve) との間で合理的な数学的一致を示し、上記サンプルがおそらく、低い多分散性、特に、厳密なサイズ分布を有する単一モード性であることを示唆した。SOS > 20 および/または%多分散性 $> 57\%$ を示す結果は、マルチモード性として報告され、その調整したグラフからの結果を報告した。

【0090】

実験2の結果を、図4に示す。ここでフィルタースループット 対 DLS平均粒度を測定し、比較した。示されるように、粒度が低減するにつれて、フィルターを通じた全体的なスループットが増大し、これは、増大した収率を生じる。

【0091】

実施例3: A/turkey/Turkey株での吸着濾過実験

【0092】

吸着濾過実験を行い、4つの分割条件を、A/turkey/Turkey/1/2005 NIBRG-23 (H5N1) を使用して試験した。より具体的には、試験した分割条件は、以下の表2に示されるように、CTAB、NaCl、およびPS80の種々の濃度での吸着フィルター能力に関するものであった。A/turkey/Turkey/1/2005 NIBRG-23 (H5N1) に関する吸着濾過追跡実験を、以下の表3に示されるように行った。

【表2】

表2: 分割条件および濾過能力結果

濾過条件	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	平均フィルタースループット (L/m^2)
1a	1.6	150	0.2	3.53
1b	1.6	150	0.2	3.87
2a	2.5	150	0.2	3.57
2b	2.5	150	0.2	4.53
3a	2.5	60	1.2	5.27
3b	2.5	60	1.2	10.9
4a	2.5	24	2.2	254
4b	2.5	24	2.2	138

【0093】

表2の結果は、CTABおよびPS80の濃度が高いほど、およびNaClの濃度が低いほど、A/turkey/Turkey (H5N1) 株に関しては、最適な濾過性能を示すことを示唆する (例えば、濾過条件4aおよび4bを参照のこと)。分割条件は同一であったが、既存の条件より $36\sim 72$ 倍良好なスループットを生じた。

【表 3】

表3: 濾過能力結果

濾過条件	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	上清濁度 (NTU)	平均フィルター スループット (L/m ²)	Vmax (L/m ²)
1	2.5	0	2.2	15	82	104
2	2.5	25	2.2	16	78	93
3	2.5	50	2.2	22	51	38
4	2.5	75	2.2	44	12	13

【0094】

10

表3の結果は、2.5 g/L CTABおよび2.2 g/L PS80の一定濃度で、NaClの増大は、増大した上清濁度および減少したフィルタースループットと相関することを示唆する。従って、減少したNaClは、A/turkey/Turkey (H5N1) 株の濾過能力の顕著な増大を提供するようである。一定のCTAB (2.5 g/L) および一定のPS80 (2.2 g/L) では、濾過能力 (スループット) は、NaClが75 mMからゼロへと減少するにつれて、約7倍改善した。

【0095】

【表 4】

表4: 表2および表3からの濾過能力結果のまとめ

20

条件	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	H1 (SRD)	SP1 (SRD/ SCA)	最も類似 のDOE 条件	ウェスタン によるNA	SDS-PAGE	吸着濾過 スループット (L/m ²)
以前の 推奨 条件	1.6	150	0.2	571	0.83	7	弱い	いくつかの MPおよびNP	3.87
収率 & SP 最適	2.5	75	2.2	637	0.87	24	あり	いくつかの MPおよびNP	12
濾過最適	2.5	0	2.2	398	0.68	21	あり	観察される MPおよびNPなし	82
推奨条件	2.5	25	2.2	502	0.77	21および24、 どちらかとい えば21	試験しなかったが、21と24との 間の中間であると予測された		254; 76*

30

【0096】

実施例 4:

方法: 採取した細胞培養物からの大規模製造条件でのウイルス粒子の精製

【0097】

インフルエンザウイルスを含むMCDK細胞培養物から清澄にした採取物を、濃縮し、塩含有Tris緩衝液に対して中空線維膜を使用してダイアフィルトレーションを行う。次いで、その採取生成物をさらに濃縮し、そのシステムを同じ緩衝液でフラッシュして、生成物を取り出す。この物質を1.2 μm カラムガードフィルタを通過させ、HCPの除去のためにクロマトグラフィーカラムに適用して、精製した完全ウイルスに達する。その精製した完全ウイルスを濃縮し、中空線維膜を使用してマグネシウム含有緩衝液へとダイアフィルトレーションを行う (UF/DF1)。ベンゾナーゼを添加して、DNAを除去する。第2のダイアフィルトレーションを行って、精製した完全ウイルスをリン酸緩衝液へと交換し、そのシステムを同じ緩衝液でフラッシュして、生成物を取り出す。その精製した完全ウイルスを、ポリソルベート80およびBPLの存在下で、2~8℃において不活性化する。不活性化の後、そのBPLを、37℃において加水分解する。ウイルス分割は、ポリソルベート80、塩化ナトリウム、およびCTABの株特異的添加とともに起

40

50

こって、それぞれ、 $1.0 \sim 2.5 \text{ g/L}$ 、 $0 \sim 200 \text{ mM}$ 、および $1.25 \sim 3.0 \text{ g/L}$ の範囲内、または代わりに表 1 に示されるように、表面抗原を可能化する。ウイルスコアを、連続流超遠心分離 (continuous flow ultracentrifugation) によって除去し、可溶性画分を、ポリマー樹脂と接触させて、CTAB を除去する。その樹脂を、生成物スラリーを $60 \mu\text{m}$ メッシュバッグを通過させることによって除去し、次いで、可溶性ウイルス表面抗原を、 $0.5 / 0.2 \mu\text{m}$ フィルターを通して処理する。その濾過した抗原を濃縮し、カセット膜を使用して、 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターを通じて処理する前に最終製剤緩衝液へとダイアフィルトレーションを行う (UF/DF2)。

【図面】

【図 1】

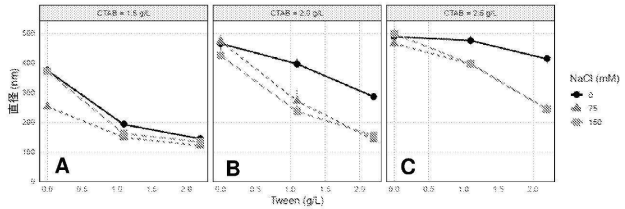


FIG. 1

【図 2】

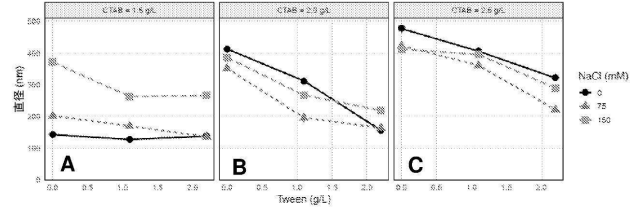


FIG. 2

【図 3】

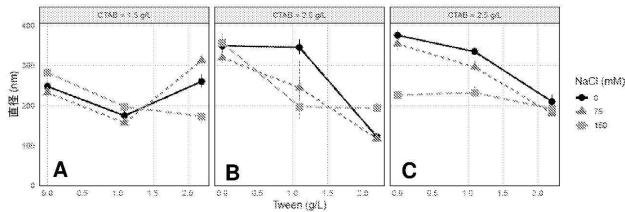


FIG. 3

【図 4】

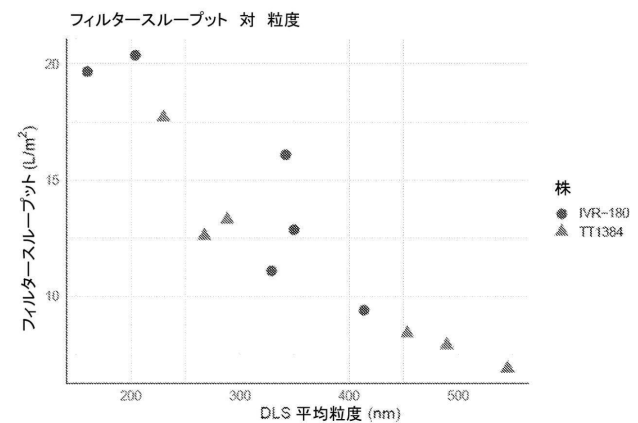


FIG. 4

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/000961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/145 A61K39/12 A61P31/12 A61P31/16 C12N7/06 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 A61P 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) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/115917 A2 (NOVARTIS AG [CH]; HAUSSMANN CHRISTOPH [DE]) 24 September 2009 (2009-09-24) page 1, line 19 - page 3, line 16 page 8, line 9 - page 9, line 10 page 10, line 21 - line 28 page 10, line 31 - page 12, line 26 page 30, line 1 - page 31, line 7 ----- -/--	1-21, 43-53, 57-71
☒ 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
10 March 2021		18/05/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Stein, Annette

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/000961

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Anonymous: "Generic process of cell culture based influenza vaccine", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055782293, Retrieved from the Internet: URL:https://www.emdmillipore.com [retrieved on 2021-03-04] the whole document, in particular figure 1 and page 6, right-hand column, second paragraph</p>	1,3,6, 14,17, 43,44
A	<p>WO 02/067983 A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE [BE] ET AL.) 6 September 2002 (2002-09-06) cited in the application page 8, line 15 - page 9, line 22 page 10, line 23 - line 27 page 19, line 25 - page 22, line 8 claims 1,6-9; examples 1,5</p>	1-21, 43-53, 57-71
A	<p>Sofikiti Antonia: "Application of Emerging Analytical Technologies for Characterisation of Influenza Vaccines", 1 March 2017 (2017-03-01), pages 1-298, XP055783127, Retrieved from the Internet: URL:https://core.ac.uk/download/pdf/153781 074.pdf [retrieved on 2021-03-08] in particular item 5.2.2, table 5.3, appendix 5.2a, items 5.2.5.2, 5.2.5.3, figure 5.9; page 127, line 1 - page 141, line 8; figures 1.8, 1.9; tables 1.2, 5.1, 5.2 page 147, line 26 - page 148, line 16; figure 5.15 page 153, line 1 - page 154, line 16; table 5.11 appendix 5.4, 5.5; page 161, line 1 - page 166, line 3; figures 5.20, 5.25, 5.27-5.30</p>	1-21, 43-53, 57-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2020/000961

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).

10

20

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.:
1-21, 43-53, 57-71

30

40

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/ IB2020/ 000961

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-21, 43-53, 57-71

A method of producing viral vaccine, in particular influenza viral vaccine, formulated in sub-virion form, the method comprising the steps:

- a. purifying viral particles from harvested cell culture;
- b. inactivating and splitting the viral particles to produce sub-virions; and
- c. purifying the sub-virions;

wherein inactivating and splitting the viral particles of step b comprises treating the viral particles with a reagent comprising a non-ionic surfactant and an ionic surfactant, and wherein the non-ionic surfactant and the ionic surfactant is present in an amount effective to reduce particle size of the viral particles; and related subject-matter.

2. claims: 22-41

A method of reducing viral particle size, the method comprising treating the viral particles with a reagent comprising a non-ionic surfactant and an ionic surfactant, and wherein the non-ionic surfactant and the ionic surfactant are present in an amount effective to reduce particle size of the viral particles.

3. claim: 42

A method of reducing viral particle size in an influenza virus purification process, the method comprising

- a. purifying viral particles harvested from cell culture;
- b. inactivating and splitting the viral particles to produce sub-virions; and
- c. purifying the sub-virions;

wherein inactivating and splitting the viral particles of step b comprises treating the viral particles with a reagent comprising a non-ionic surfactant and an ionic surfactant, and wherein the non-ionic surfactant and the ionic surfactant are present in an amount effective to reduce particle size of the viral particles.

4. claim: 54

A method of producing an influenza viral vaccine formulated comprising purified viral proteins, the method comprising the steps:

- a. purifying viral particles from a harvested cell culture of MDCK cells;
- b. inactivating and splitting the viral particles to produce

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ 1B2020/ 000961

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

sub-virions; and
 c. purifying the sub-virions to produce purified viral proteins;
 wherein inactivating and splitting the viral particles of step b comprises treating the viral particles with a reagent comprising a non-ionic surfactant and a salt, and wherein the non-ionic surfactant and the salt are in an amount effective to reduce particle size of the viral particles.

5. claim: 55

A method of producing an influenza viral vaccine formulated comprising purified viral proteins, the method comprising the steps:
 a. purifying viral particles from a harvested cell culture of MDCK cells;
 b. inactivating and splitting the viral particles to produce sub-virions; and
 c. purifying the sub-virions to produce purified influenza viral proteins;
 wherein inactivating and splitting the viral particles of step b comprises treating the viral particles with a reagent comprising an ionic surfactant and a salt, and wherein the ionic surfactant and the salt are in an amount effective to reduce particle size of the viral particles.

6. claim: 56

A method of producing an influenza viral vaccine formulated comprising purified viral proteins, the method comprising the steps:
 a. purifying viral particles from a harvested cell culture of MDCK cells;
 b. treating the purified viral particles with alkylating agent to inactivate the viral particles;
 c. treating the inactivated viral particles with an ionic surfactant to split the inactivated viral particles to produce subvirions; and
 d. purifying the sub-virions to produce purified influenza viral proteins;
 wherein inactivating and splitting the viral particles of step b and/or c further comprises treating the viral particles with a reagent comprising a non-ionic surfactant and an ionic surfactant, and wherein the non-ionic surfactant and the ionic surfactant are in an amount effective to reduce particle size of the viral particles.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2020/000961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009115917 A2	24-09-2009	AU 2009227674 A1	24-09-2009
		CA 2718430 A1	24-09-2009
		CN 101998990 A	30-03-2011
		EA 201071086 A1	29-04-2011
		EP 2268309 A2	05-01-2011
		EP 2889042 A2	01-07-2015
		EP 3459563 A1	27-03-2019
		ES 2535101 T3	05-05-2015
		JP 5518041 B2	11-06-2014
		JP 2011515387 A	19-05-2011
		KR 20100135766 A	27-12-2010
		NZ 587798 A	28-06-2013
		US 2011014230 A1	20-01-2011
		US 2016158341 A1	09-06-2016
		WO 2009115917 A2	24-09-2009
WO 02067983 A1	06-09-2002	AR 032575 A1	12-11-2003
		CA 2438960 A1	06-09-2002
		EP 1361889 A1	19-11-2003
		JP 2004536785 A	09-12-2004
		US 2004096463 A1	20-05-2004
		US 2014302090 A1	09-10-2014
		WO 02067983 A1	06-09-2002

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

F I

A 6 1 P 31/12

テーマコード (参考)

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,N
E,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,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダッド, クリストファー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 4 0, ホーリー スプリングズ, グリーン オークス
パークウェイ 4 7 5

(72)発明者 スミス, マシュー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 4 0, ホーリー スプリングズ, グリーン オークス
パークウェイ 4 7 5

(72)発明者 リディアード, デブラ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 4 0, ホーリー スプリングズ, グリーン オークス
パークウェイ 4 7 5

F ターム (参考) 4B065 AA97X BD13 BD25 CA45

4C085 AA03 BA51 BA55 CC08 DD01 DD51 EE01