(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月26日(26.09.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/195868 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 39/125 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/011464

(22) 国際出願日： 2024年3月22日(22.03.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-047043 2023年3月23日(23.03.2023) JP

(71) 出願人: デンカ株式会社 (**DENKA COMPANY LIMITED**) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 神田 明日美 (**KANDA, Asumi**); 〒9591836 新潟県五泉市南本町１－２－２ デンカ株式会社新潟工場内 Niigata (JP). 三股 亮大郎 (**MITSUMATA, Ryotaro**); 〒9591836 新潟県五泉市南本町１－２－２ デンカ株式会社新潟工場内 Niigata (JP).

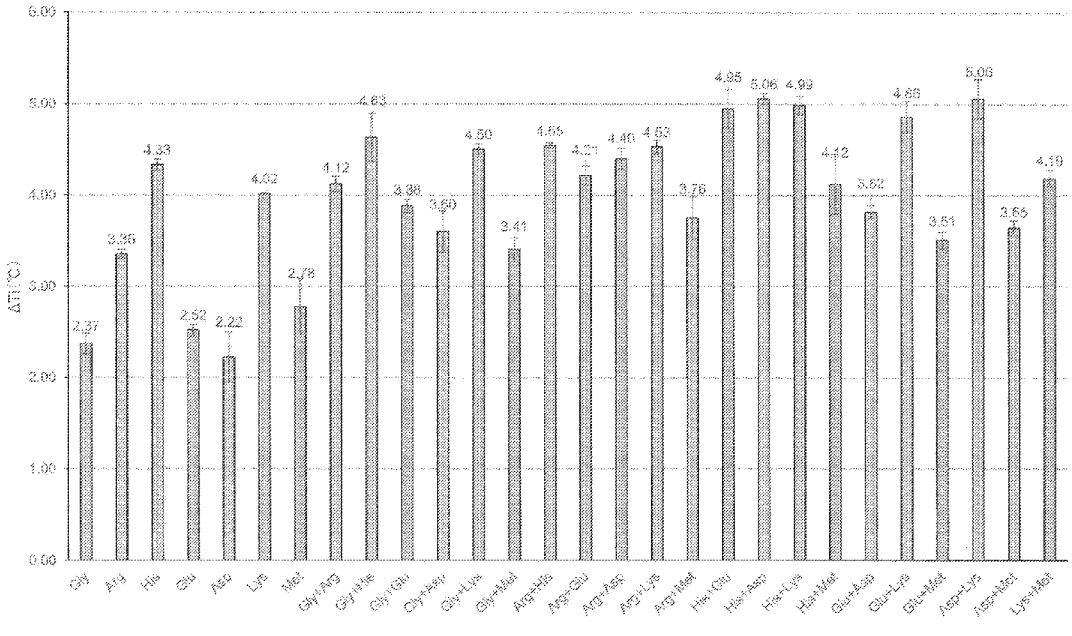
(74) 代理人: 弁理士法人アルガ特許事務所 (**ARUGA PATENT OFFICE**); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

WO 2024/195868 A1

(54) **Title:** NOROVIRUS VACCINE COMPOSITION

(54) 発明の名称： ノロウイルスワクチン組成物

[図2]



(57) **Abstract:** Provided is a norovirus vaccine composition having high thermal stability that uses VLP composed of norovirus VP1 protein as a vaccine antigen. The norovirus vaccine composition contains norovirus VP1 protein, histidine or a salt thereof, and one or more amino acids selected from lysine and glutamic acid or a salt thereof.

(57) 要約：ノロウイルスのＶＰ１タンパク質で構成されるＶＬＰをワクチン抗原とした、熱安定の高いノロウイルスワクチン組成物を提供する。ノロウイルスのＶＰ１タンパク質、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を含有するノロウイルスワクチン組成物。

［続葉有］

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

明　細　書

発明の名称 ： ノロウイルスワクチン組成物

技術分野

[0001] 本発明は、安定なノロウイルスワクチン組成物に関する。

背景技術

[0002] ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属に属するプラス鎖の一本鎖ＲＮＡウイルスである。ノロウイルスのゲノムＲＮＡは非構造タンパク質：ＯＲＦ１、構造タンパク質１（ＶＰ１）：ＯＲＦ２、構造タンパク質２（ＶＰ２）：ＯＲＦ３の３つのタンパク質をコードする領域が存在し、ＶＰ１及びＶＰ２はウイルスのカプシドを構成する。

このノロウイルスは冬季に流行する急性胃腸炎や流行性下痢症の原因ウイルスの一つだが、１０の遺伝子群に分類されており、そのうちヒトに感染するノロウイルスはＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅠ（ＧⅠ）、ＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅡ（ＧⅡ）及びＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅣ（ＧⅣ）に属しており、なかでもヒトの感染例の大半はＧⅠとＧⅡである。このＧⅠ及びＧⅡの各遺伝子群には、ＧⅠで９種類、ＧⅡで２７種類の遺伝子型が存在しており、異なる遺伝子型では基本的には抗原性も異なると考えられている。このようにノロウイルスには多くの遺伝子型が存在しているうえ、流行中に遺伝子の変異を起こすため、流行株が新たな変異株や別の遺伝子型にシフトした場合、大規模な感染を引き起こす危険性がある。そのため、世界で年間６．８億人以上が罹患し、発展途上国を中心に２０万人以上が死亡しているが、未だ有効なワクチンや治療薬はない。

[0003] しかし、有効なワクチンはないものの、世界的にノロウイルスワクチンの開発は進行しており、ワクチン抗原として最も用いられているのが、ノロウイルスのメジャーカプシドタンパク質であるＶＰ１タンパク質である。このＶＰ１タンパク質は、単独で発現させた場合でも自己会合してウイルス様粒子（Ｖｉｒｕｓ－Ｌｉｋｅ－Ｐａｒｔｉｃｌｅ：ＶＬＰ）を形成するため、

高い免疫原性を有している。

[0004] ＶＬＰを形成するため高い免疫原性を有するＶＰ１タンパク質だが、ワクチンの製剤組成によっては凝集が誘発され、これを回避する添加剤としてキトサン等の添加剤を加えることでＶＬＰの２次及び３次構造の安定化を図り、凝集が抑制できることが報告されている（非特許文献１）。しかし、キトサンはアレルゲンであり、キトサンアレルギーを有する場合は、ワクチンを接種できない可能性がある。

また、前述の通り、ノロウイルスは特に発展途上国で死亡例が多く、このような国々でこそワクチンの効果は得られやすい。一方で、発展途上国においてワクチンを供給する場合、コールドチェーンが整備されていない等の問題があり、熱安定性に優れた抗原の方が普及性が高いと考えられる。

[0005] したがって、アレルゲンを用いずにＶＰ１タンパク質ベースのノロウイルスワクチンの熱安定性を向上させることはワクチンの供給においても非常に重要な課題である。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kissmann J, Ausar SF, Foubert TR, Brock J, Switzer MH, Detzi EJ, Vedvick TS, Middaugh CR. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. J Pharm Sci. 2008 Oct;97(10):4208-18.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ノロウイルスのＶＰ１タンパク質で構成されるＶＬＰをワクチン抗原とした、熱安定の高いノロウイルスワクチン組成物を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ノロウイルスＶＰ１タンパク質のＶＬＰの熱安定性に寄与する添加剤を探索した結果、特定のアミノ酸を組み合わせて配合することに

より、当該ＶＬＰの熱安定性が向上することを見出した。

[0009] すなわち、本発明は以下の１）～８）に係るものである。

１）ノロウイルスのＶＰ１タンパク質、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を含有するノロウイルスワクチン組成物。

２）組成物中のヒスチジン又はその塩、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上アミノ酸又はその塩の含有量が、それぞれ２５ｍＭ以上４００ｍＭ以下である、１）のワクチン組成物。

３）さらに、アスパラギン酸又はその塩を含有する、１）のワクチン組成物。

４）組成物中のアスパラギン酸又はその塩の含有量が、２５ｍＭ以上２００ｍＭ以下である、３）のワクチン組成物。

５）ノロウイルスのＶＰ１タンパク質をワクチン抗原として含むノロウイルスワクチンの安定化方法であって、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を添加する工程を含む、方法。

６）ヒスチジン又はその塩、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上アミノ酸又はその塩が、ワクチン中の濃度がそれぞれ２５ｍＭ以上４００ｍＭ以下となるように添加される、５）の方法。

７）さらに、アスパラギン酸又はその塩を添加する工程を含む、５）の方法。

８）アスパラギン酸又はその塩が、ワクチン中の濃度が２５ｍＭ以上２００ｍＭ以下となるように添加される、７）の方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ＶＰ１タンパク質を抗原としたノロウイルスワクチンの熱安定性が向上し、流通性及び普及性が高いノロウイルスワクチンを創製できるため、医薬品業界に大きく貢献できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]各種添加剤におけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価。

[図2]２種類の添加剤の組み合わせにおけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価。

[図3]ヒスチジン濃度とＶＰ１タンパク質の熱安定性。

[図4]ヒスチジンと各種アミノ酸の組み合わせにおけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価。

[図5]ヒスチジン及びリシンを含む３剤混合時のＶＰ１タンパク質の熱安定性評価。

[図6]ヒスチジン及びグルタミン酸を含む３剤混合時のＶＰ１タンパク質の熱安定性評価。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0013] 本発明において、「ノロウイルスワクチン」とは、ヒトノロウイルスのワクチンであり、ノロウイルスウイルス様粒子（ＶＬＰ）をワクチン抗原とする。

ＶＬＰは、ウイルスのカプシドを細胞中で発現させた組換えタンパク質であり、ノロウイルスに形態的に類似し、内部に遺伝子を持たないウイルス様中空粒子である。

ＶＬＰの作製に用いられるノロウイルスとしては、現在知られているすべてのＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅠ（ＧⅠ）、ＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅡ（ＧⅡ）及びＧｅｎｏｇｒｏｕｐⅣ（ＧⅣ）の遺伝子型及び将来単離、同定される遺伝子型を包含し、適宜選択して使用することができる。すなわち、本発明のノロウイルスワクチンは、ＧⅠ、ＧⅡ及びＧⅣのいずれか一つのみの遺伝子型を含む単価ワクチンでもよく、複数の遺伝子型を含む多価ワクチンであっても良い。好ましくはＧⅠ、ＧⅡ及びＧⅣの複数の遺伝子型を含む多価ワクチンであり、より好ましくはＧⅠから１種類以上の遺伝子型及びＧⅡから１種類以上の遺伝子型を含む多価ワクチンである。

[0014] ＶＬＰを形成する組換えタンパク質は、ノロウイルスの構造タンパク質であるＶＰ１で構成され、このＶＬＰはバキュロウイルス発現システム、哺乳類細胞発現システム又は植物発現システム等を用いて生産することができる。

[0015] バキュロウイルス発現システムで使用する昆虫細胞は、チョウ目昆虫から樹立した細胞株であれば特に限定されず、例えば、カイコ細胞（ＢｍＮ細胞、ＢｍＮ４細胞、ＢｏＭｏ細胞等）、サクサン細胞（Ａｎｐｅ細胞）、スポドプテラ・フルギペルーダ細胞（Ｓｆ９細胞及びＳｆ２１細胞等）、クワゴマダラヒトリ細胞（Ｓｐｌｍ細胞）、イラクサキンウワバ細胞（Ｔｎ－５細胞、ＨＩＧＨ　ＦＩＶＥ細胞、ＭＧ１細胞等）等が挙げられる。また、これらの細胞に改変を加え派生した改良型の昆虫細胞株も包含される。

上記昆虫細胞を使用して調製されるノロウイルスワクチン抗原は、例えば、組換えバキュロウイルス感染後、２６～２８℃で２～１０日間程度の培養が行われ、培養終了後、感染細胞の培養上清が回収され、清澄化のため遠心分離及び濾過が行われる。次いで、濃縮のための限外濾過、並びに精製は密度勾配遠心分離やクロマトグラフィー等の手段を用いて行うことができる。

[0016] 本発明のノロウイルスワクチン組成物に含まれる抗原の量は、特異的抗体応答を誘導するのに十分な量、例えば１５μｇＶＰ１／株以上、好ましくは５０μｇＶＰ１／株以上であれば特に限定されるものではない。すなわち、本発明のノロウイルスワクチン中に含まれる抗原量は、例えば、１回の投与用量が１５～１５０μｇＶＰ１（ＶＰ１換算）、好ましくは５０～１００μｇＶＰ１（ＶＰ１換算）となるように調製することが挙げられる。

[0017] 本発明のノロウイルスワクチン組成物は、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を含有する。

本発明において、アミノ酸の塩としては、無機塩基、有機塩基、無機酸、有機酸等との塩が挙げられるが、ヒスチジンの塩としては、好ましくはナトリウム塩及び塩酸塩等が挙げられ、リシンの塩としては、好ましくは塩酸塩

、酢酸塩及び硫酸塩等が挙げられ、グルタミン酸の塩としては、好ましくはナトリウム塩、カリウム塩及び塩酸塩等が挙げられる。

後述する実施例に示すとおり、ヒスチジンにリシン又はグルタミン酸、或いはその両方を併用することにより、ＶＬＰを形成するノロウイルスのＶＰ１タンパク質の熱安定性が向上する。

したがって、ノロウイルスのＶＰ１タンパク質をワクチン抗原として含むノロウイルスワクチンにおいて、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を添加することにより、当該ワクチンを安定化することができる。

ここで、ワクチンの安定化とは、ＶＬＰを形成するノロウイルスのＶＰ１タンパク質の熱安定性が向上することを意味する。当該タンパク質の熱安定性は、例えばＴｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いて測定される熱変性曲線の変曲点温度（Ｔｉ）から算出することができる。

[0018] 本発明のノロウイルスワクチン組成物におけるヒスチジン又はその塩、また、ヒスチジンと組み合わせて使用されるリシン又はその塩、グルタミン酸又はその塩の組成物中の含有量（濃度）は、ＶＰ１タンパク質の熱安定性向上の点から、好ましくは２５ｍＭ以上、より好ましくは５０ｍＭ以上、好ましくは８０ｍＭ以上、さらに好ましくは１００ｍＭ以上で、且つ溶解性の点から好ましくは４００ｍＭ以下、より好ましくは２００ｍＭ以下、より好ましくは１５０ｍＭ以下である。

なお、ヒスチジン又はその塩、リシン又はその塩、グルタミン酸又はその塩の組成物中の含有量は、ＶＰ１タンパク質の熱安定性向上が得られる限り、同一濃度であっても異なる濃度であっても良い。例えば、組み合わせの割合（濃度比）は、ヒスチジン又はその塩を１とした場合、リシン又はその塩、グルタミン酸又はその塩は、好ましくは０．２５以上、より好ましくは０．５以上であり、そして、好ましくは２以下、より好ましくは１．５以下であり得る。

[0019] また、本発明のノロウイルスワクチンには、ノロウイルスのＶＰ１タンパ

ク質の安定性向上のため、ヒスチジン又はその塩と、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩の併用に加えて、アスパラギン酸又はその塩を併用するのが好ましい。例えば、ヒスチジン又はその塩と、リシン又はグルタミン酸のいずれかのアミノ酸又はその塩と、アスパラギン酸又はその塩の３種のアミノ酸を併用することが好適に挙げられる。

なお、アスパラギン酸の塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩及びマグネシウム塩等が例示される。

この場合、アスパラギン酸又はその塩の組成物中の含有量は、適宜設定できるが、好ましくは２５ｍＭ以上、より好ましくは５０ｍＭ以上であり、好ましくは２００ｍＭ以下、より、好ましくは１５０ｍＭ以下である。

[0020] 本発明のノロウイルスワクチン組成物において、３種のアミノ酸を併用する場合の好適な例としては、例えば、１）１００～１５０ｍＭヒスチジン又はその塩、１００～１５０ｍＭリシン又はその塩、及び１００～１５０ｍＭグルタミン酸又はその塩、２）１００～１５０ｍＭヒスチジン又はその塩、１００～１５０ｍＭリシン又はその塩、及び５０～１５０ｍＭアスパラギン酸又はその塩、３）１００～１５０ｍＭヒスチジン又はその塩、１００～１５０ｍＭグルタミン酸、及び５０～１５０ｍＭアスパラギン酸、の組合せが挙げられる。

[0021] 本発明のノロウイルスワクチン組成物は、公知の手法を用いて、ノロウイルスＶＰ１タンパク質、ヒスチジン又はその塩、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩、必要に応じてアスパラギン酸又はその塩を、水や緩衝液等の液体に溶解させて調製することができる。液体は、用途に応じて適宜選択できるが、例えば、水、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、生理食塩水、Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）等が挙げられる。

[0022] 本発明のノロウイルスワクチン組成物は、さらに医薬として許容され得る担体を含んでいてもよい。当該担体としては、ワクチンの製造に通常用いられる担体が挙げられ、具体的には、緩衝剤、乳化剤、保存剤（例えば、チメ

ロサール）、等張化剤、ｐＨ調整剤、不活化剤（例えば、ホルマリン）、スクワレン含有エマルジョンを除くアジュバント、免疫刺激剤等が例示される。

[0023] 本発明のノロウイルスワクチン組成物の１回の投与容量としては、投与部位や投与デバイスによって決定されるが、通常、０．０５～１．０ｍＬ程度であり、好ましくは０．２～０．５ｍＬである。

[0024] 本発明のノロウイルスワクチン組成物は非経口投与によって投与され、好ましくは注射投与である。注射投与としては、例えば皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、静脈内投与が挙げられる。

[0025] 本発明のノロウイルスワクチン組成物の投与対象は、ヒト及びヒトを除く哺乳動物が挙げられるが、ヒトが好ましい。ヒトを除く哺乳動物としては、例えば、ブタ、オランウータン、チンパンジー等が挙げられる。

実施例

[0026] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

[0027] 実施例１　熱安定性向上に寄与する添加剤のスクリーニング

本実施例では医薬品の添加剤として実績のある、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、マルトース、デキストラン４０、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、プロリン、メチオニン、Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン、エリソルビン酸、エデト酸ナトリウム、ジエチレントリアミン五酢酸、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０、ポロキサレンの合計２１種類を用いて、ノロウイルスのＶＰ１タンパク質の熱安定性への寄与を評価した。

[0028] 本実施例で使用したＶＬＰ（ＶＰ１タンパク質）の調製は以下に示す通りである。

Ｈｉｇｈ　Ｆｉｖｅ細胞に、ＧＩ．４（Ｃｈｉｂａ株）又はＧＩＩ．４（Ａｏｍｏｒｉ株）のＶＰ１タンパク質を組み込んだバキュロウイルスシードをＭＯＩ＝１で感染させ、回収の前日にベンゾナーゼを添加し、２７℃で合

計６日間撹拌培養した。培養終了後、回収した感染細胞の培養上清は遠心分離及びフィルター濾過にて清澄化させ、限外濾過により濃縮及び２ｗ／ｗ％しょ糖含有リン酸緩衝生理食塩液（ｐＨ７．２）へ置換した。バキュロウイルスの感染性を不活化するため、終濃度０．０５％となるように不活化剤であるベータプロピオラクトンを添加して、４℃、１２時間で反応させ、さらにウイルス除去フィルター（０．１μｍ）でバキュロウイルス粒子を除去した。このウイルス除去後に、セシウム密度勾配遠心でＶＰ１を含む画分を回収し、再度、限外濾過により濃縮及び１５ｗ／ｗ％しょ糖含有リン酸緩衝生理食塩液（ｐＨ７．２）へ置換した。この精製ＶＬＰを２６，０００×ｇで３０分間の超遠心後、さらに、上清をウイルス除去フィルター（０．１μｍ）で濾過して、これをワクチン抗原とした。

[0029] タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰを６．７ｍＭ リン酸緩衝液で希釈し、タンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように調製した。同じように、各添加剤で希釈しノロウイルスＶＬＰのタンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように調製した。なお、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、マルトース、デキストラン４０は終濃度として２００、２０、２ｍＭとなるように、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、プロリン、メチオニンは２５０、２５、２．５ｍＭとなるように、Ｎ－アセチル－Ｌ－システインは１０、１、０．１ｍＭとなるように、エリソルビン酸は１００、１０、０．１ｍＭとなるように、エデト酸ナトリウム、ジエチレントリアミン五酢酸は０．５、０．０５、０．００５ｍＭとなるように、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０、ポロキサレンは１、０．１、０．０１％となるように添加した。これらをＴｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いてＶＰ１タンパク質の熱安定性を評価した。

なお、Ｔｙｃｈｏ　ＮＴ．６では、熱変性曲線の変曲点温度（Ｔｉ値）を測定し、添加剤を加えない場合（ノロウイルスＶＰ１タンパク質のみ）に対する差分であるΔＴｉ値より、熱安定性を評価した。このΔＴｉ値が大きく

なることで、熱安定性が向上したと考えられる。

[0030] 測定結果は図１に示す通りであり、アミノ酸の添加によりΔＴｉ値が大幅に上昇し、これらはＶＰ１タンパク質の熱安定性向上に寄与すると考えられた。一方で、糖、抗酸化剤、キレート剤及び界面活性剤ではＴｉ値の上昇が確認されず、熱安定性に寄与しないと考えられた。また、アミノ酸の中でも特にグリシン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、メチオニンの熱安定性への寄与が大きく、これらのアミノ酸を添加することで熱安定性の高いノロウイルスワクチンの創製が可能になると考えられた。

[0031] 実施例２　２剤混合におけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価

実施例１にてノロウイルスの熱安定性に効果が確認されたアミノ酸（グリシン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、メチオニン）より２種類を混合し、熱安定性効果を検証した。タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰを上記で示した添加剤を単剤もしくは２剤混合したものでタンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように希釈した。なお、添加剤はそれぞれの終濃度が１００ｍＭとなるように添加し、これらをＴｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いてＶＰ１タンパク質の熱安定性を評価した。

Ｔｙｃｈｏ　ＮＴ．６での測定結果を図２に示す。図２より、ヒスチジン、アスパラギン酸、リシン及びグルタミン酸より２種類を混合した処方はΔＴｉ値が高く、熱安定性の向上する処方であり、このうちヒスチジンが最も熱安定性向上への寄与が大きいと考えられた。よって、以降の実験では、ヒスチジンの濃度設定を行い、ヒスチジン以外の他のアミノ酸を１種又は２種組み合わせて最適な処方を設定することとした。

[0032] 実施例３　ヒスチジン濃度とＶＰ１タンパク質の熱安定性評価

熱安定性への寄与が大きいヒスチジンについて、ヒスチジン濃度と熱安定性向上効果の関係を検討した。タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰにヒスチジンを添加し、タンパク質含量が１００μｇ／ｍＬと

なるように希釈した。なお、ヒスチジンはそれぞれ終濃度が２５、５０、１００ｍＭとなるように添加した。調製したこれらの溶液を、Ｔｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いてＶＰ１タンパク質の熱安定性を評価した。

測定結果を図３に示すが、設定した濃度範囲内ではＴｉ値が濃度依存的に上昇していた。したがって、ヒスチジンの添加濃度は１００ｍＭまでは高濃度となるほど、熱安定性の向上効果も高いことがわかった。しかし、４００ｍＭを超える高濃度ではヒスチジンの溶解性も悪くなり、保存期間中に析出の可能性がある。また、注射剤では高張液となると投与時の痛みを引き起こす可能性があるため、ヒスチジン濃度は１００ｍＭに設定した。

[0033] 実施例４　ヒスチジンと各種アミノ酸との混合処方におけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価

実施例２において、混合処方で熱安定性向上効果を示したグルタミン酸、アスパラギン酸、リシンについて、１００ｍＭヒスチジンと組み合わせた場合のＶＰ１タンパク質の熱安定性への寄与を評価した。

タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰにヒスチジンを添加し、そこへさらにグルタミン酸もしくはアスパラギン酸、リシンを添加し、タンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように希釈した。なお、ヒスチジンは終濃度が１００ｍＭとなるように添加し、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシンは２５、５０、１００ｍＭとなるようにそれぞれ添加した。調製した各溶液をＴｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いてＶＰ１タンパク質の熱安定性を評価した。

その結果、図４に示す通り１００ｍＭヒスチジンと１００ｍＭグルタミン酸、１００ｍＭアスパラギン酸若しくは１００ｍＭリシンを混合することで、ＶＰ１タンパク質の熱安定性は更に向上し、特にグルタミン酸又はリシンとの組み合わせでは熱安定性の向上効果は高かった。

[0034] 実施例５　３剤混合におけるＶＰ１タンパク質の熱安定性評価

実施例４において、特に熱安定性の向上が確認されたヒスチジンとリシン

の混合処方にさらにグルタミン酸若しくはアスパラギン酸、ヒスチジンとグルタミン酸の混合処方にさらにリシンもしくはアスパラギン酸を添加し、３剤混合した場合の熱安定性を評価した。

タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰにヒスチジンとリシンを添加し、さらにグルタミン酸もしくはアスパラギン酸を添加し、タンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように希釈した。なお、ヒスチジンとリシンは終濃度が１００ｍＭとなるように添加し、グルタミン酸とアスパラギン酸は２５、５０、１００ｍＭとなるようにそれぞれ添加した。また、タンパク質含量１６００μｇ／ｍＬのノロウイルスＶＬＰにヒスチジンとグルタミン酸を添加し、さらにリシンもしくはアスパラギン酸を添加し、タンパク質含量が１００μｇ／ｍＬとなるように希釈した。なお、ヒスチジンとグルタミン酸は終濃度が１００ｍＭとなるように添加し、リシンとアスパラギン酸は２５、５０、１００ｍＭとなるようにそれぞれ添加した。調製した各溶液をＴｙｃｈｏ　ＮＴ．６（ＮａｎｏＴｅｍｐｅｒ社）を用いてＶＰ１タンパク質の熱安定性を評価した。

[0035] 図５にヒスチジンとリシンの組み合わせにさらにグルタミン酸若しくはアスパラギン酸を添加した結果を示す。図５より、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸を１００ｍＭ添加することで熱安定性の更なる向上が確認された。また、図６にヒスチジンとグルタミン酸の組み合わせにさらにリシン若しくはアスパラギン酸を添加した結果を示す。図６より、リシン若しくはアスパラギン酸を１００ｍＭとなるよう添加する若しくはアスパラギン酸を５０ｍＭとなるよう添加することでＶＰ１タンパク質の熱安定性は更に向上することがわかった。

[0036] したがって、これらの結果より、１）１００ｍＭヒスチジン、１００ｍＭリシン及び１００ｍＭグルタミン酸、２）１００ｍＭヒスチジン、１００ｍＭリシン及び１００ｍＭアスパラギン酸、３）１００ｍＭヒスチジン、１００ｍＭグルタミン酸及び１００ｍＭ若しくは５０ｍＭアスパラギン酸、これら３種類の組成がＶＰ１タンパク質の熱安定性向上効果の高い３剤混合処方

であると考えられた。

請求の範囲

[請求項1] ノロウイルスのＶＰ１タンパク質、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を含有するノロウイルスワクチン組成物。

[請求項2] 組成物中のヒスチジン又はその塩、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上アミノ酸又はその塩の含有量が、それぞれ２５ｍＭ以上４００ｍＭ以下である、請求項１記載のワクチン組成物。

[請求項3] さらに、アスパラギン酸又はその塩を含有する、請求項１記載のワクチン組成物。

[請求項4] 組成物中のアスパラギン酸又はその塩の含有量が、２５ｍＭ以上２００ｍＭ以下である、請求項３記載のワクチン組成物。

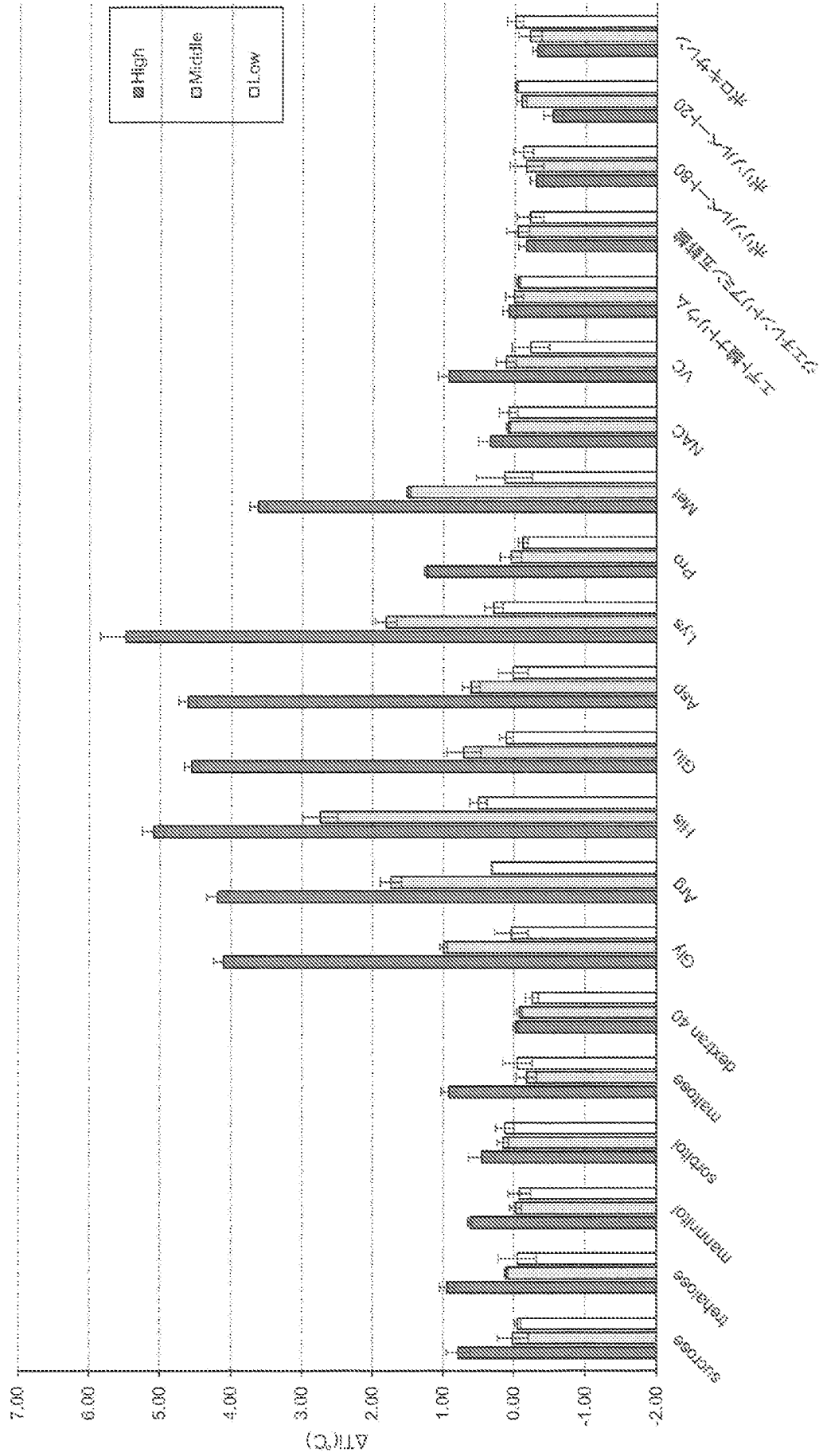
[請求項5] ノロウイルスのＶＰ１タンパク質をワクチン抗原として含むノロウイルスワクチンの安定化方法であって、ヒスチジン又はその塩、並びにリシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上のアミノ酸又はその塩を添加する工程を含む、方法。

[請求項6] ヒスチジン又はその塩、リシン及びグルタミン酸から選ばれる１種以上アミノ酸又はその塩が、ワクチン中の濃度がそれぞれ２５ｍＭ以上４００ｍＭ以下となるように添加される、請求項５記載の方法。

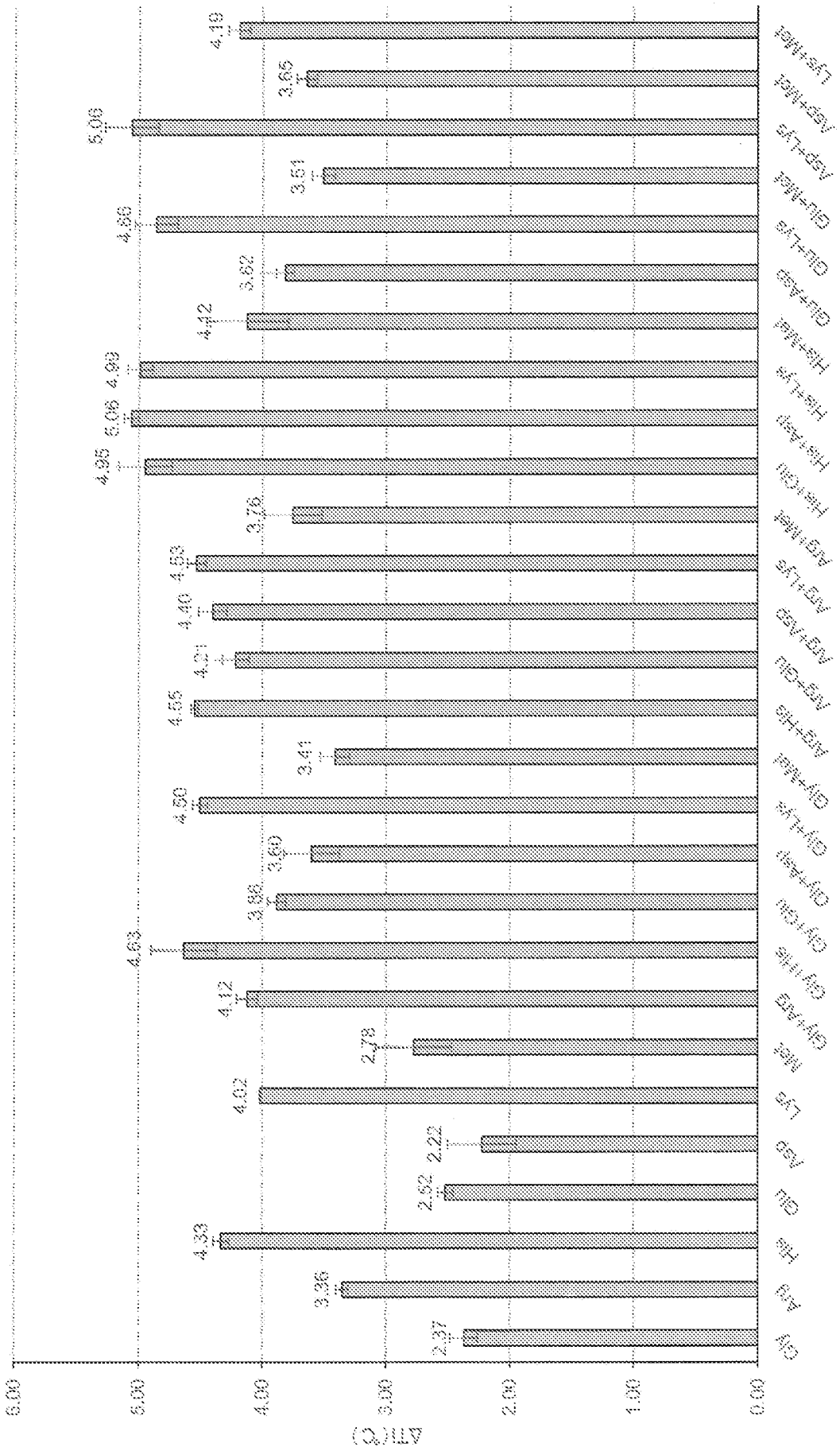
[請求項7] さらに、アスパラギン酸又はその塩を添加する工程を含む、請求項５記載の方法。

[請求項8] アスパラギン酸又はその塩が、ワクチン中の濃度が２５ｍＭ以上２００ｍＭ以下となるように添加される、請求項７記載の方法。

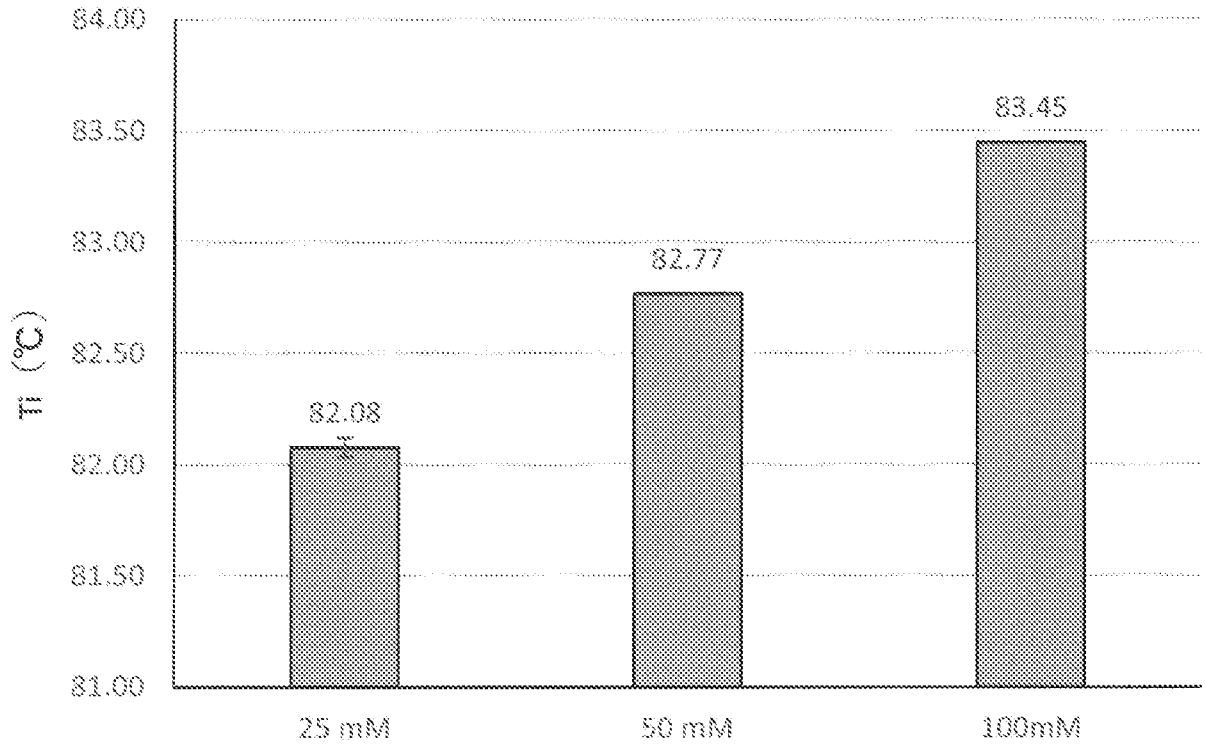
[図1]


High
Middle
Low
ΔT(℃)
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
-2.00
sucrose
trehalose
mannitol
sorbitol
maltose
dextran 40
Gly
Arg
His
Glu
Asp
Lys
Pro
Met
NAG
VC
エチルヘキサン酸ナトリウム
ジエチレングリコールモノエチルエーテル
米ヒドロキシプロピルデンプン
米ヒドロキシプロピルデンプン-60
米ヒドロキシプロピルデンプン-20
米ヒドロキシエチルデンプン

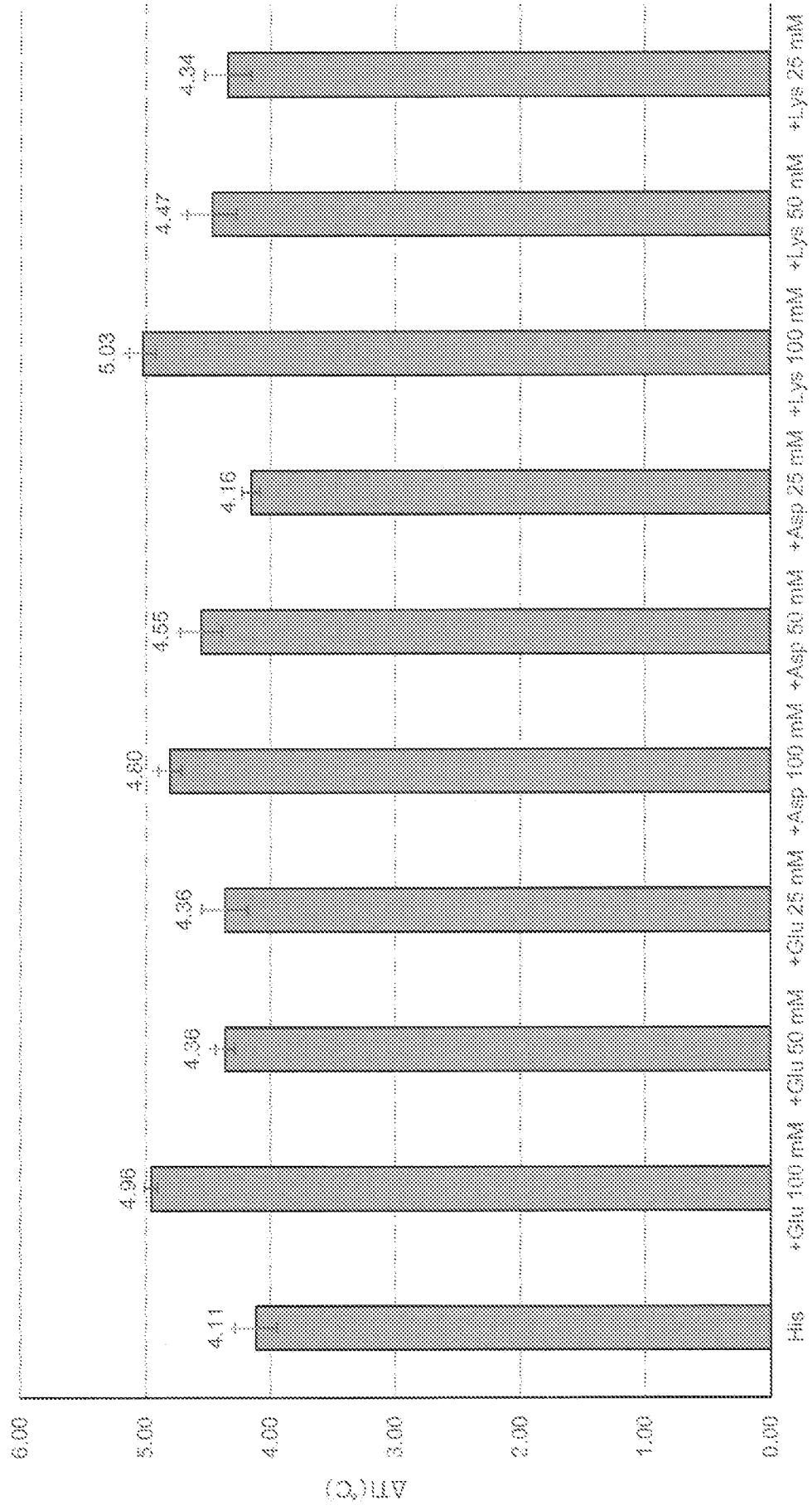
[図2]


ΔTm(℃)
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Gly
Arg
His
Glu
Asp
Lys
Met
Gly+Arg
Gly+His
Gly+Glu
Gly+Asp
Gly+Met
Gly+Lys
Gly+Asn
Arg+His
Arg+Glu
Arg+Asp
Arg+Lys
Arg+Met
His+Glu
His+Asp
His+Lys
His+Met
Glu+Asp
Glu+Lys
Glu+Met
Asp+Lys
Asp+Met
Lys+Met
4.19
3.65
5.06
3.51
4.66
3.62
4.12
4.93
5.06
4.95
3.76
4.53
4.40
4.21
4.55
3.41
4.50
3.60
3.86
4.63
4.12
2.78
4.02
2.22
2.52
4.33
3.36
2.37

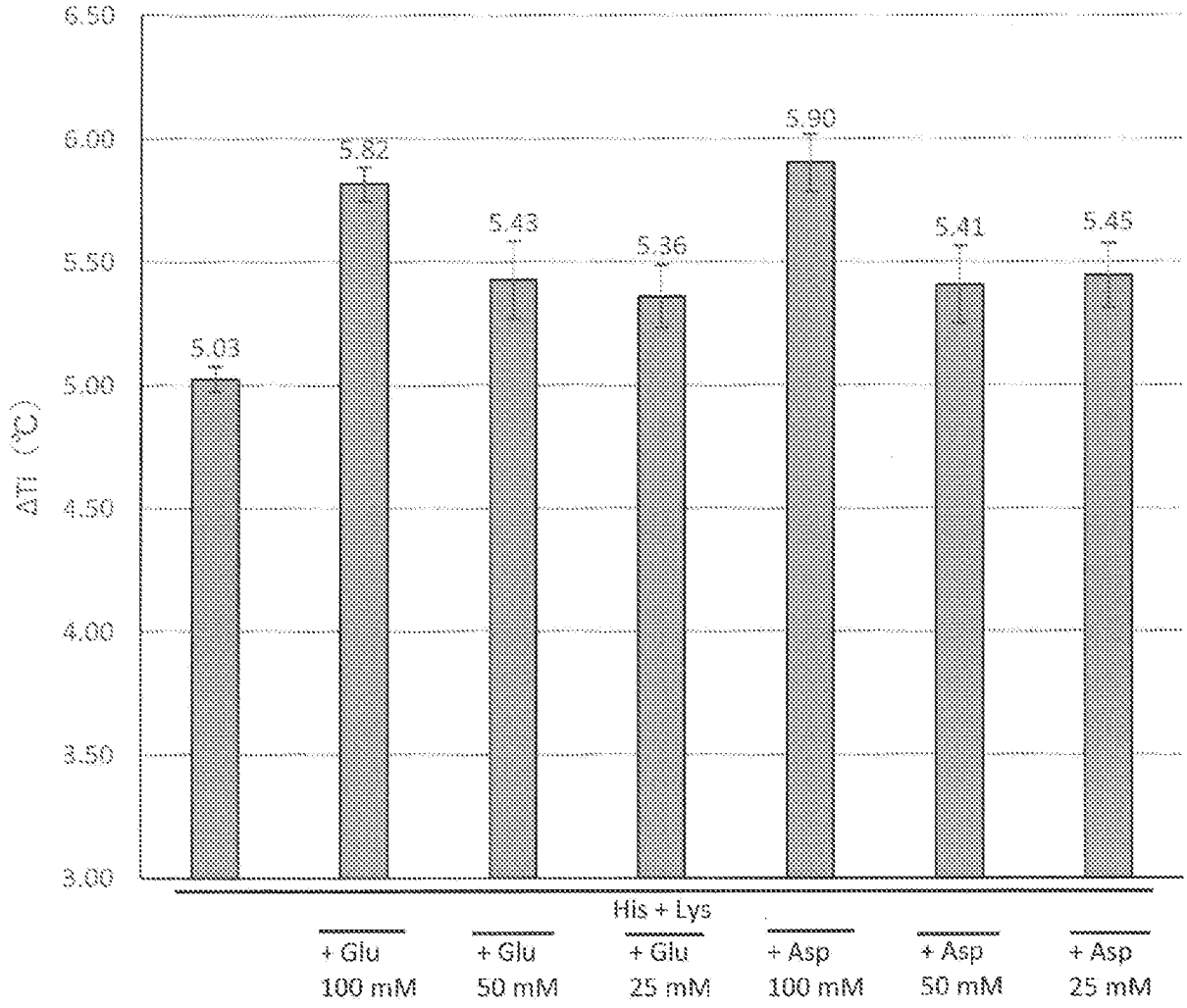
[図3]


84.00
83.50
83.00
82.50
82.00
81.50
81.00
Tt (°C)
82.08
82.77
83.45
25 mM
50 mM
100mM

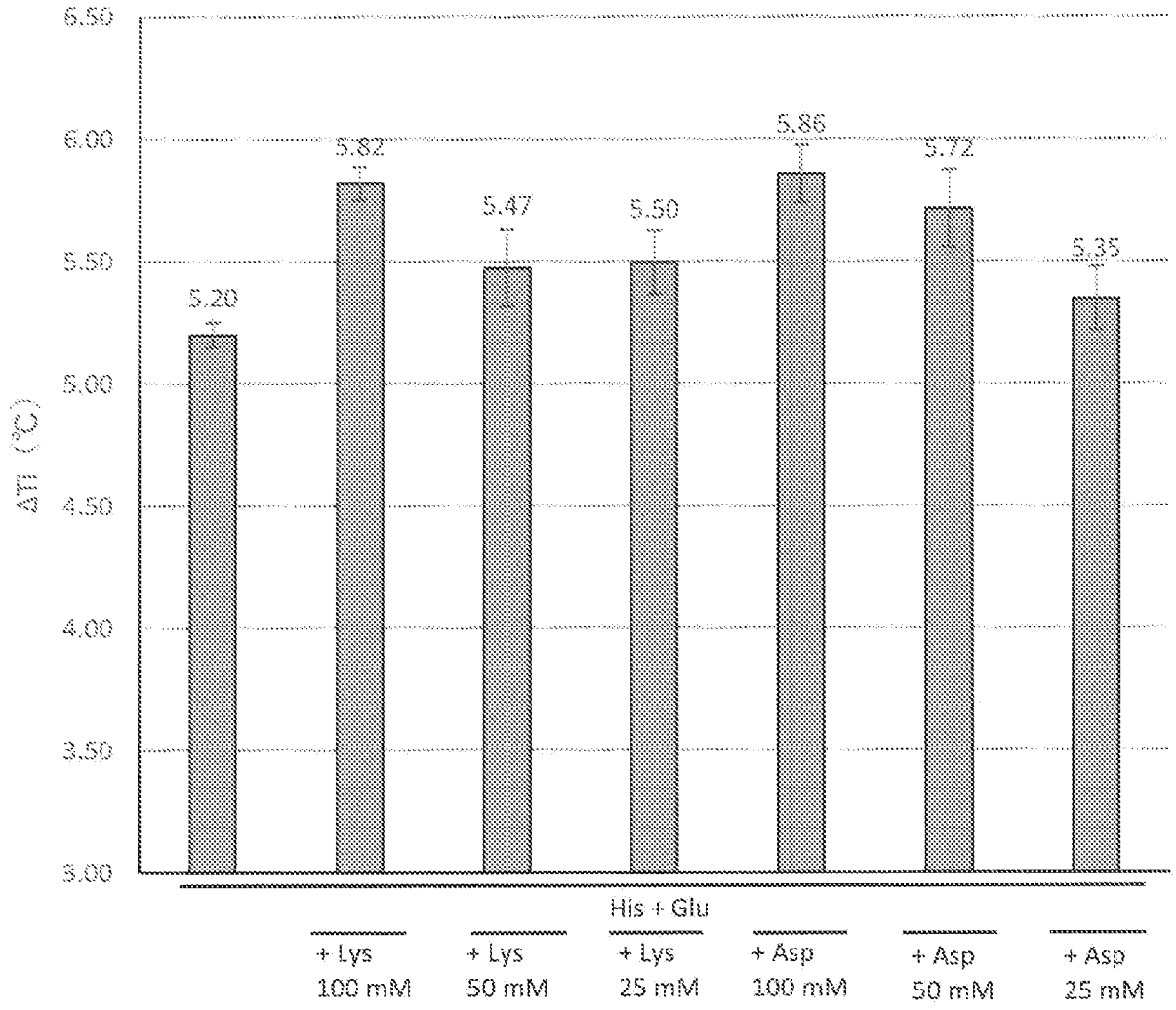
[図4]


ΔT(℃)
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
4.11
4.96
4.36
4.36
4.80
4.55
4.16
5.03
4.47
4.34
His
+Glu 100 mM
+Glu 50 mM
+Glu 25 mM
+Asp 100 mM
+Asp 50 mM
+Asp 25 mM
+Lys 100 mM
+Lys 50 mM
+Lys 25 mM

[図5]


6.50
6.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
ΔH (μJ)
5.03
5.82
5.43
5.36
5.90
5.41
5.45
His + Lys
+ Glu 100 mM
+ Glu 50 mM
+ Glu 25 mM
+ Asp 100 mM
+ Asp 50 mM
+ Asp 25 mM

[図6]


6.50
6.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
ΔH (μJ)
5.20
5.82
5.47
5.50
5.86
5.72
5.35
His + Glu
+ Lys 100 mM
+ Lys 50 mM
+ Lys 25 mM
+ Asp 100 mM
+ Asp 50 mM
+ Asp 25 mM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/011464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/125(2006.01)i; ***A61K 9/08***(2006.01)i; ***A61K 47/18***(2017.01)i; ***A61K 47/22***(2006.01)i; ***A61P 31/14***(2006.01)i; ***A61P 37/04***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i
FI: A61K39/125; A61P31/14; A61P37/04; A61P43/00 105; A61K9/08; A61K47/18; A61K47/22

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)

A61K39/125; A61K9/08; A61K47/18; A61K47/22; A61P31/14; A61P37/04; A61P43/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2021-534074 A (TAKEDA VACCINES, INC.) 09 December 2021 (2021-12-09) paragraphs [0001], [0113], [0132]	1-8
A	WO 2015/093452 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED.) 25 June 2015 (2015-06-25) paragraphs [0014], [0022], [0059], tables 15, 16	1-8
A	KISSMANN, Julian et al., Physical Stabilization of Norwalk Virus-like Particles, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2008, vol. 97, no. 10, pp. 4208-4218, DOI: 10.1002/jps.21315 summary	1-8
A	JP 49-20322 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIV.) 22 February 1974 (1974-02-22) p. 2, upper left column, line 7 to upper right column, line 1	1-8

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
01 May 2024	**21 May 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/011464

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-509226 A (SANOFI PASTEUR BIOLOGICS CO.) 25 March 2010 (2010-03-25) paragraphs [0038], [0066], [0067]	1-8
A	TANEJA, Superna et al., Increased thermal stability of proteins in the presence of amino acids, Biochemical Journal, 1994, vol. 303, pp. 147-153, DOI: 10.1042/bj3030147 summary	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/011464

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-534074 A	09 December 2021	US 2021/0308249 A1 paragraphs [0001], [0157], [0187] WO 2020/041192 A1 EP 3840778 A1	
WO 2015/093452 A1	25 June 2015	US 2016/0310412 A1 paragraphs [0042], [0076], [0221], table 15, 16 JP 6556632 B2 EP 3085357 B1	
JP 49-20322 A	22 February 1974	(Family: none)	
JP 2010-509226 A	25 March 2010	WO 2008/057550 A3 p. 14, lines 13-21, p. 22, lines 7-27 EP 2086581 B1 CN 101808657 A US 9132184 B2	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/011464

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 39/125(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i; A61K 47/18(2017.01)i; A61K 47/22(2006.01)i;
A61P 31/14(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: A61K39/125; A61P31/14; A61P37/04; A61P43/00 105; A61K9/08; A61K47/18; A61K47/22

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K39/125; A61K9/08; A61K47/18; A61K47/22; A61P31/14; A61P37/04; A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2021-534074 A (タケダ ワクチン, インコーポレイテッド) 09.12.2021 (2021-12-09) 段落[0001], [0113], [0132]	1-8
A	WO 2015/093452 A1 (武田薬品工業株式会社) 25.06.2015 (2015-06-25) 段落[0014], [0022], [0059], 表15, 16	1-8
A	KISSMANN, Julian et al., Physical Stabilization of Norwalk Virus-like Particles, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2008, Vol.97, No.10, Pages 4208-4218, DOI: 10.1002/jps.21315 要旨	1-8
A	JP 49-20322 A (財団法人 阪大微生物病研究会) 22.02.1974 (1974-02-22) 2頁左上欄7行-右上欄1行	1-8
A	JP 2010-509226 A (サノフィ パスツール バイオロジクス カンパニー) 25.03.2010 (2010-03-25) 段落[0038], [0066], [0067]	1-8

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
01.05.2024	21.05.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
川合　理恵 4U 2381
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	TANEJA, Superna et al., Increased thermal stability of proteins in the presence of amino acids, Biochemical Journal, 1994, Vol.303, Pages 147-153, DOI: 10.1042/bj3030147 要旨	1-8

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/011464

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-534074 A	09.12.2021	US 2021/0308249 A1 段落[0001], [0157], [0187] WO 2020/041192 A1 EP 3840778 A1	
WO 2015/093452 A1	25.06.2015	US 2016/0310412 A1 段落[0042], [0076], [0221], Table 15, 16 JP 6556632 B2 EP 3085357 B1	
JP 49-20322 A	22.02.1974	（ファミリーなし）	
JP 2010-509226 A	25.03.2010	WO 2008/057550 A3 p. 14 第13-21行, p. 22 第7-27行 EP 2086581 B1 CN 101808657 A US 9132184 B2	