

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7408660号
(P7408660)

(45)発行日 令和6年1月5日(2024.1.5)

(24)登録日 令和5年12月22日(2023.12.22)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12
A 6 1 K	39/21 (2006.01)	A 6 1 K	39/21
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42
請求項の数 32 (全41頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-531506(P2021-531506)	(73)特許権者	519135460
(86)(22)出願日	令和1年11月28日(2019.11.28)		キャタレント・ユーケー・スウィンドン
(65)公表番号	特表2022-510372(P2022-510372 A)		・ザイデイス・リミテッド
(43)公表日	令和4年1月26日(2022.1.26)		イギリス・グラスゴー・G 2・1 A L・
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/082940	(73)特許権者	521236933
(87)国際公開番号	WO2020/109485		マイメティックス・コーポレーション
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)		スイス・1 0 6 6・エパランジュ・ルー
審査請求日	令和4年11月18日(2022.11.18)		ト・ドゥ・ラ・コーニツシュ・4
(31)優先権主張番号	62/772,823	(74)代理人	100108453
(32)優先日	平成30年11月29日(2018.11.29)		弁理士 村山 靖彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100110364
早期審査対象出願			弁理士 実広 信哉
		(74)代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ビロソームを含む経口分散性ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含む脂質ベースの小胞;
5〜20質量%の少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタントであって、トレハロースを含む、クライオ-リオプロテクタント;
25〜40質量%のマトリックス形成剤であって、ゼラチンを含む、マトリックス形成剤;及び
40〜55質量%の構造形成剤であって、マンニトールを含む、構造形成剤
を含む経口固形ワクチン製剤。

【請求項2】

脂質ベースの小胞が、ビロソーム又はプロテオリポソームである、請求項1に記載の製剤。

10

【請求項3】

10〜15質量%の少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタントを含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項4】

33〜37質量%のマトリックス形成剤を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項5】

ゼラチンが、魚ゼラチンを含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項6】

魚ゼラチンが、高分子量魚ゼラチンである、請求項5に記載の製剤。

20

【請求項 7】

40～50質量%の構造形成剤を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項 8】

ピロソームが、インフルエンザウイルス膜又は他のエンベロープウイルスに由来する、請求項1に記載の製剤。

【請求項 9】

少なくとも1つの標的分子が、ピロソーム上に存在する、請求項1に記載の製剤。

【請求項 10】

少なくとも1つの標的分子が、HIV-1エンベロープ由来抗原を含む、請求項1に記載の製剤。

10

【請求項 11】

HIV-1エンベロープ由来抗原が、HIV-1 P1ペプチド及び/又はHIV-1組換えgp41を含む、請求項10に記載の製剤。

【請求項 12】

ピロソームが、アジュバントを含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項 13】

少なくとも1つの標的分子の口腔取り込みを促進するように口腔で崩壊するように設計されている、請求項1に記載の製剤。

【請求項 14】

口腔内に放置された後180秒以内に崩壊するように設計されている、請求項13に記載の製剤。

20

【請求項 15】

口腔内に放置された後90秒以内に崩壊するように設計されている、請求項13に記載の製剤。

【請求項 16】

口腔内に放置された後60秒以内に崩壊するように設計されている、請求項13に記載の製剤。

【請求項 17】

口腔内に放置された後30秒以内に崩壊するように設計されている、請求項13に記載の製剤。

30

【請求項 18】

口腔内への放置によって患者に投与された場合に免疫応答を誘導するように設計されている、請求項13に記載の製剤。

【請求項 19】

口腔内への放置が、舌上若しくは舌下、又は頬内若しくは咽頭領域内への放置である、請求項18に記載の製剤。

【請求項 20】

経口固形ワクチン製剤を形成する方法であって、
液体ピロソーム製剤を予備成形鑄型に投入する工程であって、ピロソーム製剤が、
免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含む脂質ベースの小胞；
1～5質量%のクライオ-リオプロテクタントであって、トレハロースを含む、クライオ-リ
オプロテクタント；
4～8質量%のマトリックス形成剤であって、ゼラチンを含む、マトリックス形成剤；及び
5～10質量%の構造形成剤であって、マンニトールを含む、構造形成剤
を含む工程と；
投入したピロソーム製剤を-60℃～-90℃の温度で冷凍する工程と；
冷凍したピロソーム製剤を-15℃未満の温度で3～9時間保持することによってそれをアニ
ールする工程と；
アニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥して製剤を形成する工程と
を含む方法。

40

50

【請求項 2 1】

投入したピロソーム製剤が、-60℃～-90℃の温度で、約1～5分間の持続期間の間冷凍される、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 2】

アニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥する工程が、アニールしたピロソーム製剤を-10℃～-20℃の温度で20～28時間保持する第1の工程、及びアニールしたピロソーム製剤を-5℃～約-15℃の温度で14～22時間保持する第2の工程を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 3】

冷凍乾燥する工程が、600ミリバール未満の圧力で行われる、請求項20に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

ピロソーム製剤が、約6.5～8のpHを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 5】

ゼラチンが、魚ゼラチンを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 6】

魚ゼラチンが、高分子量魚ゼラチンである、請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

脂質ベースの小胞が、インフルエンザウイルス又は呼吸器合胞体ウイルスに由来する、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも1つの標的分子が、HIV-1エンベロープ由来抗原を含む、請求項20に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

HIV-1エンベロープ由来抗原が、HIV-1 P1ペプチド及び/又はHIV-1組換えgp41を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 0】

脂質ベースの小胞が、アジュバントを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 3 1】

経口固形ワクチン製剤を形成する方法であって、
液体ピロソーム製剤を予備成形鑄型に投入する工程であって、ピロソーム製剤が、
免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含むピロソーム；
2～10質量%のクライオ-リオプロテクタントであって、トレハロースを含む、クライオ-リ
オプロテクタント；及び
60～200mMの緩衝系
を含む20～50質量%のピロソーム濃縮物と、
4～8質量%のマトリックス形成剤であって、ゼラチンを含む、マトリックス形成剤と、
5～10質量%の構造形成剤であって、マンニトールを含む、構造形成剤と
を含む工程；
投入したピロソーム製剤を-60℃～-80℃の温度で冷凍する工程；
冷凍したピロソーム製剤を-15℃未満の温度で3～9時間保持することによってそれをアニールする工程；並びに
アニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥して製剤を形成する工程
を含む方法。

30

【請求項 3 2】

緩衝系が、HEPES-塩化ナトリウムを含む、請求項31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本出願は、2018年11月29日出願の米国仮出願第62/772,823号の利益を主張し、その

40

50

全内容を、参照により本明細書に組み込む。

【0002】

本開示は、粘膜免疫化を誘導する経口剤形に関する。特に、本開示は、ピロソームを含有する冷凍乾燥経口分散性ワクチンに関する。本出願に至ったプロジェクトは、European Union's Horizon 2020 research and innovation programmeからの資金を贈与契約第646122号の下で受容している。

【背景技術】

【0003】

ワクチンは、伝統的に、筋内、皮内又は皮下注射によって送達される。これらの注射は、強い全身性免疫応答を産生することができる一方で、粘膜免疫応答を誘発するための効力は、特にサブユニットワクチンについては、可変性であり、多くの場合、弱い、又は検出不能である。注射したワクチンを処理した流入領域リンパ節から、抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL:cytotoxic T cell)及びB細胞から産生された抗体が、体内の様々な器官へ遊走しうるが、それらの様々な粘膜組織(例えば、生殖器、腸、呼吸器)への遊走は、多くの場合、不十分な粘膜ホーミング受容体及び走化性のために限定的か、又は可能ではない。しかしながら、これもまた非経口免疫化経路として考えられる鼻内経路は、ワクチンが粘膜部位で送達される場合よりアクセス可能である、一部の相互接続を共有している呼吸器、生殖器及び腸管内で良好な粘膜免疫応答を誘発することができる。それゆえ、そのような非経口ワクチンは、一部の場合粘膜病原体に対する、保護を提供することができる。

【0004】

ほとんどの病原体は、粘膜組織(口腔、呼吸器、生殖器及び腸管)を通して身体に入り、それらの多くは、粘膜組織においてのみ複製するので、粘膜ワクチン接種は、局所及び遠位粘膜部位での自然免疫応答(例えば、NK細胞)及び適応免疫応答(T及びB細胞)の両方を誘導することによって最前線の防御を最適に誘導することができる。

【0005】

常在粘膜防御により、末梢からの細胞動員における遅延を伴わずに、即時の保護が可能であり、このことは、病原体が拡がる前、及び一部の場合病原巣確立前の伝染及び感染事象の非常に早期の事象に、より効率的に干渉することを可能にする。

【0006】

粘膜組織及びリンパ節は、免疫細胞の90%超を含有する。更に、粘膜抗体は、全身抗体産生の約80%である。したがって、粘膜抗体による局所免疫応答は、粘膜感染(例えば、HIV-1、ヘルペスウイルス、ロタウイルス等)及び他の器官に達するための粘膜組織を介した侵入(例えば、HIV-1、B型肝炎、結核)に対する最前線の防御として作用することができる。対照的に、血液抗体は、一旦病原体が粘膜防御を通過したらバックアップ防御として、又は粘膜抗体及び粘液環境と相乗的に作用することができる。血液抗体は、主に、蚊咬傷(例えば、マラリア、チクングニア熱、デング熱、ジカ熱、西ナイルウイルス、黄熱病等)又は偶発的皮膚/粘膜創傷(例えば、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、シュードモナス・エルジノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))後に血流に直接入る病原体に対処するための効率的な最前線の防御として作用する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】WO2004110486号

【文献】WO2004071492号

【文献】WO2007099446号

【文献】WO2016039619号

【文献】EP2058002号

【文献】WO2016039620号

【文献】EP2624815B1号

【文献】仮出願第62/640,394号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system; Moser C.ら、Expert review、779～791頁(2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

粘膜ワクチン送達(頬、舌下、鼻、口腔又は膣粘膜を介する)には、局所及び遠位抗体免疫応答並びに全身性免疫応答を誘導する手段としてますます関心が寄せられている。加えて、固形剤形(例えば、頬/舌下錠剤、経口錠剤又はカプセル、膣インサート)による粘膜ワクチン送達は、集団免疫化、患者コンプライアンス、使用の容易さ、製品の有効保存期間安定性、低温流通に依存しない性能等のいくつかの利点を提供することができる。更に、粘膜ワクチン送達は、針注射恐怖症を有する患者に好適であることがあり、患者は、十分な説明によりワクチンを自己投与することができる。頬/舌下経路は、薬物及び小分子を血流に送達するために何年間も使用されているが、ワクチンのための粘膜送達手段としてのその適用は、ほとんど注目されていない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

脂質ベースの小胞は、薬物、ワクチン又はアジュバント送達系及びそれらの組合せとして使用することができる。脂質ベースの小胞は、基本構造(粒子)を形成する1つ又はいくつかの天然及び/又は合成脂質と、追加の任意選択の成分(ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、小分子)とからなってもよい。脂質ベースの小胞は、ナノ粒子(約20～200nm)～マイクロメートル未満(約200～800nm)～マイクロメートル(約800nm～10μm)スケールに及びうる。

【0011】

ビロソーム及びリポソームは、脂質ベースの小胞系に属する。ビロソームは単層であり、リポソームは単層、二層又は多層でありうる。ビロソームは、脂質ベースのビロソーム粒子の形成のための出発物質として使用される任意のエンベロープウイルス由来タンパク質を含有するタイプのサブユニットワクチンである。これらのビロソームは、遺伝物質を欠き、非複製性であり、且つ感染性ではない場合があり、そのため、それらが安定化形態で配合されうる限り、それらは経腸及び非経口免疫化に好適かつ安全である。ビロソームは、ペプチド、タンパク質及び/若しくは炭水化物形態、核酸、アジュバント、特定の脂質並びに/又は小分子(薬物)の下、追加の分子、例えば、同種標的分子(同じ病原体起源)又は異種標的分子(出発ウイルス物質とは異なる病原体由来)を含有してもよい。ビロソームと同様に、また、リポソームは、医薬、ワクチン及びアジュバントの投与のための媒体として使用することができるが、脂質膜は、任意のネイティブウイルスタンパク質を含有しない。一部の実施形態では、本明細書で使用されるリポソームは、プロテオリポソーム(すなわち、タンパク質を伴うリポソーム)でありうる。

【0012】

理想的には、安定化は、低温流通に依存しないワクチン保存を可能にしうるか、又はワクチンが製品の生物活性を損なうことなく、推奨される低温流通条件外で高温及び低温行程に耐えることを可能にしうる。

【0013】

出願人らは、ビロソームを含有する冷凍乾燥経口分散性ワクチン、及びビロソームの安定性を保存しうる(粒子構造について物理的に、且つ標的分子について化学的に)、そのようなワクチンを作製する方法を発見した。製品安定性は、低温流通保存条件に依存せず、周囲温度(例えば、約25℃)での保存中に維持することができ、また、偶発的な冷凍条件(例えば、約-4℃～約-17℃)、及び温暖な国々で起こる高温への曝露(例えば、35℃～45℃)に耐えうる。ビロソームワクチンを含有する本明細書で開示する冷凍乾燥舌下剤形は、粘膜免疫を誘導することができ、また、全身性免疫応答を誘発することができる。特に、液

10

20

30

40

50

体ピロソーム濃縮物及びその緩衝液の組成と、固形剤形のための液体ベースマトリックス(ピロソーム濃縮物を除外する)の組成と、冷凍乾燥舌下錠剤の下で固形剤形を生成するための製造条件との組合せにより、ピロソーム及び標的分子完全性が保存されており、様々な環境条件下での保存中の安定性を有する、舌下錠剤のための適切な物理的属性を有する固形ワクチン形態を生成することができる。安定なピロソーム固形剤形を投与することは、舌下粘膜免疫化に好適でありうる。

【0014】

ピロソームは、精製した出発ウイルス由来のウイルス膜タンパク質を含有する脂質膜を有するので、それらは、エンベロープウイルス様粒子(「VLP」)ファミリーに属する。VLPとして、ピロソームは、ネイティブウイルスエンベロープの機能的活性を伴って、又は伴わずに、ウイルス粒子構築、組成、抗原膜表面提示を綿密に模倣しうる。ピロソームは、一般的に、可溶化剤によるエンベロープウイルスからの可溶化した膜タンパク質及び脂質の精製、続いてアジュバントを伴うか、又は伴わない天然又は合成脂質及び抗原の添加、並びに前記可溶化剤の、混合物からの除去によって得られ、脂質二分子膜を形成し、それらから突き出すタンパク質を伴う、再構成されたウイルス膜を含みうる。抗原は、ネイティブタンパク質、及び組換え又は合成タンパク質又はペプチドでありうる。また、ピロソームを最初に形成し、その後、それらの膜の共有修飾又は非共有修飾によって、アジュバント及び他の分子を含有するように修飾してもよい。ピロソームの特徴的な特色は、それらが、ネイティブウイルスエンベロープの組成、表面構築及び機能的活性を綿密に模倣しうることである。一部の場合、CD8+T細胞の誘導がワクチン法の部分である場合、前記ピロソームの特に重要な特徴は、融合膜活性を有するヘマグルチニン(HA)受容体結合の保存である。ワクチン法が抗原特異的抗体の誘導に集中している場合、HA融合活性は絶対的に必要ではないが、それでも、賦形剤としてのHAの存在は、特にそのような特性を欠きうる小抗原及びペプチドについては、T細胞ヘルプを提供しうるもので、それは重要である。本開示では特異的ワクチンが言及されるが、送達プラットフォームとしてピロソームを使用する全てのワクチンが、本開示によって企図される。HIV抗原(P1及びrgp41)及びTLR7/8アジュバントを含有するインフルエンザピロソームは、本明細書で開示するワクチンのためのモデルピロソーム濃縮物として使用することができる。HIV抗原rgp41を有するインフルエンザピロソームは、様々な動物研究において、並びに鼻内及び筋内経路を介したフェーズ1臨床研究において免疫応答を誘発することができることが示されている。そのような研究では、ピロソーム製剤は、針又は鼻液体スプレーによって投与される液体形態であり、それは、有効活性成分(「API」)の化学修飾のために4℃での限定的な有効保存期間安定性を示しやすかった。水性環境に多くの場合存在するそのようなAPI化学修飾を防止又は低減するために、低含水量の固形ワクチン形態を開発することが、有望な手法として特定された。

【0015】

出願人らは、本明細書で開示する冷凍乾燥経口分散性ワクチンとしての固形ワクチン形態の産生における様々な問題を克服することができた。特に、抗原及びアジュバントを有するピロソームを含有するインフルエンザベースのピロソーム濃縮物は、緩衝塩溶液中の懸濁液として供給されうる。冷凍乾燥ワクチン剤形を産生するために、錠剤内の頑健且つ多孔性の構造を、製造中に産生し、且つ後続の保存中に維持するべきである。ピロソーム濃縮物中の緩衝塩の存在は、そのような頑健且つ多孔性の構造の製造において困難を提示しうる。そのため、出願人らは、冷凍乾燥プロセス中に破壊又は部分的に破壊されない頑健な剤形の形成を可能にするための製造条件に関連する賦形剤の適切な量を発見した。

【0016】

加えて、また、冷凍、アニール及び冷凍乾燥プロセスは、ピロソーム粒子の完全性を損傷しうる。十分な量のピロソーム粒子が舌下粘膜を通過し、免疫細胞によって処理されて、全身性免疫応答によっても支持されうる粘膜免疫応答を誘導することができるように、十分なピロソーム粒子が冷凍乾燥製品中に残留するために、このピロソームへの損傷は、最小限にするべきである。そのため、出願人らは、賦形剤利用と冷凍乾燥プロセスとの

均衡をはかって、ピロソーム免疫原性(例えば、限定的なクラスターの存在を伴うインタクトなピロソーム)及び良好な剤形特性(例えば、経口崩壊舌下錠剤)の両方を維持することができた。

【0017】

一部の実施形態では、経口固形ワクチン剤形は、免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含む脂質ベースの小胞;5~20質量%の少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタント;25~40質量%のマトリックス形成剤;及び40~55質量%の構造形成剤を含む。一部の実施形態では、脂質ベースの小胞は、ピロソーム又はプロテオリボソームである。一部の実施形態では、剤形は、10~15質量%の少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタントを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタントは、トレハロースを含む。一部の実施形態では、剤形は、33~37質量%のマトリックス形成剤を含む。一部の実施形態では、マトリックス形成剤は、ゼラチンを含む。一部の実施形態では、ゼラチンは、魚ゼラチンを含む。一部の実施形態では、魚ゼラチンは、高分子量魚ゼラチンである。一部の実施形態では、剤形は、40~50質量%の構造形成剤を含む。一部の実施形態では、構造形成剤は、マンニトールを含む。一部の実施形態では、ピロソームは、インフルエンザウイルス膜又は他のエンベロップウイルスに由来する。一部の実施形態では、少なくとも1つの標的分子は、ピロソーム上に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つの標的分子は、HIV-1エンベロップ由来抗原を含む。一部の実施形態では、HIV-1エンベロップ由来抗原は、HIV-1 P1ペプチド及び/又はHIV-1組換えgp41を含む。一部の実施形態では、ピロソームは、アジュバントを含む。一部の実施形態では、剤形は、少なくとも1つの標的分子の口腔取り込みを促進する。一部の実施形態では、剤形は、口腔内に放置された後180秒以内に崩壊する。一部の実施形態では、剤形は、口腔内に放置された後90秒以内に崩壊する。一部の実施形態では、剤形は、口腔内に放置された後60秒以内に崩壊する。一部の実施形態では、剤形は、口腔内に放置された後30秒以内に崩壊する。一部の実施形態では、免疫応答は、口腔内への放置によって患者に投与された場合に誘導される。一部の実施形態では、口腔内への放置は、舌上若しくは舌下、又は頬内若しくは咽頭領域内への放置である。

【0018】

一部の実施形態では、患者において免疫応答を誘導する方法は、免疫応答を必要とする者の口腔内に上記の剤形のいずれかを放置する工程を含む。一部の実施形態では、口腔内への放置は、舌上若しくは舌下、又は頬内若しくは咽頭領域内への放置である。

【0019】

一部の実施形態では、経口固形ワクチン剤形を形成する方法は、液体ピロソーム製剤を予備成形鑄型に投入する工程であって、ピロソーム製剤が、免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含む脂質ベースの小胞、1~5質量%のクライオ-リオプロテクタント、4~8質量%のマトリックス形成剤、及び5~10質量%の構造形成剤を含む工程と;投入したピロソーム製剤を-60℃~-90℃の温度で冷凍する工程と;冷凍したピロソーム製剤を-15℃未満の温度で3~9時間保持することによってそれをアニールする工程と;アニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥して剤形を形成する工程とを含む。一部の実施形態では、投入したピロソーム製剤は、-60℃~-90℃の温度で、約1~5分間の持続期間の間冷凍される。一部の実施形態では、アニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥する工程は、アニールしたピロソーム製剤を-10℃~-20℃の温度で20~28時間保持する第1の工程、及びアニールしたピロソーム製剤を-5℃~約-15℃の温度で14~22時間保持する第2の工程を含む。一部の実施形態では、冷凍乾燥する工程は、600ミリバール未満の圧力で行われる。一部の実施形態では、ピロソーム製剤は、約6.5~8のpHを有する。一部の実施形態では、クライオ-リオプロテクタントは、トレハロースを含む。一部の実施形態では、マトリックス形成剤は、ゼラチンを含む。一部の実施形態では、ゼラチンは、魚ゼラチンを含む。一部の実施形態では、魚ゼラチンは、高分子量魚ゼラチンである。一部の実施形態では、構造形成剤は、マンニトールを含む。一部の実施形態では、脂質ベースの小胞は、インフルエンザウイルス又は呼吸器合胞体ウイルスに由来する。一部の実施形態では、少なくとも1つの標

的分子は、HIV-1エンベロープ由来抗原を含む。一部の実施形態では、HIV-1エンベロープ由来抗原は、HIV-1 P1ペプチド又はHIV-1組換えgp41を含む。一部の実施形態では、脂質ベースの小胞は、アジュバントを含む。

【0020】

一部の実施形態では、経口固形ワクチン剤形を形成する方法は、液体ピロソーム製剤を予備成形鑄型に投入する工程であって、ピロソーム製剤が、(1)免疫原性量の少なくとも1つの標的分子を含むピロソーム、2~10質量%のクライオ-リオプロテクタント、及び60~200mMの緩衝系を含む、20~50質量%のピロソーム濃縮物と;(2)4~8質量%のマトリックス形成剤と;(3)5~10質量%の構造形成剤とを含む工程;投入したピロソーム製剤を-60℃~-90℃の温度で冷凍する工程;冷凍したピロソーム製剤を-15℃未満の温度で3~9時間保持することによってそれをアニールする工程;並びにアニールしたピロソーム製剤を冷凍乾燥して剤形を形成する工程を含む。一部の実施形態では、緩衝系は、HEPES-塩化ナトリウムを含む。

10

【0021】

追加の利点は、以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかである。本明細書の実施例及び説明は、本質的に例示としてみなされるべきであり、限定としてみなされるべきではない。

【0022】

本出願で参照される特許文献、科学論文及びデータベースを含む全ての出版物は、各個々の出版物が個々に参照により組み込まれているのと同様に、全ての目的についてそれらの全体を参照により本明細書に組み込む。本明細書で示される定義が、参照により本明細書に組み込まれる特許、出願、公開出願及び他の出版物で示される定義と反するか、又はそうでなければそれと矛盾する場合、本明細書で示される定義が、参照により本明細書に組み込まれる定義に優先する。

20

【0023】

例示的な実施形態を、附属の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、本明細書で開示するワクチン剤形を産生するためのフローチャート概略図を示す。

30

【図2】図2は、本明細書で開示するワクチン剤形を産生するためのマトリックス配合〜最終舌下錠剤のフローチャートを示す。

【図3】図3Aは、完全にぬれた錠剤の写真及び略図である。図3Bは、硬質塊状物を伴う錠剤の写真及び略図である。図3Cは、冷凍乾燥錠剤の表面で形成する破壊された配合マトリックスのフィルム(外皮)を伴う錠剤の写真及び略図である。

【図4】図4は、5℃、25℃及び40℃で1及び3カ月間にわたり保存した(本明細書で開示する実施例2の分析)再構成Zydis(登録商標)舌下錠剤からの、ピロソーム-P1及びピロソーム-rgp41に結合する抗P1及び抗rgp41特異的抗体を示す免疫プロットの写真である。

【図5】図5は、両方とも4℃及び40℃で経時的に保存した、液体ピロソーム濃縮物、及びピロソームを含有する冷凍乾燥舌下錠剤のP1及びrgp41抗原の免疫原性を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0025】

脂質ベースの小胞(例えば、ピロソーム又はVLP)のための医薬組成物、及びこれらの医薬組成物を調製する方法が、本明細書で開示される。特に、本開示は、VLPの安定性(すなわち、構造的完全性及び抗原化学的安定性)を保存しうる、低温流通保存条件に依存せず保存されうる、且つまた、偶発的な冷凍条件及び温暖な国々で起こる高温への曝露に耐えうる冷凍乾燥経口分散性又は崩壊性剤形に関する。また、剤形は、VLPの物理的及び化学的属性を保持し、そのため、VLPは粘膜免疫化を誘導するための舌下送達に好適でありうる。

【0026】

50

出願人らは、マトリックス形成剤及び構造形成剤の量を配合及び最適化して、緩衝系及びクライオ-リオプロテクタントを含有するピロソーム濃縮物の高ローディングの使用に取り組むことができる配合を有することができた。賦形剤調整と関連して、剤形の製造パラメーターを最適化した。特に、アニール時間を最適化して、剤形に頑健性を与えるマンニトール結晶化を最大限にし、ピロソーム損傷を最小限にした。加えて、冷凍乾燥条件を最適化して、ピロソーム粒子への損傷を最小限にし、且つ冷凍乾燥中の構造破壊を最小限にした。

【0027】

脂質ベースの小胞系

脂質ベースの小胞は、薬物、ワクチン又はアジュバント送達系及びそれらの組合せとして使用することができる。脂質ベースの小胞系は、小胞膜(粒子)を形成する1つ又はいくつかの天然及び/又は合成脂質(例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジルグリセロール、コレステロール、スフィンゴリピド及びそれらの誘導体)と、追加の任意選択の成分(ペプチド、タンパク質、炭水化物、小分子)とからなってもよい。脂質ベースの小胞は、ナノ粒子(約20~200nm)~マイクロメートル未満(約200~800nm)~マイクロメートル(約800nm~10µm)スケールに及ぶ。

【0028】

脂質ベースの小胞/粒子は、単層、二層又は多層脂質二分子膜小胞を含みうる。一部の実施形態では、脂質ベースの小胞/粒子は、天然及び/又は合成脂質から選択される脂質を含む脂質二分子膜を含みうる。そのような脂質は、抗原膜固定、抗原提示及び/又は最適エピトープ曝露のためのフォールディングを改善するために、病原体膜及び脂質ラフトマイクロドメインをより良く模倣するように使用されうる。脂質ベースの小胞/粒子は、粒子の表面に曝露されるか、又は粒子の内側に突き出するか、又はランダムな向きを有する、膜に固定された抗原及び/又はアジュバントを有してもよい。また、抗原及び/又はアジュバントは、脂質ベースの小胞/粒子の内腔の内側に内包されてもよい。

【0029】

ピロソームは、細胞非含有系様式でインビトロ(in vitro)にて組み立てられ、サブユニットワクチンカテゴリーに属するエンベロープVLPを形成する脂質ベースの小胞である。担体としてのピロソーム脂質膜は、任意のエンベロープウイルスに由来し、その結果、出発ウイルスからの少なくともネイティブウイルス膜タンパク質を含有してもよい。これらのピロソームは、ウイルス遺伝物質を欠き、複製することができず、感染性でなく、そのため、それらは全身性及び粘膜免疫化に好適かつ安全である。加えて、ピロソームは、ピロソーム表面への固定及び/又はピロソーム内腔の内側への封入が可能である追加の分子、例えば、抗原(例えば、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸)、アジュバント、特定の脂質及び/又は小分子(薬物)を含有してもよい。

【0030】

また、リポソームは、エンベロープウイルスの天然ウイルス膜由来のタンパク質を含有しない、少なくとも1つの脂質二分子膜を有する小胞として形成されうるタイプのサブユニットワクチンを形成する脂質ベースの小胞である。またインビトロで組み立てられたそのような脂質ベースの粒子は、遺伝物質を欠き、全身性及び粘膜適用に適切でありうる。加えて、リポソームは、リポソーム表面への固定及び/又はリポソーム内腔の内側への封入が可能である追加の分子、例えば、抗原(ペプチド、タンパク質及び/又は炭水化物、核酸)、アジュバント、特定の脂質及び/又は小分子(薬物)を含有してもよい。一部の実施形態では、本明細書で使用するリポソームは、プロテオリポソーム(すなわち、タンパク質を伴うリポソーム)でありうる。

【0031】

本明細書で説明する剤形において使用される脂質は、カチオン性脂質、糖脂質、リン脂質、グリセロリン脂質、ガラクトシルセラミド、スフィンゴ脂質、コレステロール及びそれらの誘導体に属しうる。リン脂質には、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、

10

20

30

40

50

ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、カルジオリピン、及び様々な脂肪アシル組成を有するホスファチジリンノシトールが含まれるが、これらに限定されない。

【0032】

加えて、脂質は、DOTMA(N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DOTAP(N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DODAC(N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド)、DDAB(ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド)及びステアシルアミン又は他の脂肪族アミン等から選択してもよい。

【0033】

ビロソーム製剤

ビロソーム濃縮物

図1は、本明細書で開示するワクチン剤形を産生する方法100についてのフローチャートを示す。工程101では、液体ビロソーム濃縮物を、ベースマトリックス製剤の予備混合物と混合して、冷凍乾燥に好適な液体ビロソーム製剤を形成してもよい。出願人は、ビロソーム濃縮物の組成を、ベースマトリックス製剤の特定の組成と組み合わせ、必要とされる粒子特徴を有する十分なビロソームを保存するように最適化された1組の製造条件に関連して調製した場合、ワクチン生物活性が維持されうることを発見した。ビロソーム粒子の生物活性は、単層リン脂質膜と関連付けられる、粒子のコンフォメーション完全性、及び抗原性分子の質に依存する。

【0034】

一部の実施形態では、ビロソーム濃縮物は、液体ビロソーム濃縮物でありうる。ビロソーム濃縮物は、少なくとも1つのビロソーム集団を含む。ビロソーム集団は、所与の薬物を含むビロソーム、又はワクチン抗原及びウイルス由来タンパク質(例えば、ビロソームがインフルエンザウイルスに由来する場合HA)を有するワクチン送達媒体として作用するビロソームでありうる。

【0035】

一部の実施形態では、ビロソームは、異種のワクチン抗原(例えば、インフルエンザ由来ビロソームに固定されたHIV抗原)のための担体として作用するエンベロープVLPとしてのインフルエンザビロソームを生成するためにインフルエンザウイルスに由来してもよく、呼吸器合胞体ウイルス(「RSV」)のような別のエンベロープウイルスに由来してもよい。一部の実施形態では、RSV、センダイウイルス、セムリキ森林ウイルス(SFV)、水疱性口内炎ウイルス(VSV)又はシンドビスのようなエンベロープウイルスを、同種ワクチン抗原(例えば、RSVに由来するビロソーム上のネイティブRSV抗原)を提示するための、対応するRSV-ビロソーム、センダイ-ビロソーム、SFV-ビロソーム、VSV-ビロソーム又はシンドビス-ビロソームを生成するために使用してもよい。一部の実施形態では、ウイルスベースのビロソームは、任意のエンベロープウイルスに由来する。一部の実施形態では、ウイルスベースのビロソームは、非限定的に、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス及びヘパドナウイルスを含むDNAウイルスに由来する。一部の実施形態では、ウイルスベースのビロソームは、非限定的に、フラビウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、D型肝炎、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ブニavirus及びフィロウイルスを含むRNAウイルスに由来する。一部の実施形態では、ウイルスベースのビロソームは、レトロウイルスに由来する。

【0036】

一部の実施形態では、インフルエンザウイルスベースのビロソームは、Influenza viro
somes as vaccine adjuvant and carrier system; Moser C.ら、Expert review、77
9~791頁(2013); WO2004110486号; WO2004071492号; WO2007099446号; WO2
016039619号; EP2058002号; 及びWO2016039620号で説明されている様々な方法に
従って形成してもよく、当該文献は、それらの全体を参照により本明細書に組み込む。加
えて、以前に引用した参考文献で列挙される様々な特許及び他の出版物もまた、それらの

10

20

30

40

50

全体を参照により本明細書に組み込む。そのため、本出願は、ビロソーム調製のための特定の方法に限定されない。そのため、上記に説明する参考文献は、単に、ビロソーム調製の一例である。この出願は、抗原を伴うリポソームを含む、非限定的に、ビロソーム、VLP及びナノ粒子調製物等の全ての脂質ベースの粒子に適用される。

【0037】

この節は、液体ビロソーム濃縮物を説明しているが、ビロソームをリポソームで置き換えて、液体リポソーム濃縮物を形成してもよい。そのため、ビロソーム濃縮物中の成分(ビロソームそれ自体以外)は、リポソーム濃縮物に等しく適用することができる。

【0038】

ビロソーム(例えば、インフルエンザ由来ビロソーム)は、表面上にウイルスタンパク質を有しうる。一部の実施形態では、タンパク質は、ヘマグルチニン(「HA」)及び/又はノイラミニダーゼ(「NA」)でありうる。一部の実施形態では、液体ビロソーム濃縮物は、本分野の分析アッセイの状態によって検出可能な濃度で存在するウイルス膜タンパク質(例えば、HA)を含む。一部の実施形態では、ウイルス膜タンパク質は、インフルエンザビロソームを異種のワクチン抗原の担体として使用する場合、液体ビロソーム濃縮物1mLにつき約10~300 µg又は約5~150 µgである。CTL応答を誘導するために設計されるインフルエンザビロソームについて、HA濃度は、約150~800 µg/mL又は約75~400 µg/mLに及びうる。一部の実施形態では、ウイルス膜タンパク質の濃度は、上記に列挙する例の濃度よりも大きくてもよい。

【0039】

また、ビロソーム濃縮物は、脂質を含んでもよい。ビロソーム濃縮物で使用される脂質は、カチオン性脂質、糖脂質、リン脂質、グリセロリン脂質、ガラクトシルセラミド、スフィンゴ脂質、コレステロール及びそれらの誘導体に属しうる。リン脂質には、特に、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、カルジオリピン、及び様々な脂肪アシル組成を有するホスファチジルイノシトールが含まれうる。加えて、脂質は、DOTMA(N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DOTAP(N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DODAC(N,N-ジオレイル-N,N,N-ジメチルアンモニウムクロリド)、DDAB(ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド)及びステアリルアミン又は他の脂肪族アミン等から選択してもよい。一部の実施形態では、液体ビロソーム濃縮物は、約0.1~10mg/mL、約0.3~8mg/mL又は約0.5~5mg/mLの脂質を含んでもよい。

【0040】

ビロソームは、アジュバント伴うか、又は伴わない標的分子(例えば、ワクチン抗原)を含有しうる。抗原は、可溶性でビロソーム内腔の内側に封入されてもよく、ビロソーム上に共有又は非共有的に固定されてもよく、それは、ペプチド、タンパク質、多糖類、細菌細胞の全体若しくは部分的断片又は抽出物、ウイルス粒子、又は核酸であってもよく、或いは疾患を引き起こす寄生生物、例えば、原生動物若しくは寄生虫、又はそれらの組合せに由来しても、任意の植物、動物又はヒト細胞又は細胞系に由来してもよい。市販されているもの、又は病原体若しくはがん細胞若しくは非形質転換細胞の調製物(ネイティブタンパク質)の精製によって作製されたもの、組換え発現されたもの、又は標準の製造によって合成産生されたものを含む、当該技術分野で公知の任意の抗原は、ビロソームでの使用に好適でありうる。ビロソームへの組込みに好適な抗原を生成するための方法は、当該技術分野で公知であり、公知の方法のいずれかは、本明細書で開示されるように使用することができる。

【0041】

標的分子は、剤形で提供された場合、剤形を免疫原性にするのに十分な量で、液体ビロソーム濃縮物のビロソームに、及び本明細書で開示する後続の剤形に含まれる。「免疫原性量」は、所望の免疫応答を誘発するために適切な量として定義される。当業者は、他の事項の中でも、免疫化経路、剤形が投与される患者の年齢及び体重に基づいて、所与の疾

患又は感染症のための免疫原性を容易に決定することができる。

【0042】

一部の実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、約1~2000 µg/mLの標的分子を含む。標的分子は、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸若しくは小分子又はそれらの組合せでありうる。標的分子は、抗原(例えば、ワクチン抗原)、薬物、診断分子、分析センサー又はそれらの組合せとして機能しうる。一部の実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、約1~1000 µg/mLの1つの標的分子及び約1~1000 µg/mLの第2の標的分子を含む。下流の固形剤への加工後、各錠剤は、約0.01~250 µgの各標的分子を含有しうる。

【0043】

より好ましい実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、約25~500、約50~500 µg/mL、約25~225 µg/mL、約25~200 µg/mL、約50~450 µg/mL、約50~400、約100~400 µg/mL、約100~400 µg/mL、約100~200 µg/mL又は約200~400 µg/mLの少なくとも1つの標的分子(例えば、抗原)を含む。一部の実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、約1~500 µg/mL、約25~500 µg/mL、約50~450 µg/mL、約50~400 µg/mL、約25~250 µg/mL、約25~200 µg/mL、約50~250 µg/mL、約75~225 µg/mL又は約100~200 µg/mLの1つの標的分子、及び約50~450 µg/mL、約50~400 µg/mL、約25~225 µg/mL、約25~200 µg/mL、約100~500 µg/mL、約150~450 µg/mL、約175~425 µg/mL又は約200~400 µg/mLの第2の標的分子を含む。

【0044】

本明細書で開示する剤形は、B細胞(抗体)及び/又は関連T細胞サブセット(例えば、Th1、Th2、Th16、Thf、Tc1、Tc2、Tc3、Treg、その他)の誘導後に、アレルギー又は感染症、腫瘍発症及び拡がり、病原体伝染、細胞感染、病原体ロードに関連する症状を予防又は低減する治療用ワクチン又は予防用ワクチンを送達するために使用することができ、これは、ピロソーム製剤に依存する。この目標のために、標的分子は、網羅的ではない以下の代表的な疾患リスト:インフルエンザ、結核、髄膜炎、肝炎、百日咳、ポリオ、破傷風、ジフテリア、マラリア、コレラ、疱疹、腸チフス、HIV/AIDS、麻疹、ライム病、旅行者下痢、A型、B型及びC型肝炎、中耳炎、デング熱、狂犬病、パラインフルエンザ、風疹、黄熱病、赤痢、レジオネラ症、トキソプラズマ症、Q熱、出血熱、アルゼンチン出血熱、う蝕、シャーガス病、大腸菌(*E. coli*)によって引き起こされる尿路感染症、肺炎球菌疾患、流行性耳下腺炎、チクングニア熱、がん、アレルギー及びそれらの組合せに対する保護を提供しうる。加えて、標的分子は、以下の非網羅的な、原因となる生物のリスト:ビブリオ(*Vibrio*)種、サルモネラ(*Salmonella*)種、ボルデテラ(*Bordetella*)種、ヘモフィルス(*Haemophilus*)種、トキソプラズマ・ゴンディ(*Toxoplasmosis gondii*)、サイトメガロウイルス、クラミジア(*Chlamydia*)種、連鎖球菌種、ノーウォークウイルス、大腸菌、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)、ロタウイルス、ナイセリア・ゴノレー(*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス(*Neisseria meningitidis*)、アデノウイルス、エプスタイン・バーウイルス、日本脳炎ウイルス、ニューモシスティス・カリニ(*Pneumocystis carini*)、単純ヘルペス、クロストリジウム(*Clostridia*)種、呼吸器合胞体ウイルス、クレブシエラ(*Klebsiella*)種、シゲラ(*Shigella*)種、シュードモナス・エルジノーサ、パルボウイルス、カンピロバクター(*Campylobacter*)種、リケッチア(*Rickettsia*)種、水痘帯状疱疹、エルシニア(*Yersinia*)種、ロスリバーウイルス、J.C.ウイルス、ロドコッカス・エクイ(*Rhodococcus equi*)、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、パストレラ・ヘモリティカ(*Pasteurella haemolytica*)及びそれらの組合せによって引き起こされる疾患に対する保護を提供しうる。加えて、又は或いは、標的分子は、アレルギー(すなわち、アレルゲンを含むピロソーム)、がん(例えば、腫瘍抗原、抗体、抗がん薬、核酸)及び他の種類の状態に対する保護又は処置を提供しうる。

【0045】

また、本開示の獣医学的適用が企図される。したがって、標的分子は、以下の非網羅的な動物疾患のリスト:コクシジウム症、ニューカッスル病、家畜地方病性肺炎、ネコ白血病、萎縮性鼻炎、丹毒、口蹄疫、ブタ肺炎及び他の疾患状態、並びにペット及び家畜動物に影響を与える他の感染症、並びにそれらの組合せに対する保護を提供しうる。

【0046】

一部の実施形態では、ピロソームは、再構成膜に存在するウイルスタンパク質に加えて少なくとも1つのワクチン抗原を含有する。一部の実施形態では、ワクチン抗原は、HIV-1 P1ペプチド及び/又はHIV-1組換えgp41でありうる。

【0047】

上記に示される通り、また、液体ピロソーム濃縮物のピロソームは、アジュバントを含有してもよく、アジュバントと混合してもよい。ピロソーム及び他のサブユニットワクチンは、免疫応答を改善するためにアジュバントを必要とすることがあり、これは、免疫学的メモリーもまた維持しながら、抗体及びT細胞の加速及び増強した産生をもたらす。有効であるために、特定の疾患からの長期間持続する保護を提供するメモリー応答の生成と関連付けられる免疫応答を有することが好ましい。また、アジュバントは、抗原用量を低下し(用量節約)、且つ所望の免疫応答の幅を増大することを可能にしうる。抗原に曝露されると、免疫系はそれを「記憶し」、再曝露中は、免疫応答はもっと迅速である。アジュバント単独は非特異的免疫応答を誘発することがあり、強い細胞活性化が抗原の非存在下で達成された場合、自己免疫副作用を引き起こしうるので、アジュバントの免疫応答を増強する有効性は、それと組み合わせる抗原とは独立していることがある。しかしながら、抗原及びアジュバントが物理的に共に連結された場合、それら全ては、注射に際して同じ部位に共遊走することができ、このことは、非特異的炎症応答がより低い、抗原特異的免疫活性化に好都合である。好適なアジュバントには、トール様受容体(TLR)アゴニスト、インフラマソームアゴニスト、ヌクレオチド結合及びオリゴマー化ドメイン(NOD)様受容体(NLR)アゴニスト、特に非毒性細菌断片、コレラ毒素(並びにその解毒型及び断片)、キトサン、大腸菌の熱不安定性毒素(並びにその解毒型及び断片)、ラクチド/グルコリドホモ+及びコポリマー(PLA/GA)、ポリ酸無水物、例えば、トリメリチルイミド(trimellitylimido)-L-チロシン、DEAE-デキストラン、膜タンパク質抗原と複合体化したサポニン(免疫刺激複合体-ISCOM)、リポ多糖(LPS)及びムラミルジペプチド(MDP)等の細菌生成物、リポソーム、コクリエート、プロテインノイド(proteinoid)、サイトカイン(インターロイキン、インターフェロン)、遺伝子組み換え生微生物ベクター、非感染性百日咳変異体毒素、ノイリミダーゼ(neurimidase)/ガラクトースオキシダーゼ、並びに変異株由来の弱毒化細菌及びウイルス毒素、並びにそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。アジュバントの好適な量は、当業者によって容易に決定することができる。

【0048】

一部の実施形態では、ピロソームは、アジュバント3M-052(3M社によって供給されるTLR7/8アゴニスト)を有しうる。一部の実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、約8~140 µg/mL、約4~70 µg/mL、約1~60 µg/mL及び1つの錠剤につき0.01~16 µgの範囲内の3M-052アジュバントを含有しうる。

【0049】

一部の実施形態では、液体ピロソーム濃縮物は、各々がアジュバントを伴うか、又は伴わない少なくとも1つの抗原を有する、少なくとも2つの異なるピロソーム集団を含みうる。一部の実施形態では、これらの2つの異なるピロソーム集団は、異なる抗原を有してもよいが、同じアジュバントを有しうる(例えば、ピロソーム-rgp41/3M-052と混合したピロソーム-P1/3M-052)。一部の実施形態では、これらの2つの異なるピロソーム集団は、異なる抗原を有してもよいが、異なるアジュバントを伴いうる(例えば、ピロソーム-rgp41/アジュバントBと混合したピロソーム-P1/アジュバントA)。

【0050】

一部の実施形態では、ピロソーム濃縮物は、1つのピロソームにつき、アジュバントを伴うか、又は伴わない少なくとも2つの異なる抗原を含みうる(例えば、アジュバントを伴

10

20

30

40

50

うか、又は伴わないP1及びrgp41抗原の両方を有するピロソーム)。

【0051】

また、液体ピロソーム濃縮物は、緩衝系を含んでもよい。一部の実施形態では、ピロソームは、緩衝系中に懸濁されうる。緩衝系は、ピロソーム濃縮物中のピロソームの物理的完全性及び化学的安定性を維持することができる。一部の実施形態では、ピロソームは、約6～9、約6.5～8、約7～8、約7.2～7.6、約7.3～7.5又は約7.4の標的pHを維持するために緩衝系中に懸濁される。加えて、緩衝系は、ピロソームが約2～8℃の保存温度で液体形態である場合、ピロソームを安定化することができる。

【0052】

好適な緩衝系には、HEPES-塩化ナトリウム(HN)緩衝液、HEPES-塩化ナトリウム-EDTA(HNE)緩衝液、リン酸緩衝系(PBS)又はそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、緩衝系は、ピロソーム濃縮物において約5～1000mM、約60～200mM、約100～300mM、約125～275mM、約150～250mM、約175～225mM、約180～210mM、約185～200mM、約185～195mM又は約190～195mMでありうる。緩衝系がピロソーム濃縮物においてHEPES-塩化ナトリウムである場合、塩化ナトリウムは、ピロソーム濃縮物において約5～1000mM、約50～150mM、約125～175mM、約130～160mM、約130～150mM、約135～145mM又は約140～145mMでありうる。緩衝系がピロソーム濃縮物においてHEPES-塩化ナトリウムである場合、HEPESは、ピロソーム濃縮物において約1～200mM、約10～75mM、約10～50mM、約25～75mM、約30～70mM、約40～60mM、約45～55mM又は約48～52mMでありうる。

【0053】

また、液体ピロソーム濃縮物は、少なくとも1つのクライオ-リオプロテクタントを含みうる。ピロソームは、本明細書で開示する剤形を産生する冷凍及び/又は冷凍乾燥工程中に損傷することがある。そのため、冷凍及び/又は冷凍乾燥工程中のピロソーム保存を改善するために、クライオ-リオプロテクタントをピロソーム濃縮物に含めてもよい。クライオ-リオプロテクタントの例には、トレハロース等のポリオール、ショ糖等の糖、及びリジン等のアミノ酸、イヌリン等のオリゴ糖(中鎖オリゴ糖)又はそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。使用されるクライオ-リオプロテクタントは、ワクチン製剤に好適であるために不活性でありうる。液体ピロソーム濃縮物は、約1～20% w/w、約1.5～10% w/w、約2～10% w/w、約4～10% w/w、約2～9% w/w、約2～5% w/w、約3～8% w/w、約3.5～8% w/w、約3.5～7% w/w、約4～8% w/w又は約5～7% w/wのクライオ-リオプロテクタントを含みうる。

【0054】

ピロソーム濃縮物は、ピロソーム製剤の約1～75% w/w、約10～65% w/w、約15～60% w/w、約20～55% w/w、約20～50% w/w又は約25～50% w/wでありうる。一部の実施形態では、ピロソーム濃縮物は、ピロソーム製剤の約15～35% w/w、約20～30% w/w、約23～27% w/w又は約25% w/wでありうる。

【0055】

ベースマトリックス製剤

ベースマトリックス製剤は、最終剤形の構造を提供する助けとなるものである。そのため、ベースマトリックス製剤は、マトリックス形成剤を含みうる。マトリックス形成剤は、取り扱い中の強度及び弾性を与える、剤形のネットワーク構造を提供することができる。好適なマトリックス形成剤には、ゼラチン、デンプン又はそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。追加のマトリックス形成剤は、EP2624815B1号に見出すことができ、当該特許は、その全体を参照により本明細書に組み込む。ゼラチンは、魚ゼラチン、ウシゼラチン、ブタゼラチン又はそれらの組合せでありうる。ゼラチンの各々は、様々なゲル化特徴を有しうる。ゼラチン溶液がゲルを形成する程度は、ゼラチンの濃度及びゼラチン溶液の温度に依存しうる。ウシゼラチンの溶液は、18℃未満の温度でゲル化する傾向があり、したがって、ゲル化ゼラチンとみなすことができる。対照的に、魚ゼラチンは、10℃くらいの低い温度で溶液のままであり、したがって、非ゲル化ゼラ

チンとみなすことができる。一部の実施形態では、ゼラチンは、低エンドトキシンゼラチン、例えば、仮出願第62/640,394号で開示する方法に従って供給されるゼラチン又は産生されるゼラチンであってもよく、当該出願は、その全体を参照により本明細書に組み込む。一部の実施形態では、ピロソーム製剤中のマトリックス形成剤の量は、約1~15% w/w、約2~12、約3~10% w/w、約4~8% w/w、約4~6%、約5~7% w/w又は約6% w/wでありうる。

【0056】

ピロソーム製剤が投入される温度は、10~18℃くらいの低い温度でありうる。そのため、ウシゼラチン単独を使用する製剤は、これらの低温で投入することができないことがある。しかしながら、ウシゼラチンと別の種類のゼラチン(例えば、魚ゼラチン)との組合せは、使用することができる。出願人らは、魚ゼラチンが、頑健なマトリックス構造、及び口腔粘膜との十分な接触時間に影響を与えるために望ましい約30~180又は30~60秒の崩壊時間を有する冷凍乾燥錠剤を提供しうることを発見した。加えて、魚ゼラチンは、本明細書で開示する量等の高ローディングの、緩衝塩のような可溶性成分を含有する製剤組成のための良好な物理的属性の冷凍乾燥剤形を提供することができる。

【0057】

一部の実施形態では、魚ゼラチンは、高分子量魚ゼラチン、標準分子量魚ゼラチン又はそれらの組合せでありうる。高分子量魚ゼラチンは、分子量分布の50%超が30,000ダルトンを超える魚ゼラチンとして定義される。標準分子量魚ゼラチンは、分子量分布の50%超が30,000ダルトン未満である魚ゼラチンとして定義される。

【0058】

一部の実施形態では、また、マトリックス形成剤は、抗原のための安定化剤、及び粘膜付着剤としてはたらきうる。加えて、また、デンプンは、免疫刺激賦形剤としてはたらきうる。

【0059】

また、ベースマトリックス製剤は、構造形成剤を含んでもよい。好適な構造形成剤には、マンニトール、デキストロース、ラクトース、ガラクトース、シクロデキストリン又はそれらの組合せを含むがこれらに限定されない糖が含まれうる。構造形成剤は、結晶化して構造的頑健性を冷凍乾燥製品に与えるので、それは、充填剤として冷凍乾燥において使用することができる。ピロソーム製剤中の緩衝塩及びトレハロース等の可溶性賦形剤は、その結晶化を阻害することがある。アニール時間の延長は、典型的に、結晶化を可能にするために使用される。しかしながら、また、これらの可溶性賦形剤の存在は、アニール中の冷凍製品の溶解を引き起こしうる。そのため、出願人らは、構造形成剤、緩衝塩及びクライオ-リオプロテクタントの量と、アニール条件(すなわち、温度及び時間)との間の平衡を発見した。一部の実施形態では、ピロソーム製剤中の構造形成剤の量は、約1~20% w/w、約3~15% w/w、約4.5~10% w/w、約4.5~8% w/w、約5~10% w/w、約6~10% w/w、約7~9% w/w又は約8% w/wでありうる。出願人らは、4.5% w/w未満の構造形成剤の値で、冷凍乾燥中に一部の微小構造破壊が起こり、冷凍乾燥剤形の乏しい分散/崩壊をもたらしうることを発見した。そのため、より高い量の構造形成剤が、ピロソームに劇的に影響を与えることなく、微小構造破壊を最小限にするか、又は除去することが分かった。

【0060】

加えて、また、ベースマトリックス製剤は、クライオ-リオプロテクタントを含んでもよい。クライオ-リオプロテクタントの例には、トレハロース等のポリオール、ショ糖等の糖、及びリジン等のアミノ酸、イヌリン等のオリゴ糖(中鎖オリゴ糖)又はそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。クライオ-リオプロテクタントを使用して、ピロソームを後続の冷凍及び冷凍乾燥中の損傷から保護することができる。しかしながら、クライオ-リオプロテクタントの添加は、冷凍乾燥中に剤形マトリックスの微小構造破壊を誘導することがある。そのため、免疫応答を誘導するためのピロソームの質を維持するために、微小構造破壊を最小限にし、同時に十分な数のピロソームを保存するように、均衡をはか

るべきである。ベースマトリックス製剤中のクライオ-リオプロテクタントの量は、約0.01~2% w/w、約0.1~1.5% w/w、約0.2~1% w/w又は約0.25~0.75% w/wでありうる。そのため、ピロソーム製剤(すなわち、液体ピロソーム濃縮物及びベースマトリックス製剤)中のクライオ-リオプロテクタントの正味の量(これより以降「(正味)」)は、約0.5~6% w/w、約0.5~5% w/w、約0.5~4.5% w/w、約1~4.5% w/w、約1.5~4.5% w/w、約1.5~3% w/w、約1.5~2.5、約2~3% w/w、約2.5% w/w又は約2% w/wでありうる。出願人らは、これらのレベルで、クライオ/リオプロテクタントは、冷凍乾燥中の許容できない微小構造破壊をもたらすことなく、十分な低温(クライオ)-凍結乾燥(リオ)保護を提供することができることを発見した。

【0061】

一部の実施形態では、また、ベースマトリックス製剤は、粘膜付着剤、例えば、ガムを含んでもよい。好適なガムには、アカシア、グアー、寒天、キサンタン、ジェラン、カラギーナン、カードラン、コンニャク、ローカストビーン、ウェラン、トラガカントガム、アラビアガム、カラヤガム、ガティガム、ペクチン、デキストラン、グルコマンナン及びアルギネート、又はそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。

【0062】

また、ベースマトリックス製剤は、追加の薬学的に許容される剤又は賦形剤を含有してもよい。そのような追加の薬学的に許容される剤又は賦形剤には、マンニトール、デキストロース及びラクトース等の糖、塩化ナトリウム及びケイ酸アルミニウム等の無機酸、哺乳動物起源のゼラチン、魚ゼラチン、修飾デンプン、保存剤、抗酸化物質、界面活性剤、粘性増強剤、浸透性増強剤、着色剤、香味料、pH調節剤、甘味料、矯味剤並びにそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。好適な着色剤には、赤色、黒色及び黄色酸化鉄、並びにFD & C色素、例えば、FD & C青色2番及びFD & C赤色40番、並びにそれらの組合せが含まれる。好適な香味料には、ミント、ラズベリー、甘草、オレンジ、レモン、グレープフルーツ、キャラメル、バニラ、サクランボ及びブドウ香料、並びにこれらの組合せが含まれる。好適なpH調節剤には、クエン酸、酒石酸、リン酸、塩酸、マレイン酸、水酸化ナトリウム(例えば、3% w/w水酸化ナトリウム溶液)及びそれらの組合せが含まれる。一部の実施形態では、ベースマトリックス製剤及び/又はピロソーム製剤は、約6~9、約7~8、約7.2~7.6、約7.3~7.5又は約7.4の標的pHを維持するための量のpH調節剤を有する。好適な甘味料には、アスパルテーム、アセスルファムK及びタウマチン、並びにそれらの組合せが含まれる。当業者は、所望の場合、これらの様々な追加の賦形剤の好適な量を容易に決定することができる。

【0063】

また、ベースマトリックス製剤は、溶媒を含んでもよい。一部の実施形態では、溶媒は、水(例えば、精製水)でありうる。一部の実施形態では、ベースマトリックス製剤及び/又はピロソーム製剤を差し引いた残りは、溶媒である。

【0064】

ベースマトリックス製剤は、ピロソーム製剤の約25~99% w/w、約35~90% w/w、約40~85% w/w、約45~80% w/w又は約50~75% w/wでありうる。一部の実施形態では、ベースマトリックス製剤は、ピロソーム製剤の約65~85% w/w、約70~80% w/w、約73~77% w/w又は約75% w/wでありうる。

【0065】

ピロソーム製剤を含む剤形の作製

上記に示す通り、工程101において液体ピロソーム濃縮物を、ベースマトリックス製剤と混合して冷凍乾燥プロセスに好適なピロソーム製剤を形成する。図2は、本明細書で開示するワクチン剤形を形成する方法のより詳細な説明を提供する。一部の実施形態では、ベースマトリックス製剤は、マトリックス形成剤及び構造形成剤を溶媒中に溶解して予備混合物を形成することによって調製することができる。例えば、図2の工程201で示されるように、ゼラチン及びマンニトールを水中に溶解してもよい。予備混合物を、約40~80℃、約50~70℃、約55~65℃又は約60℃まで加熱し、約45~75分間、約55~65分

10

20

30

40

50

間又は約60分間維持してもよい。工程202で示されるように、予備混合物を、60℃まで加熱し、1時間維持してもよい。その後、予備混合物を、約30～50℃、約35～45℃又は約40℃まで冷却し、ふるいにかけて、その後、更に約10～20℃又は約15℃まで冷却し、方法の残り全体を通してこの温度で維持してもよい。工程203で示されるように、予備混合物を、40℃まで冷却し、ふるいにかけてもよい。次に、工程204で示されるように、予備混合物を、15℃まで冷却してもよい。

【0066】

次に、クライオ-リオプロテクタントを、予備混合物に添加してもよい。例えば、工程205で示されるように、トレハロースを予備混合物に添加してもよい。続いて、pH調節剤を使用して、pHを約6～9、約7～8、約7.2～7.6、約7.3～7.5又は約7.4に調節してもよい。例えば、工程206で示されるように、水酸化ナトリウム溶液を使用して、pHを7.4に調節してもよい。pHを調節した後、液体ピロソーム濃縮物を添加してもよい。液体ピロソーム濃縮物を添加した後、pHを再チェックし(工程207)、必要な場合、追加のpH調節剤を使用して約6.0～8.5、約7～8、約7.2～7.6、約7.3～7.5又は約7.4に調節してもよい。この混合物を、溶媒で所望のバッチサイズに調整してもよい(すなわち、ピロソーム製剤)。例えば、工程208で示されるように、必要に応じた量の水を混合物に添加してもよい。

【0067】

図1の工程102では、液体ピロソーム製剤は、予備成形鑄型に投入されうる。本明細書で使用される場合、「投入される」とは、所定のアリコートの溶液又は懸濁液の配置(deposition)を指す。本明細書で使用される場合、「予備成形鑄型」とは、水溶液又は懸濁液が配置され、その中で次に、冷凍乾燥されうる任意の好適な容器又は区画を指す。本開示のある特定の実施形態では、予備成形鑄型は、1つ又は複数のプリスターポケットを有するプリスターパックである。約150～1000mg又は約500mgの湿式充填投入質量(投入充填質量とも呼ばれる)の量のピロソーム製剤の所定のアリコート量を計量して、予備成形鑄型に入れてもよい。一部の実施形態では、ピロソーム製剤は、約10～20℃、又は約15℃で投入してもよい。例えば、工程209で示されるように、ピロソーム製剤は、500mgの投入充填質量で、15℃にて投入してもよい。

【0068】

図1の工程103で、その後、投入したピロソーム製剤は、予備成形鑄型中で冷凍される。予備成形鑄型に投入したピロソーム製剤は、当該技術分野で公知の任意の手段によって冷凍される。例えば、製剤を、低温貯蔵チャンバー(例えば、液体窒素トンネル)を通して通過させてもよい。冷凍中の温度は、約-50～-100℃、約-60～-90℃、約-60～-80℃、約-65～-75℃又は約-70℃でありうる。冷凍持続期間は、約1.5～5分間、約2～4.5分間、約2.5～4分間、約3～4分間、約3～3.5分間又は約3.25分間に及びうる。例えば、工程210で示されるように、投入したピロソーム製剤は、-70℃で3分15秒間冷凍してもよい。

【0069】

図1の工程104で、予備成形鑄型中の冷凍単位を収集し、約-25℃、約-20℃、約-15℃、約-10℃、約-5℃未満の温度のフリーザー内に入れ、構造形成剤を結晶化させるためにある期間の間アニール(すなわち、冷凍保持)してもよい。構造形成剤結晶化は、冷凍乾燥中の冷凍単位の破壊を防ぐための構造的強度を有する冷凍単位を提供しうる。これは、ピロソーム完全性に重要でありうる。アニール時間は、約3～9時間、約4～8時間、約5～7時間又は約6時間に及びうる。例えば、工程211で示されるように、冷凍単位を、-15℃未満で約3～9時間アニールしてもよい。

【0070】

アニールした後、工程105で、アニールした冷凍単位を冷凍乾燥して、剤形を形成してもよい。冷凍乾燥プロセス中、冷凍単位から水が昇華する。一部の実施形態では、冷凍単位は、冷凍乾燥器の棚上にロードしてもよい。一部の実施形態では、冷凍乾燥器は、約-15～-35℃、約-20～-30℃又は約-25℃まで予冷してもよい。アニールした冷凍単位を冷凍乾燥器に入れると、冷凍乾燥周期を開始してもよい。一部の実施形態では、冷凍乾燥周

期を開始すると、真空にし、棚温度を上昇させてもよい。冷凍乾燥器は、低圧(すなわち、真空)で作動してもよい。一部の実施形態では、冷凍乾燥器は、約1000ミリバール、約900ミリバール、約800ミリバール、約700ミリバール、約600ミリバール、約500ミリバール又は約400ミリバール未満又はこれに等しい圧で作動しうる。

【0071】

出願人らは、剤形の構造的頑健性及び剤形中のピロソームの最小限の損傷を達成しうる2工程冷凍乾燥周期(工程212)を発見した。2工程冷凍乾燥周期は、冷凍単位を約-5℃~-25℃、約-10℃~-20℃、約-13℃~-17℃、又は約-15℃で約12~36時間、約18~30時間、約20~28時間又は約24時間保持する第1の工程を含みうる。加えて、2工程冷凍乾燥周期は、第1の工程に続く第2の工程を含みうる。第2の工程は、冷凍単位を約0℃~-20℃、約-5℃~-約-15℃、約-8℃~-約-12℃、又は約-10℃で約6~30時間、約12~24時間、約14~22時間、又は約18時間保持することを含みうる。2工程冷凍乾燥周期の終わりに、冷凍乾燥器の温度を、およそ周囲温度(すなわち、約20~25℃又は約23℃)に上昇させてもよい。

【0072】

一部の実施形態では、2段階冷凍乾燥プロセスは、次の順序で、冷凍乾燥器を約-25℃まで予冷し、冷凍乾燥器を-15℃まで2時間徐々に上げ、冷凍乾燥器を-15℃で24時間保持し、冷凍乾燥器を-10℃まで2時間徐々に上げ、-10℃で18時間保持し、0℃まで15分間徐々に上げ、23℃まで15分間徐々に上げることを含みうる。

【0073】

工程213で、冷凍乾燥剤形を、冷凍乾燥器から除去し、任意の欠陥について検査してもよい(以下で説明する品質検査)。その後、剤形を、約35%RH未満の大気湿度の保存キャビネットに入れてもよく、その後、剤形を、それらの予備成形鑄型に密閉してもよい。密閉プロセス(工程214)により、予備成形鑄型上に蓋用ホイルを置き、冷凍乾燥剤形のブリスターを提供してもよい。

【0074】

冷凍乾燥剤形中の水は、冷凍乾燥中に昇華によって除去されうる。したがって、クライオ-リオプロテクタントを除く、冷凍乾燥剤形中のピロソーム濃縮物の残り(すなわち、冷凍乾燥ピロソーム濃縮物からの残りのピロソーム、抗原、アジュバント及び緩衝系)は、剤形の約1~5質量%、約2~4質量%、約2.5~3.5質量%、約2.6~3.4質量%、約2.7~3.3質量%、約2.8~3.2質量%、約2.9~3.1質量%、又は約3~3.1質量%でありうる。

【0075】

上記に示されるように、標的分子は、剤形で提供された場合、剤形を免疫原性にするのに十分な量で、本明細書にて開示する剤形に含まれる。当業者は、他の因子の中でも、投与経路、剤形が投与される患者の年齢及び体重に基づいて、所与の疾患又は感染症のための免疫原性を容易に決定することができる。一部の実施形態では、固形剤形は、0.01~250 µgの各標的分子(例えば、HIV-1 P1ペプチド及び/又はrgp41)を含有しうる。

【0076】

一部の実施形態では、冷凍乾燥剤形中のクライオ-リオプロテクタントのうちの少なくとも1つは、剤形の約5~20質量%、約8~18質量%、約10~15質量%、約11~15質量%、又は約12~15質量%でありうる。一部の実施形態では、冷凍乾燥剤形中のクライオ-リオプロテクタントのうちの少なくとも1つは、剤形の約1~5質量%、約1~4質量%、又は約2~4質量%でありうる。

【0077】

一部の実施形態では、剤形中のマトリックス形成剤の量は、約20~50質量%、約25~45質量%、約25~40質量%、約30~40質量%、約33~37質量%、又は約35~37質量%でありうる。一部の実施形態では、剤形中の構造形成剤の量は、約27~65質量%、約27~60質量%、約40~55質量%、又は約45~50質量%でありうる。一部の実施形態では、冷凍乾燥投与量中のpH調節剤(例えば、水酸化ナトリウム)の残りは、約0.01~0.08質量%でありうる。

【0078】

本開示の剤形は、溶解剤形であり、したがって、より速い崩壊時間の明確な利点を有する。投与経路は、経口、膣又は鼻であってもよいが、好ましくは経口(すなわち、舌下及び/又は頬内)でありうる。口腔内に放置され、唾液と接触すると、剤形は、約1～約180秒、約1～約120秒、約1～約60秒以内、好ましくは約1～約30秒以内、より好ましくは約1～約10秒以内、最も好ましくは約5秒未満で崩壊することができる。

【0079】

製剤、試験方法及び実施例

実施例のために、インフルエンザウイルスから調製した液体ピロソーム濃縮物を使用した。ピロソームは、インフルエンザHA、並びに添加された抗原及びアジュバントを含有した。各々、HIVエンベロープ糖タンパク質由来の単一の抗原を含有する、2つのピロソーム調製物を作製した。液体ピロソーム濃縮物は、2つのピロソーム調製物の混合物であった。2つのHIV-gp41由来抗原は、最後の35C末端エクトドメイン残基を示すP1ペプチド、並びにクラスターI及び最後の21C末端エクトドメイン残基を欠く切断型rgp41であった。アジュバント3M-052は、いずれかのピロソーム調製物中に存在するか、又は非存在であった。ピロソームを、pH 7.4の142.5mM塩化ナトリウム及び50mM HEPESを含有するHEPES-塩化ナトリウム緩衝液中に懸濁した。加えて、トレハロース(クライオ-リオプロテクタント)を、液体ピロソーム濃縮物の0～10% w/wの範囲内で試験した。以下のTable 1(表1)は、私たちの実験の一部について使用したHIV-1液体ピロソーム濃縮物の標的組成を要約し、この実験中、500mg(投入充填質量)の水性ピロソーム製剤のアリコートを計量して、ポケット予備成形ブリスターに入れ、続いて冷凍及び冷凍乾燥した。投入充填質量は、150mg～1000mgに及ぶことがあり、HIV-1液体ピロソーム濃縮物の組成は、必要とされる標的用量に適合するように調節されうる。以下の標的範囲は、目的及び更なる使用、例えば、動物研究用、又はヒト研究用の使用に依存しうることに留意されたい。したがって、他の標的濃度は、他の目的のために有用でありうる。

【0080】

10

20

30

40

50

【表 1】

TABLE 1

500mg 投入充填質量の Zydys (登録商標)ビロソーム製剤のための 脂質ベースの粒子濃縮物の例	脂質ベースの粒子濃縮物中の例の 標的分子及び賦形剤
HIV ワクチン MYM-V202(Zydys(登録商標) ビロソーム製剤中の液体ビロソームの 25%ローディングのための 4 倍濃縮物)	- 標的分子(P1 抗原):50~450 μ g/mL - 標的分子(rgp41 抗原):50~400 μ g/mL - HA 賦形剤:10~160 μ g/mL - アジュバント(例えば、3M-052):8~140 μ g/ml - リン脂質:0.5~5mg/mL - 塩化ナトリウム:50~150mM - HEPES 10~50mM - トレハロース:4~10% w/w - pH6.5~8.0
HIV ワクチン MYM-V202(Zydys(登録商標) ビロソーム製剤中の液体ビロソームの 50%ローディングのための 2 倍濃縮物)	- 標的分子(P1 抗原):25~225 μ g/mL - 標的分子(rgp41 抗原):25~200 μ g/mL - HA 賦形剤:5~80 μ g/mL - アジュバント(例えば、3M-052):4~70 μ g/ml - リン脂質:0.5~5mg/mL - 塩化ナトリウム:50~150mM - HEPES 10~50mM - トレハロース:2~5% w/w - pH6.5~8.0
プラセボワクチン VP02(最終 Zydys(登録商標) ビロソーム製剤中の液体ビロソームの 25%ローディングのための 4 倍濃縮物)	- HA 賦形剤:10~160 μ g/mL - アジュバント(例えば、3M-052):8~140 μ g/ml - リン脂質:0.5~5mg/mL - 塩化ナトリウム:50~150mM - HEPES 10~50mM - トレハロース:4~10% w/w - pH6.5~8.0

10

20

30

【0081】

私たちの実験の一部では、各錠剤についてのHA及びHIV-1抗原の標的用量は、20 μ g H A、25 μ g P1及び50 μ g rgp41であった。これらの用量を達成するために、高い湿式充填投入質量と組み合わせた液体ビロソーム濃縮物の高ペイロードが必要とされた。Table 2(表2)は、液体ビロソーム濃縮物ローディング(25~50% w/wに及ぶ)と湿式充填投入質量(250~1000mgに及ぶ)との様々な組合せを示す。湿式充填投入質量は、冷凍乾燥前に1用量につき計測されたビロソーム製剤のアリコートの量である。

【0082】

40

50

【表 2】

TABLE 2

液体ピロソーム濃縮物 HA 及び抗原含有量	ベースマトリックス 製剤中の液体 ピロソーム濃縮物 ローディング%	投入充填 質量	1 錠剤あたりの ピロソームワクチン 標的用量 HA/P1/rgp41
HA 80 μ g/ml(アジュバ ント 3M-052 を伴う) P1 100 μ g/ml rgp41 200 μ g/ml	25% w/w	1000 mg	20 μ g /25 μ g/50 μ g
	50% w/w	500 mg	20 μ g /25 μ g/50 μ g
HA 160 μ g/ml(アジュバ ント 3M-052 を伴う) P1 200 μ g/ml rgp41 400 μ g/ml	25% w/w	500 mg	20 μ g /25 μ g/50 μ g
	50% w/w	250 mg	20 μ g /25 μ g/50 μ g

10

【0083】

液体ピロソーム濃縮物の25%ローディングは、ベースマトリックス製剤に添加されうる。投入充填用量質量は、500mgでありうる。Table 3(表3)は、評価したHA及び抗原含有量の範囲を示す。

20

【0084】

【表 3】

TABLE 3

成分	液体濃縮物中の 標的組成	評価のために 供給された組成	25%ローディング 製剤中の組成
抗原及びアジュバントでタグ付けされたピロソーム	HA:10~160 μ g/ml P1:50~450 μ g/ml rgp41:50~400 μ g/ml 3M-052:8~140 μ g/ml	HA:70~160 μ g/ml P1:40~100 μ g/ml rgp41:70~230 μ g/ml 3M-052:16~65 μ g/ml	HA:18~40 μ g/ml P1:10~25 μ g/ml rgp41:17.5~57.5 μ g/ml 3M-052:4~16.3 μ g/ml
塩化ナトリウム	50~150mM	142.5mM	35.625mM
HEPES	10~50mM	50mM	12.5mM
トレハロース	4~10% w/w	3.5~7% w/w	0.9~1.75% w/w

30

【0085】

水性組成物中の緩衝液の存在は、氷点を低下させ、そのため、製剤組成物を冷凍し、且つその冷凍状態を維持することを困難にしうる。加えて、また、緩衝塩はアニールプロセス中のマンニトールの結晶化を低下させうるので、冷凍乾燥中に標的マトリックス構造の破壊が起こりうる。マンニトールの結晶化は、錠剤マトリックスに強度及び構造を提供して構造破壊を防ぐために必要とされる。しかしながら、マンニトールの結晶化は、冷凍、アニール及び冷凍乾燥中にピロソーム粒子を損傷することがある。液体ピロソーム濃縮物のより低いローディング百分率(例えば、25%ローディング)は、この影響を低減することになる。また、液体ピロソーム濃縮物のより低いローディング百分率とより大きな投入充填質量との組合せが、考慮されうる。

40

【0086】

50

また、高い緩衝液含有量を有する製剤組成と組み合わせたピロソーム製剤の高い湿式充填投入質量は、冷凍し、且つ構造を維持して、冷凍乾燥中の破壊を最小限にすることをより困難にしうる。しかしながら、より大きな錠剤(例えば、1000mg投入充填質量)は、より大きな表面領域を覆うことができ、ピロソーム通過を潜在的に改善しうる。高い湿式充填投入質量が必要とされる場合、低い緩衝液含有量を有する製剤組成が好ましい。

【0087】

Table 4(表4)(製剤1)は、ピロソーム製剤の水性組成物、及び本明細書で評価する錠剤ピロソームの対応する組成物を要約する。以下の製剤及び錠剤を、図2で示し、説明する工程に従って作製した。加えて、冷凍した製剤を、500ミリバールの真空で以下の2工程冷凍乾燥プロセスに供した:(a)-25℃予冷する;(b)-15℃まで2時間徐々に上げる;(c)-15℃で24時間保持する;(d)-10℃まで2時間徐々に上げる;(e)-10℃で18時間保持する;(f)0℃まで15分間徐々に上げる;(g)23℃まで15分間徐々に上げる。次に、真空を解放し、冷凍乾燥器を大気圧に戻した。

【0088】

各成分の濃度(% w/w)は、凍結乾燥中の昇華による、液体ピロソーム濃縮物、水酸化ナトリウム溶液及び調製に使用した水中に存在する水の除去前の量である。また、以下の表は、各成分が及びうる量を含む。

【0089】

【表4】

TABLE 4

成分	評価した% w/w 範囲	% w/w 製剤 1/2	500mg の湿式投入充填質量についての量 (mg)	冷凍乾燥後の量(mg)
液体ピロソーム濃縮物	25~50%	25%	125mg	約 2.5~2.6mg*
トレハロース	0.5%~4.5%	2%** (正味)	10mg	10mg** (正味)
魚ゼラチン	4~6%	6%	30mg	30mg
マンニトール	4.5~8%	4.5% / 8%	40 mg	40 mg
水酸化ナトリウム溶液(例えば、3% w/w)	qs pH 7.4	qs pH 7.4	約 1.3mg (qs pH 7.4)	約 0.04mg(昇華によって除去された水)
水(水性マトリックス混合物を調製するため)	qs 100%	qs 100%	約 293.7mg	除去された水
冷凍乾燥ワクチン錠剤の総質量	N/A	N/A	N/A	約 82.64mg

【0090】

*上記に示されるように、液体ピロソーム濃縮物は、5% w/wトレハロースを伴う142.5 mM NaCl及び50mM HEPESの緩衝系中に懸濁されたピロソームを含んだ。500mg投入充填質量中のピロソーム製剤の25%ローディング(すなわち、125mgの液体ピロソーム濃縮物)のために、ピロソーム、抗原、アジュバント、NaCl及びHEPES(トレハロースを除外する)の水を昇華させた乾物見積もりは、約2.5~2.6mgである。

【0091】

**これは、ピロソーム製剤及び剤形中のトレハロースの正味の量である。そのため、この量は、液体ピロソーム濃縮物からのトレハロース、及びベースマトリックス製剤から添

加されたトレハロースを含む。

【0092】

冷凍乾燥剤形の特性:

冷凍乾燥剤形は、物理的属性及びピロソーム品質(粒径特徴及び抗原含有量)において安定であることがあり、低温流通保存条件に依存せず保存することができる。加えて、冷凍乾燥剤形は、ピロソームが、保存又は輸送中の零下保存条件への偶発的な曝露に抵抗性であることを可能にすることができる。

【0093】

剤形物理的特徴:

許容される物理的特徴を有する冷凍乾燥錠剤を産生した。錠剤の物理的属性は、外観、分散特徴、崩壊時間及び含水量を含む。

【0094】

10個の冷凍乾燥錠剤の錠剤概観を試験する。各錠剤を、プリスター包装から除去する。錠剤表面及び基部上の表面欠陥について各錠剤の目視検査を行う。基準としては、冷凍乾燥錠剤は、表面欠陥を伴わない良好な外観を有するべきである。加えて、錠剤は、破損することなくプリスターポケットから除去するのに十分な頑健性のものであるべきである。

【0095】

分散特徴(インビトロ試験):最少で5つの錠剤を試験する。第1に、 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の約200 mLの精製水を含むビーカーを準備する。その後、各錠剤をプリスター包装から除去し、錠剤を水面上に基部を下にして放置する。各錠剤が完全にぬれるか、又は分離するのにかかる時間の間、時間を置く。ぬれは、単位が完全にぬれるのにかった時間である。錠剤のぬれは、斑点で起こり、最後に、単位全体がぬれるように合併することがある。分散試験は、単位の中心がぬれた集塊になった場合に完了したと考えられる。したがって、ぬれ時間は、単位の中心が単位の最も厚い部分であるので、単位の中心が全体的にぬれたときを計測する。5つの錠剤の各々について、ぬれ時間を記録する。各試験の最長時間は、60秒間である。これよりも長い時間は、単に60秒超と記載してもよい。分離=単位が破損分解するのにかった時間。この時間は、単位が端からばらばらに壊れ始めるときを計測してもよい。5つの錠剤の各々について、分離時間を記録する。各試験の最長時間は、60秒間である。これよりも長い時間は、60秒超と記載してもよい。ときには、単位は、この時間制限内に完全にぬれないか、又は完全に分離しない。ときに、単位は、その中に硬質塊状物を有することがあり;別のときには、それは表面が全くぬれないこともある。加えて、単位全体が、硬質の外皮で覆われることがある。それが起こった場合、適宜、「硬質塊状物」又は「外皮が残る」と言及する、これについての注釈を説明に記載する。「硬質塊状物」及び/又は「外皮」の形成は、冷凍乾燥中の微小構造の破壊を示しうる。図3A~図3Cは、3つの可能な非分散状態の単純化した描写を、単位が水中にあるときに見える単位の側面図及び上面図で示す。図3A~図3Cの写真は、同じカテゴリーについての一部の代表的な単位を示す。分散特徴試験についての基準は、5つの錠剤が、60秒又はそれ未満で完全にぬれうるかどうか、並びに/又は硬質塊状物及び外皮の存在を伴わない触知可能な集塊に分離しうるかどうかである。一部の実施形態では、本明細書で開示する剤形は、60秒又はそれ未満で完全にぬれること、並びに/又は硬質塊状物及び/若しくは外皮の存在を伴わない触知可能な集塊に分離することができる。

【0096】

崩壊時間(インビトロ試験):6つの錠剤を、この試験に使用する。6つのビーカーを、精製水で満たし、 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に制御した水浴に入れる。その後、各錠剤をプリスター包装から除去する。慎重に6つの錠剤の各々上にワイヤクリップを置く。クリップが損傷をもたらすことなく錠剤を挟むことを確実にされたい。次に、薬局方に記載の試験を行う。そのような試験の例は、米国薬局方(701)の崩壊である。各錠剤について最長崩壊時間を記録する。崩壊時間試験の基準としては、6つの錠剤の各々について崩壊時間は60秒を超えないべきである。一部の実施形態では、本明細書で開示する剤形は、60秒未満の崩壊時間を有しうる。

10

20

30

40

50

【0097】

含水量:錠剤の含水量を決定するために、744 Oven Sample Processorを伴うMethro n 831 Karl Fischer Coulometer(電量法水分計)(Metrohm社、Herisau、Switzerland)を使用する。錠剤を正確に計量し、それをガラスバイアルに入れる。水分が進入しないことを確実にするためにバイアルを即座に圧着閉鎖する。その後、試料バイアルを744 Oven Sample Processorに入れ、温度を102℃に設定する。Hydranal Coulometric AG Oven試薬を使用して蒸発した水分を滴定して、放出された水分量を定量する。試験を3重で行い、平均値を記録する。含水量についての基準は、冷凍乾燥剤形が、約8%未満、好ましくは6%未満、より好ましくは4%未満の含水量を有するかどうかである。一部の実施形態では、本明細書で開示する剤形は、約8%未満、好ましくは6%未満、より好ましくは4%未満の含水量を有する。

10

【0098】

ピロソーム特徴:

ピロソームを含有する冷凍乾燥剤形は、ピロソームの免疫原性及び免疫学的利点に必要なとされる、出発液体ピロソーム集団からのインタクトなピロソームの割合、その粒径、及び表面抗原含有量の点で十分に保存されうる。ピロソーム構造は、剤形を産生するために使用される冷凍乾燥プロセスによって破壊されることがある。そのため、再構成した冷凍乾燥錠剤の溶液から、ピロソーム微粒子特徴を評定する。ピロソームは、インタクトな個々の粒子として、及び様々なサイズのクラスターとして存在することがあり、全ては免疫原性であるが、様々な抗原/エпитープ曝露を有し、舌下障壁を横断する様々な性能を有する。ピロソームは、(a)平均粒径及び(b)ピロソーム保存(インタクトなピロソーム)の割合の点で特徴付けることができる。

20

【0099】

NTA技術を使用するピロソーム粒径及び粒子濃度(1mLあたりのピロソーム粒子のカウント)評定:ナノ粒子トラッキング解析(NTA、NanoSight NS300器具による)は、溶液中に存在する30~1000nmの範囲内の様々な粒径を特定することができる高感度法である。試料溶液中の粒子を、個々にトラッキングし、同時に直接観察によって解析することができる。ナノ粒子は、それらの周囲の水分子のランダム運動のためにブラウン運動で運動する。小粒子は、より大きな粒子よりも速く運動する。各粒子のブラウン運動をビデオにより実時間で追跡し、NTAによりブラウン運動を解析して粒径を決定する。各粒子の運動をトラッキングすることによって、拡散計数を計算することができ、その後、ストークス・アインシュタイン式の適用を通して、粒径を計算することができる。この粒子毎の方法は、粒径分布及び濃度(すなわち、既知の体積の液体中の粒子数)についての高解像度結果を産生する。器具検出についての最適検出のための標的値を、以下のTable 5(表5)に要約する。

30

【0100】

40

50

【表 5】

TABLE 5

品質指標	標的	原理
PPF (フレームあたりの 粒子)	50～100	粒子カウントは、達成可能な解像度及び生成したプロファイルの統計的精度に影響を与える
有効トラック数	>5000	多分散試料について生成したプロファイルの統計的精度
S:N (シグナル対ノイズ比)	高	小粒子又は微粒子の検出の改善
SD (標準偏差)	低	より変動的ではないデータは、結果のより高い信頼性を与える
プロファイルの外観	良好:非ガウス分布、ピーク上の最小限のショルダリング	データにノイズがあまり存在しない、明確な粒径集団

10

20

【0101】

試験試料は、液体形態でなければならない。この研究のために、ビロソームワクチンは、液体形態で供給される。本明細書で開示するワクチン製剤からの試験試料について、混合物は液体形態で供給され、冷凍単位は試験前に液体形態に解凍され、冷凍乾燥剤形は水緩衝液で液体形態に再構成される。試験試料は、濃縮し過ぎないようにするべきである。液体試験試料は、適宜HN緩衝液で更に希釈して、検出を最適化してもよい。希釈緩衝液は高純度のものであってもよく、使用前に少なくとも0.22 μmフィルターを通して濾過してもよい。NTA解析について設定した実験パラメーターを、以下のTable 6(表6)に要約する。

30

【0102】

【表 6】

TABLE 6

パラメーター	設定
試料希釈	内容物による(希釈した試験試料中のビロソームカウントの濃度に依存して1:100～1:8000 に及びうる)
キャプチャー数	5
キャプチャー持続期間	60 秒間
温度制御	25℃
粘度	0.9Cp

40

【0103】

試料を、当該技術分野で公知のNTAによって測定した。一部の実施形態では、本明細書

50

で開示する断片及びクラスターを含むピロソーム粒子範囲は、約50～500nmでありうる。一部の実施形態では、インタクトなピロソームであるピロソーム粒子は、約70～400nm又は約70～200nmの範囲内(主ピーク)でありうる。一部の実施形態では、ピロソーム粒子の平均直径は、約70～200nm、約100～175nm、約125～155nmでありうる。検出目的のために、試料中のピロソーム集団の粒子濃度は、少なくとも 10^{10} カウント/mLでありうる。

【0104】

フローサイトメトリーを使用したピロソーム保存割合の評定:この評定のために、フローサイトメトリーを使用する。第1に、脂溶性色素Dil(長鎖ジアリルカルボシアニン)をピロソームの脂質二分子膜に挿入することによって、出発液体ピロソーム粒子を標識する(標準試料は100%の出発物質である)(Dilによる標識は、粒径に対して測定可能な効果を有しない)。第2に、冷凍乾燥錠剤を再構成し、冷凍乾燥錠剤中のピロソームをDilで標識する(試験試料)。その後、試料を、AMNIS画像化フローサイトメーターを使用して解析し、標準試料(冷凍乾燥前の液体ピロソーム)と試験試料(冷凍乾燥したピロソーム)との間の事象を比較して、(a)ピロソーム回復の百分率及び(b)ピロソームクラスターの百分率の点で、冷凍乾燥後のピロソーム保存の割合を見積もる。一部の実施形態では、単一粒子としてのピロソーム回復の百分率は、出発物質の約20～50%、約30～50%、又は約40～50%でありうる。一部の実施形態では、ピロソームクラスター(ダブルット、トリプレット又はより高次数の形態)の百分率は、約50%未満、約25%、約10%、又は約5%でありうる。

【0105】

ピロソームのヘマグルチニン(HA)、HIV-1抗原P1、HIV-1抗原及びアジュバントの含有量
ピロソームのインフルエンザHA、HIV-1抗原及びアジュバント含有量は、様々な方法によって定量することができる。これらを、以下のTable 7(表7)で表にする。

【0106】

【表7】

TABLE 7

定量する内容物	方法
インフルエンザ HA	イムノブロットアッセイ SRID アッセイ ELISA HPLC アッセイ
HIV-1 抗原	Immunoblot assay HPLC assay ELISA
アジュバント	UV 分光学アッセイ HPLC アッセイ

【0107】

HA、P1及びrgp41のイムノブロットアッセイ法:この解析では、製剤(液体ピロソーム濃縮物、又はピロソームを含有する再構成した冷凍乾燥剤形)を、ニトロセルロース膜上に吸収させ、抗原を、加熱手技、変性剤又は還元剤の非存在によりそれらのネイティブ状態で維持する。このアッセイは、特異的抗体にアクセス可能な全ての抗原を検出し、特異的エピトープへのアクセスを破壊又は遮断する主要な抗原分解又は変性について示す。また、それは、特定の賦形剤が抗体のその抗原への結合を妨げうるかどうかを示す。解析のための冷凍乾燥剤形(試験試料)を調製するために、各錠剤を、0.5mLの水に溶解する(すなわち、冷凍乾燥錠剤を、冷凍乾燥前のピロソーム製剤の組成に再構成し戻す)。陽性対照を調製するために、液体ピロソーム濃縮物の試料を、超純水で希釈する(希釈は4倍である)。液体ピロソーム濃縮物は、理想的には、剤形試験試料の作製において使用される同じバッチ

である。全ての試験試料及び陽性対照の連続2倍希釈液を調製する。精製HA及びrgp41、並びに合成P1のような追加の陽性対照も使用してもよい。1.5 μ Lの各試料及び陽性対照を、乾燥ニトロセルロース膜上に点配置する(左～右へ増大する希釈で-非希釈、 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/8$ 、 $1/16$ 、 $1/32$ 、 $1/64$ 、 $1/128$)。乾燥膜を1%(w/v)カゼインでブロッキングし、特異的抗体溶液-HIV-1 P1抗原に特異的なヒトモノクローナル抗体(mab)2F5、及びHIV-1 rgp41抗原に特異的なウサギ抗rgp41血清とインキュベートする。インキュベーション後、ニトロセルロース膜を洗浄する。その後、蛍光標識二次抗体(抗ヒト又は抗ウサギ)により、結合した特異的抗体を、700nm及び800nmでの2つの異なる蛍光標識の同時検出を可能する遠赤色蛍光スキャナーを使用して検出する。各試料スポット(最低～最高)についての蛍光生データシグナルを、各々の陽性対照スポットの希釈液と比較する(陽性対照に対する%)。試料の算術平均の百分率を計算する。

【0108】

3M-052についてのUV分光法アッセイ:アジュバント分子3M-052は、いくつかのUV吸収ピークを有する。これらのピークの一部は、脂質及びタンパク質の吸収と重複する。320nmのUV分光法によって決定を行った。

【0109】

P1及びrgp41についてのHPLCアッセイ:C18カラムでの逆相高速液体クロマトグラフィーによって水～アセトニトリル勾配を使用して、HIV抗原P1及びrgp41を分離した。280nmのUV分光法によって決定を行い、ピーク領域をHPLC系ソフトウェアによって定量した。

【0110】

ELISAエンドポイント抗体タイター:Maxisorp96ウェルプレート(Nunc社-平底)及びPolysorpプレートを、各々、PBS(pH7.4)中に調製した0.1mLのrgp41又はP1ペプチド(2 μ g/mL)により4℃で16時間コーティングした。プレートを0.05% v/vのTween20を含むPBS(PBST)で3回洗浄し、その後、PBST中に調製したブロッキング溶液1%BSAを各ウェルに添加し、室温(RT)で2時間インキュベートした。プレートを、PBSTで3回洗浄し、その後、1ウェルにつき0.1mLの、PBST中の0.1%BSA中に調製した、 $1/1000$ に希釈した免疫前血清、又は免疫血清連続希釈液($1/1000 \sim 1/64,000$)を添加し、RTで2時間インキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄し、PBST中の0.1%BSA中に $1:4000$ 希釈したヤギ抗ラットIgG-HRPとRTで2時間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、その後、0.1mLの測色基質o-フェニレンジアミン(OPD)を添加し、反応を2M H_2SO_4 で停止し、続いて492nmでプレートを読み取った。

【実施例1】

【0111】

ピロソーム完全性を損傷することなく冷凍乾燥中に微小構造破壊を低減するための、低温冷凍乾燥周期と関連した高マンニトールレベル(8% w/w)の使用。

構造頑健性を増大させるために剤形においてマンニトールを使用する。ピロソーム粒子を保護するための高レベルの緩衝液の存在及びトレハロースの添加のために、4.5% w/wの典型的なレベルでのマンニトールの使用は、冷凍乾燥中の十分な構造支持を提供することができなかった。したがって、微小構造破壊が起こった。

【0112】

しかしながら、出願人らは、より高レベルのマンニトールと低温冷凍乾燥周期との組合せを使用することによって、構造的により頑健な冷凍乾燥錠剤を達成することができることを発見した。この実施例は、4.5% w/wマンニトールを含有する製剤と8% w/wマンニトールを含有する製剤とを比較するデータを示す。両方の製剤で、HN緩衝液(pH7.4)(50 mM HEPES、142.5mM NaCl)中のHA 70～80 μ g/ml、P1 40～50 μ g/ml、rgp41 70～80 μ g/ml(A/Brisbane/59/2007(H1N1))を含有する、Mymetics社によって供給される液体ピロソーム濃縮物MYM-201ロット160125-1の25% w/wローディングを、ピロソーム製剤において使用した。魚ゼラチン及び正味のトレハロースレベルを、それぞれ、ピロソーム製剤の6% w/w及び2% w/wに維持した。図2で示されるように、製剤を、5

00mgの投入充填質量アリコートで15℃にてアルミニウムトレーのプリスターポケットに投入した。投入した水性ワクチン混合物を含有するトレーを、-70℃に設定した冷凍チャンバーを通して3分15秒間の持続期間の間アルミニウムトレーを通過させることによって冷凍した。冷凍した製品を含有するアルミニウムトレーを収集し、-15℃未満の温度のフリーザーに入れ、冷凍を保持して6時間アニールし、その後凍結乾燥した。その後、-15℃24時間、続いて-10℃18時間を使用する2工程FD周期を使用した。冷凍乾燥錠剤のプリスターを、サシェ中に密閉し、周囲条件で保存した。

【0113】

凍結乾燥錠剤の物理的特徴(外観及び分散時間)を、上記に説明する試験に従って評価した。加えて、凍結乾燥錠剤中のピロソーム粒径を、上記に説明する試験に従って特徴付けた。結果を、以下のTable 8(表8)に要約する。

【0114】

【表8】

TABLE 8

マンニトール 4.5%(製剤 1)	マンニトール 8%(製剤 2)
外観:良好(n=182)	外観:良好(n=184)
分散時間(n=8) ● ぬれ:60 秒超(2 単位-外皮、5 単位-硬質塊状物) ● 分離:60 秒超(完全には分散しなかった)	分散時間(n=8) ● ぬれ:28 秒未満 ● 分離:36 秒未満
NTA 分析 ● 冷凍乾燥錠剤:136nm(主ピーク) ● ビロソーム粒子%(200nm 未満):50%超	NTA 分析 ● 冷凍乾燥錠剤:140nm(主ピーク) ● ビロソーム粒子%(200nm 未満):50%超

【0115】

全ての錠剤は、良好な外観を有した。4.5% w/wマンニトール製剤は、微小構造破壊のために錠剤中に見られる外皮及び/又は硬質塊状物を伴う不十分な分散挙動を有する。製剤を、マンニトールの結晶化を促進する8% w/wまで増大させると、冷凍乾燥錠剤の構造が改善した。8% w/wのマンニトールを有する製剤は、良好な分散挙動を有し、柔らかく、触知可能な集塊を与えた。低温冷凍乾燥周期と組み合わせると、冷凍乾燥錠剤中のピロソーム粒子は、影響を受けなかった。冷凍乾燥錠剤中のピロソーム粒径は、製剤間で全体的に同等であった。

【実施例 2】

【0116】

ICH条件下で3カ月間保存した冷凍乾燥ワクチン剤形(製剤1)の安定性データ

液体ピロソーム濃縮物は、一般的に、2〜8℃で安定であるが、液体HIVピロソームワクチンは、抗原上で起こる重要な化学修飾のために数カ月間の限定的な有効保存期間を有し、一方で、凝集はない。低含水量を有する固形ワクチン形態では、そのような修飾は経時的に減速され、最小限であることが予想され、有効保存期間は1年超に延長される。冷凍乾燥錠剤製剤1の形態のピロソームワクチンの安定性を、この実施例で示す。HN緩衝液(pH7.4)(50mM HEPES、142.5mM NaCl)中の約100 µg/ml HIV-1 P1、230 µg/ml HI

V-1 rgp41、130 µg/ml HA(A/Brisbane/59/2007(H1N1))、65 µg/mlアジュバント 3M-052からなる、Mymetics社によって供給される液体ビロソーム濃縮物バッチMYM V 202ロット170130-1を、7% w/wトレハロースを伴って、凍結乾燥ワクチン錠剤(バッチ Z33787A101)の製造のために供給した。

【0117】

ワクチン錠剤を調製するために、最初に、液体ビロソーム製剤混合物を調製した。それは、25% w/wの液体ビロソーム濃縮物バッチMYM V202ロット170130-1、6% w/w魚ゼラチン、4.5% w/wマンニトール、2% w/w(正味の)トレハロース、pH7.4にするための水酸化ナトリウム溶液(必要量)、及び100% w/wにするための精製水(必要量)を含有した。

【0118】

液体ビロソーム製剤混合物を、500mgの投入充填質量アリコートで15℃にてアルミニウムトレイのプリスターポケットに投入した。投入した水性ワクチン混合物を含有するトレイを、-70℃に設定した冷凍チャンバーを通して3分15秒間の持続期間の間トレイを通過させることによって冷凍した。冷凍した製品を含有するアルミニウムトレイを収集し、-15℃未満の温度のフリーザーに入れた。その後、-15℃24時間、続いて-10℃18時間を使用する2工程FD周期を使用した。

【0119】

凍結乾燥錠剤のプリスターを、サシェ中に密閉し、5℃、25℃/60%相対湿度、及び40℃/75%相対湿度で3カ月間保存した。初期試験及び3カ月間試験の結果を、以下のTable 9(表9)に要約する。

【0120】

【表9】

TABLE 9

試験	初期	5℃/3カ月	60%RHで 25℃/3カ月	75%RHで 40℃/3カ月
外観	良好	良好	良好	良好
含水量(%w/w)	5.22	5.20	5.76	4.83
崩壊時間(秒)	<13	<23	<41	<25
NTA:主ピーク (nm)	101	120	124	124
ビロソーム粒子 (200nm未満)%:	>50%	>50%	>50%	>50%

【0121】

安定性データは、錠剤外観が良好であり、バッチ間で一貫性があったことを示す。含水量は、5~6% w/wであり、3カ月の保存期間にわたり様々な安定性条件間でほとんど差がなかった。この製剤は、4.5% w/wマンニトールを含有するので、崩壊時間の変動性で示されるように、凍結乾燥中に一部の微小構造破壊がある。ビロソーム粒径の点では、様々な安定性条件で保存された錠剤間で、DLS及びNTAデータは、ビロソーム粒径の識別可能な差を示さなかった。出発液体ビロソーム濃縮物は、50%を超える200nm未満の粒子を有する。結果は、再構成単位からの200nm未満のビロソームは、本質的に、同様の桁まで保存されることを示す。

【0122】

半定量的イムノブロット分析を使用して、抗原HIV-1抗原P1及びrgp41を、分解について3カ月間にわたりモニターした。全ての試料を事前に2倍希釈した。この目的のために、

P1に特異的なヒトmAb 2F5、及びウサギ抗rgp41血清を使用した。ワクチンバッチを産生するために使用した液体ピロソーム濃縮物バッチMYM-V202ロット170130-1を、8倍希釈し、陽性対照として使用した。図4は、イムノプロット分析の写真を示す。試料Z33787A101について、5℃で保存した錠剤は、初期試料(t=0)と比較して、1カ月間及び3カ月間の保存後にrgp41抗原シグナルの減少を示さないか、又は最小限の減少のみを示した。同様に、25℃で保存した単位は、rgp41抗原についてシグナル強度の最小限の差のみがあり、P1抗原についてわずかな減少があった。40℃単位についての差は、より大きかったが、それでもこれは、10～20%のアッセイ精度内でありうる。

【0123】

rgp41及びP1についての蛍光データの定量的評価を、それぞれ、Table 10(表10)及びTable 11(表11)に示す。各表の上部は、示される安定性試料についての各スポット(最低～最高希釈液)の蛍光生データシグナルを示す。各表の下部は、各々の陽性対照スポットの希釈液と比較した各試料スポットの値を示す(陽性対照に対する%)。最下部の列は、全ての試料の百分率の算術平均を示す。測定値の明らかな外れ値は、平均計算から除外した。

【0124】

【表10】

TABLE 10

rgp41	MYM-V202	Z33787A101						
		t= 0	1カ月間				3カ月間	
		5℃	5℃	25℃	40℃	5℃	25℃	40℃
	7702462	9058972	8032375	9201721	7801344	6321957	10300125	8521558
	4339215	5472388	4683281	4902260	4771430	4016424	4072924	3454675
	5371152	4467722	3785349	3403051	4176710	3596774	2556036	3084636
	3319677	3265426	2311220	3464764	3194101	3263683	3054427	2615003
	2259183	2179005	2166937	2708839	2159053	2482939	2704366	2043011
	1704534	1689938	1182171	1769144	1533427	1448772	1594263	1077611
	1339732	1048682	751850	1056018	675617	785497	976990	621839
	679095	632167	517094	514737	455636	490586	451385	417028
	対照に対する%	117.6	104.3	119.5	101.3	82.1	133.7	110.6
	対照に対する%	126.1	107.9	113.0	110.0	92.6	93.9	79.6
	対照に対する%	83.2	70.5	63.4	77.8	67.0	47.6	57.4
	対照に対する%	98.4	69.6	104.4	96.2	98.3	92.0	78.8
	対照に対する%	96.5	95.9	119.9	95.6	109.9	119.7	90.4
	対照に対する%	99.1	69.4	103.8	90.0	85.0	93.5	63.2
	対照に対する%	78.3	56.1	78.8	50.4	58.6	72.9	46.4
	対照に対する%	93.1	76.1	75.8	67.1	72.2	66.5	61.4
	%(平均)	99.0	81.2	97.3	86.0	74.0	80.0	65.3

【0125】

【表 1 1】

TABLE 11

P1	MYM-V202	Z33787A101						
		t= 0	1カ月間				3カ月間	
		5°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
	2764625	1461965	1245932	1471586	1238537	1516476	1351413	1572627
	1208918	1606470	723609	1235559	1338350	547105	470287	508107
	845363	997068	578732	617270	997966	619197	352482	610820
	453354	904843	566560	879843	1200198	1211985	882260	490097
	249520	317945	287210	840751	673118	324793	339128	261055
	149361	269482	142741	311659	342849	146881	159835	115068
	86167	110800	63348	127920	163997	124010	91144	49784
	28407	42578	19915	18230	19079	24436	27082	27289
	対照に対する%	52.9	45.1	53.2	44.8	54.9	48.9	56.9
	対照に対する%	132.9	59.9	102.2	110.7	45.3	38.9	42.0
	対照に対する%	117.9	68.5	73.0	118.1	73.2	41.7	72.3
	対照に対する%	199.6	125.0	194.1	264.7	267.3	194.6	108.1
	対照に対する%	127.4	115.1	336.9	269.8	130.2	135.9	104.6
	対照に対する%	180.4	95.6	208.7	229.5	98.3	107.0	77.0
	対照に対する%	128.6	73.5	148.5	190.3	143.9	105.8	57.8
	対照に対する%	149.9	70.1	64.2	67.2	86.0	95.3	96.1
	%(平均)	136.2	81.6	147.6	161.9	112.4	96.0	76.8

【0 1 2 6】

Z33787A101のワクチン錠剤について、5°Cで保存した錠剤は、初期試料(t=0)と比較して、1カ月間及び3カ月間の保存後にrgp41及びP1抗原シグナルの減少を示さないか、又は最小限の減少のみを示した。同様に、25°Cで保存した単位は、rgp41抗原についてシグナル強度の最小限の差のみがあり、P1抗原についてわずかな減少があった。40°C単位についての差は、抗原P1及びrgp41の両方についてより大きかったが、それでもこれは、とりわけ、連続希釈試料内で再び変動が見られたので、アッセイの精度内でありうる。

【0 1 2 7】

様々な温度で3カ月間にわたり保存した全てのワクチン錠剤について320nmのUV分光法によって3M-052の決定を行った。値は、以下のTable 12(表12)に示す。

【0 1 2 8】

【表 1 2】

TABLE 12

時点	保存条件	OD (320 nm)
0	5°C	0.116
1 カ月	5°C	0.114
1 カ月	25°C / 60% RH	0.112
1カ月	40°C / 75% RH	0.110

【0 1 2 9】

これらの試料間で識別可能な差は観察できず、それゆえ、3M-052濃度は、このアッセイの精度内で、全ての試料において安定なままであると考えられた。全体的に、HA、P1、rgp41及び3M-052は、様々な保存条件下で保存した冷凍乾燥錠剤において安定であり、以下のTable 13(表13)で示されるように経時的に小さな変動を有した。

【0 1 3 0】

【表 13】

TABLE 13

安定性研究中の抗原及びアジュバント 検出	液体ビロソーム 濃縮物	冷凍乾燥錠剤
5℃で3カ月間にわたる rgp41 の変化 (予測されなかった分解=基準)	有意でない	有意でない
5℃と比較した、25℃で3カ月間に わたる rgp41 の変化(分解)	実施せず	最小限の減少
5℃と比較した、37～40℃で3カ月間に わたる rgp41 の変化(分解)	実施せず	最小限の減少
5℃で3カ月間にわたる P1 の変化 (予測されなかった分解=基準)	有意でない	有意でない
5℃と比較した、25℃で3カ月間に わたる P1 の変化(分解)	実施せず	最小限の減少
5℃と比較した、37～40℃で3カ月間に わたる P1 の変化(分解)	実施せず	最小限の減少
5℃で3カ月間にわたる 3M-052 の変化 (予測されなかった分解=基準)	有意でない	有意でない
5℃と比較した、37～40℃で3カ月間に わたる 3M-052 の変化(分解)	有意でない	有意でない

【実施例 3】

【0131】

ICH条件下で保存した冷凍乾燥ワクチン剤形(製剤2)の安定性データ。

製剤2についての冷凍乾燥錠剤の形態のビロソームワクチンの安定性を、この実施例で示す。HN緩衝液(pH7.4)(50mM HEPES、142.5mM NaCl)中の約121 µg/ml HIV-1 P1、67 µg/ml HIV-1 rgp41、41 µg/ml HA(A/Brisbane/59/2007(H1N1))、39 µg/mlアジュバント3M-052からなる、Mymetics社によって供給される液体ビロソーム濃縮物バッチMYM V202ロット17MYM002/F17255を、7% w/wトレハロースを伴って、凍結乾燥ワクチン錠剤(バッチMYM-212ロット1690747)の製造のために使用した。

【0132】

ワクチン錠剤を調製するために、最初に、液体ビロソーム製剤混合物を調製した。それは、25% w/wの液体ビロソーム濃縮物バッチMYM V202ロット17MYM002/F17255、6% w/w魚ゼラチン、8% w/wマンニトール、2% w/w(正味の)トレハロース、pH7.4にするための水酸化ナトリウム溶液(必要量)、及び100% w/wにするための精製水(必要量)を含有した。

【0133】

液体ビロソーム製剤混合物を、500mgの投入充填質量アリコートで15℃にてアルミニウムトレイのプリスターポケットに投入した。投入した水性ワクチン混合物を含有するトレイを、-70℃に設定した冷凍チャンバーを通して3分15秒間の持続期間の間トレイを通過させることによって冷凍した。冷凍した製品を含有するアルミニウムトレイを収集し、-15℃未満の温度のフリーザーに入れた。その後、-15℃24時間、続いて-10℃18時間を使

用する2工程FD周期を使用した。

【0134】

冷凍乾燥錠剤のブリスターを、サシェ中に密閉し、5℃、25℃/60%相対湿度、及び40℃/75%相対湿度で3カ月間保存した。初期試験及び6カ月間試験の結果を、以下のTable 14(表14)に要約する。

【0135】

【表14】

TABLE 14

試験	外観	崩壊時間	含水量
初期	良好	22 秒間	3.6%
5℃で 1 カ月間	良好	8 秒間	3.8%
25℃/60%RH で 1 カ月間	良好	16 秒間	3.7%
40℃/75%RH で 1 カ月間	良好	14 秒間	3.6%
5℃で 3 カ月間	良好	12 秒間	3.7%
25℃/60%RH で 3 カ月間	良好	10 秒間	3.7%
40℃/75%RH で 3 カ月間	良好	13 秒間	3.9%
5℃で 6 カ月間	良好	8 秒間	3.9%
25℃/60%RH で 6 カ月間	良好	10 秒間	3.8%
40℃/75%RH で 6 カ月間	良好	13 秒間	4.0%

【0136】

安定性データは、錠剤外観が良好であり、バッチ間で一貫性があったことを示す。含水量は、3.6～4.0% w/wであり、6カ月の保存期間にわたり様々な安定性条件間でほとんど差がなかった。この製剤は、8% w/wマンニトールを含有するので、より短く、且つより一貫した崩壊時間で示されるように、冷凍乾燥中の微小構造破壊があまりない。

【0137】

抗原(HIV-1抗原P1及びrgp41)含有量の安定性を、HPLCアッセイを使用して分解について3カ月間にわたりモニターした。液体ワクチンMYM V202(出発物質)について、2～8℃(冷保存条件)で1カ月間及び3カ月間保存した場合、P1含有量は、それぞれ、4%及び7%低減したことが分かった。rgp41について、含有量は、冷保存条件で1カ月及び3カ月にて、それぞれ、16%及び25%低減した。液体ピロソームを25℃及び40℃で保存した場合、P1及びrgp41は、1カ月及び3カ月後にもはや検出されなかった。

【0138】

保存時の凍結乾燥錠剤中の抗原含有量の結果を、抗原P1及び抗原rgp41について、それぞれ、Table 15(表15)及びTable 16(表16)に示す。凍結乾燥錠剤形態では、P1抗原は、2～8℃(低温流通条件)で3カ月後に含有量低下が観察されず非常に安定なままであり、また、低温流通条件外での1及び3カ月間保存中もまた影響を受けないままであった。rgp41抗原について、2～8℃、25℃及び40℃で1カ月後に、それぞれ、約5%、10%及び20%の低下が観察された。3カ月間の保存では、低下は、それぞれ、約13%、15%及び19%であった。HPLC法の精度を考慮すると、観察された15%未満の低下濃度差は、有意でない。更に、観察された漸進的な抗原喪失又は低下は、化学修飾に関連し、構造的切断、アミノ酸を失うこと又は凝集を伴う高度な分解のためではない。その一方で、所与のエピトープにおける化学修飾は、その認識を潜在的に変更し、その領域への抗体結合を減少又は増大させることがあるが、他の領域は、等しく十分に認識されるままでありうる。

【0139】

T0では、P1及びrgp41抗原は、同様のSDS-PAGE泳動プロファイルを有し、舌下錠剤では、まだ、特異的モノクローナル抗体によって認識され、P1及びrgp41に対する血清抗体は、まだ、キーペプチドを有する様々なP1及びgp41ペプチドに対して反応していた。これらの分析は、全体として、P1及びrgp41が、製造プロセス中にそれらの抗原性及び免疫原性のほとんどを保存していたことを示唆する(データは示していない)。

【0140】

【表15】

TABLE 15

時点	P1 含有量(凍結乾燥錠剤)		
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/単位}$	低減/増大%
2~8°C(平均 5°C)(低温流通条件)での保存			
初期(T0)	24.7	12.35	適用なし
1 カ月間 (T1)	28.6	14.3	+ 15.8 (喪失なし)
3 カ月間 (T3)	27.6	13.8	+ 11.7 (喪失なし)
25°C/60%RH での保存			
1 カ月間 (T1)	27.9	13.95	+ 13.0 (喪失なし)
3 カ月間 (T3)	27.5	13.75	+ 11.13 (喪失なし)
40°C/75%RH での保存			
1 カ月間 (T1)	25.8	12.9	+ 4.5 (喪失なし)
3 カ月間 (T3)	24.0	12.0	-2.8 (喪失)

【0141】

【表16】

TABLE 16

時点	rgp41 含有量(凍結乾燥錠剤)		
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/単位}$	低減%
2~8°C(平均 5°C)(低温流通条件)での保存			
初期(T0)	13.5	6.75	適用なし
1 カ月間(T1)	12.8	6.4	-5.2
3 カ月間(T3)	11.8	5.9	-12.6
25°C/60%RH での保存			
1 カ月間(T1)	12.1	6.05	-10.4
3 カ月間(T3)	11.5	5.75	-14.8
40°C/75%RH での保存			
1 カ月間(T1)	10.8	5.4	-20.0
3 カ月間(T3)	10.9	5.45	-19.3

【実施例 4】

【0142】

零下温度保存条件下で保存した凍結乾燥錠剤の安定性。

実施例4のデータは、ビロソームワクチン錠剤及びビロソーム粒子の、零下条件下で保存した場合の、物理的特徴の安定性を示す。HN緩衝液(pH7.4)(50mM HEPES、142.5mM NaCl)中のHA 70~80 µg/ml、P1 40~50 µg/ml、rgp41 70~80 µg/ml(A/Brisbane/59/2007(H1N1))を含有する、Mymetics社によって供給される液体ビロソーム濃縮物MYM-201ロット160125-1の25% w/wローディング、6% w/w魚ゼラチン、8% w/wマンニトール及び2% w/w(正味の)トレハロースを含有する液体ビロソーム製剤混合物を、500mgの投入充填質量で投入し、冷凍乾燥した。製剤を、500mgの投入充填質量アリコートで15℃にてアルミニウムトレイのブリスターポケットに投入した。投入した水性ワクチン混合物を含有するトレイを、-70℃に設定した冷凍チャンバーを通して3分15秒間の持続期間の間アルミニウムトレイを通過させることによって冷凍した。冷凍した製品を含有するアルミニウムトレイを収集し、-15℃未満の温度のフリーザーに入れ、冷凍を保持して6時間アニールし、その後凍結乾燥した。その後、-15℃24時間、続いて-10℃18時間を使用する2工程FD周期を使用した。冷凍乾燥錠剤のブリスターを、サシェ中に密閉し、-15℃のフリーザー内に1週間保存した。錠剤のブリスターの対応する組をサシェ中に密閉し、同じ持続期間の間、周囲条件に置いた。上記の試験方法に従って説明されるように、これらの錠剤を、外観、分散特徴(ぬれ時間及び分離時間)及びビロソーム粒径分布について評定した。

【0143】

全ての単位は、両方の条件での保存後に良好な外観を有することが分かった。データは、零下保存は、錠剤分散特徴(ぬれ及び分離時間)(Table 17(表17))及びビロソーム粒径分布(Table 18(表18))に対してほとんど効果を有しないことを示した。

【0144】

【表 17】

TABLE 17

条件	ぬれ時間(秒)	分離時間(秒)
周囲条件保存	<31	<37
零下保存	<32	<35

【0145】

【表 18】

TABLE 18

条件	NTA: 主ピーク粒径 (nm)	NTA: ビロソーム粒径 (200nm 未満)%
1 週間周囲条件 消化後	130	59.9
1 週間零下、 消化後	132	60.6

10

【実施例 5】

【0146】

再構成した冷凍乾燥錠剤からのビロソーム粒子のフローサイトメトリー評価。

プロセス開発からの冷凍乾燥錠剤試料中に保存されたビロソームの割合の見積もりを、以下に要約する。Table 19(表19)に示す値は、ビロソームゲートに対応する焦点領域における事象の測定値を使用したAMNISフローサイトメトリーデータに由来した。

【0147】

20

【表 19】

TABLE 19

ワクチン製剤	産生の終わりに対 する回復したビロ ソームの百分率	クラスター(ダブ レット、トリプレ ット、より高次の形 態)の百分率
液体ワクチン	100%	<5%
冷凍乾燥錠剤 (再構成)	24~40%	10~25%

30

【0148】

データは、出発ビロソームの24~40%が冷凍乾燥錠剤中で保存され、冷凍乾燥錠剤のこれらのビロソームの10~25%がクラスターで、ほとんどの場合ダブレット及びトリプレットとして存在することを示す。

【実施例 6】

【0149】

40

液体ビロソーム製剤、及びビロソームを含有する再構成した冷凍乾燥舌下錠剤からのP1及びrgp41抗原の免疫原性評価。

液体ビロソーム濃縮物(液体ワクチンMYM-V202)、及び実施例3についてのビロソームを含有する冷凍乾燥舌下錠剤を、4℃及び40℃で3カ月間の期間にわたり保存し、免疫原性評価を行う。1カ月間の保存後に、40℃で保存した液体ワクチン及び舌下錠剤の試料を、保存キャビネットから除去し、免疫原性評価を行った。3カ月間の保存後に、4℃及び40℃で保存した液体ワクチン及び舌下錠剤の試料を除去し、免疫原性評価を行った。

【0150】

免疫原性評価のために、ウィスターラット(1群につきn=10)、各性別50%を使用した。ラットを0日目、28日目及び56日目に免疫化した。液体ワクチンは、0.1mL中に3.9 µg

50

のP1、2.2 µgのrgp41及び1.3 µgの3M-052 TLR7/8(アジュバント)を含有し、これを皮下注射用に使用した。舌下錠剤については、0.1mL中の約3 µgのP1、1.7 µgのrgp41及び1 µgの3M-052 TLR7/8(アジュバント)を達成するために十分な量の舌下錠剤を、滅菌水に溶解して、皮下注射によって投与した。0日目に免疫前血清、及び65日目に免疫血清を収集し、各動物血清について、及び血清プールについて、エンドポイント抗体タイターを決定した。

【0151】

図5は、様々な温度で保存した液体ワクチン及び舌下錠剤からのP1及びrgp41の免疫原性を示す。P1及びrgp41抗原の両方を含有する液体アジュバント化ワクチン製剤MYM-V 202は、温度感受性であり、熱安定性の改善を有する舌下錠剤ワクチン形態の免疫原性との比較のための標準物質としての役割を果たした。黒色線は、4°Cで3カ月間保存したワクチンを示し;黒色破線は、40°Cで1カ月間保存したワクチンを示し;灰色線は、40°Cで3カ月間保存したワクチンを示す。データは、冷凍乾燥錠剤について抗原の免疫原性が保持されることを示す。また、各パネルで、エンドポイント抗体タイターを示す。エンドポイントタイターは、免疫前バックグラウンドよりも2倍超高いOD値を生成する最後の血清希釈液に対応する。

【0152】

追加の定義

別に定義しない限り、本明細書で使用する当該技術分野の全ての用語、記号、並びに他の技術用語及び科学用語又は用語法は、請求される主題が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有すると意図される。一部の場合、通常理解される意味を有する用語は、明確にするために、及び/又は参照を容易にするために本明細書で定義され、本明細書中のそのような定義の包含は、必ずしも、一般的に当該技術分野で理解されている定義との実質的な差を表すとは解釈されるべきではない。

【0153】

本明細書中の値又はパラメーターの「約」についての言及は、その値又はパラメーターそれ自体に方向付けられる変動を含む(且つ説明する)。例えば、「約X」について言及する記載は、「X」の記載を含む。加えて、一連の値又はパラメーターが続く「～未満」、「～超(～を超える)」、「多くて」、「少なくとも」、「～未満又はそれに等しい」、「～超又はそれに等しい」という句又は他の同様の句についての言及は、その句を、一連の値又はパラメーター中の各値又はパラメーターに適用することを意味する。例えば、溶液は少なくとも約10mM、約15mM又は約20mMの濃度を有するという言明は、その溶液が少なくとも約10mM、少なくとも約15mM又は少なくとも約20mMの濃度を有することを意味することを意味する。

【0154】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明らかに別のよう示さない限り、複数形も含むと意図される。また、「及び/又は」という用語は、本明細書で使用される場合、関連付けられる列挙される項目のうちの1つ又は複数の任意の、及び全ての可能な組合せについて言及するか、又は包含することが理解されるべきである。「～を含む(includes)」、「～を含むこと(including)」、「～を含む(comprises)」及び/又は「～を含むこと(comprising)」という用語は、本明細書で使用される場合、言明される特色、整数、工程、操作、要素、成分及び/又は単位の存在を特定するが、1つ又は複数の他の特色、整数、工程、操作、要素、成分、単位及び/又はそれらの群の存在又は付加を除外しないことが更に理解されるべきである。

【0155】

本出願は、本文及び図面においていくつかの数値範囲を開示する。開示される数値範囲は、固有に、終点を含む開示される数値範囲内の任意の範囲又は値を支持するが、本開示は、開示される数値範囲全体を通して実施することができるので、正確な範囲限定は、明細書内で逐語的に言明されない。

【0156】

上記の説明は、当業者が本開示を作製及び使用することを可能にするために提示され、特定の適用及びその要求に関して提供される。好ましい実施形態に対する様々な修飾は、当業者に容易に明らかであり、本明細書で定義される一般原理は、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく、他の実施形態及び適用に適用されうる。したがって、本開示は、示される実施形態に限定されることを意図しないが、本明細書で開示される原理及び特色と一致する最も広範な範囲と一致するべきである。

【符号の説明】

【0157】

- 100 ワクチン剤形を産生する方法
- 101 工程 10
- 102 投入する
- 103 冷凍する
- 104 アニールする
- 105 冷凍乾燥する
- 201 ゼラチン及びマンニトールを水中に溶解する
- 202 予備混合物を60℃まで加熱し、1時間維持する
- 203 予備混合物を40℃まで冷却し、ふるいにかける
- 204 予備混合物を15℃まで冷却する
- 205 トレハロースを添加する
- 206 水酸化ナトリウム溶液を使用してpHを7.4に調節する 20
- 207 液体ピロソームワクチンを添加し、pHをチェックする
- 208 100%にするための残りの必要量の水を添加する
- 209 500mgの充填質量を15℃で投入する
- 210 -70℃で3分15秒間冷凍する
- 211 -15℃未満で3～9時間アニールする
- 212 2段階冷凍乾燥周期を使用して乾燥させる
- 213 錠剤品質について検査する
- 214 密閉する

30

40

50

【図面】
【図 1】

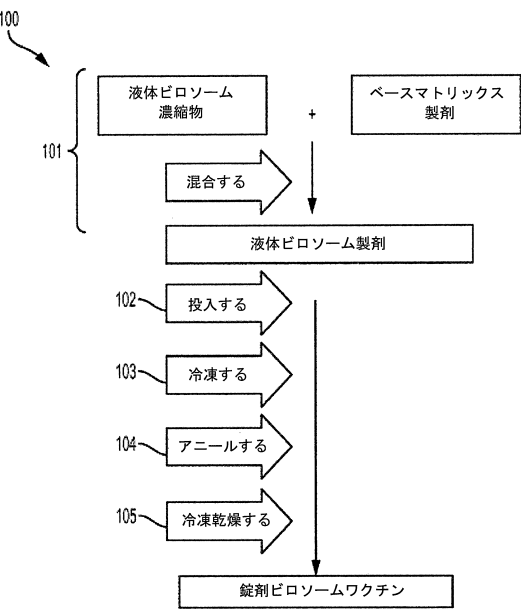


FIG. 1

【図 2】

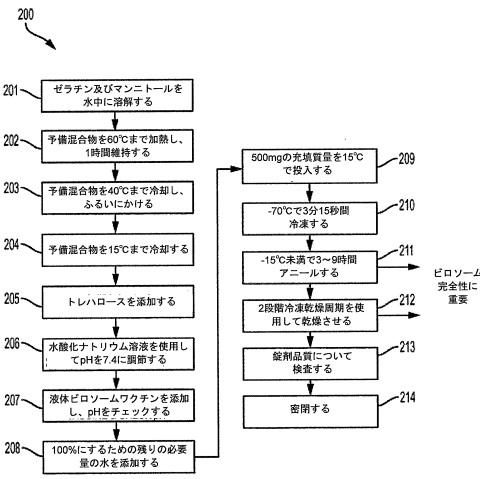


FIG. 2

【図 3】

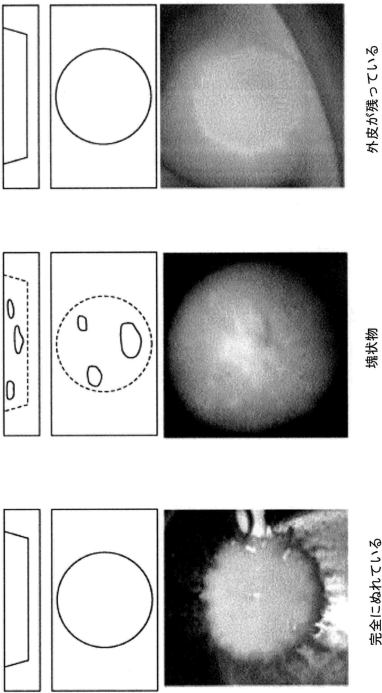


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

【図 4】

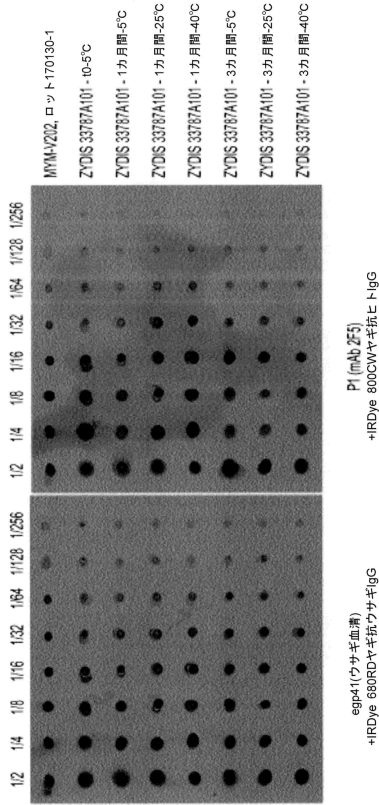


FIG. 4

10

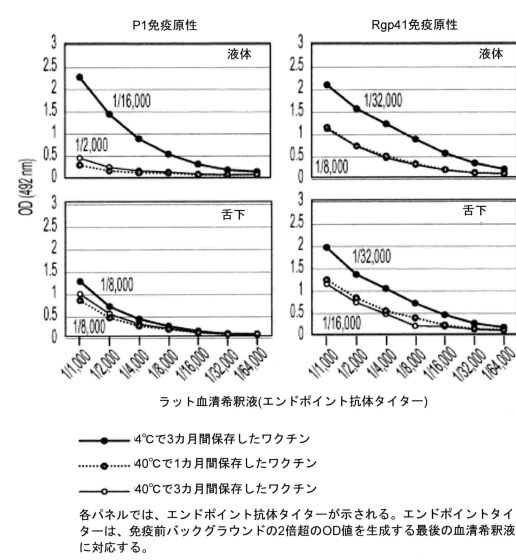
20

30

40

50

【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 9/20 (2006.01)

F I

A 6 1 K 9/20

(72)発明者 イク・テン・ウォン

イギリス・ウィルトシャー・エスエヌ４・７エイチエス・ロイヤル・ウットン・バセット・ホワイ
トゾーン・クローズ・１９

(72)発明者 チャーリー・スマードン

イギリス・ウィルトシャー・エスエヌ１５・１エフピー・チッペナム・バーズ・マーシュ・ヴュー
・ヒッコリー・ウェイ・４４

(72)発明者 ホジャステ・シルカニ

イギリス・ウィルトシャー・エスエヌ２５・２アールエル・スウィンドン・タッドポール・ガーデ
ン・ヴィレッジ・グリーン・ストリート・１１３

(72)発明者 マリオ・アマッカー

スイス・３１８５・シュミッテン・ヴェンネヴィルシュトラッセ・１１ベ

(72)発明者 シルヴァン・フルーリー

スイス・１０４１・ポッタン・グラン・リュ・３

(72)発明者 アントニウス・ヨハンネス・ヘンドリクス・ステグマン

オランダ・２２３１・テーゼット・レインスブルグ・コーニンヒン・エマプラントスーン・６

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表２０１０－５０５７６６（ＪＰ，Ａ）

特表２０１８－５３３５４７（ＪＰ，Ａ）

特表２０１３－５３９７６６（ＪＰ，Ａ）

国際公開第９７／０１３５３１（ＷＯ，Ａ１）

国際公開第２０１１／１２４８７６（ＷＯ，Ａ１）

特表２０１３－５１５７４８（ＪＰ，Ａ）

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017年, Vol.108, pp.71-77

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)