

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-507165

(P2017-507165A)

(43) 公表日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/00
A 61 P 31/00
A 61 P 35/00
A 61 P 37/04
A 61 P 31/12

G

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6
4 C 0 8 5
4 F 2 1 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-558550 (P2016-558550)
(86) (22) 出願日 平成26年12月16日 (2014.12.16)
(85) 翻訳文提出日 平成28年7月20日 (2016.7.20)
(86) 國際出願番号 PCT/US2014/070664
(87) 國際公開番号 WO2015/095230
(87) 國際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
(31) 優先権主張番号 61/916,555
(32) 優先日 平成25年12月16日 (2013.12.16)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 596060697
マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
39ケンブリッジ、マサチューセッツ・ア
ヴェニュー・77
(71) 出願人 515116467
トキタエ エルエルシー
アメリカ合衆国、98005-4046
ワシントン州、ベルビュー、ワンハンドレ
ッドアンドサーティーナインス アベニュー
一 サウスイースト 3150
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マイクロモールド成形された、または3次元印刷されたパルス放出ワクチン製剤

(57) 【要約】

好ましくは2つまたはそれを超える期間で放出する抗原の単回注射のための、エマルジョン系およびマイクロモールド成形された(「MM」)、または3次元印刷された(「3DP」)ポリマー製剤を開発した。製剤は、好ましくは生体適合性、生分解性ポリマーから形成されている。抗原をカプセル封入する別個の領域は、単独で、または他の抗原、アジュバント、安定剤、および放出調整剤との組み合わせで、製剤中に存在する。抗原は好ましくは、投与時に賦形剤中に存在するか、または即時放出のために製剤の表面に存在し、そして抗原の初期放出の10~45日後に放出されるために、必要に応じて、1つまたはそれを超えるさらなる期間における10~90日間隔での抗原の放出のために製剤内に組み込まれている。ポリオに対する免疫化のための好ましい実施形態では、抗原は投与時に、ならびにその2か月後、4か月後および6か月後に放出される。

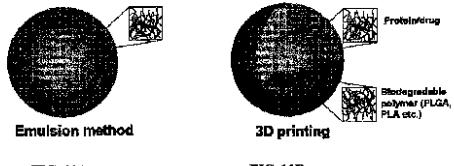


FIG. 11A

FIG. 11B

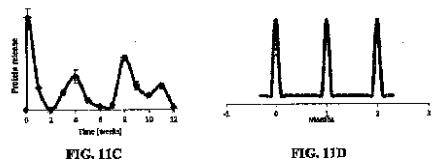


FIG. 11C

FIG. 11D

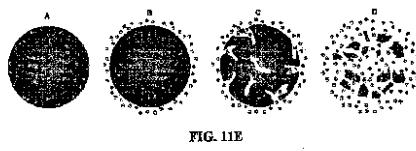


FIG. 11E

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗原を、必要に応じて前記抗原のための安定剤と組み合わせて含む生体適合性ポリマーのエマルジョン製剤、3次元印刷、またはマイクロモールディングによって形成されたポリマー製剤であって、前記抗原が、インビボで免疫応答を引き出すのに有効な量で規定の期間に放出される、ポリマー製剤。

【請求項 2】

治療用、予防用、栄養補助用、または診断用薬剤を、必要に応じて安定剤と組み合わせて含む生体適合性ポリマーのエマルジョン製剤、3次元印刷、またはマイクロモールディングによって形成されたポリマー製剤であって、前記薬剤が少なくとも2つの異なる時点で、または異なる放出動態で、前記製剤の別個の領域から放出される、ポリマー製剤。10

【請求項 3】

前記薬剤が1つまたはそれを超える抗原であり、前記抗原が、インビボで免疫応答を引き出すのに有効な量で規定の期間に放出される、請求項2に記載の製剤。

【請求項 4】

投与時に賦形剤中に存在するか、前記製剤の表面に存在するか、または前記製剤と混合された、インビボで免疫応答を引き出すのに有効な量の抗原をさらに含む、請求項1または3に記載の製剤。

【請求項 5】

糖、油、脂質、および炭水化物、好ましくは糖であり、最も好ましくはスクロース、トレハロース、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、必要に応じて糖ガラスの形態である糖からなる群から選択される安定化剤をさらに含む、請求項1または2に記載の製剤。20

【請求項 6】

前記抗原が感染病原体または腫瘍に対して免疫応答を引き出す、請求項1または3に記載の製剤。

【請求項 7】

前記感染病原体がウイルス、細菌、真菌または原虫である、請求項6に記載の製剤。

【請求項 8】

前記ウイルスがポリオ、インフルエンザ、肝炎、口タウイルス、麻疹、ムンプス、風疹、および水痘からなる群から選択される、請求項7に記載の製剤。30

【請求項 9】

前記細菌がジフテリア(Diphtheria)、百日咳(Pertussis)、破傷風菌、肺炎球菌、および髄膜炎菌からなる群から選択される、請求項7に記載の製剤。

【請求項 10】

前記抗原が、腫瘍に対するT細胞応答を選択的に引き出す腫瘍抗原である、請求項6に記載の製剤。

【請求項 11】

前記ポリマーが加水分解による生分解性であり、好ましくはポリエステルであり、最も好ましくはポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、およびそれらのコポリマーからなる群から選択される、請求項1または2に記載の製剤。40

【請求項 12】

10~90日の間隔で、好ましくは30~60日の間隔で放出を提供する、請求項1または2に記載の製剤。

【請求項 13】

マイクロ粒子、マイクロカプセル、またはミクロスフェアの形態である、請求項1または2に記載の製剤。

【請求項 14】

前記製剤が注射用である、請求項1または2に記載の製剤。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記製剤が移植可能である、請求項 1 または 2 に記載の製剤。

【請求項 1 6】

前記製剤は、鼻、肺、口腔、膣および直腸からなる群から選択される粘膜表面に適用することができる、請求項 1 または 2 に記載の製剤。

【請求項 1 7】

治療用、予防用、栄養補助用または診断用薬剤を、それを必要とする個体に送達する方法であって、前記個体に請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の製剤を投与することを含む、方法。

【請求項 1 8】

前記製剤が、抗原を、必要に応じて前記抗原のための安定剤と組み合わせて含む生体適合性ポリマーの 3 次元印刷またはマイクロモールディングによって形成されたポリマー製剤であって、前記抗原が、インビボで免疫応答を引き出すのに有効な量で規定の期間に放出される、請求項 1 7 に記載の方法。 10

【請求項 1 9】

前記抗原が 2 か月またはそれを超える月間隔で放出され、前記抗原がポリオまたは D P T である、請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は概して、ワクチンの複数回の放出を提供する注射用ワクチン製剤の分野内にある。 20

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

ワクチンは典型的には抗原の初期用量、続いて初期投与後の、典型的には 1 0 ~ 6 0 日後の規定の回数の 1 またはそれを超えるブースター用量を含む。世界の大部分で、ブースター用量の投与の必要性は、ワクチンの実用性を明らかに制限し、ならびに農業適用における経費および困難を増加させる。 30

【0 0 0 3】

ポリマーミクロスフェアは、効果的なワクチン送達ベヒクルである可能性を有する。それらは抗原提示細胞 (A P C) のターゲティングを強化する能力を有し、そして抗原の制御された、持続放出の可能性を有し、それによって複数回のワクチン接種の必要性を排除する可能性がある。さらにポリマーマトリックスは、不適な外部環境からのシールドとして作用でき、そして有害反応を低減させ、そして免疫低下した個体において、ワクチン株によって引き起こされる問題を抑制する可能性を有する。 P L G A ミクロスフェアは、バースト放出を伴う、および伴わない単回免疫化用に開発された。 P L G A が提供する生分解性の性質および持続放出特性を考慮すると、 P L G A から製剤化されたミクロスフェアは、ワクチンの送達に有用であり得る。 K i r b y ら、 C h a p t e r 1 3 : F o r m a t i o n a n d C h a r a c t e r i s a t i o n o f p o l y l a c t i d e - c o - g a l a c t i d e P L G A m i c r o s p h e r e s (2 0 1 3) にまとめられている。 P L G A 系のマイクロ粒子は、ダブルエマルジョン溶剤蒸発、ナノ沈殿、クロスフロー濾過、塩析技術、エマルジョン拡散法、ジェットミリングおよび噴霧乾燥によって従来的に生成される。 K i r b y ら、 C h a p t e r 1 3 : F o r m a t i o n a n d C h a r a c t e r i s a t i o n o f p o l yl a c t i d e - c o - g a l a c t i d e P L G A m i c r o s p h e r e s (2 0 1 3) にまとめられている。 P L G A ミクロスフェアを製剤化して、アジュvantとして作用できる、薬物およびタンパク質を含む様々な部分 (m o i e t y) を組み込むこともできる。これらの方 40 法によって生成された P G L A 粒子を凍結乾燥し、そして後の使用および送達のために保存できることが企図されてきた。 50

【0004】

Hanesら、*Adv. Drug. Del. Rev.*、28:97-119(1997)は、ポリマーミクロスフェアを作製して、サブユニットタンパク質およびペプチド抗原を、それらの天然形態で連続様式またはパルス様式で数週間から数か月間、信頼でき、そして再現性のある動態で送達して、ブースター免疫化の必要性を取り除く試みに関して報告している。ミクロスフェアは、カプセル封入された抗原に及ぼすそれらの保護効果および腸管のパイエル板によって取り込まれるそれらの能力ゆえに、経口ワクチン送達のキャリアとしての可能性を有している。ポリマー・マトリックス内に捕捉されるか、またはこれに代えて、ポリマー自体の骨格に組み込まれ、そしてポリマーが分解する場合に抗原と一緒に放出される、サイトカインを含むワクチンアジュvantの共送達によって、抗原のためのこれらの最適なデポー製剤の効力が強化され得る。

10

【0005】

Cleelandら、*J. Controlled Rel.* 47(2):135-150(1997)によって報告されるように、後天性免疫不全症候群(AIDS)のためのサブユニットワクチン(例えば、gp120)の投与は、反復免疫化を擬似するシングルショットワクチンによって促進できる。gp120のパルス放出を提供するポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)ミクロスフェアを作製した。ポリマー溶剤として塩化メチレンまたは酢酸エチルのいずれかを用いて、水中油中水型マイクロカプセル化法を使用してミクロスフェアを作製した。タンパク質は、2つの別個の段階において、生理学的条件下で放出された:初日に初期バーストが放出され、そして数週間または数か月後にタンパク質の第2バーストが放出された。タンパク質の第2バーストはPLGAの固有粘度およびラクチド/グリコリド比(バルク浸食)に依存した。

20

【0006】

これらの研究により、注射用マイクロ粒子を使用してワクチン応答を達成することが可能であることが実証される。しかしながら、そのような生成物はヒトまたは動物使用のためにまだ承認されていない。抗原の効果的な搭載、カプセル封入および放出の均一性、ならびに抗原性に影響を及ぼさない、溶剤の極度な低レベルを達成することは困難である。

【0007】

熱に安定な製剤の開発によってワクチン流通のための「コールドチェーン」の必要性を無くすことで、年間約2億ドルを節約し得ると推測されている。これらの戦略の実行に伴う困難の原因是、適切な凍結保護(cryoprotectant)方法の欠如にある。Kirbyら、*Chapter 13: Formation and Characterisation of poly lactide-co-galactide PLGA microspheres*(2013)にまとめられている。ナノワクチンに関する類似の情報および開示を、Gregoryら、*Frontiers in Cell and Infect. Microbiol.* 3: Article 13(2013)に見出すことができる。Nandedkar、*J. Biosci.* 34:995-1003(2009)。ミクロスフェアに含まれるタンパク質の安定化には問題が多い。多くの種類の安定化賦形剤が研究されている。KimおよびPack、*BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. 1:19-50(2006)にまとめられている。加えて、ミクロスフェア製作に使用されるポリマーの種類、その分解速度、分解生成物の酸性度、疎水性等もまた、組み込まれたタンパク質の安定性に影響し得る。

30

【0008】

したがって、2回またはそれを超える回数でカプセル封入された抗原の放出を提供する注射用ポリマー製剤を提供することは本発明の目的である。

【0009】

カプセル封入された抗原に損傷を与えず、そして安定化できる注射用ポリマー製剤を提供することは本発明のさらなる目的である。

2回またはそれを超える回数でカプセル封入された抗原の放出を提供する注射用ポリマー製剤のマイクロモールディングおよび3次元印刷のための方法および材料、ならびに得

40

50

られた製剤を提供することが本発明のなおさらなる目的である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Kirbyら、Chapter 13 : Formation and Characterisation of poly lactic acid - co - galactide PLGA microspheres (2013)

【非特許文献2】Hanesら、Adv. Drug. Del. Rev., 28 : 97 - 119 (1997)

【非特許文献3】Clelandら、J. Controlled Rel. 47 (2) : 135 - 150 (1997) 10

【非特許文献4】Gregoryら、Frontiers in Cell and Infect. Microbiol. 3 : Article 13 (2013)

【非特許文献5】Nandedkar、J. Biosci. 34 : 995 - 1003 (2009)

【非特許文献6】KimおよびPack、BiOMEMS and Biomedical Nanotechnology. 1 : 19 - 50 (2006)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

好ましくは2つまたはそれを超える期間で放出する、抗原の単回注射のためのエマルジョン系およびマイクロモールド成形された（「MM」）、または3次元印刷（「3DP」）されたポリマー製剤を開発した。製剤を好ましくは生体適合性、生分解性ポリマーで形成する。単独で、または他の抗原、アジュvant、安定剤、および放出調整剤との組み合わせで抗原をカプセル封入する別個の領域が製剤内に存在する。抗原は好ましくは投与時に賦形剤中に存在するか、または即時放出のために製剤の表面に存在し、そして抗原の初回放出から10～45日後に放出するために、必要に応じて1つまたはそれを超えるさらなる期間に10～90日間隔で抗原を放出するために製剤内に組み込まれている。トレハロースガラスのような安定化剤の使用により抗原を安定化し得る。ポリオに対する免疫化のための好ましい実施形態では、投与のときに、そしてその2、4および6か月後に抗原を放出する。好ましい実施形態では、放出のバースト間の漏れは最小であり、そして放出は狭い時間枠で生じる。 30

【0012】

研究により、オーバーラップがなく、カプセル封入された抗原に対する分解または損傷が最小である、抗原の別個の放出を提供するポリマーおよび溶剤系の選択が実証される。好ましい溶剤としては、塩化メチレンおよびクロロホルムが挙げられ、そして好ましいポリマーはポリ乳酸（「PLA」）、ポリグリコール酸（「PGA」）、およびそれらのコポリマー（「PLGA」）である。

【0013】

針またはカニューレを介する皮下または筋肉内注射用に、鼻腔内のような粘膜領域への局所注射用に、または表皮への乱切によるために、製剤を設計する。好ましい適用は、細菌、ウイルス、原虫および寄生生物のような感染病原体に対して効果的な免疫応答を引き出す抗原の投与のためのものである。しかしながら、製剤は、他の治療用、予防用または診断用薬剤を単独でまたは抗原と組み合わせて投与するために使用してもよい。 40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、PLA上で26倍の三価IPVを、室内の温度および湿度で16時間乾燥させた後に保持されたD抗原のパーセンテージに及ぼす、賦形剤：ワクチン比低下の影響を示す棒グラフである。賦形剤：10%ソルビトール、8.5%MSG、8.5%MgCl₂。

20

30

40

50

【図2】図2は、37℃で湿気のある環境で賦形剤を伴う、凍結乾燥したIPV(Ⅰ型、Ⅱ型、およびⅢ型)の長期間安定性を示す線グラフである。安定性を経時的な(日)回収パーセント(回収%)として表現する。線グラフでは、Ⅰ型IPVに関する線を(1)と指定し、Ⅱ型IPVに関する線を(2)と指定し、そしてⅢ型IPVに関する線を(3)と指定する。

【図3】図3Aおよび3Bは、PLL(50kD)からの、モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図3A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図3B、%BSA)の、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【図4】図4Aおよび4Bは、PLL(100kD)からの、モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図4A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図4B、%BSA)の、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【図5】図5Aおよび5Bは、PLL(300kD)からの、モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図5A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図5B、%BSA)の、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【図6】図6Aおよび6Bは、P(d,1)LA(20kD)からの、モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図6A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図6B、%BSA)の、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【図7】図7Aおよび7Bは、PLGA製剤(図7A)およびボーラス注射(図7B)に関する、経時的な(週)タンパク質放出のグラフである。

【図8】図8Aおよび8Bは、カルボキシル基で誘導体化されたPLGA(50:50)(20kD)からの、0.5%の別のモデルタンパク質卵白アルブミン(「OVA」)の放出と比較した、0.5%のモデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図8A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図8B、%BSA)の、経時的な(週)放出のグラフである。

【図9】図9Aおよび9Bは、カルボキシル基で誘導体化されたPLGA(50:50)(31kD)からの、5%の別のモデルタンパク質卵白アルブミン(「OVA」)の放出と比較した、5%のモデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図9A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図9B、%BSA)の、経時的な(週)放出のグラフである。

【図10】図10Aおよび10Bは、カルボキシル基で誘導体化されたPLGA(50:50)(31kD)からの、0.5%の別のモデルタンパク質卵白アルブミン(「OVA」)の放出と比較した、0.5%のモデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)(図10A、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ のミクロスフェア；図10B、%BSA)の、経時的な(週)放出のグラフである。

【図11】図11Aおよび11Bは、エマルジョンによって(図11A)、および3D印刷またはマイクロモールディング(図11B)によって作製された粒子の概略図であり、ならびにボーラス注射からのタンパク質の放出をモデル化している、エマルジョン粒子(図11C)および3DP粒子(図11D)からのタンパク質の放出である。図11Eは、ボーラス注射をシミュレーションする、1か月経過時のポリマー分解に基づくバーストの概略図である。

【図12】図12A～12Dは、3D印刷プロセスの概略図である：PLGA粒子の構造を作り出し(図12A)、薬物またはタンパク質を粒子に充填し(図12B)、薬物またはタンパク質を乾燥させ(図12C)、そして粒子をカプセル封入する(図12D)。

【図13】図13は、印刷中に圧電式のノズルジェットから「インク」(ポリマー溶液)の均一な単独の液滴を生成するために最適化されるべき波形パラメータの概略図である。

【図14AB】図14A～14Cは、糖賦形剤である1Mトレハロース、1Mスクロース

10

20

30

40

50

、および3Mスクロースと共に凍結乾燥し、次いで4、25または37でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

【図14C】図14A～14Cは、糖賦形剤である1Mトレハロース、1Mスクロース、および3Mスクロースと共に凍結乾燥し、次いで4、25または37でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

【図15A】図15Aおよび15Bは、0、0.5、0.75、1または1.25Mトレハロース、1と共に凍結乾燥し、次いで4(図15A)または25(図15B)でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。
10

【図15B】図15Aおよび15Bは、0、0.5、0.75、1または1.25Mトレハロース、1と共に凍結乾燥し、次いで4(図15A)または25(図15B)でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

【図16A】図16Aおよび16Bは、溶剤としてテトラフルオロエチレン('TFE')、ジクロロメタン('DCM')、またはTFEおよびDCMを用いて、糖賦形剤無しで(図16A)または賦形剤として0.75Mトレハロースを用いて(図16B)、溶剤が蒸発するまで溶剤と混合した後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。
20

【図16B】図16Aおよび16Bは、溶剤としてテトラフルオロエチレン('T_{FE}')、ジクロロメタン('DCM')、またはTFEおよびDCMを用いて、糖賦形剤無しで(図16A)または賦形剤として0.75Mトレハロースを用いて(図16B)、溶剤が蒸発するまで溶剤と混合した後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

【図17A】図17Aは、0Mの糖、0.5Mトレハロース、または0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIVPを3D-印刷されたPLA基材に印刷し、そして25、相対湿度22%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。図17Bは、0.25Mトレハロースまたは0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIVPを3D-印刷されたPLA基材に印刷し、そして25、相対湿度10.7%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。
30

【図17B】図17Aは、0Mの糖、0.5Mトレハロース、または0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIVPを3D-印刷されたPLA基材に印刷し、そして25、相対湿度22%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。図17Bは、0.25Mトレハロースまたは0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIVPを3D-印刷されたPLA基材に印刷し、そして25、相対湿度10.7%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

【図18A】図18Aおよび18Bは、0.5または0.75Mトレハロースと共に凍結乾燥し、次いで25でインキュベートした後(図18A)、またはピペッティングされた0.5Mトレハロース・スクロースもしくは噴射された0.5Mトレハロース・スクロースと共に凍結乾燥し、次いで25、相対湿度10.7%で乾燥させた後(図18B)に保持されたD抗原のパーセントのグラフである。
40

【図18B】図18Aおよび18Bは、0.5または0.75Mトレハロースと共に凍結乾燥し、次いで25でインキュベートした後(図18A)、またはピペッティングされた0.5Mトレハロース・スクロースもしくは噴射された0.5Mトレハロース・スクロースと共に凍結乾燥し、次いで25、相対湿度10.7%で乾燥させた後(図18B)に保持されたD抗原のパーセントのグラフである。

【図19AB】図19A～19Cは、注射後1週目(図19A)、2週目(図19B)、

10

20

30

40

50

および4週目(図19C)に表3に提示された群に関してプロットされた抗-B S A Ig G(抗体)力値を示す(1og2値で)グラフである。陰性対照は全てゼロであり、そしてミクロスフェア製剤は、ボーラス対照と比較して、同等またはより強い応答を生じている。(F4およびF8は空のミクロスフェアであり、薬物は含まれない;表4参照)。

【図19C】図19A~19Cは、注射後1週目(図19A)、2週目(図19B)、および4週目(図19C)に表3に提示された群に関してプロットされた抗-B S A Ig G(抗体)力値を示す(1og2値で)グラフである。陰性対照は全てゼロであり、そしてミクロスフェア製剤は、ボーラス対照と比較して、同等またはより強い応答を生じている。(F4およびF8は空のミクロスフェアであり、薬物は含まれない;表4参照)。

【図20】図20A~20Cは、製剤C(図20A)、製剤G(図20B)、および製剤E(図20C)を用いて調製されたミクロスフェアのサイズ分布を示すヒストグラムである。図20D~20Fは、製剤C(図20D)、製剤G(図20E)、および製剤E(図20F)の容積分布を示すヒストグラムである。

【図21】図21A~21Dは、0.5、3、または5重量% B S Aを含有する7~17kDaの50:50PLGA(図21A)、24~38kDaの50:50PLGA(図21B)、38~54kDaの50:50PLGA(図21C)、および4~15kDaの75:25PLGA(図21D)を用いて製剤化されたミクロスフェアからの毎週のBSA放出を示す(パーセンテージ(%)で)線グラフである。エラーバーは標準偏差を表す。

【図22】図22Aおよび22Bは、マイクロ粒子から放出されたBSAに対するマウス血清におけるIgG抗体力値を示す線グラフであり、そして1og2スケールでの経時的な幾何平均としてプロットされている。図22Aは、一連の3用量に一致するボーラスBSA注射と比較した、低用量製剤CおよびGを示す。図22Bは、その用量に一致するボーラス対照と比較した、高用量製剤Eを示す。ボーラスBSAを対照群で0、4、および8週目に注射した。塗りつぶした記号は、A(3群)に関してANOVA分析、およびB(2群)に関してスチューデントt検定を使用して決定されたその時点での、同形の塗りつぶしていない記号の群と用量が一致する対照との間の有意差を示す。1、2、および3つの塗りつぶした記号は、それぞれp<0.05、p<0.01、およびp<0.001を示し、そしてエラーバーは標準偏差を表す。

【図23】図23Aおよび23Bは、低用量(図23A)および高用量(図23B)のBSAでの免疫化によって誘起されるピーク力値を示すドットプロットである。全てのマイクロ粒子製剤に関するピーク力値は4週目に生じたが、両方のボーラス注射群は10週目でピークになった。NSは、多重比較に関して、ホルム-ボンフェローニ補正を用いるスチューデントt検定を使用したときの、有意水準0.05での有意差無しを表す。製剤C、G、およびEに関する調整したp値はそれぞれ0.0645、0.0543、および0.0784である。

【図24】図24A~24Cは、シェルのマイクロ作製の工程を示すマイクロモールディングプロセス(図24A)、薬物によるシェルの充填(図24B)、およびキャップによるシェルの密封(図24C)の概略図である。

【図25】図25は、ボルテックスまたは超音波処理による有機性/水性混合の間の、賦形剤としてゼラチン、マルトデキストリン、プルラン、ミリスチン酸、およびTween80を伴う、または伴わないIPVの安定性(回収%)を示す棒グラフである。

【図26】図26は、ボルテックスまたは超音波処理によるPLGAとの有機性/水性混合の間の、賦形剤としてゼラチン、マルトデキストリン、プルラン、ミリスチン酸、およびTween80を伴う、または伴わないIPVの安定性(回収%)を示す棒グラフである(son=超音波処理)。

【図27】図27は、一晩の凍結乾燥による乾燥の後の、または30~35度1時間のGenevacの使用の後の、賦形剤としてプルラン、プルラン/BSA、ソルビトール/MSG/MgCl₂を伴うIPVの安定性(回収%)を示す棒グラフである。

【図28】図28は、緩衝剤としてAl(OH)₃(線(2))、ミリスチン酸(線(3)

10

20

30

40

50

)) 、および Mg(OH)₂ (線 (4)) の存在下での P L G A 粒子による経時的な (日) 放出溶媒の pH における変化を示す線グラフである。緩衝剤の不在下での経時的な放出溶媒の pH における変化を表す線を (1) と標識する。

【図 2 9】図 2 9 は、 P L G A 粒子による経時的な (日) 放出溶媒の pH における変化を示す線グラフである。バッファーを 2 ~ 3 日毎に交換した後に試験した P L G A 5 0 2 H に関する線を (1) と指定し、バッファーを 7 日毎に交換した後に試験した P L G A 5 0 2 H に関する線を (2) と指定し、バッファーを 2 ~ 3 日毎に交換した後に試験した P L G A 5 0 3 H に関する線を (3) と指定し、そしてバッファーを 7 日毎に交換した後に試験した P L G A 5 0 3 H に関する線を (4) と指定する。

【発明を実施するための形態】

10

【0 0 1 5】

発明の詳細な説明

I . 定義

本明細書にて使用される場合の「積層造形」または「3 D 印刷」とは、デジタルモデルから実際に任意の形状の 3 次元の固体物体を作製するプロセスを指す。積層プロセスを使用して 3 D 印刷が達成され、ここで材料の連続層は異なる形状または厚みで置かれる。いくつかの実施形態では、「3 D 印刷」には、ノズルを通して噴射または押し出しされ、そして所望の形状に固化された押し出し、または溶媒系のポリマー含有インク（例えば、P L G A 、 P L L A 等）が含まれる。形状は、x 、 y および z 方向に制御され得る。

【0 0 1 6】

20

本明細書にて使用される場合、「マイクロモールディング」とは、概してマイクロスケールで部品またはデバイスを製造するのに適しているプロセス、またはマイクロスケールにおいて特色または耐容性を有する部品またはデバイスを製造するのに適しているプロセスを指す。例示的な技術には、限定するものではないが、リソグラフィが含まれる。

【0 0 1 7】

本明細書にて使用される場合、「マイクロデバイス」とは、1 ミクロン ~ 1 0 0 0 ミクロン、1 ミクロン ~ 5 0 0 ミクロン、1 ミクロン ~ 2 5 0 ミクロン、または 1 ミクロン ~ 1 0 0 ミクロンのような、マイクロスケールの寸法を有する任意の物体またはデバイスを指す。

【0 0 1 8】

30

「直径」なる用語は、当該技術分野において認識されており、そして物理学的な直径または流体力学的な直径のいずれかを指すために本明細書にて使用される。エマルジョンの直径は、典型的には流体力学的な直径を指す。カプセルの直径は、球形または非球形の形状の両方で、水和状態での物理学的直径を指してよい。カプセルの内側に封入された粒子、コロイドおよびセルの直径は、水和状態での物理学的直径を指す。本明細書にて使用される場合、非球形粒子または非球形カプセルの直径は、粒子の表面の 2 点間の最大直線距離を指し得る。複数の粒子またはカプセルに言及する場合、粒子またはカプセルの直径は、典型的には粒子またはカプセルの平均直径を指す。粒子またはコロイドの直径は、種々の技術を使用して測定することができ、その技術には限定するものではないが、光学または電子顕微鏡、および動的光散乱が含まれる。

【0 0 1 9】

40

本明細書にて使用される場合の「生体適合性」なる用語は、それ自体宿主（例えば、動物またはヒト）に対して毒性でなく、また宿主において毒性濃度でモノマーもしくはオリゴマーサブユニットもしくは他の副産物を生成する速度で分解もしない（材料が分解する場合）1 つまたはそれを超える材料を指す。

【0 0 2 0】

本明細書にて使用される場合の「生分解性」なる用語は、材料がその成分サブユニットに分解もしくは解体すること、または例えば生化学的プロセスによる材料のより小さな（例えば、非ポリマー性の）サブユニットへの消化を意味する。

【0 0 2 1】

50

「ミクロスフェア」、「マイクロ粒子」、または「マイクロカプセル」は、当該技術分野において認識されており、そして例えば、本組成物のような生体適合性ポリマーから形成される、実質的に球形の固体または半固体構造を含み、1ミクロン～500ミクロン、1ミクロン～250ミクロン、または1ミクロン～100ミクロンのような、約1またはそれを超えて約1000ミクロンまでの範囲にわたるサイズを有する。「マイクロ粒子」なる用語もまた当該技術分野において認識されており、そしてミクロスフェアおよびマイクロカプセル、ならびに上記2つのカテゴリーのいずれかに容易に分類され得ない構造を含み、その寸法は全て平均で約1000ミクロン未満である。マイクロ粒子は球形または非球形であってよく、そして任意の規則的な、または不規則的な形状を有してもよい。構造が直径で約1ミクロン未満である場合、対応する、当該技術分野において認識されている用語である「ナノスフェア」、「ナノカプセル」および「ナノ粒子」を用いてもよい。

10

【0022】

本明細書にて使用される場合、「狭い範囲の放出」とは概して、1時間、数時間、1日、1週間、1か月等のような具体的な期間にわたって薬剤が放出されることを意味する。

【0023】

本明細書にて使用される場合、「抗原」または「ワクチン」とは、哺乳動物のような宿主生物において、特異的免疫応答を生成する任意の分子または実体を指す。

【0024】

本明細書にて使用される場合、「免疫応答」とは、哺乳動物のような宿主において何らかの将来的な暴露に対して免疫を生成する抗原またはワクチンに対する特異的応答を指す。

20

【0025】

「水溶性」とは概して、水性環境において溶解するかまたは分離する何らかのものを指す。

【0026】

本明細書にて使用される場合の「エマルジョン」とは、液体の連続相において均質に分散された液体の別個の相を指す。

【0027】

本明細書にて使用される場合、「親水性」とは、有機溶剤と比較して、水に対してより大きな親和性を有し、したがって水に溶解性である分子を指す。水（または緩衝化水溶液）と、オクタノール、酢酸エチル、塩化メチレン、またはメチルtert-ブチルエーテルのような水非混和性有機溶剤との間の分配係数を測定することにより、化合物の親水性を定量化することができる。平衡化の後に、有機溶剤中よりも水中により高い濃度の化合物が存在する場合、その化合物は親水性であると考えられる。

30

【0028】

本明細書にて使用される場合、「疎水性」とは、水と比較して、有機溶剤に対してより大きな親和性を有し、したがって有機溶剤に溶解性である分子を指す。水（または緩衝化水性溶液）と、オクタノール、酢酸エチル、塩化メチレン、またはメチルtert-ブチルエーテルのような水非混和性有機溶剤との間のその分配係数を測定することにより、化合物の疎水性を定量化することができる。平衡化の後に、水中よりも有機溶剤中により高い濃度の化合物が存在する場合、その化合物は疎水性であると考えられる。

40

【0029】

I I . 製剤

A . ポリマーおよび溶剤系

ポリマー

ミクロスフェアまたはマイクロカプセルを含み、そしてエマルジョン系であるものを含む、マイクロ粒子から形成され得る製剤、またはマイクロモールディングによって調製されるもののようなデバイスは、ポリマーから形成される。抗原は分散されていてもよいし、ポリマーによってカプセル封入されていてもよい。1つの実施形態では、デバイスは、1つまたはそれを超えるワクチンまたは抗原および安定剤を含有するだけのコア、ならび

50

に1つまたはそれを超える生分解性ポリマーのみを含有するシェルまたは粒子壁を、添加剤を伴って、または伴わずに、含有する。抗原を伴わないポリマーを使用して密封するか、または製剤の領域を他の領域から分離し、そして異なる速度で放出し得る。

【0030】

ポリマーは、抗原を保存する条件下で、および抗原を保存する試薬を使用して、生体適合性かつ処理可能でなければならない。製剤は、親水性ポリマー、疎水性ポリマー、両親媒性ポリマー、またはそれらの混合物から作製できる。製剤は1つまたはそれを超える親水性ポリマーを含有できる。

【0031】

親水性ポリマーとしては、デンプンおよび多糖のようなセルロース系ポリマー；親水性ポリペプチド；ポリ-L-グルタミン酸(PGS)、-ポリグルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-セリン、またはポリ-L-リジンのようなポリ(アミノ酸)；ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、およびポリ(エチレンオキシド)(PEO)のようなポリアルキレンゲリコールおよびポリアルキレンオキシド；ポリ(オキシエチル化ポリオール)；ポリ(オレフィン系アルコール)；ポリビニルピロリドン；ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)；ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)；ポリ(サッカライド)；ポリ(ヒドロキシ酸)；ポリ(ビニルアルコール)、ならびにそれらのコポリマーが挙げられる。

【0032】

疎水性ポリマーの例としては、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、およびポリ(乳酸-コ-グルコール酸)のようなポリヒドロキシ酸；ポリ3-ヒドロキシブチレートまたはポリ4-ヒドロキシブチレートのようなポリヒドロキシアルカノエート；ポリカプロラクトン；ポリ(オルトエステル)；ポリ無水物；ポリ(ホスファゼン)；ポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)；チロシンポリカーボネートのようなポリカーボネート；ポリアミド(合成および天然ポリアミドを含む)、ポリペプチド、およびポリ(アミノ酸)；ポリエステルアミド；ポリエステル；ポリ(ジオキサン)；ポリ(アルキレンアルキレート)；疎水性ポリエーテル；ポリウレタン；ポリエーテルエステル；ポリアセタール；ポリシアノアクリレート；ポリアクリレート；ポリメチルメタクリレート；ポリシロキサン；ポリ(オキシエチレン)／ポリ(オキシプロピレン)コポリマー；ポリケタール；ポリホスフェート；ポリヒドロキシバレート；ポリアルキレンオキサレート；ポリアルキレンスクシネート；ポリ(マレイン酸)、ならびにそれらのコポリマーが挙げられる。ある特定の実施形態では、疎水性ポリマーは脂肪族ポリエステルである。好ましい実施形態では、疎水性ポリマーはポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、またはポリ(乳酸-コ-グルコール酸)である。

【0033】

製剤は1つまたはそれを超える生分解性ポリマーを含有できる。

【0034】

生分解性ポリマーは、水に不溶性または難溶性であり、体内で水溶性材料に化学的に、または酵素的に変換されるポリマーを含み得る。生分解性ポリマーは、架橋されたポリマーを水に不溶性または難溶性にさせる加水分解性架橋基によって架橋された可溶性ポリマーを含み得る。

【0035】

生分解性ポリマーとしては、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレンゲリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリル酸およびメタクリル酸エステルのポリマー、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、

10

20

30

40

50

セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシルエチルセルロース、セルローストリニアセテート、セルロース硫酸ナトリウム塩、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)、ポリエチレン、ポリプロピレンポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルアセテート)、ポリ塩化ビニルポリスチレンおよびポリビニルピロリドン、それらの誘導体、直鎖および分岐鎖コポリマーおよびそれらのブロックコポリマー、ならびにそれらのブレンドが挙げられる。例示的な生分解性ポリマーとしては、ポリエステル、ポリ(オルトエステル)、ポリ(エチレンイミン)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(ヒドロキシブチレート)、ポリ(ヒドロキシバレート)、ポリ無水物、ポリ(アクリル酸)、ポリグリコリド、ポリ(ウレタン)、ポリカーボネート、ポリリン酸エステル、ポリホスファゼン、それらの誘導体、直鎖および分岐鎖コポリマーおよびそれらのブロックコポリマー、ならびにそれらのブレンドが挙げられる。10

【0036】

両親媒性ポリマーは疎水性ポリマーブロックおよび親水性ポリマーブロックを含有するポリマーであり得る。疎水性ポリマーブロックは、1つもしくはそれを超える前記疎水性ポリマーまたはそれらの誘導体もしくはコポリマーを含有できる。親水性ポリマーブロックは1つもしくはそれを超える上記親水性ポリマーまたはそれらの誘導体もしくはコポリマーを含有できる。20

【0037】

特に好ましい実施形態では、マイクロ粒子は、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、およびポリ(乳酸-コ-グリコール酸)のような生分解性ポリエステルまたはポリ無水物を含有する。マイクロ粒子は1つまたはそれを超える以下のポリエステルを含有できる：グリコール酸単位を含むホモポリマー(本明細書では「PGA」と称する)、ならびにポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D,L-乳酸、ポリ-L-L-ラクチド、ポリ-D-L-ラクチド、およびポリ-D,L-ラクチドのような乳酸単位(本明細書では総称的に「PLA」と称する)、ならびにポリ(-カプロラクトン)のようなカプロラクトン単位(本明細書では総称的に「PCL」と称する)；ならびに乳酸：グリコール酸の比によって特徴付けられる種々の形態のポリ(乳酸-コ-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-コ-グリコリド)のような、乳酸およびグリコール酸単位を含むコポリマー(本明細書では総称的に「PLGA」と称する)；ならびにポリアクリレート、ならびにそれらの誘導体。例示的なポリマーとしてはまた、種々の形態のPLGA-P EGまたはPLA-P EGコポリマーのような、ポリエチレングリコール(PEG)と前記されたポリエステルとのコポリマーが挙げられる(本明細書では総称的に「PEG化ポリマー」と称する)。ある特定の実施形態では、PEG領域は切断可能なリンカーによってポリマーに共有結合して、「PEG化ポリマー」を生じることができる。30

【0038】

製剤は1つのポリマー、または2つもしくはそれを超えるポリマーの混合物を含有できる。マイクロ粒子は安定剤、界面活性剤、または脂質のような他の実体を含有してもよい。40

【0039】

溶剤

ポリマー製剤には常にいくらか残留物が存在するので、溶剤は生体適合性でなければならない。代表的なポリマー溶剤としては、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラフルオロエチレン、および酢酸アシルのような有機溶剤が挙げられる。抗原を、アセトン、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、およびそれらの混合物のような水性また50

は水混和性溶剤に溶解できる。

【0040】

B. 治療用、予防用、栄養補助用、および診断用薬剤

ワクチンの送達に関する記載したが、製剤を使用して種々の治療用、予防用、栄養補助用、および／または診断用薬剤の放出を提供し得ることが理解される。これらの薬剤は低分子量薬物、ホルモンまたは成長因子のようなタンパク質、免疫調整物質、抗体、核酸分子(DNA、RNA、マイクロRNA、siRNA)であってよい。

【0041】

抗原

感染病原体

10

送達のための抗原は、破傷風菌のような細菌、肝炎、インフルエンザ、およびポリオのようなウイルス、ならびにPlasmodium(マラリア)およびLeishmaniaのような原虫のような死滅させられたか、または弱毒化させた感染病原体である。表2にいくつかのワクチンを列挙し、その抗原は開示された製剤において使用することができる。他の抗原は、これらの感染病原体についての抗原として、癌抗原として、または免疫刺激剤として効果的な抗原性タンパク質、または炭水化物のようなハプテン、または糖抗原である。

【0042】

灰白髄炎(ポリオ)は高度に伝染性のウイルス疾患であり、神経系に侵入し、そしてほんの数時間で全身麻痺を引き起こし得る。200に1つの感染が非可逆性の麻痺に至り、この麻痺は通常下肢に限定される。麻痺した人のうち、5%～10%が横隔膜の麻痺のために死亡する。ポリオのための治療はない。しかしながら、これは、ワクチン接種によって予防することができる。

20

【0043】

ポリオの症例は1988年以来、99%を上回って減少しており、125を超える流行国において推定350,000の症例が、2012年には、報告された症例はわずか223になった。現在2013年の始めには、世界中でわずか3か国(アフガニスタン、ナイジェリア、およびパキスタン)のみがこの疾患の流行国である。積極的なワクチン接種の努力にも関わらず、ポリオは完全には根絶されておらず、そして特に発展途上国において、依然として大流行が生じる。

30

【0044】

ポリオに対して保護する2つの型のワクチン：不活化ポリオワクチン(IPV)および経口ポリオワクチン(OPV)がある。IPVは、効果的であるためには、血流に投与する必要がある。対照的に、OPVは腸上皮を通過することにより効果的である。OPVは優れた腸免疫を付与し、投与が容易であり、そして経費が安いが、生きたポリオウイルスがワクチン接種を受けたものによって排出される。これは集団全体がワクチン接種されていない場合の懸念である。

【0045】

そのように、IPVの使用は好ましい。

40

【0046】

癌抗原

変異ゆえに異常構造を有する、腫瘍細胞において生成された任意のタンパク質は、腫瘍抗原として作用できる。そのような異常タンパク質は、関連する遺伝子の変異によって生成される。異常タンパク質の生成をもたらす癌原遺伝子および腫瘍抑制因子の変異は、腫瘍の原因であり、ゆえにそのような異常タンパク質は腫瘍特異的抗原と称される。腫瘍特異的抗原の例としては、rasおよびp53遺伝子の異常生成物が挙げられる。対照的に腫瘍形成に関係しない他の遺伝子の変異は、腫瘍関連抗原と称される異常タンパク質の合成をもたらし得る。

【0047】

正常には非常に低量で生成されるが、その生成が腫瘍細胞において劇的に増加するタン

50

パク質は免疫応答の引き金となる。そのようなタンパク質の例は、酵素チロシナーゼであり、これはメラニン生成に必要である。正常には、チロシナーゼは微量で生成されるが、そのレベルはメラノーマ細胞において極めて向上している。

【0048】

腫瘍胎児性抗原は別の重要なクラスの腫瘍抗原である。例は、フェトプロテイン（ AFP）および癌胎児性抗原（CEA）である。これらのタンパク質は、正常には、胚発生の初期段階で生成され、そして免疫系が十分に発達するときまでに消失する。ゆえにこれらの抗原に対する自己寛容は発達しない。

【0049】

異常タンパク質はまた腫瘍ウイルス、例えば、エプスタイン・バーウイルス（「EBV」）およびヒトパピローマウイルス（「HPV」）に感染した細胞によっても生成される。これらのウイルスに感染した細胞は、転写される潜在型ウイルス性DNAを含有し、そして得られたタンパク質は免疫応答を生じる。タンパク質に加えて、細胞表面糖脂質および糖タンパク質のような他の物質もまた、腫瘍細胞において異常構造を有する場合があり、したがって免疫系の標的となり得る。

【0050】

多くの腫瘍抗原は腫瘍ワクチンとして効果的である可能性を有する。フェトプロテイン（胚細胞性腫瘍、肝細胞癌腫）および癌胎児性抗原（腸がん、肺がん、乳がん）に加えて、腫瘍抗原の例としては、CA-125（卵巣がん）、MUC-1（乳がん、上皮性腫瘍抗原（乳がん）、およびメラノーマ関連抗原（悪性メラノーマ）が挙げられる。

【0051】

C. 安定化剤

抗原安定性は、ワクチン製剤の形成の間の、および体温での抗原構造の維持として定義される。以下で論じられるように、ポリマー組成物、溶剤の選択、および加工条件は抗原安定性を維持するのに非常に重要である。

【0052】

安定化剤を加えてもよい。糖は、タンパク質のための安定化剤の典型的なグループである。例としては、スクロース、フルクトース、マンニトール、グルコース、およびトレハロースのような单糖、ならびにより複雑な糖が挙げられる。Alcockら、Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. Science Translational Medicine、2(19):19-19ra12(2010)を参照のこと。

【0053】

インビトロでの抗原特異的ELISAによって、および動物においてインビボで免疫応答（例えば、IgG）を測定することによって、抗原の安定化を決定することができる。カプセル封入および/または製造プロセスの各工程の間、25（室温）、高湿度/高温条件での保存の間、生理学的条件下（pH 7.2、37）およびインビボ（動物モデル）での安定性を評価する。

【0054】

D. 抗原増加速度または放出の完全性

ガス発生によるバースト放出系は、カプセル封入された抗原の即時的な放出を可能にし得る。浸出または凍結乾燥により除去される細孔形成剤を利用してよい。

【0055】

I II I . 製造の方法

デバイスを製造するために使用される方法は、加工の間、および体温の両方で抗原安定性を維持すること、および形成および投与後の漏れを最小限にすることが不可欠である。製剤化後の滅菌は、典型的にはガンマ放射のような方法と組み合わされた無菌製造条件の組み合わせにより達成することができる。

10

20

30

40

50

【0056】

A. エマルジョン

標準的な技術を使用して、マイクロ粒子を作製することができる。好ましい技術は、有機溶剤中のポリマー溶液の、水溶液による乳化である。多量の非溶剤相への有機相の添加は、自然にできる単一のエマルジョンを形成し、そして得られた溶液を絶えず攪拌して、溶剤を蒸発させる。直ぐにミクロスフェアの形成が生じる。攪拌後、ミクロスフェアを洗浄し、次いで乾燥させる。

【0057】

実施例により、単独で、またはトレハロースおよびスクロースのような安定剤との組み合わせで、ポリマーおよび抗原の乳化を使用したマイクロ粒子の形成が実証される。

10

【0058】

B. 3次元印刷

3D印刷はミクロスフェアの一貫性を増大させ、より均一な放出を可能にし、そして増大した担持容量を有する「マイクロロッド」のような、より複雑なデバイスを作製するための手段を提供でき、それは複数のミクロスフェアからの同時放出の必要性を排除し、そしてスケールアップを容易にすることができます。

20

【0059】

3次元(3D)印刷は、デジタルモデルから3D物体を作製するプロセスである。3D印刷は積層プロセスであり、ここで材料の連続層を異なる形状で置く。各層を加えた後、典型的には光重合により「インク」を重合させ、そしてこのプロセスを、3D物体が作り出されるまで繰り返す。最近の商業的な利用可能性および低減されたコストによって、ワクチンおよび医薬品を含む生体分子の3D印刷が、発展途上国へのこれらの化合物の流通にとって魅力的なものになっている。これは最終製品をその国へ輸送する必要性を無くす。代わりに、3Dプリンタは、治療の場において、世界中の至る所からもたらされ得る単純なコンピュータプログラムから、要求される生体分子をプリントアウトすることができます。

20

【0060】

3D印刷のワークフローは、3つの逐次的な工程で記載できる：1) 粉末供給システムプラットフォームは持ち上げられ、そして製作プラットフォームは1層低下させられる；2) ローラーがポリマー粉末を薄層に広げる；3) プリントヘッドが、隣接する粉末粒子と一緒に結合させる液体結合剤を印刷する。Bilal et al., Biomaterials, 33: 6020 - 6041 (2012)。ナノ生体材料製作のために、大抵は2種類の3D印刷技術が採用される。1つは典型的なプリンタを用いるインクジェット印刷である。Marizzaら、Microelectronic Engin. 111: 391 - 395 (2013)。他方はナノインプリントリソグラフィである。

30

【0061】

ナノインプリントリソグラフィ(NIL)は、ナノ構造を製作するための迅速で、そしてコスト効率の高い技術である。NILの手順は、そのような構造の複数の層を互いの上部に積み重ねることである；すなわち、完成した二重層の構造は、第2の層を上部に加工できるように化学的・機械的研磨を使用して平坦化されたスペーサー層で覆われている。Liul、J. Nanomat. Aug. (2013)。

40

【0062】

インクジェット印刷を使用して、単分散PLGA粒子が生成されている。Bohmerら、Colloids and Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects, 289: 96 - 104 (2006)。簡単に述べると、水相に浸したインクジェットノズルでPLGA溶液の液滴を印刷する。この方法により、予測可能、かつ制御可能なサイズでミクロスフェアが生成される。この技術を使用して、パクリタキセル搭載单分散ミクロスフェアが作り出されている。Radulecuら、Digital Fabrication Sep: 18 - 21 (2005)。この技術に変更を加えたものを使用して、多層单分散ミクロスフェアが作り出されている。KimおよびPack

50

、 Bi o M E M S and Bi o m e d i c a l N a n o t e c h n o l o g y 、 1 : 1 9 - 5 0 (2 0 0 6) を参照のこと。このテクノロジーを利用して、マイクロカプセルの厚さを 2 ミクロン未満から数十ミクロンまで変動させることができると同時に、全径で 5 0 ミクロンに近いマイクロカプセルのための、完全、および十分に集中したコアカプセル封入が維持される。

【 0 0 6 3 】

ミクロスフェアからの薬物送達速度は、均一な単分散マイクロ粒子、様々なサイズのマイクロ粒子の混合物、および異なる分解可能な層を有するマイクロ粒子を提供することによって変更されている。 Kim および Pack 、 Bi o M E M S and Bi o m e d i c a l N a n o t e c h n o l o g y 、 1 : 1 9 - 5 0 (2 0 0 6) を参照のこと。 10

【 0 0 6 4 】

インターネットサイトの store.makerbot.com/repli_cator_2 (2 0 1 3) ; Tekin ら、 Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles . Soft Matter 、 4 : 7 0 3 - 7 1 3 (2 0 0 8) ; Jang ら、 Influence of fluid physical properties on ink-jet printability . Langmuir 、 2 5 : 2 6 2 9 - 2 6 3 5 (2 0 0 9) ; Lan 、 Design and Fabrication of a Modular Multi-Material 3 D Printer . M . S c . Thesis : Massachusetts Institute of Technology 、 2 0 1 3 ; およびウェブサイトの imageexpert.com/site-new/pdf/JetXpert.pdf . (2 0 1 3) で、さらなる情報を見出すことができる。 20

【 0 0 6 5 】

実施例により、 3 D P を使用したマイクロ粒子の調製を実証する。単分散インク液滴を一貫して噴射するために波形を最適化した。印加電圧、印加電圧の期間、および経時的な電圧の変化（スロープ）は全て、高品質なインク液滴を噴射するために最適化されなければならないパラメータである。例えば、 1 , 4 - ジオキサン中 5 w / v % 3 1 k (平均分子量) PLGA の溶液に関して波形を最適化した。 Jet X pert 撮像システムを用いて波形を最適化し、そして次にインクおよび波形を複合材料インクジェット 3 D プリンタに移した。 Jet X pert 撮像を定圧波形で行った。 1 つの実施形態では、 5 w / v % 3 1 k PLGA / 1 , 4 - ジオキサン (Z = 5 . 3 、 = 6 . 0 8 ミリパスカル秒) を使用した。この具体的な溶液に関して波形を最適化した。別の実施形態では、 1 5 w / v % 1 2 k PLGA / 1 , 2 - ジクロロエタン (Z = 5 . 8 、 = 6 . 2 4 ミリパスカル秒) を使用した。大抵のノズルは第 1 の実施形態でのような最適な噴射を示したが、ごくわずかなノズルがサテライト滴を含有する液滴列を生じた。第 3 の実施形態では、 1 5 w / v % 1 2 k PLGA / クロロホルム (Z = 5 . 8 、 = 5 . 9 9 ミリパスカル秒) を使用した（表 1 ）。より揮発性の溶剤（クロロホルムまたはアセトン）を使用した場合、大抵のノズルは 1 滴より多くの液滴を継続的に発射した。概して、一定の最適化された波形および類似の流体特性のために、より揮発性の溶剤で作られたインクは一貫性のない噴射をもたらし、そしてプリントヘッドノズルは印刷の間に詰まった（ 1 , 2 - ジクロロエタンまたはクロロホルムを使用した場合に観察された）。ノズルが詰まるのを防ぐために、インクを 1 , 4 - ジオキサンおよび DMF で作製することができる。これらの溶剤を用いる印刷は、構造がモーフィングするのを防ぐために、層間でより長い乾燥時間が要求される。所定のポリマーに関して、 GPC によって決定された場合、インク中のポリマー濃度を上昇させることにより、インクの粘度が上昇した。所定のポリマー濃度に関して、ポリマーの分子量範囲を大きくすることにより、インクの粘度が上昇した。ポリマーの添加後、インク密度および表面張力において観察された変化は、粘度変化と比較して、無視できるほどであった。 30 40

【 0 0 6 6 】

図11Aおよび11Bは、エマルジョンによって(図11A)、および3D印刷によって(図11B)作製された粒子の概略図であり、ならびにエマルジョン粒子(図11C)および理想的な場合の3DP粒子(図11D)からのタンパク質の放出である。これらは得られた構造における差を示し、それはまた放出動態を変化させる。

【0067】

図12A～12Dは3D印刷プロセスの概略図である：PLGA粒子の構造を作り出し(図12Aおよび24A)、薬物またはタンパク質を粒子に充填し(図12Bおよび24B)、薬物またはタンパク質を乾燥させ(図12C)、そして粒子をカプセル封入する(図12Dおよび24C)。概略図は、ワクチンを充填した立方体形状の構造物を示すが、モールドを利用して任意の形状のものを提供してよく、そしてモールドを層で、またはより複雑なパターンで充填してよいことが理解される。

10

表1：3DPのための溶剤

【表1】

分子量範囲/ 溶剤	%w/v	密度 (g/ml)	表面張力 (mN/m)	粘度 (mPa-s)	Z数 (無次元)
4k-15k/ クロロホルム	5%	1.45	28.07	1.42	24.6
	10%	1.43	27.93	3.17	10.9
	15%	1.44	27.67	5.03	6.9
7k-17k/ クロロホルム	5%	1.45	27.99	2.26	15.4
	10%	1.41	27.74	3.64	9.4
	15%	1.43	28.26	5.99	5.8
24k-38k/ クロロホルム	5%	1.45	28.12	3.60	9.7
	10%	1.40	27.77	9.32	3.7
	15%	1.44	28.70	26.3	1.3
4k-15k/ 1,2-ジクロロエタン	5%	1.28	33.31	2.26	15.8
	10%	1.28	32.92	3.65	9.7
	15%	1.27	33.68	5.58	6.4
7k-17k/ 1,2-ジクロロエタン	5%	1.28	33.69	2.35	15.3
	10%	1.25	32.17	3.88	9.0
	15%	1.29	33.95	6.24	5.8
24k-38k/ 1,2-ジクロロエタン	5%	1.26	32.36	3.94	8.9
	10%	1.30	33.90	13.8	2.6
	15%	1.27	33.68	49.1	0.7
24k-38k/ 1,4-ジオキサン	5%	1.09	31.52	6.08	5.3
24k-38k/ ジメチルホルムアミド	5%	0.97	36.60	5.50	5.9

20

30

40

【0068】

波形パラメータを最適化して、印刷中に圧電式のノズルジェットから「インク」(ポリマー溶液)の均一な単独の液滴を生成することができる(図13)。滴サイズは、印加電

50

圧、電圧のスロープ、ポリマーおよび溶剤選択および濃度を含む、最適化された種々のパラメータの関数である。

【0069】

C. マイクロモールディング

Parkら、Biomed. Microdevices、9:223-234(2007)は、精緻な設計を有するポリマー・マイクロ構造を製作するためのマイクロモールディングの使用について記載している。マイクロモールドをポリマー・マイクロ粒子で充填して、複雑な幾何学的形態を有し、そして穏やかな加工条件を使用して作製された、複数の材料から構成されたマイクロ構造を生成した。典型的には油・水、ダブルエマルジョン系；噴霧乾燥法；超臨界コンディショニング法；およびミリング法を使用して、これらのマイクロ粒子を調製する。好ましい実施形態では、フォトレジストで作られた雌型マスター・モールドをフォトリソグラフィによって作り出し、雌型マスター・モールドから、ポリジメチルシロキサン(PDMS)で雄型マスター構造物を成形し、そして雄型マスター構造物からPDMSで作られた雌型複製モールドを成形することにより、マイクロモールドを調製することができる。温度／圧力法を使用して、かつ／または溶剤からポリマー・マイクロ粒子をマイクロモールド成形することができる。

10

【0070】

噴霧乾燥およびエマルジョン技術を使用して、1～30 μmのサイズのポリマー・マイクロ粒子をPLA、PGAおよびPLGAから作製した。これらのポリマー・マイクロ粒子をPDMSマイクロモールドに室温で充填し、そして例えばマイクロ粒子をモールド内で、超音波で一緒に溶接することにより、一緒に溶融または結合させるが、同時にそのパッキング構造に固有の空隙を維持する。異なる組成のポリマーを有するように多層のマイクロ構造を製作し、そしてカプセル封入された化合物はマイクロ構造の異なる領域に位置した。モールドをポリマーメルトの代わりに固体ポリマー・マイクロ粒子で充填して、穏やかな加工条件を使用して、複雑な幾何学的形態を有し、そして複数の材料から構成されるマイクロ構造を複製した。マイクロ粒子は室温および低圧でマイクロモールドの空洞に容易に流れ込むことができ、それにより高いアスペクト比を有するマイクロ構造を作るのが容易となる。さらに、ポリマー・マイクロ粒子は、薬物のような化学的な化合物をカプセル封入でき、そしてモールドに連続層で充填して、複数の材料の組成物を収容することができる。モールドを充填した後、熱および超音波溶接、ならびに溶剤およびガスによる溶接を含むプラスチック溶接法により、モールド内でマイクロ粒子を溶接することにより、最終的なマイクロ構造を作り出すことができる。

20

30

【0071】

一度、投与後の特定の時点での狭い時間の放出を得るために要求されるポリマー材料および条件を同定したら、これらの同じ技術を使用して、ワクチン製剤を製剤化することができる。

【0072】

I V. 投与の方法

ワクチン接種を必要とする個体にワクチン製剤を投与する。抗原の供給源に対する保護効果を引き出すスケジュールで放出される、有効な量の1つまたはそれを超える抗原を含む投薬製剤としてこれらを投与する。

40

【0073】

マイクロ粒子またはマイクロカプセルを、好ましくは皮下または筋肉内に、例えば上腕背部の皮下に注射により、または粘膜表面（口腔、鼻腔内に、肺経路を介して、または他の開口部）に投与できるが、数日を超える長期間にわたって放出が起こるべき場合、注射が好ましい。

【0074】

投与の時点で抗原のボーラスを放出するように投薬形態を設計する。これは、抗原の溶液または分散物を、後の時間に複数回の放出を提供するワクチン製剤と組み合わせて投与することにより、達成され得るか、またはデバイスは、最初のボーラス、および後続の放

50

出（複数可）を提供するように製剤化され得る。

代表的なワクチンを表2に示す：

【表2】

年齢▶ ワクチン▼	誕生	1か月	2か月	4か月	6か月	12か月	15か月	18か月	19-23か月		
B型肝炎 ¹	HepB		HepB			HepB					
ロタウイルス ²			RV	RV	RV ²						
ジフテリア、 破傷風、 百日咳 ³			DTaP	DTaP	DTaP	脚注 参照 ⁸	DTaP				
インフルエンザ菌 b型 ⁴			Hib	Hib	Hib ⁴	Hib					
肺炎球菌 ⁵			PCV	PCV	PCV	PCV					
不活化 ポリオウイルス ⁶			IPV	IPV	IPV						
インフルエンザ ⁷					インフルエンザ(毎年)						
麻疹、 ムンプス、風疹 ⁸						MMR		脚注参照 ⁸			
水痘 ⁹						水痘		脚注参照 ⁸			
肝炎A ¹⁰						HepA(2用量)					
髄膜炎菌 ¹⁰											

【0075】

第三世界各国で大きな関心が寄せられるさらなるワクチンとしては、ポリオおよび痘瘡が挙げられる。以下ではこの適用のためのワクチンの例としてポリオワクチンを使用する。

【0076】

I P VワクチンS S Iは、麻痺性灰白髄炎に対する予防的ワクチン接種のために使用される不活化ワクチンである。I P VワクチンS S Iは、ベロ細胞において増殖させた、不活化ポリオウイルス1型、2型および3型を含有する。

用量あたりの含有量(0.5mL)：

不活化ポリオウイルス1型(B r u e n h i l d e) 40D抗原単位；

不活化ポリオウイルス2型(M E F - 1) 8D抗原単位；

不活化ポリオウイルス3型(S a u k e t t) 32D抗原単位；

199培地を0.5mLまで。

【0077】

このワクチンは血清およびトリプシンを使用せずに製造され、そして保存剤またはアジュバントを含有しない。抗生物質は製造において使用しない。I P VワクチンS S Iは微量の残留ホルムアルデヒドを含有する。これはデンマークでS t a t e n s S e r u m I n s t i t u tによって製造されている。

【0078】

I P VワクチンS S Iは1回用量のバイアルに分配された注射用溶液である。初回ワクチン接種用に0.5mLの一連の3用量を投与する。

【0079】

以前に初回ワクチン接種されたヒトのブースターワクチン接種用に、0.5mLの1用量を、最も早く初回のワクチン接種シリーズの6か月後に投与する。追加のブースター用量の投与は、ポリオ免疫化に関する国の推奨に従って行われるべきである。ワクチンを筋肉内または皮下に投与すべきである。ワクチンは血管内に投与してはならない。最初の投薬時の年齢は少なくとも6週であるべきであり、そして初回ワクチン接種シリーズには、少なくとも4週間隔で少なくとも3回の免疫化が含まれるべきである。大抵の国は、D P Tワクチンと同じスケジュール（典型的には2月齢、4月齢、および6月齢）を使用してI P Vを与える。

【0080】

I P VワクチンS S Iの免疫原性および安全性は、小児使用のための組み合わせワクチンを用いた臨床試験を含め、いくつかの臨床試験において調査されている。I P V以外に

、これらの試験には破傷風、ジフテリア、百日咳およびインフルエンザ菌 b 型に対するワクチン抗原が含まれた。

【0081】

2月齢で免疫化を開始する場合、少なくとも1か月間隔での3回免疫化の初回ワクチン接種シリーズの完了によって、2回目の免疫化の1か月後に、3つ全ての型のポリオウイルスへの抗体陽転を招くことが予期できる。2月齢の前、および最も早くて6週齢のときに免疫化を開始する場合、89%～99%の抗体陽転率が実証されている。したがって、このようなスケジュールでは、9月齢または生後2年目でのブースター用量を考慮すべきである。

【0082】

I P V ワクチン S S I は、I P V または O P V で初回免疫化された乳幼児、就学前児童および成人のワクチン再接種に使用できる。I P V ワクチン S S I は、1～3用量の I P V 、続いて1～3用量の O P V を使用する、I P V / O P V 混合スケジュールで使用できる。O P V の最初の用量の前に I P V を投与することが推奨される。I P V / O P V 混合スケジュールでは、初回ワクチン接種後の保護抗体の持続が、少なくとも20年間続いたことが示されている。I P V のみのスケジュールにおいて保護 S S I の持続に推奨される用量：

D 抗原 1 型 - 40 D U / m l

D 抗原 2 型 - 8 D U / m l

D 抗原 3 型 - 32 D U / m l

20

10 倍の三価 I P V :

D 抗原 1 型 - 327 D U / m l

D 抗原 2 型 - 70 D U / m l

D 抗原 3 型 - 279 D U / m l

【0083】

本発明は以下の非限定的な実施例によってさらに理解される。

【実施例】

【0084】

以下の実施例は、薬物／抗原の制御放出のための様々なポリマー・薬物またはポリマー・抗原製剤について記載する。制御放出はポリマー分解に依存して、単回注射後、経時に薬物／抗原放出の複数回のバーストを達成する。ポリマー分解に基づく薬物／抗原放出のバースト後の製剤の免疫原性、および抗抗原抗体力値の持続的増加もまた提示する。製剤を作製する方法についても記載し、それには、自然形成エマルジョンを介したポリマー・マトリックスへの抗原の組み込み、または3D印刷またはマイクロモールディングを介したポリマーシェル内への抗原のカプセル封入が含まれる。抗原の安定性、ポリマーマトリックスの安定性、および製剤の安定性を改善する研究も提示し、これにより所望の放出特性および免疫原性を伴う製剤を得ることができる。

30

【0085】

実施例 1：ワクチンの別個の放出のためのポリマーおよび溶剤の選択

40

材料および方法

ポリマー型 - P L G A 、 P L L A ；ポリマー分子量 - 9.5 k 、 20 k 、 31 k 、 46 k

薬物搭載 - 0.5 、 3 、 5 % ；賦形剤 - トレハロース、スクロース

カプセル封入 - 自然形成エマルジョン

本プロセスでは、有機相として C H₂ C l₂ : T F E : : 4 : 1 . (C H₂ C l₂ - ジクロロメタン T F E - トリフルオロエタノール) を、ポリ(ビニルアルコール)(「P V A」)と共に使用して、5%、3%または0.5%ウシ血清アルブミン(「B S A」)または不活化ポリオウイルス(「I P V」)をポリマーにカプセル封入した。多量の非溶剤相への有機相の添加は、自然形成の単一のエマルジョンを形成し、そして得られた溶液を絶えず攪拌して、溶剤を蒸発させる。直ぐにミクロスフェアが形成される。攪拌後、ミク

50

ロスフェアを洗浄し、次いで乾燥させる。Jaklenecら、Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-1 from PLGA microsphere-based scaffolds. Biomaterials, 29 (10) : 1518 - 1525 (April 2008) を参照のこと。

【0086】

37で、1mlのPBSバッファー(pH 7.2)に懸濁した10mgのミクロスフェアを用いてインピトロで放出試験を行った。用いた時点は1日目、4日目、7日目およびその後毎週である。各時点で、バイアルを遠心分離し、上清を取り除いてアッセイし、新鮮な1mlのPBSを加え、そしてペレット化されたミクロスフェアを再懸濁した。

10

【0087】

結果

図21Aは、カルボキシル基で誘導体化されたPLGA(50:50)(20kD)からの、モデルタンパク質であるウシ血清アルブミン(「BSA」)の、5%BSA、3%BSA、および0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【0088】

図21Dは、カルボキシル基で誘導体化されたPLGA(50:50)(9.5kD)からのウシ血清アルブミンの、5%BSA、3%BSA、および0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

20

【0089】

これらの図は、分子量は異なるが、同じポリマーからの放出を示す。この差だけで放出プロファイルが劇的に変化した。

【0090】

図3Aおよび3Bは、PLL A(50kD)からのウシ血清アルブミンの、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【0091】

図4Aおよび4Bは、PLL A(100kD)からのウシ血清アルブミンの、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

【0092】

図5Aおよび5Bは、PLL A(300kD)からのウシ血清アルブミンの、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。

30

【0093】

これらの3つのグラフ間の差は分子量だけである。しかしながら、いずれの場合にも。図21におけるものの範囲に類似する、実質的に、異なる放出期間はなかった。

【0094】

図6Aおよび6Bは、P(d, 1)L A(20kD)からの、ウシ血清アルブミンの、5%BSAおよび0.5%BSAに関する経時的な(週)放出のグラフである。結果は図3~5および21に類似する。

【0095】

PLGA-COOH(50:50)を使用して最良の結果が得られた。これをPLGA製剤(図7A)に関して、ボーラス注射(図7B)と比較して図7Aおよび7Bにまとめる。

40

【0096】

図7Aで使用された製剤の詳細を表3に提示する(表4および5も参照のこと)。表3では、F3とF7との差は、ポリマーの分子量である。F5は高搭載のBSAを有する。F3およびF7は約3つの均等な用量を有するが、F5は初期用量が多く、続いて2つの用量がより少なく、これは2回のブースターショットによる初期ボーラスに非常に類似している。0日目に製剤を動物に注射する(単回注射)が、ボーラス対照は試験の経過中に3回注射して、製剤放出動態を擬似する。陰性対照には、製剤用の空のミクロスフェア、およびボーラス注射用の生理食塩水が含まれる。注射容量は200μl(マウスの皮下(

50

S C) 注射のための最大容量) であった。200 μl 注射の 2 回の注射(1 下肢あたり 1 回) を実施した。最大の注射可能なミクロスフェア濃度は 50 mg / ml であった。

表 3 . F3、F5 および F7 製剤の注射後の第 1 ピーク、第 2 ピークおよび第 3 ピークでの放出された BSA の量 (μg)

【表 3】

群 (n=10)	BSA の量 (μg)			
	第 1 ピーク	第 2 ピーク	第 3 ピーク	合計
F3: 0.5% BSA, 20k BI-502H, 50/50	22.2	19.8	21.6	63.6
F7: 0.5% BSA, 31k PLGA, 50/50	23.0	13.6	34.0	70.6
ボーラス対照 (2)	22.0	22.0	22.0	66.0
F5: 5% BSA, 31k PLGA, 50/50	298.0	68.4	65.4	431.8
ボーラス対照 (1)	298.0	68.4	65.4	431.8

【0097】

図 8 A および 8 B は、カルボキシル基で誘導体化された PLGA (50 : 50) (20 kD) からの、0.5% の卵白アルブミンの放出と比較した、0.5% のウシ血清アルブミンの経時的な(週) 放出のグラフである。

【0098】

図 9 A および 9 B は、カルボキシル基で誘導体化された PLGA (50 : 50) (31 kD) からの、5% の卵白アルブミンの放出と比較した、5% のウシ血清アルブミンの経時的な(週) 放出のグラフである。

【0099】

図 10 A および 10 B は、カルボキシル基で誘導体化された PLGA (50 : 50) (31 kD) からの、0.5% の卵白アルブミンの放出と比較した、0.5% のウシ血清アルブミンの経時的な(週) 放出のグラフである。

【0100】

これら全ては、ポリマーの分子量または搭載パーセントによってのみ変わる、優れた結果を示している。

【0101】

実施例 2 : 3DP によって作製されたマイクロ粒子と比較した、エマルジョンによって作製されたマイクロ粒子からの予測放出プロファイル

コンピュータ制御されたインクジェット 3D 印刷により製作された粒子を、同一のマイクロメートルスケールの寸法、薬物搭載、およびポリマー・マイクロ構造内の薬物の空間的位置で作製できる。2つの方法の間の主要な差は、エマルジョン系の粒子(左)はマトリックス系であり、そして薬物は粒子全体にわたって均質に分配されているという点である。3D またはマイクロモールド形成された粒子を右に示す。ワクチンおよびポリマーは明確に分離されており、ここでワクチンはコア内に存在し、そしてポリマーはシェル内にのみ存在する。これらの区別は、2つの粒子型の間の放出動態の独特な制御を可能にする。またマイクロモールド形成された粒子 / 3D 印刷された粒子により、コアサイズも制御できるので、より高度な搭載が可能になる。

【0102】

図 11 C の放出グラフは実施例 1 のデータに基づく。

【0103】

図 11 E の概略図では、薬物またはワクチンをポリマー・ミクロスフェアにカプセル封入し、そしてポリマー・マトリックス全体にわたって分散させる(A)。一度水和すると、表面上のいかなる薬物も即座に放出され(B)、ゆえに初期バーストを引き起こす。この事象に続いて、ミクロスフェアは残留孔を有し、それを通して薬物がゆっくりと拡散して、第 2 のバーストを引き起こすことができる(C)。最後に、ポリマー・バルクが浸食された

10

20

30

40

50

ときに、著しい分子量の分解のために、薬物の残りが第3のバーストで放出される(D)。

【0104】

実施例3：マイクロ粒子を作製するための圧電式噴射のパラメータの選択
材料および方法

最適化：

P L G A の均一な、単独の液滴を噴射するためにノズルから適用される圧力
(波形)を補正する。

P L G A 溶液の粘度を最適化する(Z数)。

ノズルから効果的に噴射するのに十分に低い粘度にする。

基材上に固化するのに十分に高い粘度にする。

10

【0105】

圧電式ドロップ・オン・デマンド(DOD)インクジェット印刷における適切な滴形成は、無次元のZ数を使用して記載できることが、試験により示されている。Z数は、インクの流体特性(表面張力、密度、および粘度)およびプリントヘッドのノズルのサイズによって決定される。

【0106】

Z数範囲は、特定の波形でのインクの印刷適性を決定するために定義できる。

Z数を使用してP L G A 溶液を特徴付けする：

20

【0107】

溶剤をP L G A 溶解性および物理学的特性(すなわち蒸気圧および沸点)に基づいて選択する。

【0108】

1つのP L G A 溶液インクに関して、一度最適な波形を決定すると、その同じ波形を使用して、ある特定の範囲内のZ数を有するP L G A 溶液を使用することにより、異なる分子量のP L G A で印刷することができる。

【0109】

結果

B S A およびI P V 溶液を噴射するための波形を図13で示すように最適化した。これにより、ポリマープリンタ粒子をワクチンで充填することが可能になる。

30

【0110】

実施例4：I P V D 抗原の喪失を最小にし、そして凍結乾燥およびカプセル封入の間の安定性を増加させるための試験

凍結乾燥によるD抗原の喪失を防止するために、カプセル封入の前にI P V を濃縮するための方法および試薬を最適化するために試験を行った。使用できる方法としては、遠心濾過および透析が挙げられる。

【0111】

エマルジョンプロセスの間のD抗原喪失を低減させ得る賦形剤を試験した。B S A を使用していくらかの成功を得ている。この試験は糖を利用した。糖ガラスを形成するために糖濃度を変更して試験した。乾燥のために湿度条件も変更して試験した。

40

【0112】

自然形成エマルジョンのプロセスのための他の溶剤系との比較も行った。初期の研究では、クロロホルム/アセトンを有機相に使用した。続く研究では、酢酸エチルをジクロロメタン(D C M)の代わりに使用した。

【0113】

材料および方法

A l c o c k らは、糖ガラスに組み込まれたウイルスが長期間の固体状態安定性を示すことを報告した。(A l c o c k ら、S c i e n c e T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e、2(19) : 19 - 19 r a 1 2 (2010)) 3 D 印刷された基材におけるI P V 安定性を類似の様式で試験した。共溶解した糖(スクロースおよびトレハロ

50

ース)を含有するIPV溶液を、MakerBot Replicator 2を使用して印刷された、スケールアップされたPLA構造物に沈着させた。IPV/糖溶液の乾燥を周囲湿度で行ったが(湿度約20%)、これはAlcockらが使用した湿度(約10%)よりも高かった。

【0114】

結果

図14A、14Bおよび14Cは、糖賦形剤である1Mトレハロース、1Mスクロース、および3Mスクロースと共に凍結乾燥し、次いで4、25または37でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

10

【0115】

結果により、糖がIPVの安定性を顕著に増加させ、そして4および25での安定性の差はわずかしかなかったが、37では安定性はより低かったことが実証される。結果によりまた、安定性はIPV型によって異なることも示された。

【0116】

図15Aおよび15Bは、0、0.5、0.75、1または1.25Mトレハロースと共に凍結乾燥し、次いで4(図15A)または25(図15B)でインキュベートした後に保持されたD抗原(I型、II型およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。最良の結果は0.5Mおよび0.75Mトレハロースで得られた。

20

【0117】

図16Aおよび16Bは、溶剤としてテトラフルオロエチレン('TFE')、ジクロロメタン('DCM')、またはTFEおよびDCMを用いて、糖賦形剤無しで(図16A)または賦形剤として0.75Mトレハロースを用いて(図16B)、溶剤が蒸発するまで溶剤と混合した後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。DCMは統計的に有意により良好であった。IPVはカプセル封入のプロセスの間に有機溶剤に暴露した場合、トレハロースを賦形剤として使用した場合でさえ安定ではなかった。

【0118】

図17Aは、0Mの糖、0.5Mトレハロース、または0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIPVを、3D-印刷されたPLA基材上に印刷し、そして25、相対湿度22%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。図17Bは、0.25Mトレハロースまたは0.5Mトレハロース・スクロースを伴うIPVを、3D-印刷されたPLA基材上に印刷し、そして25、相対湿度10.7%で乾燥させた後に保持されたD抗原(I型、II型、およびIII型IPV)のパーセントのグラフである。

30

【0119】

Alcockらは、ウイルス/糖溶液を制御された条件下(20~25、相対湿度2~10%)で基材上に乾燥させた。図17Aに関する乾燥は、換気型細胞培養フード(20~25、相対湿度22.9%)内でPLA基材上のIPV/糖溶液を伴った。図17Bに関する乾燥は、デシケーター内(20~25、相対湿度10.7%)でPLA基材上のIPV/糖溶液を伴った。安定性は室内温度/湿度に関して良好であった(3つ全てのIPV型は>50%D抗原を保持した)。

40

【0120】

図18Aおよび18Bは、0.5または0.75Mトレハロースと共に凍結乾燥し、次いで25でインキュベートした後(図18A)、またはピペッティングされた0.5Mトレハロース・スクロースもしくは噴射された0.5Mトレハロース・スクロースと共に凍結乾燥し、次いで25、相対湿度10.7%で乾燥させた後(図18B)に保持されたD抗原のパーセントのグラフである。

【0121】

これらの試験により、最良の結果は、凍結乾燥したIPVを含有する3D-印刷された

50

P L A 粒子を室内温度および湿度（相対湿度約20%）で保存することにより得られたことが実証される。試験によってまた、I P Vを噴射することは、I P Vを凍結乾燥するよりも、I P V安定性を有意に低下させないことが実証された。

【0122】

実施例5：B S A含有P L G A製剤の短期間インビボ免疫原性

抗B S A Ig G（抗体）力価として提示される免疫応答を、製剤F 3、F 5およびF 7の注射後、1、2、および4週目に測定した。前記の表3および以下の表4に提示する。製剤F 4およびF 8は空のミクロスフェア（薬物無し）であり、陰性対照として使用した（表4参照）。

【0123】

結果を図19A、19B、および19Cに提示する。抗体力価（log2）を1、2、および4週目の種々の群に関してプロットする。陰性対照は全てゼロであり、そしてミクロスフェア製剤はボーラス対照と比較して同等またはより強い応答を生じている。

【0124】

実施例6：B S A含有P L G Aミクロスフェアの長期間インビボ免疫原性

材料および方法

材料

ポリ(D,L-乳酸-コ-グリコール酸)（P L G A R e s o m e r（登録商標）R G 5 0 2 H、R G 5 0 3 H、R G 5 0 4 H、およびR G 7 5 2 H）およびB S AをS i gma - A l d r i c h（セントルイス、ミズーリ州）から購入した。ポリ(ビニルアルコール)（P V A、分子量=25,000）をP o l y s c i e n c e s, I n c . (ウォーリントン、ペンシルバニア州)から購入した。この研究で使用したジクロロメタン(D C M)および2,2,2-トリフルオロエタノール(T F E)は試薬等級であった。

【0125】

ミクロスフェア製作

B S Aを含有するP L G Aミクロスフェアの16の製剤（表4）を、自然形成单一エマルジョン法(F u r a, J Pharm Sci, 92: 1582-1591, 2003; およびJ a k l e n e cら、B i o m a t e r i a l s, 29: 185-192, 2008)を使用して製作した。簡単に述べると、200mgのP L G Aを10mLの4:1 D C M:T F Eに溶解し、そして300μLのB S A(水中)と混合した。混合により透明な単相の溶液が形成され、次いでそれを200mLの5(w/v)%P V A(水中)に加えた。自然に形成したエマルジョンを室温で3時間攪拌した。次いで粒子を遠心分離によって収集し、水で5回洗浄し、そして凍結乾燥した。インビボ使用のために調製する場合、有機相およびB S A溶液を0.2μmのポリテトラフルオロエチレンフィルター(W h a t m a n、リトル・チャルフォント、英国)を通して濾過し、そして滅菌層流フード内で混ぜ合わせた。

【0126】

表4. ミクロスフェア製剤およびサイズ特徴付け

10

20

30

【表4】

製剤	BSA (% w/w)	PLGA M _w (kDa)	PLGA比	粒子サイズ (μm)	90% の 粒子が下回る (μm)
A (F1)	5	7-17	50:50	10.5 ± 6.8	18.5
B (F2)	3	7-17	50:50	10.6 ± 6.4	18.1
C (F3)	0.5	7-17	50:50	10.3 ± 6.2	22.1
D (F4)	0	7-17	50:50	10.5 ± 5.9	17.4
E (F5)	5	24-38	50:50	8.6 ± 6.7	21.4
F (F6)	3	24-38	50:50	11.4 ± 8.3	21.4
G (F7)	0.5	24-38	50:50	12.1 ± 8.2	23.1
H (F8)	0	24-38	50:50	11.4 ± 7.2	20.2
I (F9)	5	38-54	50:50	14.1 ± 9.4	25.4
J (F10)	3	38-54	50:50	12.0 ± 7.1	20.3
K (F11)	0.5	38-54	50:50	11.9 ± 6.8	20.6
L (F12)	0	38-54	50:50	11.9 ± 6.4	19.7
M (F13)	5	4-15	75:25	11.3 ± 7.0	19.7
N (F14)	3	4-15	75:25	12.2 ± 7.4	21.2
O (F15)	0.5	4-15	75:25	12.4 ± 7.5	21.1
P (F16)	0	4-15	75:25	11.7 ± 6.5	19.9

【0127】

ミクロスフェアの特徴付け

Multisizer 3 Coulter Counter を使用してミクロスフェアサイズ分布を決定した。0.39 μm の bin サイズを使用してヒストグラムを作り、そして ± 5 bin の ウィンドウ サイズで中心移動平均を使用して平滑化した。JSM-5600LV SEM (JEOL、東京、日本) を使用して 5 kV の 加速電圧で、走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像を収集した。撮像の前に、Hummer 6.2 スパッタリングシステム (Anatech、バトルクリーク、ミシガン州) を使用して、サンプルを Au / Pd でコートィングして表面帶電を防止した。

【0128】

インビトロ BSA 放出

10 mg のミクロスフェアを、キャップ付きチューブ内で 1 mL の リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) に分散し、そして回転プラットフォーム上で、37 °C でインキュベートした。各時点 (1 日目、次いで週 1 回を 1 ~ 13 週間) で、サンプルを 1500 の 相対遠心力 (RCF) で 5 分間遠心分離し、その後上清を収集した。次いでサンプルを 新鮮な PBS に再懸濁し、そしてその後の時点でのサンプリングのためにインキュベーターに戻した。ミクロスフェアからの BSA 放出を、ビシンコニン酸 (BCA) アッセイを使用して定量化し、そして試験の終わりまでに放出された全量に基準化した。サンプルを 3 回反復で実行し、そしてデータを 平均 ± 標準偏差として報告した。

【0129】

BSA ミクロスフェアのインビトロ投与

全ての動物実験は MIT の動物愛護委員会により承認された。簡単に述べると、6 ~ 8 週齢の 雌 BALB/c マウスに (1) BSA 搭載ミクロスフェア、(2) 非搭載ミクロス

10

20

30

40

50

フェア、(3)ボーラスBSA、または(4)生理食塩水のみを注射した。最初の2群のマウスには1回だけ注射したが、ボーラスBSAまたは生理食塩水のみを受けたマウスには、4週目および8週目に再度注射して、インビトロでのPLGAミクロスフェアからのBSA放出の量およびタイミングに一致させた。サンプルを200μlの生理食塩水に溶解または懸濁(適用可能な場合)させ、そして各後肢に全量で400μlを皮下注射した。表5は各群に関する正確な投薬計画を含有する。0、1、2、4、6、8、および10週目に、100μlの血液を頸下から採取し、そして凝固の後、2000RCFで、4で10分間遠心分離して、血清を分離した。

【0130】

表5. インビボBSA投与のための投薬レジメン

【表5】

群	BSAの量(μg)				10
	第1用量	第2用量	第3用量	合計	
製剤C (0.5% BSA, 7-17 kDa PLGA)*	22	20	22	64	
製剤G (0.5% BSA, 24-38 kDa PLGA)*	23	14	34	71	
低用量ボーラスBSA	22	22	22	66	
製剤E (5% BSA, 24-38 kDa PLGA)*	298	68	65	431	
高用量ボーラスBSA	298	68	65	431	
非搭載PLGAミクロスフェア、7-17 kDa	0	0	0	0	
非搭載PLGAミクロスフェア、24-38 kDa	0	0	0	0	30
生理食塩水	0	0	0	0	

インビボで使用した全てのPLGAは50:50であった。

*はインビトロの結果に基づく理論的用量を示す。

【0131】

PLGAミクロスフェアからのBSA放出の免疫原性

エンドポイント酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を使用して、BSAに対する血清抗体力値を決定した。96ウェルMaxisorp ELISAプレート(Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州)を、0.1M炭酸水素ナトリウム中100μLの100μg/mlのBSA溶液で、4で一晩コーティングした。次いで0.05%Tween20を含有するPBS(PBST)で、プレートを3回洗浄し、次いでブロッキング剤として、PBST中5%脱脂乳中で、37で2時間インキュベートした。別の一連のPBSTでの3回の洗浄の後、マウス血清サンプルを、4倍段階希釈物に加え、そして37で2時間インキュベートした。試験が進むにつれて、血清希釈の程度を増加させ、そして力値が上昇した。次いでプレートをPBSTで5回洗浄し、そしてブロッキングバッファー中1:1000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス2次抗体(Southern Biotechnology Associates、バーミングハム、アラバマ州)と共に37で2時間インキュベートした。プレートをPBSTでさらに5回洗浄し、そしてアルカリ性

40

50

リン酸塩基質キット (Bio-Rad、ハーキュリーズ、カリフォルニア州) からの 1 倍ジエタノールアミンバッファーに溶解した錠剤から調製した、 $100 \mu\text{L}$ の p - ニトロフェニルリン酸溶液を使用して展開した。10 分後に、各ウェルに $100 \mu\text{L}$ の 0.4 M 水酸化ナトリウムを加えることにより反応を停止させ、そして Tecan Infinite M200 プロマイクロプレートリーダー (Maeennedorf、スイス) を使用して、吸光度値を 405 nm で読み取った。バックグラウンド値の 2 倍よりも大きな吸光度を生じる最高血清希釈度の逆数として力価を報告した。

【0132】

統計分析

表 4 および図 20 における全てのデータは平均 \pm 標準偏差として報告している。インビトロ試験を 3 回反復の実験で実施し、一方インビオ試験は全ての時点で全群に関して 10 回反復の実験で実施したが、10 週目の製剤 C は例外で、そこでは 1 匹の動物からの血液量が不十分であったため、9 回の反復を使用した。3 つの低用量群に関して一元 ANOVA 散状統計分析、ならびに高用量ミクロスフェアおよびボーラス注射の比較のために対応のない両側スチュードント t 検定を使用して、時間を一致させた抗体力価を比較した。多重比較の影響を弱めるためホルム - ボンフェローニ補正を用いる対応のない両側スチュードント t 検定を使用して、 0.05 の有意レベルでピーク抗体力価の比較を実施した。

10

【0133】

結果

B S A 含有 P L G A ミクロスフェアの特徴付け

P L G A および B S A の 16 全ての製剤は広範な粒子サイズの分布を伴う、球形のマイクロ粒子を生成した (表 4)。インビオ試験に使用した製剤 C、G、および E のサイズおよび形状は、全ての製剤の代表であった。製剤 C は、直径 $10.3 \pm 6.2 \mu\text{m}$ であるミクロスフェアを生成したが、容積と直径との間の 3 次の関係のために、P L G A 中の B S A の分布が均質であると仮定すると、 $10.3 \mu\text{m}$ より小さな粒子はたった 4.2% の抗原搭載を含有した (Narasimhanら、J Control Release、47 : 13 - 20、1997)。より大きな粒子が、抗原の大部分を含有し、その容積の 90% が、製剤 C に関しては、 $22.1 \mu\text{m}$ より大きな粒子に含有された。製剤 G および E は、粒子直径がそれぞれ 12.1 ± 8.2 および $8.6 \pm 6.7 \mu\text{m}$ で類似の特徴を実証したが、粒子容積の 90% が、それぞれ 23.1 および $21.4 \mu\text{m}$ より大きな粒子に含有された。ミクロスフェア直径および容積分布のヒストグラムを図 20A ~ 20F に見ることができる。50% の累積粒子表面積が製剤 C、G、および E に関してそれぞれ直径 23.67 、 29.54 、および $27.58 \mu\text{m}$ よりも大きな粒子に存在したので、分布の大きい方の端の粒子はまた表面積効果に実質的にも寄与した。

20

30

【0134】

P L G A ミクロスフェアからの B S A のインビトロ放出

P L G A ミクロスフェアからのインビトロ放出動態を B C A アッセイによって決定し、そして実験の期間中に放出された全 B S A のパーセントとして表現した。乳酸対グリコール酸の 50 : 50 比の 3 つのポリマーのいずれかを使用して製作された P L G A ミクロスフェアにおいて、75 : 25 比と比較して、B S A 放出および粒子分解はより迅速に生じた。50 : 50 比の P L G A を使用して生成された全てのミクロスフェア製剤は 14 週以内に分解したが、一方 75 : 25 P L G A は 22 週で分解した。B S A 放出のタイミングは、B S A 搭載よりもポリマー型により依存すると思われたが、大抵の場合に搭載が主にバーストのサイズに影響を及ぼした。図 21A にて示されるように、低分子量 ($7 \sim 17 \text{ kDa}$) P L G A は 8 週の経過にわたって、3 つの別個のバーストで放出し、そして 14 週目までに完全に分解した。中間分子量 ($24 \sim 38 \text{ kDa}$) の P L G A もまた、B S A 搭載に依存して、9 ~ 12 週にわたって広がる 3 つのバーストを示し、そして 14 週目までに分解した (図 21B)。最も高い分子量 ($38 \sim 54 \text{ kDa}$) の P L G A は、1 日目および 8 週目に顕著なバーストを伴って 9 ~ 12 週にわたって B S A を放出したが、3 %

40

50

B S A 搭載ミクロスフェアと 5 % B S A 搭載ミクロスフェアとの間により連続的な放出動態を伴った(図 21 C)。低分子量(4 ~ 15 kDa)PLGA から作製された、より高い乳酸含有量(75 : 25)を伴うミクロスフェアは 22 週にわたって分解し、そして初期バーストの後、段階的で半連続的な放出を示した(図 21 D)。

【0135】

16 のインビトロ製剤のうち、製剤 C、G、および E を、そのインビトロ放出動態に基づいて後のインビボ試験のために選択した。製剤 C のミクロスフェアを、0.5 % B S A を搭載した、低分子量 PLGA (7 ~ 17 kDa) を使用して作製し、製剤 G のミクロスフェアをわずかにより高い分子量の PLGA (24 ~ 38 kDa) および 0.5 % B S A を用いて作製し、そして製剤 E のミクロスフェアを製剤 G と同じ分子量の PLGA を用いるが、より高い(5%)B S A 搭載を伴って作製した。製剤 C からの B S A 放出は、3 つの別個のピークを特徴とし、それぞれ、1 日目に全 B S A の 33.4 ± 5.1% が放出され、4 週目に 27.2 ± 4.3% が放出され、そして 6 週目および 7 週目の時点にかけて、32.1 ± 5.2% が放出された(図 21 A)。最小の B S A 放出は 1、2、4、および 5 週目に、または 7 週目の後に観察され、そしてミクロスフェアは、粒子の完全な溶解によって証明されるように、10 週目までに完全に分解した。

10

【0136】

製剤 G ミクロスフェアはまた 3 つのバーストでの B S A 放出を特徴とする(図 21 B)が、より長い時間枠にわたって広がった。加えて、全ミクロスフェア分解は、製剤 C についての 10 週よりもむしろ、14 週後に観察された。製剤 G からの最初の B S A バーストは 1 日目の時点で観察され、全 B S A の 28.0 ± 5.7% が放出された。これに 4 週目の 12.9 ± 2.9% の第 2 バーストが続き、そしてバーストは 8 週目から 11 週目まで延長され、その間に累積的に 43.8 ± 2.0% の B S A が放出された。粒子の完全な分解を通して、他のどの時点でも、放出溶媒中に B S A はほとんど、または全く観察されなかつた。

20

【0137】

製剤 E ミクロスフェアはその B S A の 63.7 ± 7.3% を 1 日目に放出したが、これはいずれの製剤の全量および全パーセンテージの両方に関しても、最大の初期バーストであった(図 21 C)。この初期バースト後の実質的な B S A 放出を伴う時点は 3 週目および 8 週目のみであり、そのときに全搭載の 8.9 ± 0.9% および 8.8 ± 2.1% がそれぞれ放出された。同じ分子量(24 ~ 38 kDa)の PLGA を使用した製剤 G に類似して、製剤 E は 14 週目で完全に分解した。

30

【0138】

B S A 含有 PLGA ミクロスフェアの免疫原性

各ミクロスフェア製剤に対する液性免疫応答を、インビトロで粒子から放出された B S A の量およびタイミングと一致する、3 つのボーラス注射からなる陽性対照と比較した。実験群内で、連続した週の間での力価における統計的に有意な増加を放出の証拠として使用した(1サンプル対応の t 検定)。製剤 C は、1、2、および 4 週目で以前の時点と比較して抗体力値の有意な増加を誘起し(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ 、および $p < 0.001$)、次いで 6 および 8 週目に有意に減少し(それぞれ $p < 0.01$ および $p < 0.05$)、その後 10 週目で安定化した(図 22)。同様に、製剤 G を受けたマウスは、1、2、および 4 週目に力価の有意な増加を示し(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.001$ 、および $p < 0.01$)、6 週目でそのままであり、次いで 8 週目までに有意に低下し($p < 0.05$)、その後 10 週目に再度安定化した。製剤 E は、抗体力値が 1、2、および 4 週目に有意に増加した(全てに関して $p < 0.001$) ような、類似の応答を誘起し、6 週目に横ばいになり、次いで試験の終わりまで減少した($p < 0.05$)。全体としては、3 つ全てのマイクロ粒子製剤に対する免疫応答は、力価が最初の 4 週間にわたって上昇し、次いで 10 週目までゆっくりと減少するような、類似した経時的な進行を実証した(図 22)。しかしながら、抗体力値の大きさは、B S A 搭載に大いに依存すると思われた。インビトロ実験に基づいて、製剤 E は、大きな初期バーストのために、

40

50

最も早い時点（1日目）に製剤Cよりもおよそ13倍多いBSAを放出し、そして同様に13倍高い抗体力価を誘起した。製剤Eによって誘起された抗体力価が、7倍のBSAを放出した後、製剤Cに伴うものよりも8倍高かったので、この傾向はまた試験の終わりでも観察された。

【0139】

BSA搭載ミクロスフェア製剤のいずれかを受けた動物からの抗体力価は、用量が一致するボーラス注射を受けた動物からのものよりも、2および4週後に有意に高かった（それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$ ）。しかしながら、4週目での2回目のボーラス注射で追加免疫化した後、力価は、6および8週目で、製剤と、用量が一致するそれらのボーラス群との間で、統計的に類似した。次いで3回目のボーラスの投与の後の10週目に、ボーラスBSAを受けた動物は、力価の別のスパイクを示し、その時点の、全ての用量が一致するミクロスフェア群と比較して、有意に高い抗体力価をもたらした（ $p < 0.001$ ）。

10

【0140】

時間が一致する抗体力価は、抗原提示のタイミングを示唆するが、抗原提示のタイミングにおいて起こり得るミスマッチのために（Parayaniら、J. Pediatr. 105: 200-205 (1984)；Barracoughら、Am J Kidney Dis. 54: 95-103 (2009)）、ピーク抗体力価がこの場合の免疫応答のより有用な指標であるかもしれない。インビトロでのミクロスフェアバーストのタイミングを合わせるためにボーラス注射スケジュールを選択したが、加速したインビボ分解が抗原放出の相殺を招いた可能性がある。結果的に、実験の終わりには、抗原の不存在下で予期されるように、ミクロスフェア群の抗体力価が数週間低下したが、ボーラス対照群における力価は3回目の注射の後に、その最高レベルに到達した。ピークの抗体力価を比較することが、タイミングの影響を制御し、そしてどの処置がより免疫原性であるかを決定する助けとなる。

20

【0141】

製剤C、G、およびEに関する抗体力価は、ミクロスフェア投与4週間後に、10g2スケールでそれぞれ 13.9 ± 1.3 、 13.7 ± 2.2 、および 16.1 ± 2.1 でピークとなったが、小用量および大用量に一致するボーラスは10週後にそれぞれ 15.5 ± 1.5 および 17.7 ± 0.8 の10g2力価でピークとなった（図23）。多群力価比較に推奨されているホルム-ポンフェロー二補正法（Reverbéri、Blood Transfus. 6: 37-45 (2008)）を使用して、製剤CおよびG（図23A）は、3回の $22\mu g$ のBSAの注射からなる、用量が一致するボーラス対照と統計的に異なることのないピーク抗体力価を誘起した（それぞれ $p^* = 0.0645$ および $p^* = 0.0543$ ）。製剤E（図23B）はまた、3回のボーラス注射からなる用量が一致するボーラス対照と、統計的に異なることのないピーク力価を誘起した（ $p^* = 0.0784$ ）（表5）。

30

【0142】

実施例7：薬物送達のためのPLGAマイクロモールド成形された粒子
材料および方法

40

単一薬物粒子の開発は、3つの主要な工程：1) シェルのマイクロ作製、2) ワクチン/薬物充填、および3) 粒子密封を含む。

【0143】

シェルのマイクロ作製には、マスク製作（リソグラフィ）、フルオロ-モールド製作（UVコア）およびPLGAの熱プレス（120度30分間）を使用してよい。薬物充填の工程は、Biidotロボットによって実行してもよく、コアを1.5nLの容量の薬物で充填する。PLGAキャップをシェル上に置き、そして次に粒子を37度5分間密封し、そしてアセトンを5分間蒸発させることにより密封を達成する。

【0144】

プロセスの概略図を図12A～12Dおよび24A～24Cに提示する。これらのマイ

50

クロ粒子は、それぞれ 3 7 で 5 分間密封する積み重ねとして製造してよい。

【 0 1 4 5 】

結果

マイクロモールド成形された粒子シェルの x 、 y 、および z 寸法は、 $450 \times 450 \times 300 \mu\text{m}$ で、 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}$ のコアを有する（キャップ寸法は $450 \times 450 \times 150 \mu\text{m}$ ）か、または $200 \times 200 \times 150 \mu\text{m}$ で、 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}$ のコアを有する。これらの寸法により、 21 ゲージの針（内径 $514 \mu\text{m}$ ）または 23 ゲージの針（内径 $337 \mu\text{m}$ ）を用いて粒子を送達することが可能になる。

【 0 1 4 6 】

実施例 8 . 薬物 / 糖溶液を沈着させるための単独の P L A 粒子

10

材料および方法

0.5 M トレハロースおよび 0.5 M スクロース溶液中の I P V を P L A 粒子に沈着させ、次いで幹細胞培養フード内で、室温で乾燥させた。 M a k e r b o t プリンタを使用して、 P L A 粒子を 3 D 印刷してもよい。

【 0 1 4 7 】

結果

この方法によって、糖溶液中の薬物または抗原を基材上に沈着させることが可能になり、そのため薬物または抗原は糖ガラス内で安定化されるので、単独の P L A 粒子は、薬物および抗原の上での乾燥、ならびにその送達に有用なプラットフォームとして役立つ可能性がある。 P L A 粒子上での I P V 抗原の安定性に関する試験を以下の実施例にて提示する。

20

【 0 1 4 8 】

実施例 9 : I P V ミクロスフェアの安定性

前記実施例 1 にて提示される I P V ミクロスフェア形成のプロセスは、製造プロセスの間の I P V 安定性に関する課題をはらんでいる。この課題を、課題を克服する知見の概要と共に表 6 に提示する。

【 0 1 4 9 】

表 6 . I P V 安定性に対する障害、障害を克服するために取られたアプローチおよび知見の概要。

【表6】

障害	アプローチ	知見
IPVが有機溶剤中、または有機性／水性境界で安定でない	ダブルエマルジョン法ではIPVが水性の「泡」中に維持される。有機溶剤との直接接触を最低限にする	<ul style="list-style-type: none"> - ダブルエマルジョンが効果的である - ボルテックスおよび超音波処理のパラメータを調整して、IPV回収を最大にできる
	IPVをBSAまたは温かめ界面活性剤と共にカプセル封入して、乳化の間の水性／有機性界面へのIPVの暴露を低減させる	<ul style="list-style-type: none"> - 賦形剤は回収を改善する、 <ul style="list-style-type: none"> - ゼラチン - Tween(ポリソルベート)80
IPVがエマルジョンを形成する物理的な混合プロセスを切り抜けられない場合がある	低エネルギー混合:ホモジナイス、ボルテックス、低振幅超音波処理等を使用する	
IPVが乾燥後、安定でない	乾燥法(凍結乾燥、空気乾燥、真空)を変える	<ul style="list-style-type: none"> - 室温で、真空中で1時間乾燥させたミクロスフェアは、高いIPV回収を示す
	乾燥中に賦形剤を加える	<ul style="list-style-type: none"> - ソルビトール/MSG/MgCl₂は乾燥中の回収を改善する
	賦形剤と共にカプセル封入する	<ul style="list-style-type: none"> - ソルビトール/MSG/MgCl₂をw/o/oミクロスフェアに共カプセル封入できる
IPVが水和した37°Cの環境においてミクロスフェアマトリックス中で安定でない	IPVを賦形剤と共にカプセル封入して、安定性の維持を助ける	<ul style="list-style-type: none"> - ゼラチンおよびソルビトール/MSG/MgCl₂は経時的な安定性を改善する
IPVがポリマー分解生成物中で安定でない	IPVを塩基性賦形剤と共にカプセル封入して、酸性副産物を緩衝する	<ul style="list-style-type: none"> - IPVは<p>H6または>pH8で安定でない</p> - Mg(OH)₂は酸性副産物を緩衝する
ミクロスフェアが所望の時点で放出のバーストを示さない	ポリマー組成(PLGA分子量、LA-GAの比)を変える	<ul style="list-style-type: none"> - 異なる分子量および比のPLGAをBSAミクロスフェアで試験している
	ポリマーに添加する賦形剤を変える	<ul style="list-style-type: none"> - pHに影響する添加剤を含有するミクロスフェアを試験している

10

20

30

【0150】

実施例10: IPVとゼラチンまたは穏やかな界面活性剤との同時カプセル封入および超音波処理が乳化中のIPV安定性を増加させる

30

材料および方法

IPVを水および/または賦形剤と、100:1のw/w比で混合した。使用した賦形剤はゼラチン、マルトデキストリン、ブルラン、ミリスチン酸、およびTween80であった。次いで賦形剤を伴うIPVをDCM、またはPLGA/DCMに加えた。混合物を最高設定で10秒間ボルテックスするか、または25%の振幅で10秒間超音波処理した。ELISAバッファー(PBS中、1%BSA、1% Triton-X100)を加え、混合物を高設定で10秒間ボルテックスし、そして遠心分離によって層を分離した。水層を除去し、そしてELISAによって試験した。

40

【0151】

結果

ゼラチンおよびTween80の両方がI、IIおよびIII型IPVの安定性を改善した(図25)。

【0152】

IおよびIII型IPVは概して損傷に対して最も鋭敏であり、20%振幅で30秒間の超音波処理で最良の回収を示した(図26)。

【0153】

実施例11: Genevacを用いるIPVおよび賦形剤の乾燥はIPV回収を改善する

材料および方法

IPVを26倍に濃縮し、そしてブルラン、ブルラン/BSA、またはソルビトール/

50

M S G / M g C l₂ と、 1 0 0 : 1、 3 5 0 : 1、 または 7 0 0 : 1 の質量比で混合した。賦形剤を伴う I P V を凍結乾燥（一晩）によって、または Genevac（1時間、30～35）を使用して乾燥させた。賦形剤を伴う乾燥 I P V を再懸濁した後、 E L I S A によって回収を試験した。

【 0 1 5 4 】

結果

凍結乾燥（Lyo）およびGenevacの全ての対となる群で（図27）、Genevacは凍結乾燥よりも高い回収を示した。

【 0 1 5 5 】

実施例12：凍結乾燥した I P V は 37 で長期間安定性を示す

10

材料および方法

I P V を賦形剤である 10% ソルビトール、8.5% M S G、および 8.5% M g C l₂ と 40,000 : 1 で混合し、そしてプラスチックチューブ中で凍結乾燥した。凍結乾燥した、賦形剤を伴う I P V をプラスチックチューブ中で、乾燥剤と共に袋内で、加湿環境および 37 で 30 日まで保存した。種々の時点で、凍結乾燥した I P V を再懸濁し、そして E L I S A によって回収に関して試験した。

【 0 1 5 6 】

結果

賦形剤を伴う凍結乾燥形態の I、II および III 型 I P V は、37 で保存した場合、長期間安定性を示した（図2）。

20

【 0 1 5 7 】

実施例13：P L G A 粒子による放出溶媒の pH の変化

P L G A はバルク浸食によって分解し、ミクロスフェアの内側の酸蓄積をもたらす。インピトロ保存の間に、限定された容量のバッファーはチューブ内に酸蓄積を引き起こす場合があり、それは粒子浸食およびミクロスフェアの内側の酸蓄積に至る場合がある。インピボ適用では、局所環境におけるバッファーは常に補給され、粒子の外側の酸蓄積は最低限である。P L G A はバルク浸食によって分解するので、ミクロスフェアの内側の酸蓄積は問題になる可能性がある。したがって、いくつかの P L G A 分子を、バッファーを 2～3 日毎に、または 7 日毎に変えた場合の放出溶媒の pH の経時的な変化に関して試験した。

30

【 0 1 5 8 】

結果

図29における結果は、P L G A 分子単独で放出溶媒の pH を変化させて、経時にそれをさらに酸性にさせることを実証する。2～3日毎にバッファーを変えることが、この影響を軽減する助けとなるが、それでは問題を解決しない。

【 0 1 5 9 】

実施例14. P L G A ミクロスフェアの酸性生成物を緩衝する賦形剤

I型 I P V は pH 7.4、37 で比較的に安定であり、そして II型 および III型 I P V は pH 6～8、37 で安定であったことが観察された。したがって、いくつかの賦形剤を、P L G A ミクロスフェアの酸性生成物を緩衝するそれらの緩衝能力に関して試験した。

40

材料および方法

M g (O H)₂、A l (O H)₃、およびミリスチン酸のような緩衝剤を P L G A ミクロスフェアに組み込んで、放出溶媒の pH の変化を最小化した。また、M g (O H)₂ は水にほとんど、または全く溶けず、それはポリマーマトリックス全体にわたって分布したままであり、そして潜在的に内部区画を緩衝できる。A l (O H)₃ は公知のアジュvant であり、そして免疫原性を増加させることができる。

【 0 1 6 0 】

結果

図28における結果では、M g (O H)₂ が放出溶媒中の酸性副産物を緩衝でき、そし

50

て約 pH 7 で放出溶媒の pH を安定化できることが実証される。

実施例 15 . 安定化賦形剤を組み込む I P V ミクロスフェア

【0161】

実施例 9 ~ 14 の調査に基づいて、I P V および種々の安定化添加剤を組み込む P L G A ミクロスフェアを作製した。これらの製剤を以下の表 7 に提示し、そして P L G A 5 0 2 H を用いて作った。P L G A 5 0 3 H のような、より高分子量のポリマーを用いる他の製剤もまた企図される。

【表 7】

ポリマー mg (分子量)	およそそのD U I P V 搭載 (I型/II型/III型)	IPV 相への 添加剤	PLGA 相への添加剤	外側の搅拌相 (第2エマルジョン)		混合速度/時間 (第1エマルジョン)	乾燥
				油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒		
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	無し	水相: 1% I P V A, 5% スクロース	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% magistic acid	水相: 1% I P V A, 5% スクロース	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% Al(OH) ₃	水相: 1% I P V A, 5% スクロース	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	8.65 mg S MMA	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% Mg(OH) ₂	水相: 1% I P V A, 5% スクロース	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	
20 (12g)	21662187	ゼラチン 2 mg 4.3 mg S MMA	10% Mg(OH) ₂	油相: trinopal oil + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% Mg(OH) ₂	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	
20 (31g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% Mg(OH) ₂	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (31g)	21662187	ゼラチン 2 mg 4.3 mg S MMA	10% Mg(OH) ₂	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (31g)	21662187	ゼラチン 4 mg	10% Mg(OH) ₂	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	三(乙チル)酸	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し
20 (12g)	21662187	ゼラチン 4 mg	5% Mg(OH) ₂	油相: 鉱物油 + Span 80	ソニケーター 30% 振幅、 30 秒	22 mg S MMA	賦形剤無し

表7. ポリマー分解に基づく薬物／抗原放出のバーストのための安定化添加剤を組み込んだIPVミクロスフェア製剤。
S/M/Mとは10%ソルビトール、8.5%MSG、8.5%MgCl₂を指す。

10

20

30

40

【0162】

実施例 16 . P L A 上での乾燥の後の I P V 安定性により、より低い賦形剤：ワクチン比の使用が可能になる

【0163】

P L A 上で 2 6 倍の三価 I P V を室内の温度および湿度で 1 6 時間乾燥させた後の D 抗

50

原の保持を試験した。使用した賦形剤は 10 % ソルビトール、8.5 % M S G、8.5 % M g C l₂ であった。賦形剤の、試験したワクチンに対する比は 300 対 1、100 対 1、60 対 1、30 対 1、または賦形剤無しであった。保持された D 抗原のパーセントを E L I S A によってアッセイした。

【0164】

結果

P L A 上での溶液の乾燥に際して、比を 30 : 1 にまで下げたときに、安定性の有意な降下は観察されなかった（図 1）。このデータにより、濃縮された賦形剤不含の I P V は、抗原活性を大きく喪失することなく、P L A 立方体上で乾燥させることができることが示された。

10

【0165】

実施例 17. 賦形剤と混合し、P L A 立方体上で乾燥させた濃縮 I P V の他の製剤表 8 に列挙した製剤は、濃縮 I P V を示された賦形剤溶液（「ポリオール」および「その他」の欄）と、示された比（「賦形剤：ワクチン」の欄、全ての示された比は 100 : 1 である）で混合し、そして P L A 立方体上で一晩乾燥させたときに保持された D 抗原 % を表す。

20

【0166】

他に定義しない場合、本明細書で使用する全ての技術的用語および科学的用語は、開示された本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に引用した文献および引用した材料は、具体的に参照によって組み込まれる。当業者は、本明細書に記載する本発明の具体的な実施形態に対する多くの同等のものを認識するか、または通常の実験のみを使用して確認することができる。このような同等のものが以下の請求の範囲によって包含されることを意図する。

【表8】

表8. 示された賦形剤およびIPV(100:1の比)と共に1日間空気乾燥した後にPLA粒子に保持されたD抗原(1型、3型および3型IPV)の/%セント。

		賦形剤(ワクチン)	日	°C	乾燥	保存	1型	2型	3型
ボリオール 無し	その他 シリク	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	4	18	4
マルトデキストリン メチセルロース	アルギニン エクトイン コピキシン	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	7	84	33
HPMC HPMC		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	62	52	57
	MSG	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	59 n/a	79	
無し	ゼラチン,ユビキチン ゼラチン スクロース	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	65 n/a	73	
ヘプタグルコン酸Ca トレハロース	リン酸Ca スレオニン ゼラチン	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	75	74	79
CMC		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	77	78	79
グリセロール ヘプタグルコン酸Ca	MSG ゼラチン ペプトン ユビキチン マンニール グルタミン シリビトール マルトデキストリン マルトデキストリン マンニール トレハロース シリビトール スクロース シリビトール	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	78	80	86
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	81	83	84
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	82	82	84
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	82	84	86
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	85 n/a	85	83
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	84	87	85
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	84	91	90
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	91 n/a	89	
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	90	88	90
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	88 n/a	94	
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	93	95	91
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	92	94	92
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	93	90	92
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	96 n/a	92	
		100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	95 n/a	97	
	MSG, MgCl2	100	1	25	空気乾燥	BSLキャビネット	90	95	99

【図1】

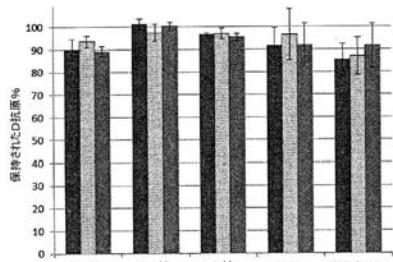
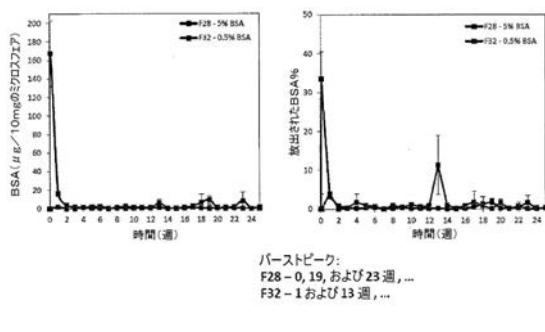


FIG. 1

【図3】

モデルタンパク質放出動態
PLLA - 50k



FIGS. 3A および 3B

【図2】

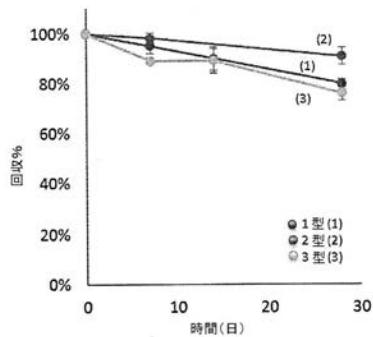
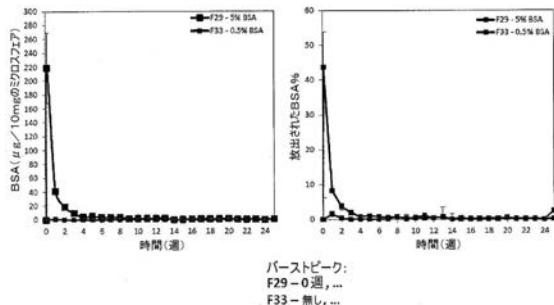


FIG. 2

【図4】

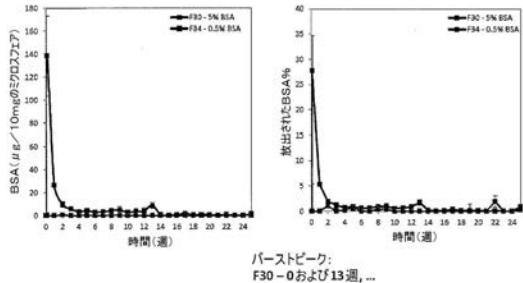
モデルタンパク質放出動態
PLLA - 100k



FIGS. 4A および 4B

【図5】

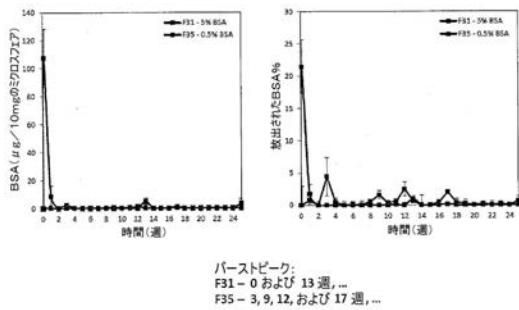
モデルタンパク質放出動態
PLLA - 300k



FIGS. 5A および 5B

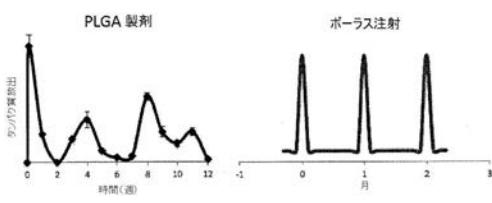
【図6】

モデルタンパク質放出動態
P(d,l)LA - 20k



FIGS. 6A および 6B

【図7】

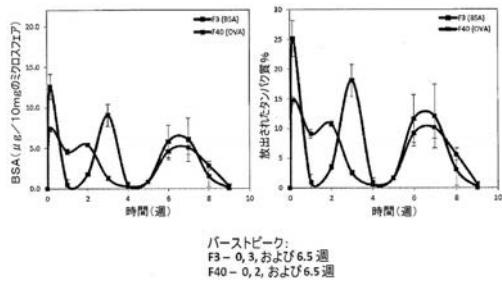


FIGS. 7A

FIG. 7B

【図8】

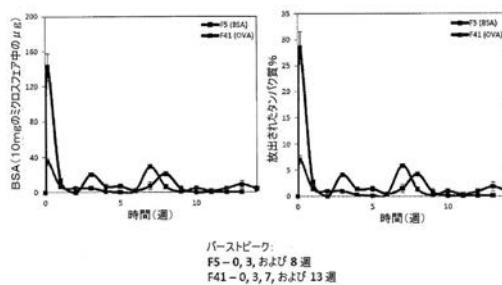
モデルタンパク質放出動態
PLGA-COOH - 50/50 - 20k, 0.5% 搭載



FIGS. 8A および 8B

【図9】

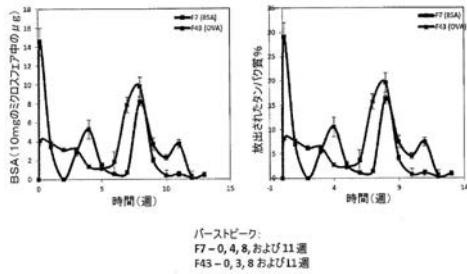
モデルタンパク質放出動態
PLGA-COOH - 50/50 - 31k, 5% 搭載



FIGS. 9A および 9B

【図10】

モデルタンパク質放出動態
PLGA-COOH - 50/50 - 31k, 0.5% 搭載



FIGS. 10A および 10B

【図11】

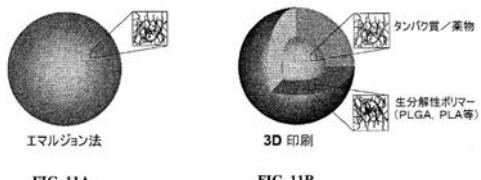


FIG. 11A

FIG. 11B

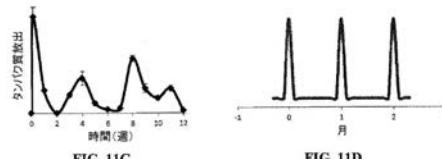


FIG. 11C

FIG. 11D

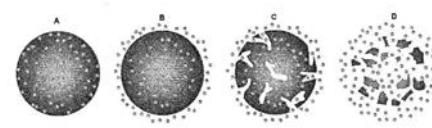


FIG. 11E

【図12】

3D印刷カプセル封入プロセス

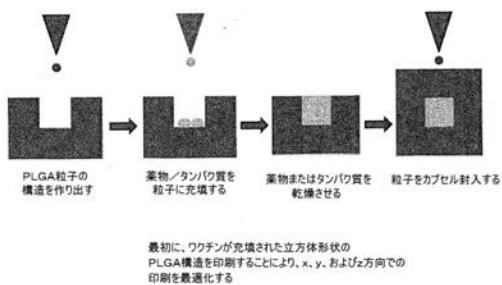


FIG. 12A

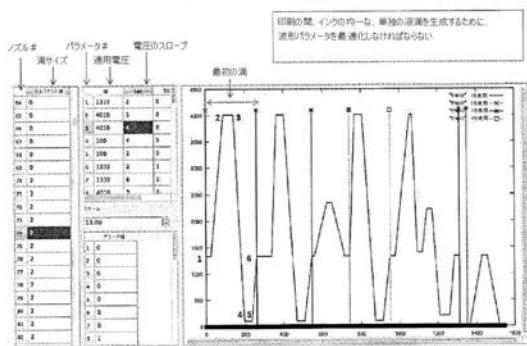
FIG. 12B

FIG. 12C

FIG. 12D

【図13】

圧電式ノズル噴射の波形



【図 16B】

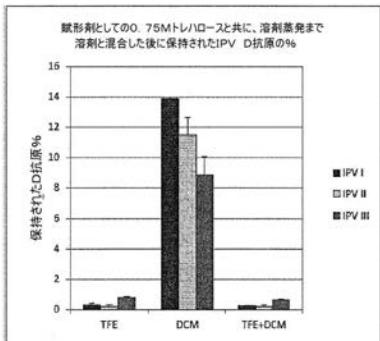


FIG. 16B

【図 17B】

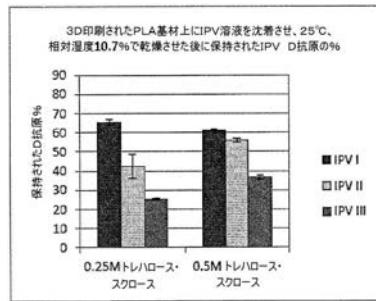


FIG. 17B

【図 17A】

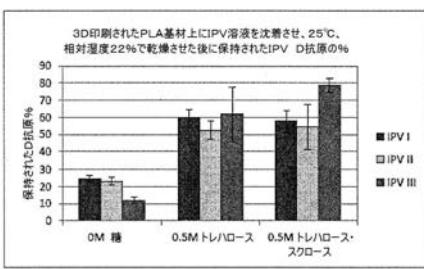


FIG. 17A

【図 18A】

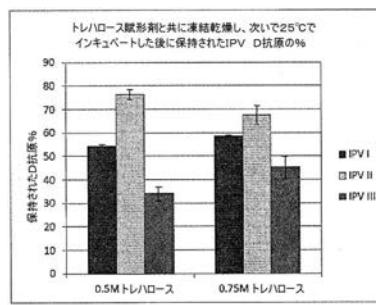


FIG. 18A

【図 18B】

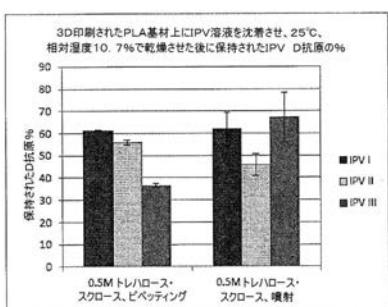


FIG. 18B

【図 19A B】

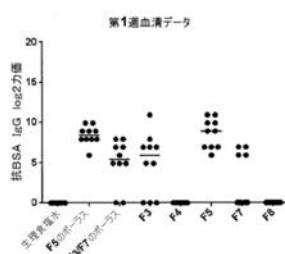


FIG. 19A

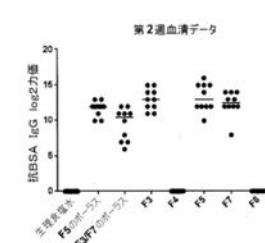


FIG. 19B

【図 19C】

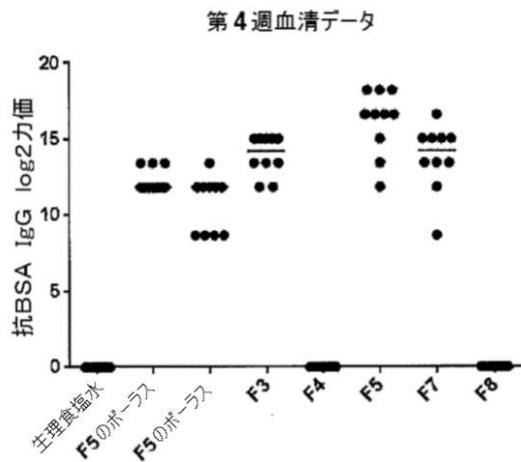


FIG. 19C

【図 20】

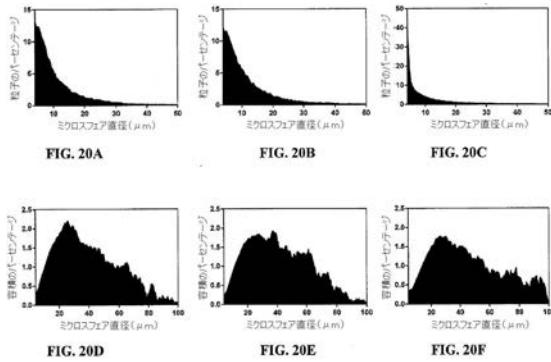


FIG. 20D

FIG. 20B

FIG. 20C

FIG. 20E

FIG. 20F

【図 21】

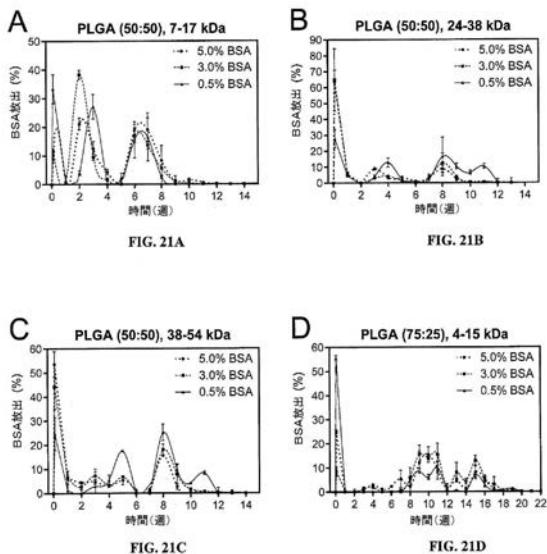


FIG. 21A

FIG. 21B

FIG. 21C

FIG. 21D

【図 22】

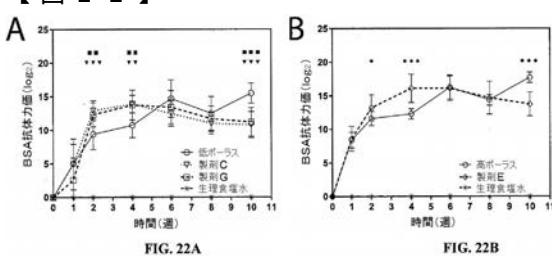


FIG. 22A

FIG. 22B

【図 23】

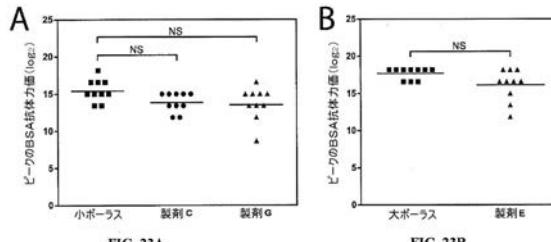


FIG. 23A

FIG. 23B

【図 24】

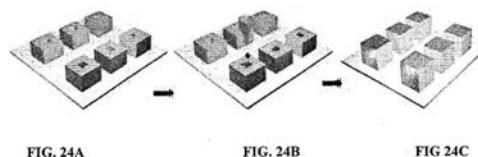


FIG. 24A

FIG. 24B

FIG. 24C

【図 25】

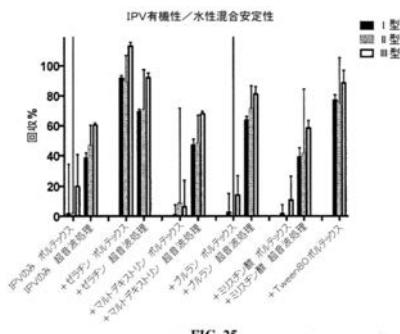
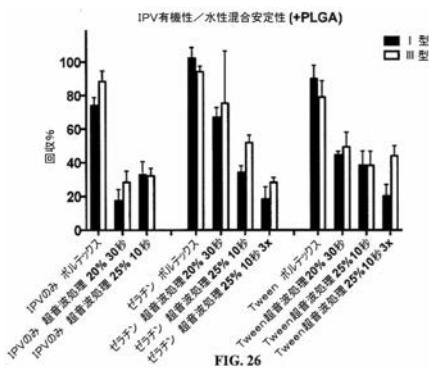
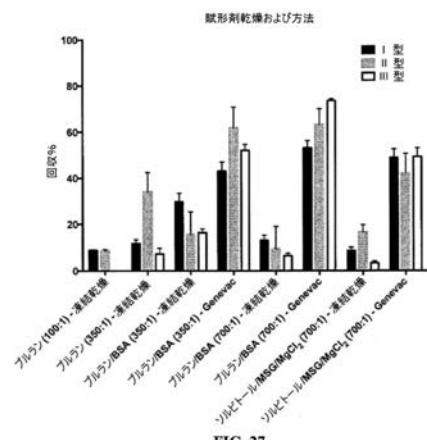


FIG. 25

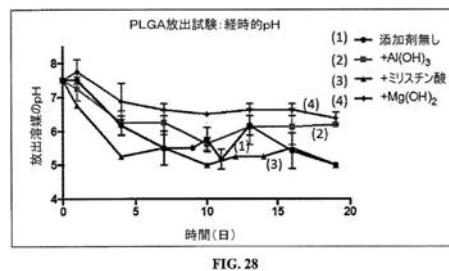
【図26】



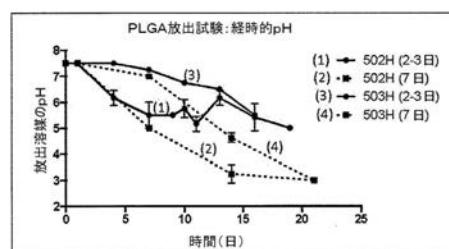
【図27】



【図28】



【図29】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61K39/12 ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N
--

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SANCHEZ A ET AL: "PULSED CONTROLLED-RELEASE SYSTEM FOR POTENTIAL USE IN VACCINE DELIVERY", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 85, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 547-552, XP000587597, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1021/JS960069Y abstract page 548, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 5 page 549, left-hand column, paragraph 1 - page 552, left-hand column -----	1-19
Y	page 548, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 5 page 549, left-hand column, paragraph 1 - page 552, left-hand column ----- -/-	1,2

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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
--

13 March 2015

20/03/2015

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Montero Lopez, B

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070664

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CLELAND J L ET AL: "Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1: Part 4. Optimizing microencapsulation and pulsatile release of MN rgp120 from biodegradable microspheres", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 47, no. 2, 4 August 1997 (1997-08-04), pages 135-150, XP004125825, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/S0168-3659(96)01625-2 abstract	1-19
Y	page 136, left-hand column, paragraph 2 - page 138, right-hand column, paragraph 1; table 6	1,2
	page 148, right-hand column, last paragraph - page 149, left-hand column, paragraph 2	

X	CLELAND J L: "Single-administration vaccines: controlled-release technology to mimic repeated immunizations", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 17, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 25-29, XP004155530, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01272-4 abstract	1-19
Y	page 27, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2	1,2

X	CN 103 251 941 A (UNIV HAINAN) 21 August 2013 (2013-08-21)	1-19
Y	the whole document	1,2

X	WO 2007/027273 A1 (ELAN PHARMA INT LTD [IE]; DEVANE JOHN [IE]; STARK PAUL [IE]; FANNING N) 8 March 2007 (2007-03-08) page 4, line 12 - page 6, line 19 page 7, line 15 - page 8, line 18 page 20, line 24 - page 21, line 24 page 29, line 6 - line 16 page 34, paragraph 4 - page 35, line 7 page 37, line 1 - line 25 page 40, line 1 - line 14 page 47, line 15 - line 28	2,5,11, 13,16,17

	-/-	
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070664

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/033241 A1 (DONOVAN STEPHEN [US]) 19 February 2004 (2004-02-19) page 8, paragraph 0085 - page 9, paragraph 0093 page 10, paragraph 0121 page 11, paragraph 0123 - paragraph 0125 page 11, paragraph 0129 - page 12, paragraph 0133 page 14, paragraph 0169 - paragraph 0171 -----	2,5, 11-13, 15,17
X	JAKLENEC ET AL: "Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta1 from PLGA microsphere-based scaffolds", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 29, no. 10, 31 December 2007 (2007-12-31), pages 1518-1525, XP022433839, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.MATERBULL.2007.03.021 abstract page 1519, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 page 1520, right-hand column, paragraph 1 page 1522, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 page 1524, left-hand column, paragraph 2 -----	2,5, 11-17
Y	NUXOLL ERIC ED - MATTOSSI HEDI ET AL: "BioMEMS in drug delivery", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 65, no. 11, 15 November 2013 (2013-11-15), pages 1611-1625, XP028775843, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2013.07.003 page 1618, left-hand column, paragraph 3 -----	1,2
Y	WO 03/092633 A2 (THERICS INC [US]; WANG CHEN-CHAO [US]; YOO JAEDEOK [US]; BORNANCINI ES) 13 November 2003 (2003-11-13) page 5, line 12 page 11, line 8 - line 25 page 17, line 5 - page 18, line 25 page 30, line 20 - page 31, line 19 -----	1,2
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/070664

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
CN 103251941	A	21-08-2013	NONE		
WO 2007027273	A1	08-03-2007	AU BR CA CN EA EP KR SG WO	2006285349 A1 PI0612297 A2 2613474 A1 101879140 A 200800092 A1 1901722 A1 20080024206 A 162811 A1 2007027273 A1	08-03-2007 03-11-2010 08-03-2007 10-11-2010 30-06-2008 26-03-2008 17-03-2008 29-07-2010 08-03-2007
US 2004033241	A1	19-02-2004	US US	2004033241 A1 2007020295 A1	19-02-2004 25-01-2007
WO 03092633	A2	13-11-2003	AT AU CA EP ES JP JP US US WO	407665 T 2003232078 A1 2483028 A1 1503741 A2 2316791 T3 5041663 B2 2005524702 A 2004005360 A1 2012177696 A1 03092633 A2	15-09-2008 17-11-2003 13-11-2003 09-02-2005 16-04-2009 03-10-2012 18-08-2005 08-01-2004 12-07-2012 13-11-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/13	
A 6 1 K 39/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/165 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 39/20 (2006.01)	A 6 1 K 39/15	
A 6 1 K 39/25 (2006.01)	A 6 1 K 39/165	
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 39/20	
A 6 1 K 39/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/25	
A 6 1 K 39/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/05	
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/10	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/08	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 K 9/50 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 9/50	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
B 2 9 C 67/00 (2017.01)	A 6 1 K 9/14	
B 3 3 Y 80/00 (2015.01)	A 6 1 K 47/34	
	B 2 9 C 67/00	
	B 3 3 Y 80/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ジャクレネック , アナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139 , ケンブリッジ , シドニー ストリート 2
3 , アパートメント 201

(72)発明者 ゲイツ , ウィリアム

アメリカ合衆国 ワシントン 98052-6399 , レッドモンド , ワン マイクロソフト
ウェイ

(72)発明者 エックホフ , フィリップ エー .

アメリカ合衆国 ワシントン 98033 , カークランド , 105ティーエイチ アベニュー

エヌイー 4230

(72)発明者 ニコリック , ポリス

アメリカ合衆国 ワシントン 98101 , シアトル , 1エスティー アベニュー 1107
, アパートメント 1502

(72)発明者 ウッド , ローウェル エル . ジュニア

アメリカ合衆国 ワシントン 98004 , ベルビュー , 112ティーエイチ アベニュー
エヌイー 989 , ナンバー 2310

(72)発明者 ランガー , ロバード エス .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02459 , ニュートン , モントベール ロード 98

(72)発明者 グエン , タン ドゥク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02148 , モールデン , ワシントン ストリート 1
7

(72)発明者 ツェン , ステファニー イー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02144 , サマビル , チェリー ストリート 58 ,
アパートメント 5

(72)発明者 ノーマン , ジェイムズ ジェイ .

アメリカ合衆国 メリーランド 20852 , ベセスダ , ノース , ウッドグレン ドライブ
11357 , エスピーティー . 339

Fターム(参考) 4C076 AA17 AA61 AA94 BB11 BB22 BB25 BB27 BB29 BB30 CC06

CC27 CC31 CC35 DD66Q DD67Q EE24A EE48A EE51Q FF11 FF16

FF32 FF36 FF68

4C085 AA03 AA04 BA02 BA07 BA10 BA12 BA17 BA49 BA51 BA53

BA55 BA56 BA58 BA63 BA78 BA87 BB01 CC07 CC08 DD13

DD14 EE01 EE03 EE05 EE07 GG01 GG10

4F213 AA01 AA24 AB01 AC05 AH81 WA25 WB01 WL02 WL26 WL96