

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-532944

(P2022-532944A)

(43)公表日 令和4年7月20日(2022.7.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-569917(P2021-569917)
 (86)(22)出願日 令和2年5月26日(2020.5.26)
 (85)翻訳文提出日 令和4年1月7日(2022.1.7)
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/034595
 (87)国際公開番号 WO2020/243115
 (87)国際公開日 令和2年12月3日(2020.12.3)
 (31)優先権主張番号 62/852,983
 (32)優先日 令和1年5月25日(2019.5.25)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く

(71)出願人 508296509
 アクセス ツー アドバンスド ヘルス インスティテュート
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト1616番、スイート400
 (74)代理人 110001656
 特許業務法人谷川国際特許事務所
 (72)発明者 クラマー, リャン
 アメリカ合衆国 9 8 0 3 7 ワシントン州, リンウッド, 170番 プレイス サウスウエスト 718
 (72)発明者 アルヒャー, ミシェル
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 7 ワシントン 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アジュバントワクチンエマルジョンを噴霧乾燥するための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、免疫応答を誘導または増強するためのワクチンおよび薬学的組成物を含む熱安定性噴霧乾燥剤ならびにその使用方法を提供する。噴霧乾燥剤は、一般に、抗原および/またはアジュバント、代謝可能な油、ならびに1つ以上の賦形剤を含む乾燥粉末である。

【選択図】図1

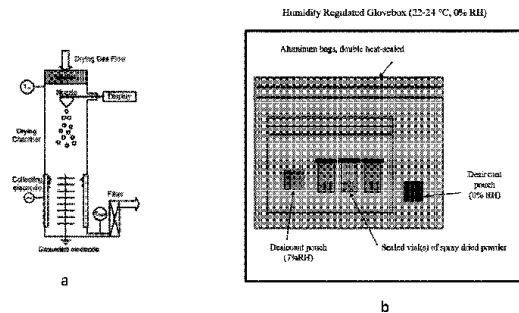


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および 1 つ以上の賦形剤を含む、乾燥粉末ワクチン組成物であって、前記乾燥粉末の粒子サイズが、約 120 μm 未満の直径を有する、乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 2】

有効量のアジュバント、代謝可能な油、および 1 つ以上の賦形剤を含む、乾燥粉末ワクチン組成物であって、前記乾燥粉末の粒子サイズが、約 120 μm 未満の直径を有する、乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 3】

前記粒子が、約 20 μm 未満の直径を有する、請求項 1 または 2 に記載の噴霧乾燥ワクチン組成物。

【請求項 4】

前記 1 つ以上の賦形剤が、トレハロース、ラクトース、ラフィノース、およびラクツロースからなる群から選択される糖である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記代謝可能な油が、スクアレン、合成スクアレン、ブドウ種子油、ポリプレノール、オリーブ油、または合成イソプレノイドから選択される、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記アジュバントが、TLR4 アゴニストである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記組成物が、約 8 ~ 約 60 の温度で少なくとも 1 ヶ月間熱安定性である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、少なくとも 3 ヶ月間熱安定性である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、少なくとも 6 ヶ月間熱安定性である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が、少なくとも 12 ヶ月間熱安定性である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロール - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DSPC)、卵 PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記代謝可能な油が、スクアレンである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 TLR4 アゴニストが、MPL、3d-MPL、または合成 GLA である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 TLR4 アゴニストが、GLA である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記粒子サイズが、約 20 μm 未満であり、前記組成物が、吸入可能である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記抗原が、ポリペプチド、ポリペプチドをコードする核酸、または病原体である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記乾燥粉末が、噴霧乾燥によって生成される、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 18】

有効量のアジュバント、代謝可能な油、および 1 つ以上の賦形剤を含む、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物であって、前記乾燥粉末の粒子サイズが、約 120 μm 未満の直径を有する、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 19】

有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および 1 つ以上の賦形剤を含む、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物であって、前記乾燥粉末の粒子サイズが、約 20 μm 未満の直径を有する、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 20】

前記粒子が、約 10 μm 未満の直径を有する、請求項 18 または 19 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

10

【請求項 21】

前記粒子が、100 nm ~ 300 nm の直径を有する、請求項 20 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 22】

前記組成物が、約 8 ~ 約 60 の温度で少なくとも 1 ヶ月間熱安定性である、請求項 18 または 19 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 23】

シェル形成剤をさらに含む、請求項 18 または 19 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

20

【請求項 24】

前記シェル形成剤が、ロイシンである、請求項 23 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

【請求項 25】

1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロール - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DSPC)、卵 PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 18 または 19 に記載の吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物。

30

【請求項 26】

熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を生成するための方法であって、水中油型エマルジョンを噴霧乾燥して熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を形成するステップを含み、前記水中油型エマルジョンが、(1) 抗原、(2) 代謝可能な油、(3) 1 つ以上の賦形剤、(4) アジュバント、および (5) シェル形成剤を含む、方法。

【請求項 27】

前記噴霧乾燥ワクチンを、乾燥剤パウチと一緒にダブルヒートシーリングでアルミニウムバッグにパッケージングすることをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記水中油型エマルジョンが、シェル形成剤をさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記水中油型エマルジョンが、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロール - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、卵 PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

所定のプロセスパラメータで微粒化ガスを使用して噴霧乾燥機において前記組成物を噴霧乾燥して、噴霧乾燥粉末ワクチンを得ることをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

50

前記パラメータが、10 psiの微粒化ガス圧力、0.6 mL/分の微粒化ガス流量、および200 SLPMの乾燥ガス流量を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を対象に投与する方法であって、熱安定性乾燥粉末ワクチンを前記乾燥粉末の吸入を介して投与することを含む、方法。

【請求項33】

前記乾燥粉末ワクチンの粒子サイズの直径が、約20 μm未満である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を対象に投与する方法であって、熱安定性乾燥粉末ワクチンを前記乾燥粉末の呼吸器送達を介して投与することを含む、方法。 10

【請求項35】

前記呼吸器送達が、鼻または肺経路を介する、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記乾燥粉末ワクチンの粒子サイズの直径が、約120 μm未満である、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を対象に投与する方法であって、(1)乾燥粉末ワクチンを水性希釈剤で再構成することと、(2)再構成された前記乾燥粉末ワクチンを非経口経路を介して投与することと、を含む、方法。 20

【請求項38】

前記熱安定性乾燥粉末ワクチンが、請求項1、2、または17に記載の組成物である、請求項32、34、または37に記載の方法。

【請求項39】

呼吸成分を有する疾患を治療する方法であって、乾燥粉末の吸入を介して熱安定性乾燥粉末ワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項40】

呼吸成分を有する前記疾患が、結核(TB)、インフルエンザ(流感)、呼吸器合胞体ウイルス感染症(RSV)、および肺癌を含む、請求項39に記載の方法。

【発明の詳細な説明】 30

【技術分野】

【0001】

本明細書は、一般に、アジュバントおよび/またはアジュバント/抗原エマルジョンを噴霧乾燥するための乾燥粉末組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

パンデミックに備えてワクチンを備蓄すること、および遠隔または発展途上地域へのワクチンの提供は、冷蔵なしでのワクチン製剤化安定性の欠如によって制限される。これは、特に遠隔地域への輸送中の、冷蔵利用可能性の欠如のために、発展途上国へワクチンを提供することを困難にし得る。ワクチンについてのコールドチェーンの要件を排除することは、貯蔵および輸送のコストを大幅に低減し、パンデミックのための備蓄をさらに単純化するであろう。加えて、既存ワクチンは、一般に、対象へのワクチンの投与前に、抗原のアジュバントとの混合を必要とする。投与前に混合を必要としない1バイアルワクチンの提供は、損失のリスクを大幅に低減し、ワクチン接種のプロセスを単純化するであろう。 40

【0003】

背景セクションで議論される主題は、単に背景セクションにおけるその言及の結果として先行技術であると想定されるべきではない。同様に、背景セクションにおいて言及されるか、または背景セクションの主題に関連する問題および問題の原因の理解は、先行技術において以前に認識されていたと想定されるべきではない。背景セクションにおける主題は、単に異なるアプローチを表し得、それ自体も発明であり得る。本明細書で引用されるす 50

べての刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0004】

本発明の一態様は、有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および1つ以上の賦形剤を含む、乾燥粉末ワクチン組成物であり、乾燥粉末の粒子サイズは、約120 μm未満の直径を有する。本発明の他の態様は、有効量のアジュバント、代謝可能な油、および1つ以上の賦形剤を含む、乾燥粉末ワクチン組成物であり、乾燥粉末の粒子サイズは、約120 μm未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、乾燥粉末ワクチンの粒子は、約20 μm未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、1つ以上の賦形剤は、トレハロース、ラクトース、ラフィノース、およびラクツロースからなる群から選択される糖である。いくつかの実施形態において、代謝可能な油は、スクアレン、合成スクアレン、ブドウ種子油、ポリプレノール、オリーブ油、または合成イソプレノイドから選択される。いくつかの実施形態において、アジュバントは、TLR4アゴニストである。いくつかの実施形態において、組成物は、約8 ~ 約60 の温度で少なくとも1ヶ月間熱安定性である。いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも12ヶ月を含む、少なくとも6ヶ月を含む、少なくとも3ヶ月間熱安定性である。

10

【0005】

いくつかの態様において、組成物は、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DSPC)、卵PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態において、代謝可能な油は、スクアレンである。いくつかの実施形態において、TLR4アゴニストは、MPL、3d-MPL、または合成GLAである。いくつかの実施形態において、TLR4アゴニストは、GLAである。いくつかの実施形態において、粒子サイズは、約120 μm未満であり、組成物は、吸入可能である。いくつかの実施形態において、抗原は、ポリペプチド、ポリペプチドをコードする核酸、または病原体である。いくつかの実施形態において、乾燥粉末は、噴霧乾燥によって生成される。

20

【0006】

本発明の他の態様は、有効量のアジュバント、代謝可能な油、および1つ以上の賦形剤を含む、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物を含み、乾燥粉末の粒子サイズは、約120 μm未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、吸入可能な乾燥粉末ワクチン組成物は、有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および1つ以上の賦形剤を含み、乾燥粉末の粒子サイズは、約20 μm未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、吸入可能な乾燥粉末ワクチンの粒子は、約10 μm未満または100 nm ~ 300 nmと低い直径を有する。いくつかの実施形態において、組成物は、約8 ~ 約60 の温度で少なくとも1ヶ月間熱安定性である。いくつかの実施形態において、組成物は、ペプチドまたはアミノ酸の群に由来するシェル形成剤を含む。いくつかの実施形態において、シェル形成剤は、ロイシンである。いくつかの実施形態において、組成物は、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DSPC)、卵PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせを含む。

30

40

【0007】

本発明の他の態様は、水中油型エマルジョンを噴霧乾燥して熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を形成するステップを含む、熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を生成するための方法であり、水中油型エマルジョンは、(1)抗原、(2)代謝可能な油、(3)1つ以上の賦形剤、(4)アジュバント、および(5)シェル形成剤を含む。いくつかの実施形態において、方法は、噴霧乾燥ワクチンを、乾燥剤パウチと一緒にダブルヒートシーリングで

50

アルミニウムバッグにパッケージングすることを含む。いくつかの実施形態において、水中油型エマルジョンは、シェル形成剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、水中油型エマルジョンは、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロール - 3 - ホスホコリン (POPC)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、卵PC、レシチン、Tween、またはそれらの組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、噴霧乾燥粉末ワクチンを得るために、所定のプロセスパラメータで微粒化ガスを使用して噴霧乾燥機において組成物を噴霧乾燥することを含む。いくつかの実施形態において、パラメータは、10 psiの微粒化ガス圧力、0.6 mL / 分の微粒化ガス流量、および200 SLPMの乾燥ガス流量を含む。

10

【0008】

本発明の他の態様は、熱安定性乾燥粉末ワクチンを乾燥粉末の吸入を介して投与することを含む、熱安定性乾燥粉末治療剤組成物を対象に投与する方法である。

【0009】

本発明の他の態様は、(1)乾燥粉末ワクチンを水性希釈剤で再構成することと、(2)再構成された乾燥粉末ワクチンを非経口経路を介して投与することと、を含む、熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物を対象に投与する方法である。いくつかの実施形態において、熱安定性乾燥粉末ワクチンは、本明細書で提供される組成物のいずれかである。

【0010】

本発明の他の態様は、熱安定性乾燥粉末治療剤を乾燥粉末の吸入を介して投与することを含む、乾燥粉末治療剤組成物を対象に投与する方法である。方法によって誘発される治療的免疫応答は、癌の治療のためのものであり得る。方法はまた、乾燥粉末治療剤を再構成後に非経口的に投与することを含む。いくつかの実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、結核(TB)、インフルエンザ(流感)、呼吸器合胞体ウイルス感染症(RSV)、および肺癌を含むがこれらに限定されない、呼吸成分を有する疾患において治療上の利益を示し得る。いくつかの実施形態において、送達吸入を介する場合、粒子サイズは、約20 μm未満である。いくつかの実施形態において、送達が呼吸経路(鼻または肺など)を介する場合、粒子サイズは、約120 μm未満である。

20

【0011】

上記の実施形態のいずれも、単独で、または任意の組み合わせで互いに一緒に使用され得る。本明細書内に包含される発明はまた、この概要において、または要約において、部分的にのみ言及もしくは示唆されるか、またはまったく言及もしくは示唆されない実施形態を含み得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0012】

以下の図面では、同様の参照番号が同様の要素を参照するために使用される。以下の図は本発明の様々な例を示すが、本発明は図に示される例に限定されない。

【0013】

【図1】図1aはナノ噴霧乾燥機の機能原理を示す単純化された概略図を示す。図1bは粉末貯蔵中の湿度制御を確実にするためのパッケージングプロトコルについての単純化された概略図を示す。

40

【図2】示された温度で3ヶ月にわたって貯蔵された再構成SD-TG粉末(左)および再構成SD-TGI粉末(右)についてのA)スクアレン濃度、B)ナノエマルジョン直径サイズ、およびC)ナノエマルジョンの多分散指数を示すプロットを示す。凡例は、粉末についての貯蔵温度を示す。エラーバーは、3つの測定値の標準偏差を示す。略語: SD-TG、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE、SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン。

【図3】a)SD-TG微粒子、b)SD-TGI微粒子、c)100 mg/ml噴霧乾燥トレハロース、d)凍結乾燥TT(凍結乾燥有力候補)のSEM画像を示す。尺度は、

50

それぞれの画像上に提供される。略語：SD-TG、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE、SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン。

【図4】内部形態を示すために、ひびの入ったSD-TG微粒子のSEM画像を示す。尺度は、それぞれの画像上に提供される。略語：SD-TG、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン。

【図5】a) 加速貯蔵後に試料が外部形態を維持し、b) 内部粒子構造が維持されることを示す40で3ヶ月の貯蔵後のSD-TGI粉末のSEM画像を示す。尺度は、それぞれの画像上に提供される。略語：SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン。

【図6】a) 加速貯蔵後に試料が外部形態を維持し、b) 内部粒子構造が維持されることを示す40で3ヶ月の貯蔵後のSD-TGI粉末のSEM画像を示す。尺度は、それぞれの画像上に提供される。略語：SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン

【図7】SD-TG粉末試料の正規化されたラマンスペクトル、ならびに非晶質トレハロース、スクアレン、7.5pHの1Mトリス緩衝剤、および結晶トレハロースの参照スペクトルを示す。生の測定されたSD-TGスペクトルから個々の成分の寄与を差し引くことによって得られる、正規化された剰余スペクトルも示される。略語：SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93、GLA、グルコピラノシル脂質アジュバント、SE、スクアレン水中油型エマルジョン。

【図8】5、25、および40で3ヶ月の貯蔵後、ならびに時点0で示される、SD-TGI粉末製剤の正規化されたラマンスペクトルを示す。示されるすべての試料は、 460 cm^{-1} のピークに従って正規化された。時点0で得られるスペクトルから3ヶ月、40スペクトルを差し引いて得られる剰余スペクトルも示される。本質的にまっすぐな残りのスペクトルは、40で3ヶ月間貯蔵されたSD-TGI粉末が、安定性研究の開始時と有意に異なる固相を有しないことを示す。図8は次世代インパクト(NGI)の図を示す。示されるバージョンは、Alberta Idealized Throatと組み合わせられており、ヒト喉および肺における沈着をモデル化するために使用することができる。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の様々な実施形態は、本明細書における1つ以上の場所で議論または示唆され得る、先行技術で様々な欠陥によって動機付けられ得るが、本発明の実施形態は、これらの欠陥のいずれにも必ずしも対処しない。言い換えれば、本発明の異なる実施形態は、本明細書において議論され得る異なる欠陥に対処し得る。いくつかの実施形態は、本明細書において議論され得るいくつかの欠陥またはただ1つの欠陥に部分的にのみ対処する場合があります、いくつかの実施形態は、これらの欠陥のいずれにも対処しない場合がある。

【0015】

一態様において、噴霧乾燥は、抗原もしくはアジュバント、または両方を含有する乾燥粉末ワクチンを生成するために使用される。よって、本発明は、有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および1つまたは複数の賦形剤を含む乾燥粉末ワクチン組成物を提供し、乾燥粉末の粒子サイズは、呼吸器送達(例えば、鼻または肺)の場合には、約 $120\text{ }\mu\text{m}$ 未満の直径、または呼吸器送達(例えば、吸入による)の場合には約 $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満の直径を有する。他の実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、抗原を有しない。いくつかの実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、アジュバントを有しない。いくつかの実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、2つ以上の抗原もしくはアジュバント、または両方を有する。乾燥粉末ワクチンは、製剤化し、噴霧乾燥して、吸入を介した投与を促進する粒

10

20

30

40

50

子サイズを作製することができる。よって、いくつかの態様において、乾燥粉末ワクチンは、19 μm 、18 μm 、17 μm 、16 μm 、15 μm 、14 μm 、13 μm 、12 μm 、11 μm 、10 μm 、9 μm 、8 μm 、7 μm 、6 μm 、5 μm 、4 μm 、3 μm 、2 μm 、1 μm 、900 nm未満、800 nm未満、700 nm未満、600 nm未満、500 nm未満、400 nm未満、300 nm未満、200 nm未満、および100 nm未満を含むがこれらに限定されない、約20 μm 未満の粒子サイズを有する。いくつかの実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、110 μm 、100 μm 、90 μm 、80 μm 、70 μm 、60 μm 、50 μm 、40 μm 、30 μm 、および20 μm を含むがこれらに限定されない、約120 μm 未満の粒子サイズを有する。いくつかの実施形態において、吸入可能な乾燥粉末ワクチンのための製剤はまた、シェル形成剤（例えば、ロイシン）を含む。本発明の他の態様は、熱安定性および/または吸入可能である乾燥粉末ワクチン組成物を作製する方法である。

10

【0016】

当業者が理解するように、噴霧乾燥ワクチン、噴霧乾燥アジュバント混合物、噴霧乾燥ワクチン組成物、熱安定性噴霧乾燥ワクチン、乾燥粉末ワクチン、乾燥粉末アジュバント、および乾燥粉末ワクチン組成物という用語は、本明細書において交換可能に使用される。この用語は、一般的には、有効量の抗原、アジュバント、代謝可能な油、および1つ以上の賦形剤を含む、噴霧乾燥粉末を指し、乾燥粉末の粒子サイズは、約50 μm 未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、乾燥粉末の粒子サイズは、約20 μm 未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、乾燥粉末の粒子サイズは、10 μm 未満、5 μm 未満、4 μm 未満、3 μm 未満、2 μm 未満、1 μm 未満、900 nm未満、800 nm未満、700 nm未満、600 nm未満、500 nm未満、400 nm未満、300 nm未満、200 nm未満、および100 nm未満を含むがこれらに限定されない、15 μm 未満の直径を有する。ワクチンは、乾燥粉末として（吸入を介して）または再構成後に（例えば、非経口経路を介して）投与することができる。

20

【0017】

本明細書で提供されるように、噴霧乾燥ワクチンは、熱安定性である。例えば、組成物は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、および55を含むがこれらに限定されない、約8 ~ 約60 で安定である。そのような組成物は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される、緩衝剤、酸、塩基、糖、希釈剤、防腐剤、シェル形成剤、凍結保存剤などを含む薬学的に許容される賦形剤（担体）などの適切な賦形剤をさらに含む。

30

【0018】

ワクチンなどの液体材料の、乾燥粉末への変換は、冷蔵および輸送に関連するコストを低減するであろう。噴霧乾燥は、粉末が特定の特性を有するように操作されることを可能にするため、独特な解決策を提供する。そのようなものとして、本明細書の例において、噴霧乾燥は、水中油型ナノエマルジョンとして製剤化された、アジュバント添加結核ワクチンを、乾燥粉末内にカプセル化する方法として調査された。非凝集性、非晶質微粒子内のアジュバント添加ワクチンのカプセル化の成功は、すべての成分の高い保持率で、1回の反復で達成された。粉末の安定性は、異なる温度で3ヶ月にわたって調査された。結果は、粉末がすべての温度について物理的に安定であったことを示した。再構成された粉末に対する物理化学的分析は、すべての試料についてナノエマルジョンサイズが維持されたが、上昇した温度での貯蔵で小さな抗原およびアジュバントの経時的な損失を示した。これらの概念実証結果は、さらなる製剤開発を介した安定性改善の余地がある、アジュバント添加ワクチンカプセル化の新規方法を示す。噴霧乾燥の使用はまた、吸入可能な送達経路を可能にする。

40

【0019】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載される噴霧乾燥ワクチン組成物をエマルジョンに再構成し、エマルジョンを対象に投与することを含む、対象における免疫応答を刺激するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、エマルジョンは、水

50

中油型エマルジョンである。いくつかの実施形態において、免疫応答は、非特異的免疫応答である。いくつかの実施形態において、免疫応答は、抗原特異的免疫応答である。免疫応答を刺激するための本明細書に記載される方法、または本明細書に記載される再構成された熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物は、単独で、または他の従来の治療方法（例えば、化学療法剤）と組み合わせて使用することができる。別の実施形態において、本発明は、乾燥粉末を（吸入を介して）再構成なしに対象に投与することを含む、対象における免疫応答を刺激するための方法を提供する。

【0020】

いくつかの態様において、本発明は、癌、自己免疫疾患などの治療のための治療剤を投与するための方法を提供する。方法は、治療量の乾燥粉末組成物を吸入または他の方法を介して肺または呼吸器系に投与することを含み得る。方法は、乾燥粉末組成物を再構成し、次いで再構成された組成物を非経口的に投与することを含み得る。

10

【0021】

いくつかの態様において、噴霧乾燥ワクチン組成物が試験され、ナノエマルジョンサイズがすべての試料について維持された。室温で液体である物質のナノエマルジョンがゲル-微粒子に変換され、有意な損失なしに同じ液滴サイズに再構成され得ることは、当該分野において知られていなかったもので、これは驚くべき結果であった。以前の試みは、液滴サイズの有意な損失または変化のいずれかをもたらした。

【0022】

いくつかの実施形態において、本明細書における「約」の値またはパラメータの参照は、その値またはパラメータ自体に向けられる変形を含む（および説明する）。例えば、「約 X」を参照する説明は、「X」の説明を含む。

20

【0023】

定義

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態「を含む」、「からなる」、および「から本質的になる」ことを含むことが理解される。

【0024】

「個体」または「対象」は、哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、これらに限定されないが、農場動物、スポーツ動物、ペット（ネコ、イヌ、ウマなど）、霊長類、マウス、およびラットも含まれる。

30

【0025】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の参照を含む。

【0026】

本明細書で使用される場合、「噴霧乾燥エマルジョン」は、「乾燥粉末ワクチン」、「乾燥粉末」、「乾燥粉末アジュバント」、「乾燥粉末組成物」、「噴霧乾燥組成物」、「噴霧乾燥ワクチン」、「粉末」、および「乾燥エマルジョン」と交換可能に使用される。

【0027】

本明細書で使用される場合、「再構成された」乾燥粉末ワクチンまたはワクチンは、液体を乾燥粉末に添加することを指す。これは、ワクチンを投与するためであってもよく、またはワクチンを試験するためであってもよい。

40

【0028】

本明細書で使用される場合、「噴霧乾燥」は、エアロゾル化された溶液液滴の乾燥を通して粉末を生成するプロセスである。

【0029】

本明細書で使用される賦形剤は、薬理的に活性な薬物の製造プロセス、または貯蔵もしくは出荷のための充填仕上げプロセスに含まれる、薬理的に活性な薬物以外の物質を指す。本明細書で使用される「噴霧乾燥賦形剤」または「賦形剤」は、適切な粉末構造の形態または製剤化に寄与する噴霧乾燥プロセスに含まれる薬理的に活性な薬物以外の物質を指し得る。賦形剤には、増量剤、緩衝剤、乳化剤、または可溶化剤が含まれ得る。

50

【0030】

GLA-SEは、To11様受容体4アゴニストであるグルコピラノシル脂質アジュバント安定性エマルジョン(GLA-SE)、水中スクアレン型エマルジョン(SE)に製剤化された合成TLR4アゴニストであるグルコピラノシル脂質アジュバント(GLA)からなるワクチンアジュバントである。GLA-SEは、様々なワクチン抗原に対するTH1およびIgG2に歪んだ抗体応答の両方を増強する。

【0031】

ID93は、Mtbタンパク質の異なるファミリーを表す4つの抗原で構成されるサブユニットTBワクチン候補である。Rv1813は、低酸素成長下で上方調節され、外膜に局在化されることが予測される保存された仮想タンパク質である。Rv2608(PPE42)は、推定外膜関連PPE(Pro-Pro-Glu(PPE)モチーフ含有)タンパク質である。Rv3619(EsxV)およびRv3620(EsxW)は、病原性因子のESAT-6ファミリーに属する分泌タンパク質である。4つのID93抗原は、Mtb曝露個体において認識されることが示されている。

10

【0032】

噴霧乾燥は、医薬品、食品、バイオテクノロジー、および他の工業材料合成に使用される、溶液、分散液、およびエマルジョンから定義された粒子サイズを有する粉末を生成するための穏やかな方法である。図1aは、噴霧乾燥が乾燥ガスを使用して微粒化粒子から溶媒(または水)を急速に蒸発させ、溶液の固体成分(乾燥粉末)のみを残す、典型的な噴霧乾燥技法の図を示す。乾燥媒体は、典型的には、空気であるが、液体が可燃性溶媒である場合、または生成物が酸素感受性である場合、不活性ガス、例えば、窒素を使用することができる。

20

【0033】

以前には、噴霧乾燥の制限は、粒子サイズ(最小2マイクロメートル)、収率(最大約70%)、および試料体積(実験室規模のデバイスについて最小50ml)であった。最近、最小粒子サイズは300nmに低減され、最大90%の収率が可能であり、試料は1mlまで小さくなり得る。これらの拡張された限界は、スプレーヘッド、加熱システム、および静電粒子捕集器への新しい技術開発により可能である。この新技術で可能な小さな粒子サイズを強調するために、「ナノ」噴霧乾燥として記載されている。しかしながら、生成される最小の粒子は、ナノメートル尺度の超微細粒子ではなく、微細粒子に共通するサブマイクロメートル範囲にある。

30

【0034】

一般的な技法

本発明の実施は、他に示されない限り、当該分野の技術内である分子生物学、組換えDNA、生化学、および化学の従来技法を使用するであろう。そのような技法は、文献で完全に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989)、DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984)、Mullis et al., 米国特許第4,683,195号、Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984)、B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)、論文、Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)、およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)を参照されたい。

40

【0035】

噴霧乾燥アジュバントまたは抗原組成物の特徴

50

抗原および/またはアジュバントを含む噴霧乾燥組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、噴霧乾燥組成物は、乾燥粉末ワクチン組成物である。乾燥粉末ワクチン組成物は、抗原組成物、アジュバント組成物、および/または抗原/アジュバント(1バイアル)組成物であり得る。本発明は、抗原、アジュバントワクチン組成物を噴霧乾燥および貯蔵、維持、または約8 ~ 約60の温度に曝露することができ、組成物を再構成形態でまたは吸入を介して乾燥粉末として投与することができることを記載する。さらに、再構成される場合、組成物は、以下の特徴のうちの1つ以上を有し得る：(1)生理学的7.4付近で望ましいpHを維持し、(2)凝集をほとんどまたは全く有しない120 μm未満の粒子サイズを維持し、(3)各活性成分(例えば、抗原、アジュバント)の有意な劣化または改変を全く示さず、(4)対象における免疫応答を誘導または刺激するのに適している。 10

【0036】

本明細書で提供される噴霧乾燥された(乾燥粉末)ワクチン組成物の熱安定性は、噴霧乾燥された(粉末)状態で、または再構成後に評価することができる。本明細書で提供される噴霧乾燥されたワクチン組成物の熱安定性は、目視観察によって、および/または本明細書で提供される1つ以上のアッセイの補助で評価することができる。これらのアッセイは、噴霧乾燥および再構成後のエマルジョン、抗原、および/またはアジュバントの完全性の推定値を提供することができる。

【0037】

本明細書に記載される熱安定性アッセイおよび観察は、噴霧乾燥時に、噴霧乾燥の1時間後、噴霧乾燥の6時間後、噴霧乾燥の12時間後、噴霧乾燥の24時間後、噴霧乾燥の36時間後、噴霧乾燥の48時間後、噴霧乾燥の1週間後、噴霧乾燥の2週間後、噴霧乾燥の1ヶ月後、噴霧乾燥の2ヶ月後、噴霧乾燥の3ヶ月後、噴霧乾燥の4ヶ月後、噴霧乾燥の6ヶ月後、噴霧乾燥の12ヶ月後、またはそれ以降に実施することができる。アッセイおよび観察を実施する前に、組成物は、約8以上、例えば、約25以上、約37以上、または約50以上、または約60の温度で維持、貯蔵、または曝露することができる。 20

【0038】

本明細書に記載される熱安定性アッセイおよび観察は、乾燥粉末組成物の再構成時、再構成直後、再構成の1時間後、再構成の6時間後、再構成の12時間後、再構成の24時間後、再構成の36時間後、再構成の48時間後、または再構成の1週間後に実施することができる。 30

【0039】

当業者は、本発明が、先進国または発展途上世界において周囲温度により近づく温度で貯蔵および/または出荷することができる乾燥粉末ワクチン組成物を提供するように設計されることを理解し、したがって、いくつかの実施形態において、噴霧乾燥組成物は、2つ以上の温度または約8 ~ 約60の温度の組み合わせに維持、貯蔵、または曝露される。

【0040】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される乾燥粉末ワクチン組成物の熱安定性は、乾燥粉末としての再構成前に、目視観察によって評価される。他の実施形態において、本明細書で提供される乾燥粉末ワクチン組成物の熱安定性は、1つ以上のアッセイ、例えば、生物物理学的および生化学的アッセイの補助によって再構成後に評価される。 40

【0041】

いくつかの実施形態において、乾燥粉末または再構成されたワクチンの粒子サイズが評価される。例えば、動的光散乱(DLS)を使用して、エマルジョン粒子サイズを評価することができる。いくつかの実施形態において、これは、例えば、乾燥噴霧前の液体安定エマルジョン状態における、乾燥噴霧前のエマルジョン粒子サイズと比較される。いくつかの実施形態において、エマルジョン粒子サイズは、乾燥噴霧前の粒子サイズと比較されない。本明細書におけるいくつかの実施形態において、粒子サイズは、液体乾燥粉末組成物 50

のZ平均直径（Z平均）を測定することによって決定される。特定の実施形態において、熱安定性組成物は、約8℃以上の温度で維持、貯蔵、または曝露される噴霧乾燥された組成物の再構成された液体エマルジョンが、約200nm未満、約190nm未満、約180nm未満、約170nm未満、約160nm未満、約150nm未満、約140nm未満、約130nm未満、約120nm未満、約110nm未満、約100nm未満、または約90nm未満、約80nm未満、約70nm未満、または約60nm未満のZ平均直径を有する粒子サイズを有する場合に示される。特定の実施形態において、再構成されたエマルジョンは、約100nm～約200nmのZ平均直径範囲を有する粒子サイズを有する。

【0042】

いくつかの実施形態において、多分散指数（PDI）は、噴霧乾燥された組成物の再構成後に評価される。例えば、動的光散乱（DLS）を使用して、PDIを評価することができる。いくつかの実施形態において、これは、噴霧乾燥前の、例えば、噴霧乾燥前の液体安定エマルジョン状態の液体エマルジョンのPDIと比較される。

【0043】

いくつかの実施形態において、エマルジョンのpHは、噴霧乾燥された（乾燥粉末）組成物の再構成後に評価される。いくつかの実施形態において、これは、噴霧乾燥前の、例えば、噴霧乾燥前の液体安定エマルジョン状態のpHと比較される。

【0044】

いくつかの実施形態において、乾燥粉末組成物の抗原、アジュバント、および/または他の成分の劣化%または分解%は、再構成時に、または乾燥粉末として評価される。いくつかの実施形態において、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）は、もしあれば、成分の化学的劣化を評価するために使用される。1つの例示的な実施形態において、スクアレン、DMPIC、およびGLAの化学的劣化は、RP-HPLCによって監視される。他の実施形態において、再構成時に、もしあれば、噴霧乾燥組成物の、ワクチンのタンパク質抗原の劣化を評価するために、ゲルベースのクマシー染色が使用される。本明細書で提供される熱安定性組成物は、約8℃以上の温度に維持された熱安定性噴霧乾燥組成物の再構成後に約25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下の抗原および/もしくはアジュバント、または他の成分の劣化、喪失、または分解を示すものである。

【0045】

賦形剤

本発明の賦形剤は、単独で、またはこれらに限定されないが、シェル形成剤、緩衝剤、可溶性剤、等張性剤、等張化剤、界面活性剤、乳化剤、抗微生物剤、および/もしくは崩壊温度調整剤を含む、他の賦形剤と組み合わせて使用され得る。

【0046】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、薬理的に活性な薬物以外の物質であり、これは、製造プロセス、または限定なく、噴霧乾燥を含む、薬理的に活性な薬物の貯蔵もしくは出荷のための充填仕上げプロセスに含まれ、仕上げ薬学的プロセスに含有される。

【0047】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、噴霧乾燥後に粉末を生成する噴霧乾燥前に液体安定水中油型エマルジョン製剤に添加される物質である。いくつかの実施形態において、賦形剤は、噴霧乾燥粉末の粒子サイズを低減するか、あるいは粒子が互いにまたは口、喉、もしくは食道における組織に付着する可能性を低くすることによってなど、噴霧乾燥製剤の吸入性を増強する物質である。

【0048】

ワクチン製剤および/または噴霧乾燥ワクチンもしくはアジュバント製剤に適した賦形剤は、当該技術分野で知られ（例えば、Bahetia et al., 2010: J. Excipients and Food Chem.: 1(1)41-54, Grabeinstein J D. Immunofacts: Vaccines and Immu

10

20

30

40

50

n o l o g i c D r u g s - - 2 0 1 2 (3 7 t h r e v i s i o n) . S t L o u i s , M o . : W o l t e r s K l u w e r H e a l t h , 2 0 1 1 a n d , b y V a c c i n e を参照されたい)、緩衝剤、可溶化剤、等張性剤、等張化剤、界面活性剤、乳化剤、抗微生物剤、および/または崩壊温度調整剤を含む。現在承認されているワクチン中の賦形剤のリストは、Centers for Disease Control を介して見ることができ (ワールドワイドウェブ cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/B/excipient-table-2.pdf、2013年9月、“Vaccine Excipient & Media Summary. Excipients Included in U.S. Vaccines, by Vaccine” を参照されたい)、限定なく、スクロース、D-マンノース、D-フルクトース、デキストロース、リン酸カリウム、ブラスドンC、無水ラクトース、微結晶性セルロース、ポラクリリンカリウム、ステアリン酸マグネシウム、酢酸フタル酸セルロース、アルコール、アセトン、ヒマシ油、FD & C Yellow #6 アルミニウムレーキ染料、ヒト血清アルブミン、ウシ胎児血清、重炭酸ナトリウム、ヒト二倍体線維芽細胞培養物 (WI-38)、ダルベッコ改変イーグル培地、水酸化アルミニウム、塩化ベンゼトニウム、ホルムアルデヒド、グルテルアルデヒド、アミノ酸、ビタミン、無機塩、糖、グリセリン、アスパラギン、クエン酸、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、クエン酸鉄アンモニウム、ラクトース、硫酸アルミニウムカリウム、ヒドロキシリン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、ペプトン、ウシ抽出物、チメロサル (微量)、改変ミュラーおよびミラー培地、ベータ-プロピオラクトン、チメロソル (多用量バイアルのみ)、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸カリウム、塩化カリウム、グルタミン酸カリウム、塩化カルシウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、硫酸ネオマイシン、ポリミキシンB、卵タンパク質、ラクトアルブミン加水分解物、および硫酸ネオマイシンを含む。

【0049】

緩衝剤

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、緩衝剤を含む。本発明において賦形剤として有用な緩衝剤には、酢酸トリス、トリス塩基、トリスHCl、リン酸アンモニウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酒石酸、リン酸ナトリウム、塩化亜鉛、アルギニン、およびヒスチジンが含まれる。いくつかの実施形態において、緩衝剤には、塩酸、水酸化ナトリウム、およびメグルミンなどのpH調節剤が含まれる。

【0050】

可溶化剤

いくつかの実施形態において、適切な可溶化剤には、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、アルファシクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン (HP-CD) などの錯化賦形剤が含まれる。界面活性剤はまた、ポリソルベート80およびTweenを含む可溶化賦形剤として含まれ得る。可溶化剤として当該技術分野で知られている他の共溶媒が使用され得、tert-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール、ジクロロメタン、エタノール、およびアセトンを含む。

【0051】

本発明における賦形剤としての使用のための等張化剤には、グリセロール、塩化ナトリウム、スクロース、マンニトール、およびデキストロースが含まれる。崩壊温度調整剤には、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、フィコール、およびゼラチンが含まれる。抗微生物剤には、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、エチルパラベン、チメロソルが含まれる。

【0052】

等張性剤

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、等張性剤を含む。いくつかの実施形態において、等張性剤は、グリセロールである。1つの特定の実施形態において、等張性剤は、噴霧乾燥前の水中油型エマルジョン製剤中、または再構成時の水中油型エマルジョン

中に約 0.36% v/v の濃度で存在する。

【0053】

界面活性剤

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、界面活性剤を含む。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、ブルロニック F 68 である。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、約 100 : 1 (油 : 界面活性剤) の比で存在する。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、約 0.018% w/v の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、約 0.0001% w/v、約 0.0005% w/v、約 0.001% w/v、約 0.005% w/v、約 0.01% w/v、約 0.011% w/v、約 0.012% w/v、約 0.013% w/v、約 0.014% w/v、約 0.015% w/v、約 0.016% w/v、約 0.017% w/v、約 0.018% w/v、約 0.019% w/v、約 0.02% w/v、約 0.03% w/v、約 0.04% w/v、約 0.05% w/v、約 0.06% w/v、約 0.07% w/v、約 0.08% w/v、約 0.09% w/v、約 0.1% w/v、約 0.2% w/v、約 0.3% w/v、約 0.4% w/v、約 0.5% w/v、約 0.6% w/v、約 0.7% w/v、約 0.8% w/v、約 0.9% w/v、または約 1% w/v の濃度で存在する。本明細書に記載されるパーセンテージおよび比は、噴霧乾燥前の水中油型エマルジョン製剤中、または乾燥粉末中、または再構成後の乾燥粉末中いずれかの比およびパーセンテージを指す。

10

【0054】

乳化剤

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、乳化剤を含む。いくつかの実施形態において、乳化剤は、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)である。いくつかの実施形態において、乳化剤は、レシチンである。いくつかの実施形態において、乳化剤は、約 1 : 5 (乳化剤 : 油) の比で存在する。いくつかの実施形態において、乳化剤は、約 0.38% w/v の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、乳化剤は、約 0.002% w/v、約 0.005% w/v、約 0.010% w/v、約 0.015% w/v、約 0.020% w/v、約 0.025% w/v、約 0.030% w/v、約 0.035% w/v、約 0.040% w/v、約 0.045% w/v、約 0.050% w/v、約 0.055% w/v、約 0.060% w/v、約 0.065% w/v、約 0.070% w/v、約 0.075% w/v、約 0.080% w/v、約 0.085% w/v、約 0.090% w/v、約 0.095% w/v、約 0.10% w/v、約 0.15% w/v、約 0.20% w/v、約 0.25% w/v、約 0.30% w/v、約 0.35% w/v、約 0.40% w/v、約 0.45% w/v、約 0.50% w/v、約 0.55% w/v、約 0.60% w/v、約 0.65% w/v、約 0.70% w/v、約 0.75% w/v、約 0.80% w/v、約 0.85% w/v、約 0.90% w/v、約 0.95% w/v、約 1% w/v、約 2% w/v、約 3% w/v、約 4% w/v、約 5% w/v、約 6% w/v、約 7% w/v、約 7.5% w/v、約 8% w/v、約 9% w/v、または約 10% w/v の濃度で存在する。本明細書に記載されるパーセンテージおよび比は、噴霧乾燥前の水中油型エマルジョン製剤中または乾燥粉末中いずれかの比およびパーセンテージを指す。

20

30

40

【0055】

熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物における使用のためのアジュバント

本明細書で提供される本発明のいくつかの態様において、本明細書に記載される組成物(例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン)は、アジュバントを含む。いくつかの実施形態において、アジュバントは、例えば、治療剤としての使用のために単独で提供される。他の実施形態において、アジュバントは、抗原と組み合わせて提供される。

【0056】

免疫応答を修飾する組成物における使用のためのアジュバントは、当該技術分野において周知である。例えば、本明細書に記載される組成物における使用のためのアジュバントは、免疫刺激性アジュバント、送達アジュバント、無機アジュバント、または有機アジュバ

50

ントのうちの一つ以上を含み得る。本明細書に記載される組成物における使用のためのアジュバントの非限定的な例は、とりわけ、Barouch D. H., 2008, Nature, 455 (7213): 613-9、Morrow et al., 2008, AIDS, 22 (3): 333-8、およびMcGeary et al., 2003, Peptide Sci., 9 (7): 405-181に見出すことができる。

【0057】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバント（例えば、熱安定性乾燥粉末ワクチン）は、免疫刺激性アジュバントである。免疫刺激性アジュバントは、例えば、サイトカイン、TLRリガンド、または微生物毒素などの免疫系に直接作用するアジュバントであり得る。本明細書におけるいくつかの実施形態において、アジュバントは、サイトカインアジュバントである。一つ以上のサイトカインは、単独で、または本明細書に記載される組成物において一つ以上の追加のアジュバントと組み合わせて、アジュバントとして適切であり得る。適切なサイトカインには、インターフェロン（IFN）、インターロイキン（IL）、ケモカイン、コロニー刺激因子、または腫瘍壊死因子が含まれる。いくつかの実施形態において、インターフェロンは、I型IFN、II型IFN、またはIII型IFNである。いくつかの実施形態において、インターフェロンは、Inalpa、Inbeat's、IFN-、またはIFN-、およびこれらの中からのサブタイプ（例えば、IFN-、IFN-2、およびIFN-3）である。いくつかの実施形態において、サイトカインは、インターロイキンである。本明細書に記載される組成物においてアジュバントとして使用することができるインターロイキンの非限定的な例には、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35、およびIL-36が含まれる。いくつかの実施形態において、サイトカインは、ケモカインである。いくつかの実施形態において、ケモカインは、CCケモカイン、CXCKケモカイン、Cケモカイン、またはCX3CKケモカインである。本明細書に記載される組成物においてアジュバントとして使用することができるCCケモカインの非限定的な例には、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、およびCCL28が含まれる。本明細書に記載される組成物において使用することができるCXCKケモカインの非限定的な例には、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、およびCXCL17が含まれる。いくつかの実施形態において、サイトカインは、コロニー刺激因子である。いくつかの実施形態において、コロニー刺激因子は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、またはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）である。いくつかの実施形態において、サイトカインは、腫瘍壊死因子である。本明細書に記載される組成物においてアジュバントとして使用することができる腫瘍壊死因子ファミリータンパク質の非限定的な例には、TNF- および4-1BBLが含まれる。

【0058】

いくつかの実施形態において、免疫刺激性アジュバントは、Toll様受容体（TLR）リガンド（例えば、TLRアゴニスト）である。一つ以上のTLRリガンドは、単独で、または本明細書に記載される組成物において一つ以上の追加のアジュバントと組み合わせて、アジュバントとして適切であり得る。TLRには、多数の感染性病原体の中または上に存在し得るような様々な保存された微生物分子構造について宿主細胞に初期認識能力を

10

20

30

40

50

付与する自然免疫系の細胞表面膜貫通受容体が含まれる。(例えば、Armant et al., 2002 *Genome Biol.* 3(8): reviews 3011.1-3011.6、Fearon et al., 1996 *Science* 272:50、Medzhitov et al., 1997 *Curr. Opin. Immunol.* 9:4、Luster 2002 *Curr. Opin. Immunol.* 14:129、Lien et al. 2003 *Nat. Immunol.* 4:1162、Medzhitov, 2001 *Nat. Rev. Immunol.* 1:135、Takeda et al., 2003 *Ann Rev Immunol.* 21:335、Takeda et al. 2005 *Int. Immunol.* 17:1、Kaisho et al., 2004 *Microbes Infect.* 6:1388、Datta et al., 2003 *J. Immunol.* 170:4102)。

【0059】

自然免疫系を介した免疫応答の開始を促進するTLR媒介シグナル伝達の誘導は、細胞表面TLRに關与するTLRアゴニスト(すなわち、TLRリガンド)によって引き起こされ得る。例えば、リポ多糖(LPS)は、TLR2またはTLR4を介したTLRアゴニストであり得(Tsan et al., 2004 *J. Leuk. Biol.* 76:514、Tsan et al., 2004 *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C739、Lin et al., 2005 *Shock* 24:206)、ポリ(イノシン-シチジン)(ポリI:C)は、TLR3を介したTLRアゴニストであり得(Salem et al., 2006 *Vaccine* 24:5119)、CpG配列(非メチル化シトシン-グアノシンまたは「CpG」ジヌクレオチドモチーフを含有するオリゴデオキシヌクレオチド、例えば、CpG 7909、Cooper et al., 2005 *AIDS* 19:1473、CpG 10101 Bayes et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:193、Vollmer et al. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5:673、Vollmer et al., 2004 *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2314、Deng et al., 2004 *J. Immunol.* 173:5148)は、TLR9を介したTLRアゴニストであり得(Andalousi et al., 2006 *Glia* 54:526、Chen et al., 2006 *J. Immunol.* 177:2373)、ペプチドグリカン、3M003(關連化合物3M001および3M002の供給源でもある、3M Pharmaceuticals, St. Paul, Minn.からの、4-アミノ-2-(エトキシメチル)-ジメチル-6,7,8,9-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノール水和物、分子量318Da、Gorden et al., 2005 *J. Immunol.* 174:1259)は、TLR7アゴニスト(Johansen 2005 *Clin. Exp. Allerg.* 35:1591)および/またはTLR8アゴニスト(Johansen 2005)であり得、フラジェリンは、TLR5アゴニストであり得(Feuillet et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:12487)、プロフィリンは、TLR11アゴニストであり得(Hedhli et al., 2009, *Vaccine*, 27(16):2274-87)、リポペプチドは、TLR1、TLR2、および/またはTLR6アゴニストであり得(Gao et al., 2013, *Vaccine*, 31(26):2796-803)、かつC型肝炎抗原は、TLR7および/またはTLR9を介してTLRアゴニストとして作用し得る(Lee et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1828、Horsmans et al., 2005 *Hepatol.* 42:724)。他のTLRアゴニストが知られており(例えば、Schirmbeck et al., 2003 *J. Immunol.*

171:5198)、特定の現在記載される実施形態に従って使用され得る。

【0060】

例えば、背景として(例えば、米国特許第6,544,518号を参照されたい)、非メチル化CpGジヌクレオチド(「CpG」)を含有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、全身経路および粘膜経路の両方によって投与される場合アジュバントであることが知られている(WO96/02555、EP468520、Davis et al., J. Immunol., 1998, 160(2):870-876、McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6)。CpGは、DNAに存在するシトシン-グアノシンジヌクレオチドモチーフの略語である。免疫刺激におけるCGモチーフの中心的な役割は、Krieg, Nature 374, p 546 1995によって解明された。詳細な分析は、CGモチーフが特定の配列コンテキストにある必要があり、そのような配列が細菌DNAでは一般的であるが、脊椎動物DNAではまれであることを示した。免疫刺激性配列は、多くの場合、プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジンであり、ジヌクレオチドCGモチーフは、メチル化されていないが、他の非メチル化CpG配列は、免疫刺激性であることが知られており、本発明の特定の実施形態において使用され得る。CpGは、ワクチンに製剤化される場合、遊離抗原と一緒に遊離溶液で投与され得るか(WO96/02555、McCluskie and Davis、上記)、または抗原に共有結合され得るか(PCT公開第98/16247号)、または水酸化アルミニウムなどの担体と製剤化され得る(例えば、Davis et al. 上記、Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8)。

【0061】

いくつかの実施形態において、本発明のアジュバントとしての使用のためのオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも6つ以上のヌクレオチドによって分離される2つ以上のジヌクレオチドCpGモチーフを含有する。本発明のオリゴヌクレオチドは、典型的には、デオキシヌクレオチドである。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチド間は、ホスホロジチオエート、またはより好ましくはホスホロチオエート結合であるが、ホスホジエステルおよび他のヌクレオチド間結合は、混合ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の範囲内である。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたはホスホロジチオエートを生成するための方法は、米国特許第5,666,153号、同第5,278,302号、およびWO95/26204に記載されている。

【0062】

好ましいオリゴヌクレオチドの例は、以下の刊行物に開示される配列を有し、特定の本明細書に開示される実施形態について、配列は、好ましくはホスホロチオエート修飾ヌクレオチド間結合を含有する:(1)CPG 7909:Cooper et al., "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults." AIDS, 2005 Sep. 23; 19(14):1473-9、(2)CpG 10101:Bayes et al., "Gateways to clinical trials." Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005 Apr; 27(3):193-219、および(3)Vollmer J., "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9." Expert Opinion on Biological Therapy. 2005 May; 5(5):673-682。

【0063】

代替CpGオリゴヌクレオチドは、それらがそれらに対する重要ではないヌクレオチド配

列置換、挿入、欠失、および/または付加を有するという点で異なる、上記で引用された刊行物に記載される好ましい配列の多型を含み得る。本発明の特定の実施形態において利用される CpG オリゴヌクレオチドは、当該技術分野で知られている任意の方法（例えば、EP 468520）によって合成され得る。便利なことに、そのようなオリゴヌクレオチドは、自動合成装置を利用して合成され得る。オリゴヌクレオチドは、典型的には、デオキシヌクレオチドである。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド間結合は、ホスホロジチオエート、またはより好ましくは、ホスホロチオエート結合であるが、ホスホジエステルもまた、現在企図される実施形態の範囲内である。異なるヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチド、例えば、混合ホスホロチオエートホスホジエステルも企図される。オリゴヌクレオチドを安定化する他のヌクレオチド間結合もまた使用され得る。

10

【0064】

特定の実施形態において、アジュバントは、TLR4アゴニストである。いくつかの実施形態において、本発明の組成物において使用されるTLR4アゴニストは、米国特許公開第2007/021017号、同第2009/045033号、同第2010/037466号、および同第2010/0310602号に記載されるものなどのグルコピラノシル脂質アジュバント（GLA）を含み、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、本明細書における本発明の組成物において使用されるアジュバントは、弱毒化リポドA誘導体（ALD）である。ALDは、分子がリポドAのより少ないか、または異なる有害作用を示すように改変または構築されているリポドA様分子である。これらの有害作用には、ニワトリ胚50%致死用量アッセイ（CELD50）で評価される発熱性、局所的シュワルツマン反応性、および毒性が含まれる。本発明に従って有用なALDには、モノホスホリルリポドA（MLA）および3-脱アシル化モノホスホリルリポドA（3D-MLA）が含まれる。MLAおよび3D-MLAは、既知であり、本明細書において詳細に記載される必要はない。例えば、モノホスホリルリポドAおよびその製造を開示する、Ribi ImmunoChem Research, Inc. に譲渡された、1984年3月13日に発行された米国特許第4,436,727号を参照されたい。同様にRibi ImmunoChem Research, Inc. に譲渡された、Myersらの米国特許第4,912,094号および再審査証明書B1米国特許第4,912,094号は、3-脱アシル化モノホスホリルリポドAおよびその製造方法を具現化する。

20

30

【0065】

いくつかの実施形態において、イミダゾキノリンなどの応答修飾因子および当該技術分野で知られている他の免疫応答修飾因子もまた、特定の現在開示される実施形態においてアジュバントとして含まれ得る。特定の好ましいイミダゾキノリン免疫応答修飾因子には、非限定的な例として、レシキモド（R848）、イミキモド、およびガルジキモド（Hemmi et al., 2002 Nat. Immunol. 3:196、Gibson et al., 2002 Cell. Immunol. 218:74、Gorden et al., 2005 J. Immunol. 174:1259）が含まれ、これらおよび他のイミダゾキノリン免疫応答修飾因子は、適切な条件下で、本明細書に記載されるようなTLRアゴニスト活性も有し得る。他の免疫応答修飾因子は、核酸ベースの二重ステムループ免疫修飾因子（dSLIM）である。特定の現在開示される実施形態における使用について企図されるdSLIMの具体的な例は、Schmidt et al., 2006 Allergy 61:56、Weihrauch et al. 2005 Clin Cancer Res. 11(16):5993-6001、Modern Biopharmaceuticals, J. Knablein (Editor). John Wiley & Sons, Dec. 6, 2005. (dSLIMは183~約200ページに議論される)において、およびMologen AG (Berlin, FRG: [2006年8月18日にオンラインで取得、ワールドワイドウェブmologen.com/English/04.20-dSLIM.shtmlを参照されたい])から見出すこ

40

50

とができる。

【0066】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバントは、細菌または植物に由来する多糖である。本明細書に記載される組成物において単独でまたは1つ以上の追加のアジュバントと組み合わせて使用することができる多糖ベースのアジュバントの非限定的な例には、グルカン（例えば、ベータグルカン）、デキストラン（例えば、硫酸化およびジエチルアミノエチル-デキストラン）、グルコマンナン、ガラクトマンナン、レバン、キシラン、フルクタン（例えば、イヌリン）、キトサン、エンドトキシン（例えば、リポ多糖）、バイオプランMGN-3、*Actinidia eriantha*からの多糖、エルデキソマー、およびそれらの変形が含まれる。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバントは、プロテアソームまたはそのサブユニットである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバントは、リジンコアの周りに組み立てられる同一または異なる抗原ペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバントは、毒素（例えば、細菌毒素）である。いくつかの実施形態において、毒素は、*Escherichia coli*、*Vibrio cholera*、*Bordetella pertussis*、および *Bordetella parapertussis* からなる群から選択される1つ以上の細菌に由来する。

20

【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバント（例えば、熱安定性乾燥粉末ワクチン）は、送達アジュバントである。送達アジュバントは、アジュバントとして機能することができ、かつ/または抗原を送達することができる。本明細書に記載される組成物において単独でまたは1つ以上の追加のアジュバントと組み合わせて使用することができるアジュバントの非限定的な例には、鉍物塩（例えば、リン酸カルシウム）、エマルジョン（例えば、水中のスクアレン）、リポソーム（例えば、DPPC：コレステロールリポソーム）、ビロソーム（例えば、免疫増強再構成インフルエンザビロソーム）、およびマイクロスフェアが含まれる。

【0069】

特定の明細書に開示される実施形態による使用のための他のアジュバントには、ブロックコポリマーまたは生分解性ポリマーが含まれ、これは、関連技術分野における当業者が精通しているであろうポリマー化合物のクラスを指す。本明細書に記載される組成物に含まれ得るブロックコポリマーまたは生分解性ポリマーの例には、Pluronic（登録商標）L121（BASF Corp.、Mount Olive、N.J.、例えば、Yeh et al.、1996 Pharm. Res. 13:1693、米国特許第5,565,209号を参照されたい）、CRL1005（例えば、Triozzi et al.、1997 Clin. Canc. Res. 3:2355）、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ-（D,L-ラクチド-コグリコリド）（PLG）、およびポリI:Cが含まれる。（例えば、Powell and Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, New Yorkを参照されたい）。

30

40

【0070】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバント（例えば、熱安定性乾燥粉末ワクチン）は、有機アジュバントである。有機アジュバントは、生物に由来するか、または化学的に炭素を含有するアジュバントであり得る。いくつかの実施形態において、アジュバントは、微生物細胞壁に由来するペプチド（例えば、ムラミルジペプチドおよびその多型）である。いくつかの実施形態において、アジュバントは、トレハロース6,6'-ジミコレートまたはその多型である。Schwenek

50

er et al., 2013, Immunobiology, 218(4): 664-73を参照されたい。いくつかの実施形態において、アジュバントは、ステアリルチロシンである。

【0071】

QS21および同様の効果を与える構造的に関連する化合物を含み、本明細書ではQS21模倣物と呼ばれる、サポニンおよびサポニン模倣物。(例えば、米国特許第5,057,540号、EP0362279B1、WO95/17210を参照されたい)、トマチンなどの植物アルカロイド、サポニンなどの(ただしこれらに限定されない)洗剤、ポリソルベート80、スパン85およびステアリルチロシン、イミダゾキノリン免疫応答修飾因子、ならびに二重ステムループ免疫修飾因子(dSLIM、例えば、Weeratna et al., 2005 Vaccine 23: 5263)は、特定の現在記載される実施形態によるアジュバントとして使用され得る。

10

【0072】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバントは、サポニンまたはサポニン模倣物である。サポニンを含む洗剤は、例えば、米国特許第6,544,518号、Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996 Phytomedicine 2: 363-386)、米国特許第5,057,540号、Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12(1-2): 1-55、およびEP0362279B1において教示される。Quil A(サポニン)の画分を含む、免疫刺激複合体(ISCOMS)と呼ばれる粒子状構造は、溶血性であり、ワクチンの製造において使用されている(Morein, B., EP0109942B1)。これらの構造は、アジュバント活性を有することが報告されている(EP0109942B1、WO96/11711)。溶血性サポニンQS21およびQS17(Quil AのHPLC精製画分)は、強力な全身アジュバントとして記載されており、それらの生成の方法は、米国特許第5,057,540号およびEP0362279B1に開示される。QS21は、Quillaja Saponaria Molinaの樹皮に由来するHPLC精製された非毒性画分を含み得る。QS21の生成は、米国特許第5,057,540号に開示されている。(米国特許第6,936,255号、同第7,029,678号、および同第6,932,972号も参照されたい。)これらの参考文献には、全身ワクチンのための強力なアジュバントとして作用するQS7(Quil-Aの非溶血性画分)の使用も記載される。QS21の使用は、Kensil et al. (1991. J. Immunology 146: 431-437)においてさらに記載される。QS21およびポリソルベートまたはシクロデキストリンの組み合わせも知られている(WO99/10008)。QS21およびQS7などのQuil Aの画分を含む粒子状アジュバントシステムは、WO96/33739およびWO96/11711に記載されている。全身ワクチン接種研究において使用されてきた他のサポニンには、カスミソウおよびサポナリアなどの他の植物種に由来するものが含まれる(Bomford et al., Vaccine, 10(9): 572-577, 1992)。

20

30

【0073】

いくつかの実施形態において、アジュバントは、ISCOMSとして知られる「免疫刺激性複合体」(例えば、米国特許第6,869,607号、同第6,846,489号、同第6,027,732号、同第4,981,684号)であり、サポニン由来のISCOMATRIX(登録商標)を含み、これは、例えば、IscoTec(Stockholm, Sweden)およびCSL Ltd.(Parkville, Victoria, Australia)から市販されている。

40

【0074】

エスシンは、本明細書に開示される実施形態のアジュバント組成物における使用のためのサポニンに関する別の洗剤である。エスシンは、Merck index(12th Ed.: entry 3737)においてセイヨウトチノキ、Aesculus hipp

50

ocastanumの種子において発生するサポニンの混合物として説明される。その単離は、クロマトグラフィーおよび精製 (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953)) によって、ならびにイオン交換樹脂 (Erbrington et al., 米国特許第3, 238, 190号) によって説明される。エスシン (アエスシンとしても知られる) の画分は、精製され、生物学的に活性であることが示されている (Yoshikawa M, et al. (*Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996 August; 44 (8): 1454 - 1464))。

【0075】

ジギトニンは、別の洗剤であり、また *Merck index* (12th Ed., entry 3204) においてサポニンとして記載され、*Digitalis purpurea*の種子に由来し、*Gisvold et al., J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664、および *Rubensstroth-Bauer, Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621 によって記載される手順に従って精製される。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物において使用されるアジュバント (例えば、熱安定性乾燥粉末ワクチン) は、無機アジュバントである。無機アジュバントは、例えば、鉱物塩、エマルジョン、およびリン酸カルシウムなどの、一般には炭素ベースではないアジュバントであり得る。本明細書で企図される鉱物塩アジュバントには、リン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムなどのアルミニウムベースの化合物が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、リン酸カルシウムアジュバントには、オルトリン酸塩 (PO_4^{3-})、メタリン酸塩 (PO_3^-)、またはピロリン酸塩 ($P_2O_7^{4-}$) と一緒にカルシウムイオン (Ca^{2+}) が含まれるが、これに限定されない。

20

【0077】

また上記のように、本明細書に記載される組成物における使用のための1つのタイプのアジュバントは、一般に「アラム」と呼ばれる、アルミニウムアジュバントであり得る。アラムアジュバントは、以下：オキシ水酸化アルミニウム、ヒドロキシリン酸アルミニウム、または様々な独自の塩に基づいている。アラムアジュバントを使用するワクチンには、破傷風株、HPV、A型肝炎、不活化ポリオウイルス、および本明細書に記載される他の抗原についてのワクチンが含まれ得る。アラムアジュバントは、良好な安全性記録を有し、抗体応答を増強し、抗原を安定化し、大規模生成について比較的単純であるため、有利である。 (Edelman 2002 *Mol. Biotechnol.* 21: 129 - 148、Edelman, R. 1980 *Rev. Infect. Dis.* 2: 370 - 383.)。

30

【0078】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、アジュバントを含む。いくつかの実施形態において、アジュバントは、TLR4アゴニストである。いくつかの実施形態において、アジュバントは、約 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $12 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、アジュバントは、約 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $90 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、アジュバントは、本明細書に記載されるMPLまたはGLAである。いくつかの実施形態において、アジュバントは、約 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $2 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $4 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $6 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $7 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $8 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $9 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $11 \text{mg}/\text{mL}$ 、または約 $12 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度で存在する。

40

【0079】

50

本明細書に記載される特定の組成物（例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物）における使用に適したアジュバントには、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント（Difco Laboratories, Detroit, Mich.）、Merck Adjuvant 65（Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.）、AS-2およびその誘導體（SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.）、AddaVax（InvivoGen）、MF59（Novartis）、AS03（GlaxoSmithKline）、AS01B（GlaxoSmithKline）、AS02A（GlaxoSmithKline）などの市販のアジュバントが含まれる。

【0080】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、1つのアジュバントおよび第1のアジュバントとは異なる少なくとも1つのさらなるアジュバントを含有する、組成物（例えば、熱安定性乾燥粉末ワクチン組成物）を含む。例えば、本明細書で提供される組成物は、GLAおよびGLA以外の第2のアジュバントを含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組成物は、2つ、3つ、4つ、または5つのアジュバントを含む。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組成物は、2つのアジュバントを含む。

【0081】

本明細書に記載されるアジュバントは、ヒト（例えば、ヒト患者）、非ヒト霊長類、哺乳動物、または認識された免疫系を有する別の高等真核生物などの対象に投与される場合、免疫応答の効力および/または寿命を改変する（すなわち、統計的に有意に増加または減少させる、特定の実施形態において、増強または向上させる）ことができるアジュバントを含む。（例えば、Powell and Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, New Yorkを参照されたい）。本明細書に開示される特定の実施形態において、GLAおよび所望の抗原、ならびに任意に1つ以上のアジュバントは、免疫応答を、所望の抗原に対して向けられるように改変、例えば、誘発または増強し得る。

【0082】

熱安定性噴霧乾燥（乾燥粉末）ワクチン組成物における使用のための抗原
いくつかの実施形態において、熱安定性ワクチン組成物は、抗原に対する宿主における免疫反応性または免疫応答を誘発または増強するために使用される。

【0083】

いくつかの実施形態において、自己免疫抗原、アレルゲン、または癌抗原などの抗原は、宿主にすでに存在し得、ワクチン組成物は、安定なエマルジョンおよび任意に、投与される場合、対象にすでに存在する抗原に対する免疫反応性を誘発または増強するアジュバントのみを含み得る。本明細書で使用される宿主にすでに存在する抗原に対する免疫応答を誘発するための熱安定性噴霧乾燥アジュバント組成物を含むワクチン組成物のこの投与は、単剤療法である。

【0084】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるワクチン組成物は、1つ以上の抗原を含む。

【0085】

本明細書に記載される組成物の特定の実施形態、ならびにそのような組成物を生成および使用するための方法における使用のための、抗原は、任意の標的エピトープ、分子（生体分子を含む）、分子複合体（生体分子を含有する分子複合体を含む）、細胞内集合体、対象における免疫反応性の誘発または増強が望まれる細胞または組織であり得る。頻繁に、抗原という用語は、目的のポリペプチド抗原を指す。しかしながら、本明細書で使用される抗原はまた、目的のポリペプチド抗原をコードする組換え構築物（例えば、発現構築物）を指し得る。特定の好ましい実施形態において、抗原は、感染性病原体および/または

10

20

30

40

50

感染症、癌、自己免疫疾患、アレルギー、喘息、もしくは抗原特異的免疫応答の刺激が望ましいか、もしくは有益であろう任意の他の状態に関連するエピトープ、生体分子、細胞、もしくは組織であるか、またはそれらに由来し得るか、またはそれらと免疫学的に交差反応性であり得る。

【0086】

いくつかの実施形態において、抗原は、所望のレベルで対象において免疫反応性を誘発または増強するのに十分な任意の濃度で存在し得る。いくつかの実施形態において、抗原は、これらに限定されないが、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $5 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $2 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含む、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約 $10 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度範囲で存在し得る。提供される濃度は、噴霧乾燥前の水中油型エマルジョン製剤中、または乾燥粉末中、または再構成時の乾燥粉末中いずれかの抗原の濃度を指す。

10

20

【0087】

特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物（例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物）は、ヒトまたは他の哺乳動物病原体に対する免疫応答を誘発することができる抗原または抗原性組成物を含み、抗原または抗原性組成物は、HIV-1、(tat、nef、gp120、またはgp160など)由来などのウイルス、ヒトヘルペスウイルス、例えば、gDもしくはその誘導体、またはHSV1もしくはHSV2に由来するICP27などの前初期タンパク質、サイトメガロウイルス（特に、ヒト）(gBまたはその誘導体など)、ロタウイルス（生弱毒化ウイルスを含む）、エプスタインバーウイルス（gp350またはその誘導体など）、水痘帯状疱疹ウイルス（gp1、I1、およびIE63など）、またはB型肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎表面抗原またはその誘導体）、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルス由来、あるいはパラミクソウイルス：呼吸器合胞体ウイルス（FおよびGタンパク質またはその誘導体など）、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス（例えば、HPV6、11、16、18など）、フラビウイルス（例えば、黄熱ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス）、またはインフルエンザウイルス（全生または不活化ウイルス、スプリットインフルエンザウイルス、卵もしくはMDC細胞で増殖、または全流感ピロソーム（Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920によって記載）などの、他のウイルス病原体由来、またはそれらの精製もしくは組換えタンパク質、例えば、HA、NP、NA、もしくはMタンパク質、またはそれらの組み合わせ）などのウイルスに由来する組成物を含み得る。

30

40

【0088】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物（例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物）は、ヒトまたは他の哺乳動物病原体に対する免疫応答を誘発することができる抗原または抗原性組成物を含み、抗原または抗原性組成物は、N.gonorrhoeaおよびN.meningitidis（例えば、莢膜多糖およびそのコンジュゲート、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PilC、アドヘシン）を含む、Neisseria spp.; S.pyogenes（例えば、Mタンパク質またはそのフラグメント、C5Aプロテアーゼ、リポタイコ酸）、S.agalactiae、S.mutans:H.ducreyi; Branhamella catarrhalisとしても知られるM.catarrhalis（例えば、高および低分子

50

量アドヘシンおよびインバシン)を含む、*Moraxella* spp.; *B. pertussis* (例えば、パータクチン、百日咳毒素またはその誘導体、線維状赤血球凝集素、アデニル酸シクラーゼ、フィンブリエ)を含む、*Bordetella* spp、*B. paraptussis*および*B. bronchiseptica*; *M. tuberculosis* (例えば、ESAT6、抗原85A、--B、または--C)、*M. bovis*、*M. leprae*、*M. avium*、*M. paratuberculosis*、*M. smegmatis*を含む、*Mycobacterium* spp.; *L. pneumophila*を含む、*Legionella* spp; 腸管毒性*E. coli* (例えば、定着因子、易熱性毒素またはその誘導体、熱安定性毒素またはその誘導体)、腸管出血性*E. coli*、腸管病原性*E. coli* (例えば、志賀毒素様毒素またはその誘導体)を含む、*Escherichia* spp; *V. cholera* (例えば、コレラ毒素またはその誘導体)を含む、*Vibrio* spp; *S. sonnei*、*S. dysenteriae*、*S. flexnerii*を含む、*Shigella* spp; *Y. enterocolitica* (例えば、Yopタンパク質)、*Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis*を含む、*Yersinia* spp; *C. jejuni* (例えば、毒素、アドヘシン、およびインバシン)および*C. coli*を含む、*Campylobacter* spp; *S. typhi*、*S. paratyphi*、*S. choleraesuis*、*S. enteritidis*を含む、*Salmonella* spp; *L. monocytogenes*を含む、*Listeria* spp.; *H. pylori* (例えば、ウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化毒素)を含む、*Helicobacter* spp; *P. aeruginosa*を含む、*Pseudomonas* spp; *S. aureus*、*S. epidermidis*を含む、*Staphylococcus* spp.; *E. faecalis*、*E. faecium*を含む、*Enterococcus* spp.; *C. tetani* (例えば、破傷風毒素およびその誘導体)、*C. botulinum* (例えば、ボツリヌス毒素およびその誘導体)、*C. difficile* (例えば、クロストリジウム毒素AまたはBおよびその誘導体)を含む、*Clostridium* spp.; *B. anthracis* (例えば、ボツリヌス毒素およびその誘導体)を含む、*Bacillus* spp.; *C. diphtheriae* (例えば、ジフテリア毒素およびその誘導体)を含む、*Corynebacterium* spp.; *B. burgdorferi* (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. garinii* (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. afzelii* (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. andersonii* (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. hermsii*を含む、*Borrelia* spp.; *E. equi*およびヒト顆粒球エーリキア症の因子を含む、*Ehrlichia* spp.; *R. rickettsii*を含む、*Rickettsia* spp; *C. trachomatis* (例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、*C. pneumoniae* (例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、*C. psittaci*を含む、*Chlamydia* spp.; *L. interrogans*を含む、*Leptospira* spp.; *T. pallidum* (例えば、希少外膜タンパク質)、*T. denticola*、*T. hyodysenteriae*を含む、*Treponema* spp.; または他の細菌性病原体などの1つ以上の細菌性病原体に由来する組成物を含み得る。

【0089】

特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物(例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物)は、ヒトまたは他の哺乳動物病原体に対する免疫応答を誘発することができる抗原または抗原性組成物を含み、抗原または抗原性組成物は、*P. falciparum*を含む、*Plasmodium* spp.; *T. gondii* (例えば、SAG2、SAG5、Tg34)を含む、*Toxoplasma* spp.; *E. histolytica*を含む、*Entamoeba* spp.; *B. microti*を含む、*Babesia* spp.; *T. cruzi*を含む、*Trypanosoma* spp.; *G. lam*

bliaを含む、*Giardia* spp.; *L. major*を含む、*Leshmania* spp.; *P. carinii*を含む、*Pneumocystis* spp.; *T. vaginalis*を含む、*Trichomonas* spp.などの1つ以上の寄生物に由来するか(例えば、John, D. T. and Petri, W. A., *Markell and Vogle's Medical Parasitology - 9th Ed.*, 2006, WB Saunders, Philadelphia、Bowman, D. D., *Georgis' Parasitology for Veterinarians - 8th Ed.*, 2002, WB Saunders, Philadelphiaを参照されたい)、または(i)線虫感染症(これらに限定されないが、*Enterobius vermicularis*、*Ascaris lumbricoides*、*Trichuris trichiura*、*Necator americanus*、*Ancylostoma duodenale*、*Wuchereria bancrofti*、*Brugia malayi*、*Onchocerca volvulus*、*Dracunculus medinensis*、*Trichinella spiralis*、および*Strongyloides stercoralis*を含む)、(ii)吸虫感染症(これらに限定されないが、*Schistosoma mansoni*、*Schistosoma haematobium*、*Schistosoma japonicum*、*Schistosoma mekongi*、*Opisthorchis sinensis*、*Paragonimus* sp、*Fasciola hepatica*、*Fasciola magna*、*Fasciola gigantica*を含む)、および(iii)条虫感染症(これらに限定されないが、*Taenia saginata*および*Taenia solium*を含む)などの、哺乳動物を感染させることができる蠕虫に由来する、組成物を含み得る。特定の実施形態は、したがって、*Schistosoma* spp.、*Schistosoma mansoni*、*Schistosoma haematobium*、および/もしくは*Schistosoma japonicum*に由来するか、または*C. albicans*を含む、*Candida* spp.、*C. neoformans*を含む、*Cryptococcus* spp.などの酵母に由来する抗原を含むワクチン組成物を企図し得る。

【0090】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物は、結核菌群の*Mycobacterium*種の少なくとも2つの異種ポリペプチドを含む。結核菌群の*Mycobacterium*種には、伝統的に結核という疾患を引き起こすとみなされる種、ならびにAIDSを有する患者などの免疫不全患者において結核および肺疾患を引き起こす*Mycobacterium*環境および日和見種、例えば、*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)、*Mycobacterium bovis*、または*Mycobacterium africanum*、BCG、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium intracellulare*、*Mycobacterium celatum*、*Mycobacterium genavense*、*Mycobacterium haemophilum*、*Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium simiae*、*Mycobacterium vaccae*、*Mycobacterium fortuitum*、および*Mycobacterium scrofulaceum*が含まれる(例えば、*Harrison's Principles of Internal Medicine*, volume 1, pp. 1004 - 1014および1019 - 1020を参照されたい)。*Mycobacterium*種由来の抗原の配列は、容易に入手可能である。例えば、*Mycobacterium tuberculosis*配列は、Cole et al., *Nature* 393: 537 (1998)で見ることができ、Wellcome Trust、Sanger Institute、およびInstitut Pasteurによって維持されるものなどのウェブサイトで見ることができる。

【0091】

本明細書に記載される組成物において使用され得る *M. tuberculosis* の他の特異的抗原は、例えば、Th Ra 12、Tb H9、Tb Ra 35、Tb 38 - 1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC 2、および hTCC 1 (WO 99 / 5 1748) である。

【0092】

M. tuberculosis のタンパク質には、融合タンパク質およびその多型も含まれ、*M. tuberculosis* の少なくとも2つ、好ましくは3つのポリペプチドがより大きなタンパク質に融合される。特定の実施形態において、融合タンパク質には、Ra 12 - Tb H9 - Ra 35、Erd 14 - DPV - MTI、DPV - MTI - MSL、Erd 14 DPV - MTI - MSL - mTTC 2、Erd 14 - DPV - MTI - MSL、DPV - MTI - MSL - mTTC 2、Tb H9 - DPV - MTI が含まれる (WO 99 15 1748)。使用され得る他の抗原には、US 2010 / 0129391 および WO 2008 / 124647 に記載される抗原、抗原の組み合わせ、および融合タンパク質が含まれる。

10

【0093】

特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、2つ以上の共有結合した *M. tuberculosis* 抗原、またはその免疫原性フラグメントの組み合わせを含む単離された融合タンパク質を含み、抗原は、Rv 0164、Rv 0496、Rv 2608、Rv 3020、Rv 3478、Rv 3619、Rv 3620、Rv 1738、Rv 1813、Rv 3810、Rv 2389、Rv 2866、Rv 3876、Rv 0054、Rv 0410、Rv 0655、Rv 0831、Rv 1009、Rv 1099、Rv 1240、Rv 1288、Rv 1410、Rv 1569、Rv 1789、Rv 1818、Rv 1860、Rv 1886、Rv 1908、Rv 2220、Rv 2032、Rv 2623、Rv 2875、Rv 3044、Rv 3310、Rv 3881、Rv 0577、Rv 1626、Rv 0733、Rv 2520、Rv 1253、Rv 1980、Rv 3628、Rv 1884、Rv 3872、Rv 3873、Rv 1511、および Rv 3875、ならびに前述の配列のいずれかに対して少なくとも90%の同一性を有する抗原からなる群から選択される。

20

【0094】

特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、抗原 Rv 2608、Rv 3619、Rv 3620、および Rv 1813、または抗原の組み合わせに対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、ID 93 融合タンパク質を含む。ID 93 抗原は、2016年11月10日に公開された、米国特許出願第2016 / 0324783号 (単一バイアルワクチン製剤) に記載されており、配列番号1~8としてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。別の実施形態において、組成物は、抗原 Rv 2608、Rv 3619、Rv 3620、および Rv 1813 を含む、ID 93 融合タンパク質を含み、抗原の配列は、*M. tuberculosis* に由来する。別の実施形態において、ID 93 融合タンパク質は、配列番号1に示される配列、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号2に示される配列、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、治療ワクチンは、*Mycobacterium* 抗原 Rv 2608、Rv 3620、および Rv 1813 の組み合わせ、または抗原の組み合わせに対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、*Mycobacterium* 抗原 Rv 2608、Rv 3620、および Rv 1813 は、*M. tuberculosis* 抗原 Rv 2608、Rv 3620、および Rv 1813 である。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号3もしくは4に示される配列、または配列番号3もしくは4に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、抗原 Rv 1813 は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗原 Rv 3620 は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗原 Rv 2608 は

30

40

50

、配列番号7のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗原Rv3619は、配列番号8のアミノ酸配列を含む。当業者は、1つ以上のN末端アミノ酸（シグナル配列など）が除去され得ることを理解するであろう。これらの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,486,414号に記載されている。いくつかの実施形態において、組成物は、ID93融合タンパク質、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含み、これは、米国特許出願公開第2010/0129391号（具体的には、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、病原性（Rv2608、Rv3619、Rv3620）または潜伏性（Rv1813）に関連するMtbタンパク質のファミリーに属する4つの抗原を含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物は、Chlamydiaの抗原を含む。Chlamydiaの抗原には、例えば、高分子量タンパク質（HWMP）（WO99/17741）、ORF3（EP366412）、および推定膜タンパク質（Pmp）が含まれる。組成物の他のChlamydia抗原は、WO99128475に記載される群から選択することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物は、S.pneumoniaeを含む、Streptococcus sppに由来する抗原（例えば、莢膜多糖およびそのコンジュゲート、PsaA、PspA、ストレプトリジン、コリン結合タンパク質）およびタンパク質抗原ニューモリシン（Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007、Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342）、ならびにその変異体無毒化誘導体（WO90/06951、WO99/03884）を含む。他の細菌抗原は、B型H.influenzae（例えば、PRPおよびそのコンジュゲート）、分類不能型H.influenzae、例えば、OMP26を含む、Haemophilus spp.、高分子量アドヘシン、P5、P6、タンパク質Dおよびリポタンパク質D、ならびにフィンブリンおよびフィンブリン由来ペプチド（米国特許第5,843,464号）、またはそれらの複数のコピー多型もしくは融合タンパク質に由来する。

【0096】

B型肝炎表面抗原の誘導体は、当該技術分野で周知であり、とりわけ、欧州特許出願EP-A414374、EP-A-0304578、およびEP198474に記載されるPrES1、Pars2 S抗原を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物は、特にCHO細胞で発現される場合、HIV-1抗原、gp120を含む。さらなる実施形態において、組成物は、上記で定義されるようなgD2tを含む。

【0097】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物は、性器疣贅の原因であると考えられるヒトパピローマウイルス（HPV）（HPV6またはHPV11など）、および子宮頸部癌の原因であるHPVウイルス（HPV16、HPV18など）に由来する抗原を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、L1粒子またはカプソメアを含む性器疣贅予防または治療ワクチン、ならびにHPV6およびHPV11タンパク質E6、E7、L1、およびL2から選択される1つ以上の抗原を含む融合タンパク質である。融合タンパク質の特定の形態には、WO96/26277に開示されるL2E7、およびGB9717953.5（PCT/EP98/05285）に開示されるタンパク質D（1/3）-E7が含まれる。いくつかの実施形態において、組成物は、HPV16または18抗原を含む、HPV子宮頸部感染症または癌、予防または治療ワクチンである。例えば、L1もしくはL2抗原モノマー、またはウイルス様粒子（VLP）として一緒に提示されるL1もしくはL2抗原、またはVLPもしくはカプソメア構造で単独で提示されるL1単独タンパク質。そのような抗原、ウイルス様粒子、およびカプソメアは、それ自体が知られている。例えば、WO94/00152、WO94/20137、WO94/05792、およびWO93/02184を参照されたい。

【0098】

10

20

30

40

50

追加の初期タンパク質は、単独で、または例えば、E7、E2、もしくは好ましくはF5などの融合タンパク質として含まれ得、いくつかの実施形態は、L1E7融合タンパク質を含むVLPを含む(WO96/11272)。いくつかの実施形態において、HPV16抗原は、HPV16からタンパク質D-E6もしくはE7融合体を形成するタンパク質D担体と融合した初期タンパク質E6もしくはF7、またはそれらの組み合わせ、あるいはE6またはE7のL2との組み合わせを含む(WO96/26277)。あるいは、HPV16または18初期タンパク質E6およびE7は、単一分子、好ましくはタンパク質D-E6/E7融合体で提示され得る。そのような組成物(例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物)は、任意に、HPV18の前にE6およびE7タンパク質のいずれかまたは両方を、好ましくはタンパク質D-E6もしくはタンパク質D-E7融合タンパク質またはタンパク質D-E6/E7融合タンパク質の形態で含有し得る。本発明の組成物は、他のHPV株、好ましくはHPV31または33に由来する抗原をさらに含み得る。

10

【0099】

本発明の組成物は、マラリアを引き起こす寄生生物に由来する抗原をさらに含み得る。例えば、*Plasmodium falciparum*由来の抗原には、RTS、S、およびTRAPが含まれる。RTSは、B型肝炎表面抗原のpreS2部分の4つのアミノ酸を介してB型肝炎ウイルスの表面(S)抗原に連結された*P. falciparum*のサーカムスポロゾイト(CS)タンパク質の実質的にすべてのC末端部分を含むハイブリッドタンパク質である。その完全構造は、英国特許出願第9124390.7号からの優先権を主張するWO93/10152として公開された国際特許出願第PCT/EP92/02591号に開示される。酵母で発現される場合、RTSは、リポタンパク質粒子として生成され、HBVからのS抗原と共発現される場合、RTS、Sとして知られる混合粒子を生成する。

20

【0100】

TRAP抗原は、WO90/01496として公開された国際特許出願第PCT/GB89/00895号に記載されている。本発明の一実施形態は、抗原性調製物が、RTS、S、およびTRAP抗原の組み合わせを含む、マラリアワクチンである。多段マラリアワクチンの成分となる候補である可能性が高い他のマラリア原虫抗原は、*P. falciparum* MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、Sequestrin、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27125、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230、および*Plasmodium* sppにおけるそれらの類似体である。

30

【0101】

特定の本明細書に開示される実施形態は、*M. tuberculosis*もしくは*M. leprae*、または別のマイコバクテリウムなどの*Actinobacterium*; *Salmonella*、*Neisseria*、*Borrelia*、*Chlamydia*、または*Bordetella*属のメンバーなどの細菌; 単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)、およびサイトメガロウイルスなどのウイルス; HIV-1またはHIV-2などのHIV; *Aspergillus*、*Blastomyces*、*Coccidioides*、および*Pneumocystis*などの真菌、または*C. albicans*、*C. glabrata*、*C. krusei*、*C. lusitanae*、*C. tropicalis*、および*C. parapsilosis*などの*Candida*種を含む、酵母; 原虫などの寄生生物、例えば、*P. falciparum*、*P. vivax*、*P. malariae*、および*P. ovale*を含む*Plasmodium*種; または*Acanthamoeba*、*Entamoeba histolytica*、*Angiostromyces*、*Schistosoma mansoni*、*Schistosoma haematobium*、*Schistosoma japon*

40

50

icum、Cryptosporidium、Ancylostoma、Entamoeba histolytica、Entamoeba coli、Entamoeba dispar、Entamoeba hartmanni、Entamoeba polecki、Wuchereria bancrofti、Giardia、およびLeishmaniaのうち1つ以上などの別の寄生生物を含む、細菌、ウイルス、または真菌などの少なくとも1つの感染性病原体に由来する抗原を企図する。

【0102】

例えば、Borrelia sp. に由来する抗原を含有する組成物の実施形態において、抗原は、核酸、病原体由来抗原または抗原性調製物、組換え的に生成されたタンパク質またはペプチド、およびキメラ融合タンパク質を含み得る。1つのそのような抗原は、OspAである。OspAは、宿主細胞におけるその生合成による脂質化形態の完全成熟タンパク質(Lipo-OspA)であってもよく、またはあるいは非脂質化誘導体であってもよい。そのような非脂質化誘導体には、インフルエンザウイルスの非構造タンパク質(NS1)の最初の81個のN末端アミノ酸を有する非脂質化NS1-OspA融合タンパク質、および完全OspAタンパク質が含まれ、別の、MDP-OspAは、3個の追加のN末端アミノ酸を有するOspAの非脂質化形態である。

10

【0103】

本明細書に記載される感染性病原体での感染症を有するか、またはそれを有するリスクがあると疑われる対象を特定するための組成物および方法が当該技術分野で知られている。

【0104】

例えば、Mycobacterium tuberculosisという細菌は、結核(TB)を引き起こす。細菌は、通常、肺を攻撃するが、腎臓、脊椎、および脳も攻撃することができる。適切に治療されない場合、TB疾患は、致死的であり得る。疾患は、感染者がくしゃみまたは咳をするとき、空中で人から人へと蔓延する。2003年、米国では14,000件を超えるTBが報告された。

20

【0105】

結核は、一般に、長期抗生物質療法を使用して制御することができるが、そのような治療は、疾患の蔓延を防止するために十分ではなく、抗生物質耐性株の潜在的な選択に関する懸念が存在する。感染した個体は、しばらくの間、無症候性であるが、伝染性であり得る。加えて、治療レジメンの遵守は重要であるが、患者挙動は監視が困難である。一部の患者は、治療の経過を完了せず、これは効果のない治療および薬物耐性の発生につながり得る。(例えば、米国特許第7,087,713号)。

30

【0106】

現在、生菌によるワクチン接種は、結核に対する防御免疫を誘導するための最も効率的な方法である。この目的で使用される最も一般的なMycobacteriumは、ウシ型Mycobacteriumの非病原性株であるBacillus Calmette-Guérin(BCG)である。しかしながら、BCGの安全性および有効性は論争の源であり、米国などの一部の国は一般市民にワクチン接種しない。診断は、一般的には、ツベルクリンPPD(タンパク質精製誘導体)への皮内曝露を含む、皮膚検査を使用して達成される。抗原特異的T細胞応答は、注射の48~72時間後までに注射部位で測定可能な硬結をもたらし、これはMycobacterium抗原への曝露を示す。感度および特異性は、この試験の問題であるが、BCGでワクチン接種された個体を感染した個体を区別することはできない。(例えば、米国特許第7,087,713号)。

40

【0107】

マクロファージは、M.tuberculosis免疫の主要なエフェクターとして作用することが示されているが、T細胞はそのような免疫の重要なインデューサーである。M.tuberculosis感染に対する保護におけるT細胞の重要な役割は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に関連するCD4 T細胞の枯渇により、AIDS患者におけるM.tuberculosisの頻繁な発生によって示される。Mycobacterium反応性CD4 T細胞は、インターフェロン(IFN-)の強力なプロデ

50

ユーザーであることが示されており、これはひいては、マウスにおいてマクロファージの抗マイコバクテリア効果を誘導することが示されている。ヒトにおけるIFN- γ の役割は、あまり明確ではないが、研究は、1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD₃が、単独で、またはIFN- γ もしくは腫瘍壊死因子- α と組み合わせて、ヒトマクロファージを活性化してM. tuberculosis感染を阻害することを示している。さらに、IFN- γ は、ヒトマクロファージを刺激して1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD₃を作製することが知られている。同様に、IL-12は、M. tuberculosis感染に対する抵抗性の刺激において役割を果たすことが示されている。M. tuberculosis感染の免疫学の概説については、Chan and Kaufmann, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Bloom (ed.), ASM Press, Washington, D. C. (1994)を参照されたい。

10

【0108】

結核を診断するため、または結核に対する防御免疫を誘導するための既存の化合物および方法には、1つ以上のMycobacteriumタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分を含有するポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするDNA分子の使用が含まれる。そのようなポリペプチドまたはDNA配列および適切な検出試薬を含有する診断キットは、患者および生物学的試料におけるMycobacterium感染の検出に使用され得る。そのようなポリペプチドに対する抗体も提供される。加えて、そのような化合物は、Mycobacterium感染に対する免疫化のための本明細書に記載される組成物に製剤化され得る。(米国特許第6,949,246号および同第6,555,653号)。

20

【0109】

マラリアは、1960年代に世界の多くの地域では根絶されたが、疾患は、依然として持続し、既存の薬物に耐性のある疾患の新しい株が出現している。マラリアは、90を超える国で主要な公衆衛生問題である。マラリアの10症例中の9症例は、サハラ以南のアフリカで発生する。世界の人口の3分の1以上にリスクがあり、毎年3億5000万~5億人がマラリアに感染している。今年、4500万人の妊婦がマラリアに罹患するリスクがある。すでに感染した個体のうち、毎年100万人超が予防可能な疾患で死亡する。それらの死亡の大部分は、アフリカの子どもたちである。

30

【0110】

マラリアは、通常、感染した雌Anopheles mosquitoに刺されたときに伝播する。伝播するには、蚊は、すでにマラリアに感染している人から吸血していることによって感染している必要がある。マラリアは、寄生生物によって引き起こされ、疾患の臨床症状には、発熱およびインフルエンザ様症状、例えば、悪寒、頭痛、筋肉痛、および倦怠感が含まれる。これらの症状は、悪心、嘔吐、および下痢を伴う場合がある。マラリアはまた、赤血球の損失のために貧血および黄疸を引き起こし得る。

【0111】

マラリアの一種、Plasmodium falciparumでの感染症は、迅速に治療されない場合、腎不全、発作、精神錯乱、昏睡、および死亡を引き起こし得る。

40

【0112】

個体におけるマラリアのためのインビトロ診断方法が知られており、個体から採取された組織または生体液を分子またはポリペプチド組成物と接触させることを含み、当該分子またはポリペプチド組成物は、当該組成物と、組織または生体液中に存在し得る抗体と、の間で起こるインビトロ免疫学的反応、および形成された抗原-抗体複合体のインビトロ検出を可能にする条件下、P. falciparumの感染活性に起因するタンパク質の1つ以上のTエピトープの全部または一部を有する1つ以上のペプチド配列を含む(例えば、米国特許第7,087,231号を参照されたい)。

【0113】

組換えPlasmodium falciparum(3D7)AMA-1エクトドメイ

50

ンの発現および精製が記載されている。以前の方法は、ネイティブ分子のフォールディングおよびジスルフィド架橋を保持する高度に精製されたタンパク質を生成している。組換えAMA-1は、診断試薬として、ならびに抗体産生において、および単独での使用のためのタンパク質として、またはマラリアを予防するためのワクチンの一部として有用である。(米国特許第7,029,685号)。感染後に感受性哺乳動物宿主の血漿に分泌されるタンパク質またはタンパク質のフラグメントである種特異的P.vivaxマラリアペプチド抗原をコードするポリヌクレオチドが当該技術分野で記載されており、これらの抗原に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体も同様である。ペプチド抗原、モノクローナル抗体、および/またはポリクローナル抗体は、マラリアを診断するため、およびPlasmodium vivaxが感染症の原因となっている種であるかを決定するために使用されるアッセイにおいて利用される。(米国特許第6,706,872号) 感染後に感受性哺乳動物宿主の血漿に分泌されるタンパク質またはタンパク質のフラグメントである種特異的P.vivaxマラリアペプチド抗原も報告されており、これらの抗原に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体も同様である。ペプチド抗原、モノクローナル抗体、および/またはポリクローナル抗体は、マラリアを診断するため、およびPlasmodium vivaxが感染症の原因となっている種であるかを決定するために使用されるアッセイにおいて利用される(例えば、米国特許第6,231,861号を参照されたい)。

【0114】

組換えPlasmodium falciparum(3D7)AMA-1エクトドメインはまた、ネイティブ分子のフォールディングおよびジスルフィド架橋を保持する高度に精製されたタンパク質を生成する方法によって発現されている。組換えAMA-1は、診断試薬として、抗体産生における使用のために、およびワクチンとして有用である。(米国特許第7,060,276号)同様に、ネイティブ分子のフォールディングおよびジスルフィド架橋を保持する、組換えPlasmodium falciparum(3D7)MSP-142の発現および精製が知られている。組換えMSP-142は、診断試薬として、抗体産生における使用のために、およびワクチンとして有用である。(米国特許第6,855,322号)。

【0115】

マラリア感染性病原体での感染症を有するか、またはそれを有するリスクがあると疑われる対象を特定するヒトマラリア感染症の検出のための診断方法は、よってこれらおよび関連する開示に従って知られている。具体的には、例えば、血液試料は、3-アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド(APAD)、基質(例えば、乳酸塩または乳酸)、および緩衝剤を含有する試薬と組み合わせられる。試薬は、マラリア原虫によって生成される独自の解糖酵素の存在を検出するように設計される。この酵素は、寄生生物乳酸デヒドロゲナーゼ(PLDH)として知られている。PLDHは、上記の試薬を使用して宿主LDHから容易に区別可能である。試薬と寄生血液試料との組み合わせは、APADの低減をもたらす。しかしながら、APADは、宿主LDHによって低減されない。低減したAPADは、次いでスペクトル、蛍光、電気泳動、または比色分析を含む、様々な技法によって検出され得る。

【0116】

前述の方法で低減したAPADの検出は、マラリア感染の肯定的な兆候を提供する(例えば、米国特許第5,124,141号)。マラリアを診断するための別の方法論において、Plasmodium falciparum抗原GLURPに由来する特徴的なアミノ酸配列を含むポリペプチドは、ポリペプチドに対して産生されるか、またはそれと反応性である特異的抗体によって試験試料において認識される。(米国特許第5,231,168号)。

【0117】

リーシュマニア症は、インド亜大陸、アフリカ、およびラテンアメリカで頻繁に流行する広範な寄生虫症であり、ワクチン開発についての世界保健機関の優先事項である。異なる

疾患の複合体、*Leishmania* 寄生生物は、内臓の致命的な感染症、および重度の皮膚疾患を引き起こす。リーシュマニア症の最も破壊的な形態の1つは、鼻および口の外観を損なう感染症である。リーシュマニア症の症例数は増加しており、現在多くの地域で制御不能である。リーシュマニア症は、HIV感染の結果として、一部の先進国、特に南ヨーロッパでも増加している。利用可能な薬物は、毒性であり、高価であり、長期間の毎日の注射を必要とする。

【0118】

Leishmania は、マクロファージまたは免疫系の白血球に生息する寄生原虫である。寄生生物は、地球の広大な地域に生息するため、制御が難しい、小さな吸血昆虫（サシチョウバエ）に咬まれることによって伝播する。

10

【0119】

内臓リーシュマニア症は、疾患の3つの症状の中で最も危険である。毎年約50万の内臓形態（カラアザールまたは「死病」）の新規症例が発生すると推定される。現在、2億人超は、内臓リーシュマニア症に罹患するリスクがある。内臓リーシュマニア症の症例の90%超は、インド、バングラデシュ、スーダン、ブラジル、およびネパールで発生する。死亡のほとんどは子どもたちに起こる。皮膚形態を有するものは、多くの場合、永久的に外観を損なわれたままとなる。

【0120】

Leishmania 感染症は、診断が難しく、典型的には、組織生検標本の組織病理学的分析を含む。しかしながら、いくつかの血清学および免疫学的診断アッセイが開発されている。（米国特許第7,008,774号、Senaldi et al., (1996) *J. Immunol. Methods* 193:95、Zijlstra, et al., (1997) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:671-673、Badaro, et al., (1996) *J. Inf. Dis.* 173:758-761、Choudhary, S., et al., (1992) *J. Comm. Dis.* 24:323-36、Badaro, R., et al., (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:727-78、Choudhary, A., et al., (1990) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:363-366、およびReed, S. G., et al., (1990) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:632-639）。プロマスチゴートは、代謝産物を培養培地に放出して、条件培地を生成する。これらの代謝産物は、宿主に対して免疫原性である。Schnur, L. F., et al., (1972) *Isrl. J. Med. Sci.* 8:932-942、Sergeiev, V. P., et al., (1969) *Med. Parasitol.* 38:208-212、El-On, J., et al., (1979) *Exper. Parasitol.* 47:254-269、およびBray, R. S., et al., (1966) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:605-609、米国特許第6,846,648号、米国特許第5,912,166号、米国特許第5,719,263号、米国特許第5,411,865号を参照されたい）。

20

30

【0121】

いくつかの実施形態において、抗原は、参照により本明細書に組み込まれる、US2009/0041798、US2009/0291099、米国特許第8,410,258号、米国特許第8,231,881号、およびWO2012/064659に記載される*Leishmania* 抗原である。いくつかの実施形態において、抗原は、少なくとも*Leishmania* ステロール24-c-メチルトランスフェラーゼ（SMT）ポリペプチド配列および*Leishmania* 非特異的ヌクレオシドヒドロラーゼ（NH）ポリペプチド配列を含む融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、*Leishmania* NHポリペプチド配列は、*L. donovani*、*L. infantum*、および*L. major* の*Leishmania* NH配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列の少なくとも免疫原性部分を含む。いくつかの実施形態において、*Leis*

40

50

h m a n i a N Hポリペプチド配列は、配列番号 1、3、および 5 からなる群から選択される配列、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列の少なくとも免疫原性部分を含む。いくつかの実施形態において、L e i s h m a n i a S M Tポリペプチド配列は、L . d o n o v a n i、L . i n f a n t u m、および L . m a j o r の L e i s h m a n i a S M T配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列の少なくとも免疫原性部分を含む。いくつかの実施形態において、L e i s h m a n i a S M Tポリペプチド配列は、配列番号 7、9、および 11 からなる群から選択される配列、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列の少なくとも免疫原性部分を含む。いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含む。配列番号 1、3、5、7、9、11、および 13 の配列は、参照により本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 2 / 0 6 4 6 5 9 および U S 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 8 8 に提供される。

【0122】

世界中で約 4000 万人が、A I D S を引き起こすウイルスである H I V に感染している。毎年約 300 万人が疾患で死亡し、その 95% が発展途上世界である。毎年、500 万人近くが H I V に感染する。現在、サハラ以南に住むアフリカ人が疾患の最も高い負担を有するが、インド、中国、およびロシアなどの他の国へも急速に蔓延している。エビデミックは、マイノリティ人口の間で最も急速に拡大している。米国では、1981 年以来 95 万件超の A I D S が報告されている。A I D S は、生殖適齢期に人々を襲う。女性は、生物学および社会的理由の両方で、H I V / A I D S の増加したリスクを有する。

【0123】

A I D S は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) によって引き起こされ、これは体の免疫系の細胞を殺滅および損傷し、感染症および特定の癌と闘う体の能力を徐々に破壊する。H I V は、最も一般的には、感染したパートナーと無防備な性交渉を行うことによって蔓延する。問題に対する最も堅牢な解決策は、ウイルスの蔓延するのを防止することである。安全、効果的、および手頃な価格の H I V ワクチンを作製することは、この目標を達成するための 1 つの方法である。世界中で、H I V 感染のリスクが高い 5 人に 1 人未満が効果的な予防へのアクセスを有する。

【0124】

ウイルス培養、患者標本からの決定的核酸配列の P C R、および患者血清中の抗 H I V 抗体の存在についての抗体検査を含む、H I V 感染を診断するための方法が知られている (例えば、米国特許第 6,979,535 号、同第 6,544,728 号、同第 6,316,183 号、同第 6,261,762 号、同第 4,743,540 号を参照されたい)。

【0125】

本明細書に開示される特定の他の実施形態によれば、組成物および使用方法は、癌の免疫療法治療に有用であり得るように、癌細胞に由来する抗原を含み得る。例えば、組成物は、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、腎癌、または黒色腫癌のものなどの腫瘍拒絶抗原に有用性を見出し得る。例示的な癌または癌細胞由来抗原には、M A G E 1、3、および M A G E 4、または W O 9 9 / 4 0 1 8 8 に開示されるものなどの他の M A G E 抗原、P R A M E、B A G E、L a g e (N Y E o s 1 としても知られる) S A G E および H A G E (W O 9 9 / 5 3 0 6 1)、または G A G E (R o b b i n s a n d K a w a k a m i, 1 9 9 6 C u r r e n t O p i n i o n s i n I m m u n o l o g y 8, p p s 6 2 8 - 6 3 6、V a n d e n E y n d e e t a l ., I n t e r n a t i o n a l J o u r n a l o f C l i n i c a l & L a b o r a t o r y R e s e a r c h (1 9 9 7 & 1 9 9 8)、C o r r e a l e e t a l . (1 9 9 7), J o u r n a l o f t h e N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e 8 9, p . 2 9 3) が含まれる。癌抗原のこれらの非限定的な例は、黒色腫、肺癌、肉腫、および膀胱癌などの広範囲の腫瘍タイプで発現される。例えば、米国特許第 6,544,518 号を参照されたい。他の腫瘍特異的抗原は、本明細書に記載される組成物における使用に適しており、これらに限定されないが、G M 2、G M 3、

もしくは担体タンパク質へのそのコンジュゲートを含むか、または抗癌免疫応答を誘発もしくは増強するためのGLAワクチン組成物における使用のための抗原は、多くの癌の治療において有用な、全長ゴナドトロピンホルモン放出ホルモン(GnRH、WO95/20600)、短い10アミノ酸長ペプチドなどの自己ペプチドホルモンであり得る。

【0126】

別の実施形態において、前立腺特異抗原(PSA)、PAP、PSCA(例えば、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(4)1735-1740 1998)、PSMA、または好ましい実施形態においてプロスターゼとして知られる抗原などの、前立腺抗原が使用される。(例えば、Nelson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999)96:3114-3119、Ferguson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999.96, 3114-3119、WO98/12302、米国特許第5,955,306号、WO98/20117、米国特許第5,840,871号および同第5,786,148号、WO00/04149)。他の前立腺特異抗原は、WO98/137418およびWO/004149から知られている。もう一つは、STEAPである(PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)。

10

【0127】

本発明の文脈で有用な他の腫瘍関連抗原には、Plu-1(J Biol. Chem 274(22)15633-15645, 1999)、HASH-1、Hash-2、Cripto(Salomon et al Bioessays 199, 21:61-70、米国特許第5,654,140号)、およびCriptin(米国特許第5,981,215号)が含まれる。加えて、癌の治療におけるワクチンに特に関連する抗原には、チロシナーゼおよびサバイピンも含まれる。

20

【0128】

癌抗原を含む組成物に関する本明細書に開示される実施形態は、HER-2/neu発現または他の癌特異的もしくは癌関連抗原などの、腫瘍関連抗原発現を特徴とする任意の癌に対して有用であり得る。

【0129】

癌を有するか、または癌を有するリスクがあると疑われる対象における癌の診断は、広範囲の当該技術分野で認められる方法論のいずれかによって達成され得、これは臨床症状、癌の進行の程度、癌の種類、および他の因子を含む様々な因子に応じて様々であり得る。癌診断の例には、患者試料(例えば、血液、皮膚生検、他の組織生検、外科標本など)の組織病理学的、組織細胞化学的、免疫組織細胞化学的、および免疫組織病理学的検査、定義された遺伝子(例えば、核酸)マーカーのPCR検査、循環する癌関連抗原もしくはそのような抗原を有する細胞、または定義された特異性の抗体の血清学的試験、あるいは当業者が精通しているであろう他の方法論が含まれる。例えば、米国特許第6,734,172号、同第6,770,445号、同第6,893,820号、同第6,979,730号、同第7,060,802号、同第7,030,232号、同第6,933,123号、同第6,682,901号、同第6,587,792号、同第6,512,102号、同第7,078,180号、同第7,070,931号、JP5-328975、Waslylyk et al., 1993 Eur. J Bioch. 211(7):18を参照されたい。

30

40

【0130】

本発明の特定の実施形態による組成物および方法はまた、宿主または対象の免疫系が「自己」組織、細胞、生体分子(例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リボタンパク質、プロテオ脂質、脂質、糖脂質、RNAおよびDNAなどの核酸、オリゴ糖、多糖、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなど、ならびに対象細胞および組織の他の分子成分)、またはエピトープ(例えば、抗体可変領域相補性決定領域(CDR)によって、またはT細胞受容体CDRによって認識されるものなどの特定の免疫学的に定義される認識構造)に対して向けられる免疫応答を有害に媒介する疾患、状態、また

50

は障害を含む、自己免疫疾患の予防または治療に使用され得る。

【0131】

自己免疫疾患は、よって、いずれの場合にも正常な自家組織に対して向けられる細胞または抗体のいずれかが関与する異常な免疫応答を特徴とする。哺乳動物における自己免疫疾患は、一般に、2つの異なるカテゴリー：細胞媒介性疾患（すなわち、T細胞）または抗体媒介性障害のうちの1つに分類することができる。細胞媒介性自己免疫疾患の非限定的な例には、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、橋本甲状腺炎、I型糖尿病（若年発症型糖尿病）、および自己免疫性ブドウ膜網膜炎が含まれる。抗体媒介性自己免疫障害には、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（またはSLE）、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性喘息、クリオグロブリン血症、血栓性血小板減少性紫斑病、原発性硬化性胆管炎、および悪性貧血が含まれるが、これらに限定されない。全身性エリテマトーデスに関連する抗原は、核内低分子リボ核酸タンパク質（snRNP）であり、グレーブス病のそれは、チロトロピン受容体、チログロブリン、および甲状腺上皮細胞の他の成分であり（Akamizu et al., 1996、Kellerman et al., 1995、Raju et al., 1997、およびTexier et al., 1992）、天疱瘡のそれは、デスマグレイン3および他の接着分子などのカドヘリン様天疱瘡抗原であり（Memar et al., 1996、Stanley, 1995、Plott et al., 1994、およびHashimoto, 1993）、血栓性血小板減少性紫斑病のそれは、血小板の抗原である。（例えば、米国特許第6,929,796号、Gorski et al. (Eds.), Autoimmunity, 2001, Kluwer Academic Publisher, Norwell, Mass., Radbruch and Lipsky, P. E. (Eds.) Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.) 2001, Springer, NYを参照されたい。）

【0132】

自己免疫は、1型糖尿病、多発性硬化症、狼瘡、リウマチ性関節炎、強皮症、および甲状腺疾患を含む、80を超える異なる疾患において役割を果たす。ほとんどの自己免疫疾患についての罹患率の精力的な定量的推定は欠けている。1990年代後半に行われた最近の研究は、自己免疫疾患が米国で3番目に一般的な主要な病気であり、最も一般的な自己免疫疾患が850万人超のアメリカ人に影響を及ぼすことを明らかにする。疾患の有病率の現在の推定値は、米国人口の5~8パーセントの範囲である。ほとんどの自己免疫疾患は、女性に不釣り合いに影響を及ぼす。女性は、自己免疫疾患にかかる可能性が男性よりも2.7倍高い。女性は、自己免疫疾患の影響をより受けやすく、男性は、女性よりも高レベルのナチュラルキラー細胞活性を有すると思われる。（Jacobsen et al., Clinical Immunology and Immunopathology, 84:223-243, 1997.）

【0133】

自己免疫疾患は、免疫系が自己組織を非自己と間違え、不適切な攻撃を仕掛ける場合に発症する。体は、例えば、腸（クローン病）および脳（多発性硬化症）を含む、自己免疫疾患とは異なる方法で影響を受け得る。自己抗体が自己細胞または自己組織を攻撃してそれらの機能を損傷し、結果として、自己免疫疾患を引き起こすこと、自己抗体が自己免疫疾患の実際の発症（例えば、臨床的兆候および症状の出現）前に患者の血清中で検出されることが知られている。よって、自己抗体の検出は、自己免疫疾患の存在またはこれを発症するリスクの早期発見または認識を可能にする。これらの所見に基づいて、自己抗原に対する様々な自己抗体が発見され、自己抗原に対する自己抗体が臨床試験において測定されている（例えば、米国特許第6,919,210号、同第6,596,501号、同第7,012,134号、同第6,919,078号）が、他の自己免疫診断は、関連代謝産物（例えば、米国特許第4,659,659号）または免疫学的反応性（例えば、米国特許第4,614,722号および同第5,147,785号、同第4,420,558

10

20

30

40

50

号、同第5, 298, 396号、同第5, 162, 990号、同第4, 420, 461号、同第4, 595, 654号、同第5, 846, 758号、同第6, 660, 487号)の検出を含み得る。

【0134】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、腎臓透析の対象、化学療法および/または放射線療法の対象、移植レシピエントなどを含む、高齢者および/または免疫抑制者の治療に特に適用可能であろう。そのような個体は、一般に、ワクチンに対する低下した免疫応答を示し、したがって、本発明の組成物の使用は、これらの対象において達成される免疫応答を増強することができる。

【0135】

他の実施形態において、本発明の組成物において使用される抗原(複数可)には、慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの状態の予防および療法のための、細菌感染(例えば、肺炎球菌)によって引き起こされるか、または悪化されるものなどの、呼吸器疾患に関連する抗原が含まれる。COPDは、慢性気管支炎および/または肺気腫を有する患者における不可逆的または部分的に可逆的な気道閉塞の存在によって生理学的に定義される(American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1995 November; 152(5 Pt 2): 577-121)。COPDの悪化は、多くの場合、細菌(例えば、肺炎球菌)感染によって引き起こされる(Clinical Microbiology Review, 2001 April; 14(2): 336-63)。

【0136】

熱安定性組成物における使用のための油

特定の実施形態は、油を含む本明細書に記載される組成物を企図し、これは、いくつかのそのような実施形態において、アジュバント活性に寄与し得、他のそのような実施形態において、追加的または代替的に、薬学的に許容される担体または賦形剤を提供し得る。任意の数の適切な油が知られており、本開示に基づいて組成物に含めるために選択され得る。そのような油の例には、限定ではなく例示として、スクアレン、合成スクアレン、生合成スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、合成イソプレノイド、生合成イソプレノイド、ポリプレノール、オリーブ油、コレステロール、およびモノオレイン酸マンニドが含まれる。

【0137】

本明細書で企図される油は、エマルジョンシステムで使用することができ、そのようなエマルジョンシステムは、エマルジョンアジュバントと呼ばれる。エマルジョンアジュバントには、水中油型、油中水型、または水中油中水型混合物が含まれる。理論によって縛られることなく、そのようなエマルジョンアジュバントは、抗原の徐放を可能にして免疫系の持続的刺激を提供することによって機能することができる。特定のエマルジョンアジュバントは、限定されないが、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)、グルコピラノシル脂質アジュバント(GLA)、モノホスホリルリピドA(MLA)、および3-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MLA)などの免疫刺激性アジュバントを含む他のアジュバントのための送達システムとしても使用することができる。単相または多相エマルジョンシステムを含む、アジュバント組成物を製剤化するための特定のエマルジョンシステムが記載されている。水中油型エマルジョンアジュバント自体は、アジュバント組成物として有用であることが示されており(EP0399843B)、また水中油型エマルジョンおよび他の活性剤の組み合わせは、ワクチンのアジュバントとして記載されている(WO95/17210、WO98/56414、WO99/12565、WO99/11241)。油中水型エマルジョン(米国特許第5,422,109号、EP0480982B2)および水中油型エマルジョン(米国特許第5,424,067号、EP0480981B)などの他の油エマルジョンアジュバントが記載されている。

【0138】

本発明における使用のための油エマルジョンアジュバントは、天然または合成であり得、鉱物または有機であり得る。鉱物油および有機油の例は、当業者には容易に明らかになる

10

20

30

40

50

であろう。特定の実施形態において、本発明の組成物（例えば、熱安定性噴霧乾燥ワクチン）は、アジュバントが油相に組み込まれている水中油型のエマルジョンを含む。水中油型組成物がヒト投与に適しているために、エマルジョンシステムの油相は、好ましくは、代謝可能な油を含む。代謝可能な油という用語の意味は、当該技術分野において周知である。代謝可能とは、「代謝によって変換することができる」として定義することができる（Dorland's illustrated Medical Dictionary, W. B. Saunders Company, 25th edition (1974)）。油は、レシピエントに毒性ではなく、代謝によって変換することができる、任意の植物油（plant oil）、植物油（vegetable oil）、魚油、動物油、または合成油であり得る。ナッツ（ピーナッツ油など）、種子、および穀物は、植物油の一般的な供給源である。合成油も使用され得る。

10

【0139】

例えば、スクアレン（2, 6, 10, 15, 19, 23 - ヘキサメチル - 2, 6, 10, 14, 18, 22 - テトラコサヘキサエン）は、サメ肝油に多量に、オリーブ油、小麦胚芽油、米糠油、および酵母により少量見られる不飽和油であり、本発明における使用のために特に好ましい油である。スクアレンは、コレステロールの生合成における中間体であるという事実によって、代謝可能な油である（Merck index, 10th Edition, entry no. 8619）。本発明に従って有用な例示的な代謝可能な油には、スクアレン、大豆油、ゴマ油、およびカプリル酸 / カプリン酸トリグリセリド（MIGLYCOL 810油）が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、代謝可能な油は、スクアレンを含む。別の実施形態において、代謝可能な油は、酵母由来のスクアレンまたは酵母由来の関連イソプレノイド構造などの、1つ以上の酵母由来のイソプレノイドを含む。

20

【0140】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、0.01% ~ 5% v/v、約0.01% ~ 4% v/v、約0.01% ~ 3% v/v、約0.01% ~ 2% v/v、約0.01% ~ 1% v/v、または約0.01% ~ 0.5% v/vの濃度で存在する代謝可能な油を含む。いくつかの実施形態において、代謝可能な油は、約0.01% v/v、約0.05% v/v、約0.1% v/v、約0.5% v/v、約1% v/v、約1.5% v/v、約2% v/v、約2.5% v/v、約3% v/v、約3.5% v/v、約4% v/v、約4.5% v/v、約5% v/v、約6% v/v、約7% v/v、約8% v/v、約9% v/v、約10% v/v、約11% v/v、約12% v/v、約13% v/v、約14% v/v、約15% v/v、約16% v/v、約17% v/v、約18% v/v、約19% v/v、または約20% v/vの濃度で存在する。いくつかの実施形態において、代謝可能な油は、約2% v/vの濃度で存在する。いくつかの実施形態において、代謝可能な油は、1% v/v未満の濃度で存在する。記載されるパーセンテージは、噴霧乾燥前の水中油型エマルジョン製剤中、噴霧乾燥後の乾燥粉末中、または再構成された乾燥粉末中いずれかのパーセンテージを指す。

30

【0141】

安定な水中油型エマルジョン内に見られる油滴のサイズは、好ましくは、1ミクロン未満であり、実質的に30 ~ 600 nm、好ましくは直径が実質的に約30 ~ 500 nm、最も好ましくは直径が実質的に150 ~ 500 nmの範囲、特に光子相関分光法によって測定されるように直径が約150 nmであり得る。これに関して、数による油滴の80%は、好ましい範囲内にあるべきであり、より好ましくは、数による油滴の90%超、最も好ましくは95%超は、定義されたサイズ範囲内にある。

40

【0142】

エマルジョンの親水性 - 親油性バランス（HLB）は、界面活性剤の親水性または親油性の力の推定を可能にする。両親媒性分子のHLBは、一般的には、次のように計算される： $HLB = (20 \times \text{親水性部分の重量}) / (\text{両親媒性分子の重量})$ 。HLBは、0（最も親油性の分子の場合） ~ 20（最も親水性の分子の場合）の範囲の値を有し得る。界面活

50

性剤の化学組成（特に、例えば、エトキシル基またはアルケンオキシドの添加）に従って、この推定は、変化し得、HLB値のドメインは、増加し得る（例えば、LUTROL F68（登録商標）は29のHLBを有する）。界面活性剤の混合物では、混合物のHLBは、その重量比によってバランスがとられる、各界面活性剤のHLBの加算である： $HLB = (HLB \text{ 界面活性剤 } X \times \text{重量界面活性剤 } X) + (HLB \text{ 界面活性剤 } Y \times \text{重量界面活性剤 } Y) / (\text{重量界面活性剤 } X + \text{重量界面活性剤 } Y)$ 。本発明に従って作製されるエマルジョンの一実施形態において、エマルジョンの最終的なHLBは、約9～約12、好ましくは約9.5～約11.5、より好ましくは約10～約11.5である。いくつかの実施形態において、エマルジョンのHLBは、約10.5～約11.0である。水中油型エマルジョンを生成する方法は、当業者には周知である。一般的には、方法は、油相をPBS/TWEEN80（登録商標）溶液などの適切な界面活性剤と混合すること、続いてホモジナイザーを使用した均質化を含む。例えば、混合物を1回、2回以上注射針に通過させることを含む方法は、少量の液体を均質化するのに適しているであろう。同様に、マイクロfluidイザ（M110Sマイクロ流体力学装置、最大50パス、最大圧力入力6バール（出力圧力約850バール）で2分間）での乳化プロセスは、少量または多量のエマルジョンを生成するように適応することができる。この適応は、調製物が必要な直径の油滴で達成されるまで、得られたエマルジョンの測定を含む日常的な実験によって達成することができる。

10

【0143】

治療組成物

20

いくつかの実施形態において、噴霧乾燥組成物は、治療組成物であり、治療目的で有用である。よって、いくつかの実施形態において、記載される組成物は、乾燥粉末組成物を含み、疾患、状態、または障害の治療のための生物活性剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、アレルギー、癌、感染性疾患、自己免疫、または依存症の治療または予防に有用である。いくつかの実施形態において、薬剤は、免疫応答を刺激、増強、および/または調節するために有用である。よって、本明細書において、「抗原」として記載されるが、生物活性剤はまた、他の治療および免疫応答を活性化し得る。

【0144】

開示される実施形態のいくつかの態様において、組成物は、癌抗原または癌抗原をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、癌抗原を含むワクチン組成物は、HER-2/neu発現などの腫瘍関連抗原発現、または他の癌特異的もしくは癌関連抗原を特徴とする任意の癌に対して有用であろう。

30

【0145】

本開示の特定の実施形態による組成物および方法はまた、宿主または対象の免疫系が「自己」組織、細胞、生体分子（例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、プロテオ脂質、脂質、糖脂質、RNAおよびDNAなどの核酸、オリゴ糖、多糖、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなど、ならびに対象細胞および組織の他の分子成分）、またはエピトープ（例えば、抗体可変領域相補性決定領域（CDR）によって、またはT細胞受容体CDRによって認識されるものなどの特定の免疫学的に定義される認識構造）に対して向けられる免疫応答を有害に媒介する疾患、状態、または障害を含む、自己免疫疾患の予防または治療に使用され得る。

40

【0146】

自己免疫疾患は、よって、いずれの場合にも正常な自家組織に対して向けられる細胞または抗体のいずれかが関与する異常な免疫応答を特徴とする。哺乳動物における自己免疫疾患は、一般に、2つの異なるカテゴリー：細胞媒介性疾患（すなわち、T細胞）または抗体媒介性障害のうちの1つに分類することができる。細胞媒介性自己免疫疾患の非限定的な例には、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、橋本甲状腺炎、I型糖尿病（若年発症型糖尿病）、および自己免疫性ブドウ膜網膜炎が含まれる。抗体媒介性自己免疫障害には、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（またはSLE）、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性喘息、クリオグロブリン血症、血栓性血小

50

板減少性紫斑病、原発性硬化性胆管炎、および悪性貧血が含まれるが、これらに限定されない。全身性エリテマトーデスに関連する抗原は、核内低分子リボ核酸タンパク質（snRNP）であり、グレーブス病のそれは、チロトロピン受容体、チログロブリン、および甲状腺上皮細胞の他の成分であり、天疱瘡のそれは、デスマグレイン3および他の接着分子などのカドヘリン様天疱瘡抗原であり、血栓性血小板減少性紫斑病のそれは、血小板の抗原である。

【0147】

本明細書で提供される組成物は、例えば、結核に対する防御免疫を誘導するために使用され得、1つ以上のMycobacteriumタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分を含むポリペプチドならびにそのようなポリペプチドをコードするDNAおよびRNA分子の使用を含む。加えて、そのような化合物は、Mycobacterium感染に対する免疫化のためのワクチンおよび/または薬学的組成物に製剤化され得る。

10

【0148】

他の実施形態において、本開示の組成物には、慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの状態の予防および療法のための、細菌感染（例えば、肺炎球菌）によって引き起こされるか、または悪化されるものなどの、呼吸器疾患に関連する抗原が含まれる。治療され得る呼吸成分を有する他の疾患には、結核（TB）、インフルエンザ（流感）、呼吸器合胞体ウイルス感染症（RSV）、および肺癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0149】

直接的なインピボ手順に加えて、細胞が宿主から取り出され、修飾され、同じまたは別の宿主動物に配置されるエクスピボ手順が使用され得る。エクスピボの文脈において、上記の組成物のいずれかを、抗原をコードする核酸分子の組織細胞への導入に利用することができることは明らかであろう。ウイルス、物理的、および化学的取り込み方法のためのプロトコルは、当該技術分野において周知である。

20

【0150】

いくつかの態様において、本開示の組成物は、宿主、患者、または細胞培養において、免疫応答を増強または誘発するために有用である。本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意の哺乳動物を指す。患者は、感染性疾患、乳癌などの癌、または自己免疫疾患に罹患している場合があるか、または正常である（すなわち、検出可能な疾患および/または感染症を有しない）場合がある。「細胞培養物」は、免疫担当細胞または免疫系の単離された細胞（T細胞、マクロファージ、単球、B細胞、および樹状細胞を含むがこれらに限定されない）を含む任意の調製物である。そのような細胞は、当業者に周知の様々な技法のいずれかによって単離され得る（例えば、フィコール-ハイパック密度遠心分離）。細胞は、癌に罹患している患者から（そうである必要はないが）単離されている場合があり、治療後に患者に再導入され得る。

30

【0151】

薬学的および治療的熱安定性組成物の使用

別の態様において、本明細書に記載される再構成された噴霧乾燥ワクチン組成物を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を刺激するための方法が本明細書に提供される。方法は、投与前に熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物を水中油型エマルジョンに再構成するステップをさらに含む。

40

【0152】

別の態様において、本明細書に記載される再構成された噴霧乾燥ワクチン組成物を対象に投与することを含む、対象における治療応答を刺激するための方法が本明細書に提供される。方法は、投与前に熱安定性噴霧乾燥ワクチン組成物を水中油型エマルジョンに再構成するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、治療応答は、アレルギー、癌、感染性疾患、自己免疫、または依存症の治療または予防のためのものである。

【0153】

別の実施形態において、噴霧乾燥ワクチンまたはアジュバント粉末を吸入可能な方法を介して投与することを含む、対象における免疫応答を刺激するための方法が本明細書に提供

50

される。

【0154】

別の実施形態において、噴霧乾燥ワクチンまたはアジュバント粉末を吸入可能な方法を介して投与することを含む、対象における免疫応答を刺激するための方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、治療応答は、アレルギー、癌、感染性疾患、自己免疫、または依存症の治療または予防のためのものである。

【0155】

いくつかの実施形態において、本発明は、呼吸成分を有する疾患を治療するために有用である。いくつかの実施形態において、呼吸成分は、結核（TB）、インフルエンザ（流感）、呼吸器合胞体ウイルス感染症（RSV）、および肺癌（またはそれらの治療）に関連する抗原を含む。

10

【0156】

したがって、本発明は、宿主、患者、もしくは対象において、または細胞培養において、免疫応答を増強または誘発するために有用である。患者は、感染性疾患、乳癌などの癌、または自己免疫疾患に罹患している場合があるか、または正常である（すなわち、検出可能な疾患および/または感染症を有しない）場合がある。「細胞培養物」は、免疫担当細胞または免疫系の単離された細胞（T細胞、マクロファージ、単球、B細胞、および樹状細胞を含むがこれらに限定されない）を含有する任意の調製物である。そのような細胞は、当業者に周知の様々な技法のいずれかによって単離され得る（例えば、フィコール・ハイバック密度遠心分離）。細胞は、癌に罹患している患者から（そうである必要はないが）単離されている場合があり、治療後に患者に再導入され得る。

20

【0157】

投与経路

本発明は、感染性疾患、癌、または自己免疫疾患などの状態のワクチン接種、治療的処置、および予防のための方法および組成物に関する。本発明の方法は、非経口および非経口投与を含む投与経路を含む。非経口投与経路には、経口、頬側、舌下、局所、経皮、眼、耳、鼻、直腸、吸入、および腔内経路が含まれるが、これらに限定されない。注射可能な方法には、非経口投与経路、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄内、髄腔内、脳室内、動脈内、および他の注射経路が含まれるが、これらに限定されない。これらの発明は、所定の期間にわたって抗原および/またはアジュバントの制御された、持続放出または徐放を提供することができる組成物を企図する。

30

【0158】

いくつかの実施形態において、ワクチン接種用の組成物は、乾燥粉末組成物であり、投与は、乾燥粉末ワクチンをワクチンの投与前に水性希釈剤で再構成し、再構成されたワクチンを非経口的に投与することを含む。いくつかの実施形態において、アジュバントワクチン組成物は、抗原組成物とは別に再構成され、投与前に混合される。いくつかの実施形態において、再構成されたワクチンは、直ちに投与される。他の実施形態において、乾燥粉末ワクチンは、例えば、吸入を介して、乾燥粉末として投与される。いくつかの実施形態において、吸入の方法は、吸入器の使用を含む。いくつかの実施形態において、吸入器は、能動的もしくは受動的な乾燥粉末吸入器または加圧定量吸入器である。いくつかの実施形態において、乾燥粉末製剤は、肺に直接投与される。

40

【0159】

製剤

本明細書における製剤の実施形態は、乾燥粉末製剤および/または再構成された乾燥粉末製剤であるが、そのような製剤、プロセスステップ、および材料は、多少異なり得るので、本発明は、本明細書に開示される特定の製剤、プロセスステップ、および材料に限定されないことを理解されたい。

【0160】

製剤は、当業者に知られており、錠剤、コーティング錠、チュアブル錠、発泡錠、ペレット、カプセル、シロップ、坐剤、注射可能な製剤、ならびに生理液に不溶性であるか、ま

50

たは抗原および/もしくはアジュバントの放出が機械的、化学的、もしくは酵素的活性のために製剤の分解後に放出される培地中の活性剤の分散物などの製剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0161】

キットおよび薬学的バック

特定の実施形態において、本明細書に記載されるワクチン組成物を含むキットも企図されており、これは1つ以上の容器で提供され得る。一実施形態において、ワクチン組成物のすべての成分は、単一の容器と一緒に存在するが、本発明の実施形態は、そのように限定されることを意図せず、2つ以上の容器も企図する。

【0162】

そのようなキット実施形態による容器は、任意の適切な容器、器、バイアル、アンプル、チューブ、カップ、ボックス、ボトル、フラスコ、ジャー、ディッシュ、シングルウェルもしくはマルチウェル装置のウェル、リザーバー、タンクなど、または本明細書に開示される組成物が配置、貯蔵、および/もしくは輸送され、内容物を取り出すためにアクセスされ得る他のデバイスであり得る。典型的には、そのような容器は、意図された使用と適合性があり、そこからの含有される内容物の回収を容易に達成することができる材料で作製され得る。そのような容器の好ましい例は、ガラスおよび/またはプラスチックの封止された、または再封止可能なチューブおよびアンプルを含み、針および注射器を使用した内容物の取り出しと互換性のあるゴム隔壁または他のシーリング手段を有するものを含む。

10

20

【0163】

そのような容器は、例えば、ガラスまたは化学的に適合性のあるプラスチックもしくは樹脂で作製され得、これは容器からの材料の効率的な回収を可能にし、かつ/または材料を、例えば、紫外線もしくは温度限界などの劣化条件から、または微生物汚染物質を含む望ましくない汚染物質の導入から保護する材料で作製されるか、またはコーティングされ得る。容器は、好ましくは、滅菌または滅菌可能であり、本明細書に記載されるワクチン組成物および/または免疫学的アジュバント組成物および/または抗原および/または組換え発現構築物などを懸濁または溶解するために使用され得るような、任意の担体、賦形剤、溶媒、ビヒクルなどと適合性であろう材料で作製される。

【0164】

本発明は、以下の例を参照することによってより完全に理解されるであろう。しかしながら、それらは、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に記載される例および実施形態は例示のみを目的としていることが理解される。上記の様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。それに照らした様々な修飾または変更は、前述の記載から当業者には明らかになり、本出願の精神および範囲内に含まれ、添付の特許請求の範囲内に含まれるものである。

30

【実施例】

【0165】

ワクチンなどの液体材料の、乾燥粉末への変換は、冷蔵および輸送に関連するコストを低減する。噴霧乾燥は、粉末が特定の特性を有するように操作されることを可能にするため、独特な解決策を提供する。例えば、乾燥粉末処理方法としての噴霧乾燥の使用は、流動性、サイズ、および形態などの特性を制御するように得られた粉末を操作することを可能にする。実施例1~4において、噴霧乾燥は、水中油型ナノエマルジョンとして製剤化された、アジュバント添加結核ワクチンを、乾燥粉末内にカプセル化する方法として調査された。非凝集性、非晶質微粒子内のアジュバント添加ワクチンのカプセル化の成功は、すべての成分の高い保持率で、1回の反復で達成された。異なる温度での3ヶ月にわたる粉末の安定性は、粉末がすべての温度について物理的に安定であったことを示した。再構成された粉末の物理化学的分析は、すべての試料についてナノエマルジョンサイズが維持されたが、上昇した温度での貯蔵で抗原およびアゴニストの経時的な損失を示した。室温で液体である物質のナノエマルジョンがゲル-微粒子に変換され、有意な損失なしに同じ液

40

50

滴サイズに再構成され得ることは、当該分野において知られていなかったもので、これは驚くべき結果であった。実施例 4 において、噴霧乾燥の使用は、吸入可能な送達経路について調査された。

【0166】

実施例 1 ~ 4 の方法は、噴霧乾燥ワクチンまたはアジュバントを使用し、乾燥粉末、ならびに安定性および噴霧乾燥製剤の実現可能性を決定する他の重要な特徴について再構成されたワクチン製剤を特徴分析した。操作された粒子は、長期安定性のために非晶質微粒子内にナノエマルジョンをカプセル化するべきである。2 つの製剤を噴霧乾燥し、安定性について評価した：トレハロースおよびトリス緩衝剤 (SD-TG) で噴霧乾燥された GLA-SE ビヒクル、ならびにトレハロースおよびトリス緩衝剤 (SD-TGI) で噴霧乾燥された ID93 タンパク質を含む GLA-SE ビヒクル。吸入可能な製剤は、ロイシンをさらに含み得る。

10

【0167】

ID93 は、すべての年齢で結核 (TB) と闘うためのワクチンとして強力な T ヘルパー細胞 (TH1) 免疫応答を誘導する 4 つの *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) 抗原で構成される組換えタンパク質であるため、使用した [3]。この抗原は、グルコピラノシルリピド A (GLA) スクアレン水中油型エマルジョン (SE) と組み合わせられ、GLA-SE は、ナノエマルジョンとして製剤化されるアジュバントシステムである [3]。世界保健機関 (WHO) は、2018 Global Tuberculosis Report において、TB が単一の感染性因子による主要な死因であると述べている [4]。Mtb の感染を予防する現在認可されている唯一の TB ワクチン、Bacille Calmette-Guérin (BCG) は、158 ヶ国で子どもの免疫化のために効果的に実施されているが、現在、成人における TB の予防に有効なワクチンはない [4]。マウス、モルモット、および非ヒト霊長類に対する GLA-SE + ID93 ワクチン投与量試験は、誘導された TH1 応答、および BCG 免疫化の増強を示した [3]。アジュバント成分は、ヒト臨床研究において、GLA-SE + ID93 製剤によるワクチン接種が、ID93 単独によるワクチン接種よりも高い抗体応答を誘発したことが示されたので、使用した [5]。

20

【0168】

水中油型エマルジョンを噴霧乾燥することによる乾燥粉末ワクチンの製造
以下の製剤および方法を使用して、乾燥粉末噴霧乾燥ワクチンおよび / またはアジュバント組成物を生成した。

30

【0169】

【表 1】

表 1：SD-TG および SD-TGI 製剤のための製剤目標

設計目標
●コロイド濃度および完全性は噴霧乾燥後に保持された
●安定性は 37°C で ≥3 ヶ月維持された
○スクアレン含有量損失 ≤20%
○エマルジョンサイズ変化 ≤50%
○多分散指数 <0.2
○GLA 含有量損失 ≤20%
○ID93 含有量損失 ≤20%

40

【0170】

製剤は、粒子設計のためのインシリコモデリングを使用して生成した。トレハロースは、賦形剤として使用した。トレハロースは、生物製剤を安定化するために賦形剤として使用

50

される二糖であり、この研究において使用される賦形剤として選択した。比較的高い溶質濃度（100 mg/ml）の賦形剤を利用した。

【0171】

非晶質材料の物理的安定性は、貯蔵温度の関数である、その分子運動性と密接に関連しているため、最高温度のための安定性の設計が可能であった[13]。カウズマン温度以下での貯蔵、すなわち、分子運動性が重要でない温度は、物理的安定性を最大化するであろう。カウズマン温度は、 T_g を下回る約50 Kである[13]。37での長期安定性の製剤目標に基づいて、噴霧乾燥粉末の T_g は、88でなければならない。Gordon-Taylor方程式によって説明されるように[14]、砂糖-水混合物の T_g は、それらの質量分率および経験的パラメータ k に基づいて決定することができる。Chen et al. [15]は、文献データをGordon-Taylor方程式に当てはめることによって、トレハロース-水ガラス転移曲線をモデル化して、5.2の k を決定した。

10

【0172】

最終的な噴霧乾燥粉末の水分含有量は、トレハロースの水分収着データを使用して操作し、これは、トレハロース粉末を10%の出口相対湿度に供することが、約2~3%の水分含有量をもたらすであろうことを示す[16][17]。このトレハロース-水可塑化曲線[15]および水分収着データ[16][17]に基づき、乾燥機出口および収集点での相対湿度は、物理的安定性を確保するには、<10%でなければならない。同様に、得られる粉末の結晶化を防止するには、出口温度は、 T_g よりも有意に低くなければならない。これらの計算に基づいて、処理パラメータは、出口温度が約36であり、出口相対湿度が7%であるように計算した。噴霧乾燥プロセス中にナノエマルジョンの可能な蒸発を防止するために、比較的低い乾燥ガス温度も選択した。これらの計算は、トレハロース-水システムから生成される粉末についてのデータに基づいて行われたものであり、この作業における粒子は、理論的には約17%のGLA-SEエマルジョンからなるであろうことに留意されるべきである。

20

【0173】

化学物質は、次のとおり製剤化した：水中のGLA-SEビヒクルおよび水中のID93タンパク質は、IDRI (Seattle, WA, USA)によって製剤化した。トレハロース二水和物(トレハロース)およびHPLCグレード水は、Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada)から購入した。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)および塩酸(HCl)は、Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada)から購入した。有力な凍結乾燥ワクチン候補(TT)のバイアル[8]は、比較のためにIDRI (Seattle, WA, USA)によって提供された。

30

【0174】

実施例1

原料調製

原料調製は、次のとおりであった：ID93（1.2 mg/mlのID93タンパク質）は、使用前に-80で小さなアリコートに貯蔵した。同様に、ストック濃度のGLA-SE溶液（10% [v/v]のスクアレン、50 µg/mLのGLA）は、使用前に冷蔵庫に貯蔵した（ストックGLA-SEの調製については[27][28]も参照されたい）。原料は、40 mMのトリスをHPLC水中の200 mg/mLのトレハロースと混合し、次いで塩酸を使用して7.5 ± 1のpHにpH調節することによって調製した。質量は、所与の成分の必要な質量に応じて、2つの天秤（モデルXS4002S、Mettler Toledo、Mississauga, ON, Canada）、（モデルME204E、Mettler Toledo、Mississauga, ON, Canada）のうちの1つを使用して測定した。GLA-SEまたはGLASE+ID93タンパク質を、HPLCグレード水で、それぞれ、2倍作業濃度（4% [v/v]のスクアレン、20 µg/mLのGLA、8 µg/mLのID93）製剤SD-TGおよびSD-TGI

40

50

に希釈した。2つの溶液を次いで、噴霧乾燥前の溶液の最終組成が、100 mg/mlのトレハロース、20 mMのトリス、2% [v/v]のスクアレン、SD-TGについて10 µg/mLのGLA、SD-TGIについて追加の4 µg/mLのID93タンパク質であるように、1:1の比で混合した。SD-TGおよびSD-TGIの賦形剤組成目標は、20 mMのトリス、10% [w/v]のトレハロースであった。

【0175】

実施例 2

噴霧乾燥プロセス

噴霧乾燥を、Particle Engineering Groupのカスタム研究噴霧乾燥機を使用して実施した[19]。噴霧乾燥は、以下の成分を有する：二流体微粒化機、乾燥チャンバー(30 L体積)、サイクロン分離器、400 SLPM(標準リットル毎分)で1マイクロメートル未満のカットオフサイズ、サーモスタットシステムを備えた二重壁収集容器、蠕動ポンプ、プロセスガスヒーター、ガス源(圧縮空気)、プロセス制御システム、ならびにプロセスセンサーおよびデータ取得システム。原料を、他の場所で特徴分析されている、Buchi B-191二流体微粒化機(Buchi Labor Technik, AG, Flawil, Switzerland)のカスタマイズバージョンを使用して微粒化した[20]。処理条件は、インシリコモデルに基づいて決定した。原料を、蠕動ポンプ(モデル77200-60, Cole-Parmer, Montreal, QC, Canada)を使用して0.6 ml/分の速度で微粒化機に供給して、8の空気-液体比をもたらした。微粒化された液滴を、乾燥ガス温度が65 である、200 SLPMで流動する空気中で乾燥した。乾燥粉末をサイクロンによって空気から分離し、粉末をガラスジャーに収集した。これらのジャーを、封止し、25 および7% RHに設定された環境チャンバー(モデルCEO 910W-4, Lunaire Limited, Williamsport, PA, USA)においてパッケージングまで(1~2日)貯蔵した。乾燥粉末を吸入するリスクを最小限に抑えるために、噴霧乾燥プロセス中にレスピレーターを含む実験室PPEを着用した。

【0176】

実施例 3

パッケージングおよび貯蔵

噴霧乾燥製剤を、以下のプロトコルを使用してパッケージングおよび貯蔵した。パッケージング-安定性研究の間の粉末中の水分取り込みを防止するために、集中的なパッケージングプロセスが利用された。一般に、薬学的粉末完全性を保存するために適切なパッケージングが使用され、そうでなければ、粉末は、水分に供され、それによってタンパク質アンラベリングのために生物学的成分を不活性化し得る。粉末のバイアルを含有するパッケージは、温度貯蔵に入れた。パッケージング調製は、乾燥剤を噴霧乾燥機の出口相対湿度に平衡化するために、25 および7% RHに設定された環境チャンバー(モデルCEO 910W-4; Lunaire Limited, Williamsport, PA, USA)に3~4日間シリカゲルパウチを入れることを含んだ。同時に、同数のシリカゲルパウチを調整グローブボックスにおいて0% RHに平衡化した。デジタル比重計(HMP 77B湿度および温度プローブを備えたM170測定インジケーター, Vaisala, Vantaa, Finland)を使用して、環境の相対湿度を監視した。

【0177】

パッケージングプロセスを、0% RHに設定されたカスタムグローブボックス内で行った。粉末を、低結合スナップキャップチューブ(製品Z768820, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada)に測定し、これを次いで、7% RH乾燥剤パウチとともに、アルミニウムバッグに入れた。このアルミニウムバッグを次いで、ダブルヒートシーリングし、0% RH乾燥剤パウチとともに、別のアルミニウムバッグに入れた。この外部バッグもダブルヒートシーリングした。プロセスを要約する単純化された概略図を図1に示す。粉末を、次のように貯蔵した：低温安定性(5)のためのパッケージは、冷蔵庫(モデルSCGP-1804, VWR, Edmonton, AB, C

a n a d a) に入れた。25 および40 貯蔵のためのパッケージを、2つの別々のインキュベーター (モデル414005 - 120、VWR、Edmonton、AB、Canada) に入れた。前者について、インキュベーター設定値は25 であったが、温度コントローラーは25 ~ 28 の間で変動した。

【0178】

実施例4

収率および生成速度

粉末の収率および生成速度の結果は、次のとおりである：インシリコ計算は、公称固体スループットが75 mg / 分であると予測した。安定性研究のための粉末製造は、SD - TGおよびSD - TGI粉末を生成するための実際の生成速度が、それぞれ、49 mg / 分および45 mg / 分であったことを示した。理論値の60%の収率は、小規模噴霧乾燥について典型的である。しかしながら、インシリコモデリングによって決定される現在の製剤および処理パラメータは、カプセル化効率を最大化することを目標とした。いくつかの実施形態において、より大きな凝集物は、サイクロンで濾過して除去され得る。いくつかの実施形態において、増加した収率は、製剤への分散性薬剤の添加によって達成され得る。

10

【0179】

実施例5

噴霧乾燥された乾燥粉末ワクチン組成物の特徴分析

エマルジョンの保存および化学的完全性を研究して、噴霧乾燥プロセス中に溶質が失われたかを特定した。製剤開発および適切な処理パラメータを、油成分の蒸発、またはエマルジョンの凝集のいずれかを通して、プロセスにエマルジョンサイズを有意に変化させないように選択した。よって、分析を、配合された液体SD - TGおよびSD - TGI原料ならびに実施例1で議論される再構成された粉末の化学およびコロイド特性を比較するために完了した。噴霧乾燥の前および後の製剤のこれらの測定された特性を表2に示す。

20

【0180】

走査電子顕微鏡法、カールフィッシャー熱量測定、ラマン分光法、HPLC、ELISA、SDS - PAGE、ならびにpHおよび浸透圧試験などの方法を使用して、乾燥粉末および再構成粉末を次のように特徴分析した：

【0181】

A . 乾燥粉末特徴分析

乾燥粉末特徴分析は、走査電子顕微鏡法およびラマン分光法、ならびにカールフィッシャー熱量測定を使用した。すべての場合において、結果は、レプリケート測定の平均±標準偏差として報告される。各方法についてのレプリケートの数が示される。両側スチューデントのt検定を分析に使用し、統計的に有意な差を $p < 0.05$ で報告した。

30

【0182】

走査電子顕微鏡法について、粉末試料は、ひびの入った粒子を意図的に生成するような方法で、アルミニウムSEMスタブ (製品16111、Ted Pella, Inc.、Redding、CA、USA) 上に直接取り付けられた。これらの試料を、イメージング機器への損傷を防止するために、露出したナノ油滴を除去するために、インハウス真空に接続されたデシケーターに2 ~ 4日間配置した。このプロセス後、試料を80%金および20%パラジウムのコーティング (Leica ACE 600カーボン/メタルコーター、Concord、ON、Canada) で10 ~ 15 nmの厚さにスパッタリングした。粒子の画像を、Zeiss Sigma電界放出走査電子顕微鏡 (Zeiss Sigma FE - SEM、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) で撮影した。500 ~ 20000倍の倍率の範囲の画像は、3 ~ 4 kVの加速電圧を使用して5 . 3 ~ 6 . 3 mmの作動距離で撮影した。

40

【0183】

カスタム分散ラマン分光法システムを使用したラマン分光法を利用して、粉末の固体状態を評価し、参照スペクトルを得た。システムは、671 nmダイオード励起固体状態レー

50

ザー (Ventus Solo MPC6000、Laser Quantum、Stockport、UK) と、シグナルをスペクトログラフに到達する前に最適化およびクリーンアップするための一連のフィルターと、を含む。同様に Particle Engineering Group によって開発された、姉妹装置の詳細な説明、および分析の方法は、他の刊行物に見ることができる [22]。低い質量分率を有する成分 (試料の約 1 %) を検出することができない。試料を、水分曝露を防止するために窒素下の密閉された試料チャンバーに入れ、そのようなものとしてすべてのスペクトルを、22.0 ~ 23.0 の温度および < 5 % RH で取得した。測定された SD-TG および SD-TGI 粉末試料に加えて、ラマンスペクトル分析はまた、参照として非晶質および結晶トレハロース粉末試料で実施した。同様に、参照スペクトルをまた、pH 7.5 に pH 調節された、水中のスクアレンおよび 200 mg / ml のトリス緩衝剤の液体試料について得た。

10

【 0 1 8 4 】

カールフィッシャー熱量測定を使用して、質量による粉末の含水量をカールフィッシャー電量滴定装置 (モデル C 3 0、Mettler Toledo、Mississauga、ON、Canada) で測定し、結果を測定された試料質量に基づくパーセンテージとして表示した。試料中の水は、試料中のすべての水を反応させるのに必要な電流を測定することによって計算される。試料を、デフォルト Stromboli クロメトリー法の修正バージョンを使用して分析した。試験の各セットについて、2つの「ブランク」バイアルを使用して、実験時の周囲の含水量のベースラインを得た。粉末の水分含有量を、同じ粉末の2つのバイアルを測定および平均化することによって決定した。HYDRANA 水標準 (Honeywell、Mexico City、Mexico) の水分含有量を決定する実験の分析は、機械分散が 0.3 % であることを示した。

20

【 0 1 8 5 】

B . 再構成粉末特徴分析

噴霧乾燥された粉末を、次のように再構成した：予め 108 mg の粉末が集塊化およびパッケージングされたバイアルの各々は、試験時に 0.8 ml の水で再構成して、液体薬物生成物と同様の濃度をもたらした。各試験を、再構成された粉末に対して3通り行った。原料に対する測定のレプリケートは、同じバイアルから作製した。再構成された粉末を、動的光散乱、HPLC、ELISA、SDS-PAGE、pH、および浸透圧によって次のように特徴分析した：動的光散乱を使用して、エマルジョンの平均流体力学的直径、および Malvern Zetasizer APS (Malvern、UK) を使用してそれらの多分散性を特定した。液体原料測定は、3回分析された1レプリケートについてであった。GLA およびスクアレン定量化を、逆相 HPLC 分析の使用で達成した。これらの試験を、分離のための 1200 シリーズ HPLC デバイス (Agilent Technologies)、および分析物検出のための Corona Charged Aerosol Detector (CAD) (ESA Biosciences、Chelmsford、MA、USA) を使用して実施した。液体原料測定は、1回分析された2レプリケートであった。ELISA を使用して、試料を播種し、特定の抗体を使用して ID93 含有量を定量化することによって、噴霧乾燥の前および後の抗原含有量を特定した。液体原料測定は、3回分析された1レプリケートであった。SDS-PAGE を使用して、それぞれ、バンドの存在または強度に基づいて、試料中の ID93 タンパク質の存在および完全性を測定した。ID93 完全性を、バンド強度を ID93 タンパク質のストック対照と比較することによって定量化した。pH を見つけるために、再構成された粉末の 300 μ L のアリコート、Orion ROSS Ultra Semi-micro pH Electrode (Thermo Scientific、Waltham、MA、USA) を使用して測定し、試料 pH を決定した。pH メーターを、4.00、7.00、および 10.00 標準を使用して各測定前に校正した。液体原料の測定は、1レプリケートで構成された。再構成された粉末の浸透圧を、浸透圧計 (モデル 2020、Advanced Instruments、Norwood、MA、USA) を使用して測定した。液体原料の測定は、1レプリケートで構成された。

30

40

50

【 0 1 8 6 】

実施例 6

安定性研究噴霧乾燥された乾燥粉末ワクチン組成物

実施例 1 からの製剤を、様々な温度での化学、コロイド、および物理的安定性について研究した。特徴分析に使用される方法の多くを、安定性を見るために使用した。したがって、実施例 2 は、安定性研究に使用される方法を提供する。エマルジョン不安定性は、アジュバント（GLA などの TLR 4 アゴニスト）の不活性化および低下した濃度を引き起こし得、それによってアジュバントシステムによって生成される免疫応答を低下させるため、安定性は重要である。加えて、エマルジョン不安定性は、より大きな液滴を形成するエマルジョンをもたらす可能性もあり得る [6]。より大きな粒子はより早く体から除去されるので、これは免疫応答を低減することもできる。さらに、4 μm よりも大きなエマルジョンは、血圧の変化を引き起こし、塞栓症の可能性を増加させ得る [7]。GLA - SE アジュバントは、冷蔵された液体として安定であり、したがって、現在のアジュバント添加 ID 9 3 ワクチン候補は、再水和された凍結乾燥 ID 9 3 および液体アジュバントからなる 2 バイアルシステムで臨床研究において投与され、これは投与前に混合される [8]。

10

【 0 1 8 7 】

実施例 7

化学およびコロイド安定性

噴霧乾燥粉末の安定性を、表 1 で議論される予め設定された基準に基づいて評価した。3 7 などのより高い温度で 3 ヶ月での安定性は、室温での長期安定性を示した。

20

【 0 1 8 8 】

【表 2】

表 2 製剤についての噴霧乾燥の前および後の化学およびコロイド特性。

ID	スクアレン			GLA 含 ID93 含有		pH	浸透圧 (mOsmol/kg)	
	含有量 (mg/mL)	エマルジョン直 径(nm)	多分散指数	有量 ($\mu\text{g/ml}$)	量 ($\mu\text{g/ml}$)			
目標	17.2	92	0.06	10	4	7.5	約 300	
SD-TG	原料液体	19.1 \pm 0.4	95.3 \pm 0.9	0.05 \pm 0.04	9.2 \pm 0.5	N/A	7.62	383
	再構成粉末	18.8 \pm 0.3	96.9 \pm 0.2	0.07 \pm 0.02	9.5 \pm 0.4	N/A	7.57 \pm 0.04	376 \pm 8
SD-TGI	原料液体	18.8 \pm 0.3	94.9 \pm 0.8	0.06 \pm 0.01	9.3 \pm 0.4	1.17 \pm 0.02	7.56	389
	再構成粉末	17.3 \pm 0.6	97.6 \pm 1.1	0.09 \pm 0.01	9.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.1	7.55 \pm 0.01	351 \pm 8

30

略語：SD-TG、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE、SD-TGI、噴霧乾燥トレハロース+トリス+GLA-SE+ID93。

40

【 0 1 8 9 】

表 2 に示される結果では、原料液体および再構成粉末の比較は、高いカプセル化効率を示した。結果は、両方の製剤についてスクアレン成分の高い保持 (> 90%) を示す。驚くべきことに、再構成されたエマルジョンの液滴サイズは、原料中のエマルジョンとほぼ同一であり、含有量は、ほぼ不変であった。これは、これらのナノエマルジョンを、それらの破壊または（液体である）油の損失なしに噴霧乾燥することが可能であることを意味する。より小さいエマルジョンは大きいものよりも経時的に安定であることが示されているが [6]、このナノエマルジョンで示される成功は見られていなかった。さらに、多分散指数、GLA 含有量、および pH は、両方の製剤についての噴霧乾燥の経過にわたって有意に変化せず ($p > 0.05$)、集塊化するエマルジョンの数が低いことを示す。GLA

50

およびID93含有量の保持は、これらの成分が噴霧乾燥の経過にわたって劣化しなかったことを示し、これらの成分は熱応力に感受性であるため、これは特に成功であった。SD-TGI粉末中の低いID93含有量は、配合中の原料容器の側面へのタンパク質結合のためであり得る。

【0190】

噴霧乾燥直後の分析は高い保持率を示したが（実施例2を参照されたい）、ワクチンとしての噴霧乾燥エマルジョンの適用性は経時的なナノエマルジョン安定性に依存するため、経時的な粉末の安定性も調査した。脂質ナノ粒子を噴霧乾燥するMlalila et al [24]の実験は、GLA-SEと同様の直径スケールをまず示したが、デシケーターでの1ヶ月の貯蔵後、ナノ粒子サイズは2~8倍で増加した。安定性研究には、いくつかの貯蔵温度：-20、2~8、25、および40での噴霧乾燥粉末の貯蔵が含まれた。各温度について、所与の時点で粉末を再構成し、スクアレン含有量、エマルジョン直径、多分散指数、GLA濃度、ID93濃度、およびpHについて評価した。浸透圧を、すべての貯蔵温度について、当初および3ヶ月後に測定した。

10

【0191】

安定性研究の3ヶ月にわたるGLA-SEビヒクルのスクアレン成分の特性を図2に示す。スクアレン含有量は、すべての貯蔵温度で両方の粉末製剤について減少した。40で3ヶ月間の貯蔵後、SD-TGのスクアレン含有量は、 $18.8 \pm 0.3 \text{ mg/ml}$ から $15.8 \pm 0.4 \text{ mg/ml}$ まで低減し（16%損失）、SD-TGIについては $17.3 \pm 0.6 \text{ mg/ml}$ から $15.7 \pm 0.8 \text{ mg/ml}$ まで低減した（9%損失）。エマルジョン直径は、それぞれ、SD-TGおよびSD-TGIについて、 $96.9 \pm 0.2 \text{ nm}$ から $97.7 \pm 0.5 \text{ nm}$ まで（1%増加のみ）および $97.6 \pm 1.1 \text{ nm}$ から $99 \pm 0.9 \text{ nm}$ まで本質的に不変のままであった。PDIは、任意の所与の貯蔵温度で3ヶ月の経過にわたって有意に変化しなかった（ $p > 0.05$ ）。そのようなものとして、これらの変化は、すべて前述のスクアレンについての安定性基準、すなわち、 $< 20\%$ スクアレンの損失、 $< 50\%$ エマルジョンサイズの変化、および多分散指数 < 0.2 内である。有力な凍結乾燥候補に対して実施される37での3ヶ月の安定性研究と比較して、噴霧乾燥粉末は、粒子サイズ変化に関して同等の性能を有した[8]。加えて、噴霧乾燥候補の性能は、現在の2バイアル臨床提示、液体単一バイアル、および概念実証（POC）凍結乾燥候補よりも有意に良好であり、後者は、84%の粒子サイズ変化を受ける[8]。GLA保持は、-20および2~8での貯蔵について両方の粉末で3ヶ月後に高かった（87~93%保持された）。しかしながら、25で3ヶ月の貯蔵後、GLA含有量は、SD-TG製剤について $9.5 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ から $8.7 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ まで低減し（12%損失）、SD-TGI製剤について $9.0 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ から $7.2 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ まで低減した（19%損失）。同様に、40では、GLA含有量は、SD-TG製剤について $5.8 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ （40%損失）に、SD-TGI製剤について $5.1 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ （43%損失）に低減した。

20

30

【0192】

SDS-PAGE結果は、ID93がすべての貯蔵温度で存在したことを確認した。イメージングソフトウェアでの分析は、ID93+GLA-SE対照を比較して、対照のパーセンテージを単位として残るID93タンパク質を定量化した。この分析を使用して、3ヶ月での貯蔵後、SD-TGI製剤中のID93タンパク質の量は、-20で $83 \pm 19\%$ 、2~8で $66.5 \pm 11\%$ 、25で $40 \pm 5\%$ 、および40で $44 \pm 3\%$ であることがわかった。

40

【0193】

全体として、再構成された液体のpHは、すべての温度について経時的に低下する傾向があった。しかしながら、pHは、再構成されたSD-TGおよびSD-TGIについて7.41~7.61のままであった。最大変化は、0.16pH単位であり、比較的、37で3ヶ月間貯蔵された液体、2バイアル、およびPOC試料は、0.2~0.8pH単位のより大きなpH低下を示した[8]。あるいは、浸透圧は、すべての試料について

50

経時的にわずかに増加した。SD-TG 試料について、浸透圧は、2～4%増加し、最小変化は40 で発生し、最大変化は-20 貯蔵で発生した。浸透圧は、再構成されたSD-TGI 粉末について3～9%増加し、最小変化は40 で発生し、最大変化は2～8 貯蔵で発生した。

【0194】

噴霧乾燥された製剤は、製剤目標外でGLAおよびID93タンパク質のいくらかの損失を経験したが、乾燥粉末特徴分析結果は、粒子がすべての温度で物理的に安定なままであることを示した。

【0195】

B. 物理的安定性

SEM画像の粒子形態分析は、製剤を噴霧乾燥することが、微粒子が約1～20 μmの幾何学的直径の範囲であった多分散試料を生成したことを示した。それぞれ、図3aおよび3bに示される、SD-TGおよびSD-TGIのSEM画像は、噴霧乾燥された微粒子が、球状、非凝集性であり、滑らかな～わずかにくぼみのある範囲であった表面を有することを示した。加えて、これらの微粒子の類似性は、タンパク質の存在が粒子構造に影響を与えなかったことを示した。比較のために図3cに示される、同じ条件下で噴霧乾燥された100mg/mLのトレハロースの微粒子は、SD-TGおよびSD-TGI製剤と非常に類似した外部粒子形態を有し、すなわち、滑らかな、またはわずかにくぼんだ表面を有する、球状非凝集性粒子であった。SD-TGおよびSD-TGI粒子はまた、トレハロース粒子よりもわずかに大きかったが、これはSD-TGおよびSD-TGI製剤の増加した固体含有量によるものであると予想される。

【0196】

SD-TG、SD-TGI、およびトレハロースのひびの入った微粒子のSEM画像はすべて、これらの粒子が中空または中実であり得ることを示し、所与の試料内に様々なシェルの厚さがあった。しかしながら、このシェルの内部構造は、噴霧乾燥されたトレハロースとは異なった。トレハロース粒子は中実シェルを示したが、SD-TGおよびSD-TGI粒子の内部はトレハロース構造内に多数のポイドを有した。SD-TGおよびSD-TGIのSEM画像に示されるこれらのポイドは、凍結乾燥されたTT製剤の画像にも現れた(図3d)。これらのポイドのサイズもほぼナノエマルジョンサイズであるように見えたことを考慮して、ポイドは蒸発したナノエマルジョンによって残された可能性があった。表面のより高い倍率の画像は、粒子の表面上に比較的少ないポイドを示し、ナノエマルジョンの、有意な量ではないが、一部が、粒子の外面上での蓄積のために失われたことを示した。

【0197】

図5は、異なる貯蔵温度で3ヶ月貯蔵後のSD-TGI製剤を示す。図5aにおけるより低い倍率の図は、

【0198】

40 で貯蔵された試料がその外部粒子構造を維持したことを示す。微粒子は、依然として多分散、球状、非凝集性であった。粒子融合および形状変化の欠如は、物理的安定性を示した。図5bに示されるように、ナノエマルジョンによって残されたポイドが明確に異なったため、粒子の内部構造は、40 での貯蔵後も維持された。高倍率で示される外側の特徴のわずかな球状化は、粉末運動性が取るに足らないものではないことを示す。GLA-SE成分は、粉末Tgを予測された約90 未満に低下した可能性がある。

【0199】

粉末水分含有量を、次のように特定した：湿量基準による粉末の初期水分含有量は、2.6±0.1%であると測定された。5、25、および40 で3ヶ月の貯蔵後の水分含有量は、それぞれ、2.7%、2.4%、2.1%であり、すべての値は、±0.1%であり、これらの変化は、統計的に有意ではないと決定された(p>0.05)。カールフィッシャー実験に使用されるバイアルにおける高温および比較的大きな量のヘッドスペースのため、より高い温度でのわずかな粉末乾燥は予想外ではない。>30%RHの内部環境

10

20

30

40

50

を有する冷蔵庫に貯蔵された、5 試料は、水分取り込みを示さなかったことは注目に値した。この水分取り込みの欠如は、特に興味深く、実装されたパッケージングシステムが非常に堅牢であったことを示した。前述のように、噴霧乾燥粉末におけるタンパク質分解は、これらの粉末の結晶化に関連し、したがって、タンパク質分解は、粉末の T_g の任意の低下を防止することによって、これらの粉末の水分取り込みを防止することによって軽減され得る。

【0200】

固体状態分析は、試料内の成分の存在を確認し、固体状態の任意の変化を決定するために、安定性研究内の様々な時点で S D - T G および S D - T G I 粉末に対するラマンスペクトル分析を見ることを含んだ。時点 0 で得られる S D - T G 粉末の試料スペクトル、なら
びに非晶質トレハロース、スクアレン、トリス pH 7.5、および結晶トレハロースの参
照スペクトルを図 7 に示す。I D 9 3 タンパク質成分寄与は、その低質量分率（約 0.0
03%）がラマンシステムの検出限界内になかったため、分析には含まれなかった。参照
スペクトルは、G L A - S E の他の成分についても得られたが、試料中のそれらの質量分
率も検出限界の外であった。

試料スペクトルの検査は、トレハロース成分が完全に非晶質であったことを示した。これ
は、試料中の 425、460、560、865、935、および 1145 cm⁻¹ の非
晶質トレハロース特徴的ピークの存在によって明らかであり、いくつか例を挙げると、約
395、455、695、980、および 1235 cm⁻¹ の結晶トレハロース特徴的
ピークの欠如によってさらに支持された。試料中のスクアレンの存在は、1400 cm⁻¹
で現れるその特徴的なピークによって特定した。トレハロースの固体状態は、図 6 a お
よび 6 b に示される、剰余スペクトルの低い正規化された強度によってさらに確認され、
a) 試料が加速貯蔵後に外部形態を維持し、b) 内部粒子構造が維持されることを示す 4
0 で 3 ヶ月の貯蔵後の S D - T G I 粉末の S E M 画像を示す。尺度は、それぞれの画像
上に提供される。略語：S D - T G I、噴霧乾燥トレハロース+トリス+G L A - S E +
I D 9 3、G L A、グルコピラノシル脂質アジュバント、S E、スクアレン水中油型エマ
ルジョン。図 7 において、剰余スペクトルを、試料スペクトルから非晶質トレハロース（
質量分率 81%）、スクアレン（質量分率 14%）、およびトリス（質量分率 2%）につ
いての参照スペクトルを差し引くことによって得た。D M P C（質量分率 3%）参照スペ
クトルは得ることができなかったが、剰余スペクトルにおける 1325 および 1460 c
m⁻¹ [25] のピークの存在は、G L A - S E ビヒクルのこの成分による可能性が高い。

【0201】

同様の分析を、S D - T G I 粉末に対して完了し、トレハロース成分が非晶質であること
、ならびに試料中のスクアレンおよびトリス緩衝剤の存在も確認した。S D - T G および
S D - T G I は、試料間の製剤化の唯一の違いが後者における I D 9 3 の存在であるため
、同様の結果を有するであろうことが予想された。

【0202】

時点 0 ならびに 5、25、および 40 での 3 ヶ月の貯蔵後の S D - T G I の試料ベクトル
を図 8 に示す。すべてのスペクトルは非常に類似して見え、粉末の固体状態が安定性研
究の経過にわたって有意に変化しなかったことを示す。実際に、安定性研究の異なる点で
収集された S D - T G および S D - T G I スペクトルのデコンボリューションは、すべて
の試料がスクアレンおよびトリスの存在を示し、トレハロースが非晶質のままであったこ
とを確認した。これは、水分含有量が上昇しなかった場合、操作された T_g が > 88 だ
ったため、トレハロースが結晶化する可能性が低かったので、水分含有量のデータと適
合する。時点 0 スペクトル（図 8）から 40 試料で 3 ヶ月後に収集された S D - T G I
スペクトルを差し引いた後に残るスペクトルは、極めて低い正規化された残りのスペクト
ルが、2 つの試料が著しく類似しており、したがって粉末上加えられた熱応力があつて
も、粉末の固相がこの期間にわたって維持されたことを示したことを示した。

【0203】

10

20

30

40

50

賦形剤としてトレハロースを含む噴霧乾燥された水中油型製剤は、安定性について評価し、長期貯蔵のための非晶質微粒子内へのナノエマルジョンのカプセル化の実現可能性を評価した。アジュバント添加結核ワクチンの2つの製剤を安定性について試験した：水中油型エマルジョンとして製剤化された、アジュバントシステムの組成物、およびアジュバントシステムとワクチンタンパク質とを組み合わせる組成物。インシリコモデリングを、増加した成功の可能性を有する処理条件を予測するために、既知のトレハロースデータと組み合わせて使用し、よって試行錯誤の実証研究の必要量を低減した。製剤化原料および再構成された噴霧乾燥粉末の比較は、サイズおよび濃度の両方で、エマルジョン完全性が保存されたことを示した。同様に、アジュバントおよびタンパク質は、噴霧後に同様の濃度を有することが示された。これらの結果は、再構成時に示された物理化学的特性の保存のために、ワクチンの有効性が噴霧乾燥にわたって保存されたことを強く示す。 10

【0204】

これらの噴霧乾燥粉末を次いで、再構成された粉末および乾燥粉末自体の特徴分析を通して、40℃の温度まで、3ヶ月にわたる安定性について評価した。結果は、粉末が3ヶ月後にすべての温度について物理的安定性を維持したことを示した。同様に、エマルジョンサイズおよび多分散性は、両方の製剤についてすべての温度で有意に変化せず、これらの試験における性能は、凍結乾燥概念実証よりも有意に良好であり、有力な凍結乾燥候補と同等であった[8]。GLA保存は、概念実証バージョンと同等であった[8]。

【0205】

生成物の実証された可能性は、グローバルヘルス用途などの、室温での長期安定性が必要とされる用途に特に有用であることを示す。乾燥粉末として抗原を含むか、または含まないアジュバントを製剤化し、投与直前に再構成することは、輸送および貯蔵に関連するコストを大幅に低減するであろう。さらに、噴霧乾燥は、より低い処理コストを有するため、凍結乾燥よりも実行可能な代替手段である[10]。 20

【0206】

実施例 8

肺送達のための噴霧乾燥製剤

実施例1～8でワクチン組成物についての噴霧乾燥の可能性を実証した後、実験を実施して、肺送達（吸入）に適した粒子サイズを生成するように製剤を精製した。噴霧乾燥は、凍結乾燥とは異なり、粒子サイズなどの特性の操作を可能にする。これは、筋肉内注射ではなく、肺（吸入）などの他の送達経路への扉を開く。 30

【0207】

吸入可能な粒子は、以下を含む投与を成功させるための特定の特性を必要とする：1. 固体含有量を低下させ、噴霧乾燥パラメータを操作することによって入手可能であり得る、2～3 μmを含む、20 μm未満の空気力学的粒子サイズ、および2. しわのある中空の粒子を作製するための高い分散性。これは、濃度が0.25質量分率を超えるようにL-ロイシンを賦形剤として導入することによって得ることができる。

【0208】

以下の製剤を、噴霧乾燥されたID93およびGLAアジュバントのために作製した。当初、抗原ID93は、少量をpH測定することが困難であったため、吸入可能な製剤（LN-23-32およびLN-23-33）には含まれなかった。トレハロースおよびGLA-SE濃度を、凍結乾燥および噴霧乾燥TTに使用されるものの1/3で調製した（以下の表3のLN-23-17を参照されたい）。LN-23-33を、シェル形成剤としてロイシンを含んで製剤化した。 40

【0209】

【表 3】

表 3 : ロイシンを含むおよび含まない吸入可能な製剤と比較した注射可能な噴霧乾燥 I D 9 3 の製剤。

総固体およびエマルジョン含有量	バッチ ID:LN-23-17(比較のための噴霧乾燥注射剤)		バッチ ID:LN-23-32		バッチ ID:LN-23-33(ロイシンを含む)	
	124mg/ml		40.5mg/ml		50.5mg/ml	
成分	溶液中の濃度	粉末中の質量分率 (%)	溶液中の濃度	粉末中の質量分率 (%)	溶液中の濃度	粉末中の質量分率 (%)
ID93	4µg/mL	0.003%	0µg/mL	-	0µg/mL	-
トレハロース	100mg/mL	81%	33.3mg/mL	82%	33.3mg/mL	66%
トリス(緩衝剤)	2.4mg/mL [20mM]	2%	0mg/mL	-	0mg/mL	-
GMP グレードのスクアレン	17.2mg/mL	14%	5.73mg/mL	14%	5.73mg/mL	11%
DMPC		3%	1.27mg/mL	3%	1.27mg/mL	3%
GLA	10µg/mL	0.01%	3.3µg/mL	0.01%	3.3µg/mL	0.01%
ロイシン	0mg/mL	-	0mg/mL	-	10mg/mL	19.8%
供給体積(mL)	238		49		28	
100%回収された場合の質量(g)	29.5		1.98		1.41	
回収された実際の質量(g)	17.3		0.64		0.89	
収率%	59%		32%		63%	

10

20

30

【 0 2 1 0 】

表 4 は、図 8 に示される Alberta Idealized Throat (次世代インパクター) の形態の乾燥粉末吸入器を使用した予備粒子サイズ結果を提供する。以下を分析した：(1) 吸入器からの放出用量 (%)、(2) 総肺沈着 (TLD) (%) (口 - 喉への損失を示す)、(3) 質量中央空気力学的直径、MMAD (µm)、(4) 幾何標準偏差、GSD。MMAD は、乾燥粒子の直径を見る。2つの吸入可能な製剤を試験した：LN-23-32 および LN-23-33 (ロイシンを含む)。

40

【 0 2 1 1 】

表 3 の結果は、噴霧乾燥の前および後の 3 つの製剤からの成分の濃度を比較した。2つの吸入可能な製剤 (LN-23-32 および LN-23-33) を、乾燥された注射可能な製剤 LN-23-17 と比較した。表 3 の結果は、噴霧乾燥後に回収された成分の質量に基づいて、ロイシンが収率を増加させたことを示した。

【 0 2 1 2 】

50

【表 4】

表 4 a および b : (a) LN-23-32 および (b) LN-23-33 の予備粒子サイズ結果

(a)LN-23-32					
n	1	2	3	平均	STD
放出用量(%)	72%	93%	96%	87%	13%
TLD	21%	22%	19%	20%	2%
MMAD(μm)	3.0	3.4	3.3	3.2	0.2
GSD	1.8	1.6	1.6	1.7	0.1

(b)LN-23-33(ロイシンを含む)					
n	1	2	3	平均	STD
放出用量(%)	97%	93%	100%	97%	3%
TLD	33%	22%	41%	32%	10%
MMAD	3.6	3.4	3.6	3.5	0.1
GSD	1.8	1.6	2.2	1.9	0.3

10

20

【0213】

表 4 の結果は、ロイシンを含有する製剤 (LN-23-33) が吸入器からの最良の放出用量をもたらしたことを示し、総肺沈着は、口および喉で失われる粒子が少なかった (より多くの粒子が肺に到達した) ことを示す。これは、ロイシンを有する製剤がエアロゾル化ワクチン組成物に最良の結果をもたらしたことを示す。

【0214】

噴霧乾燥された吸入可能な製剤の特徴分析に使用される方法を、その中の噴霧乾燥 (乾燥粉末) ワクチン組成物に関して実施例 2 で議論されるように実施した。例えば、pH を見つけるために、再構成された粉末の 300 μL のアリコート、Orion ROSS Ultra Semi-micro pH Electrode (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して測定し、試料 pH を決定した。pH メーターを、4.00、7.00、および 10.00 標準を使用して各測定前に校正した。液体原料の測定は、1 レプリケートで構成された。再構成された粉末の浸透圧を、浸透圧計 (モデル 2020、Advanced Instruments, Norwood, MA, USA) を使用して測定した。液体原料の測定は、1 レプリケートで構成された。SD は、標準偏差を表す。粒子サイズを、液体乾燥粉末組成物の Z 平均直径 (Z-Ave d) を測定することによって決定した (表 5 の Zavg を参照されたい)。GLA およびスクアレン定量化を、逆相 HPLC 分析を使用して達成した。試験を、分離のための 1200 シリーズ HPLC デバイス、および分析物検出のための Corona Charged Aerosol Detector (CAD) を使用して実施した。液体原料測定は、1 回分析された 2 レプリケートであった。多分散指数 (PdI) は、噴霧乾燥された組成物の再構成後に評価される。例えば、動的光散乱 (DLS) を使用して、PdI を評価することができる。

30

40

【0215】

表 5 は、注射可能物と比較した吸入可能な製剤の試験の結果を示す。結果は、スクアレンおよび GLA の高い保持 (低い損失%) を示し、これらの成分が噴霧乾燥の過程にわたって劣化せず、粒子直径 (Zavg) が維持されたことを示す。多分散指数 (PdI) は、有意に変化せず、エマルジョンの集塊化が低かったことを示す。

【0216】

50

【表 5】

表 5：吸入可能な製剤と比較した噴霧乾燥 I D 9 3 のための注射可能な製剤についての試験の結果

試料 ID	説明	pH*	Zavg (nm)	SD (nm)	Pdl	GLA (ug/mL)	SD	スクア レン (mg/m L)	SD	浸透圧 (mOsm ol/kg)
目標		N/A	約 90		<0.2	3.33		5.72		
LN-23-32	プレ噴霧乾燥液体(ID93 なし、トリスなし)	7.5	92	1	0.05	3.51	0.08	5.46	0.04	105
	3.3%トレハロースを有する噴霧乾燥 GLA-SE(ID93 なし、トリスなし、1/3[GLA-SE])吸入可能	7.7	92	2	0.05	3.39	0.04	5.36	0.02	109
損失%		-2.4%	0.3%		-3.9%	3.4%		1.8%		-3.8%
LN-23-33	プレ噴霧乾燥液体(ID93 なし、トリスなし)	6.9	92	2	0.04	4.4	0.6	5.76	0.07	183
	3.3%トレハロースおよび 1%ロイシンを有する噴霧乾燥 GLA-SE(ID93 なし、トリスなし、1/3[GLA-SE])吸入可能	7.1	176	3	0.24	3.8	0.0	5.66	0.02	191
損失%		-2.7%	-91.0%		-467.4%	12.3%		1.7%		-4.4%

10

20

【 0 2 1 7 】

表 5 の結果は、1 %ロイシンを含有する吸入可能な製剤である LN - 2 3 - 3 3 が、再構成時に粒子サイズの倍化、および試料が多分散であったことを示す。しかしながら、粉末ワクチンは、再構成なしに吸入可能な乾燥粉末として使用されることが想定されるため、この結果が有効性を低減する可能性は低い。さらに、再構成体積が厳密に正確でない場合があると考えると、GLA 含有量は、ほぼ予想通りであった。よって、所望の特徴を有する熱安定性の吸入可能なアジュバント組成物が成功裏に生成された。吸入可能な製剤 LN - 2 3 - 3 3 および LN - 2 3 - 3 2 を使用して、活性量の抗原 ID 9 3 または別の抗原を含む例示的な吸入可能な製剤を生成することができる。実施例 1 ~ 3 の噴霧乾燥製剤での他の結果は、抗原の添加が粒子サイズおよび安定性に影響を及ぼさなかったことを示した。ID 9 3 含有量を、SDS - PAGE および ELISA を使用して定量化することができる。総固体含有量は、トレハロース、GMP、スクアレン、DMP C、および/またはロイシンの量を低減して、吸入可能な送達に適した粒子サイズを保持することによって、ID 9 3 を含有する異なる製剤間で変動する。よって、実施例 4 の吸入可能な製剤を、吸入可能なワクチンのための ID 9 3 などの抗原と使用することができる。

30

【 0 2 1 8 】

代替および拡張

本明細書に開示される各実施形態は、使用され得るか、またはそうでなければ開示される他の実施形態のいずれかと組み合わせられ得る。任意の実施形態の任意の要素は、任意の実施形態において使用され得る。

40

【 0 2 1 9 】

本発明は特定の実施形態を参照して説明されたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更が行われ得、同等物がその要素に置換され得ることが当業者によって理解されるであろう。加えて、本発明の本質的な教示から逸脱することなく、修飾が行われ得る。

【 0 2 2 0 】

50

【表 6 - 1】

参考文献

- [1] R.Vehring, "Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying," *Pharmaceutical Research*, vol.25, no.5, pp.999-1022, 2007.
- [2] C.Encina, C.Vergara, B.Gimenez, F.Oyarzun-Ampuero and P.Robert, "Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil," *Trends in Food Science & Technology*, vol.56, pp.46-60, 2016.
- [3] S.Bertholet, G.C.Ireton, D.J.Ordway, H.Plessner Windish, S.O.Pine, M.Kahn, T.Phan, I.M.Orme, T.S.Vedvick, S.L.Baldwin, R.N.Coler and S.G.Reed, "A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*," *Science Translational Medicine*, vol.2, no.53, pp.53-74, 2010. 10
- [4] W.H.Organization, "Global Tuberculosis Report," World Health Organization, Geneva, 2018.
- [5] R.N.Coler, T.A.Day, R.Ellis, F.M.Piazza, A.M.Beckmann, J.Vergara, T.Rolf, L.Lu, G.Alter, D.Hokey, L.Jayashankar, R.Walker, M.A.Snowden, T.Evans, A.Ginsberg and S.G.Reed, "The TLR-4 agonist adjuvant, GLA-SE, improves magnitude and quality of immune responses elicited by the ID93 tuberculosis vaccine: first-in-human trial," *Nature Partner Journals*, vol.3, no.34, 2018.
- [6] C.B.Fox, R.C.Anderson, T.S.Dutill, Y.Goto, S.G.Reed and T.S.Vedvick, "Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol.65, pp.98-105, 2008.
- [7] A.G.Floyd, "Top ten considerations in the development of parenteral emulsions," *Pharmaceutical Science and Technology Today*, vol.2, no.4, pp.134-143, 1999. 20
- [8] R.M.Kramer, M.C.Archer, N.Dubois, N.Dubois Cauwelaert, E.A.Beebe, P.-w.D.Huang, Q.M.Dowling, A.M.Schwartz, D.M.Fedor, T.S.Vedvick and C.B.Fox, "Development of a thermostable nanoemulsion adjuvanted vaccine against tuberculosis using a design-of-experiments approach," *International Journal of Nanomedicine*, vol.13, pp.3689-3711, 2018.
- [9] M.T.Orr, R.M.Kramer, L.V.Barnes, Q.M.Dowling, A.L.Desbien, E.A.Beebe, J.D.Laurance, C.B.Fox, S.G.Reed, R.N.Coler and T.S.Vedvick, "Elimination of the cold-chain dependence of a nanoemulsion adjuvant vaccine against tuberculosis by lyophilization," *Journal of Controlled Release*, vol.10, no.177, pp.20-26, 2014.
- [10] H.Schwartzbach, "Achieving aseptic drying with spray drying technologies," *Pharmaceutical Technology Europe*, vol.23, no.9, 2011. 30
- [11] International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, "ICH Harmonised Tripartite Guideline-Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)," ICH, 2003.
- [12] S.Ohtake and J.Wang, "Trehalose: current use and future applications," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.100, no.6, pp.2020-2053, 2011.
- [13] D.Zhou, G.G.Zhang, D.Law, D.J.Grant and E.A.Schmitt, "Physical stability of amorphous pharmaceuticals: Importance of configurational thermodynamic quantities and molecular mobility," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.91, no.8, pp.1863-1872, August 2000.
- [14] M.Gordon and J.S.Taylor, "Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers," *Journal of Applied Chemistry*, vol.2, no.9, pp.493-500, September 1952. 40

【 0 2 2 1 】

【表 6 - 2】

[15] T.Chen,A.Fowler and M.Toner,“Literature review:supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture,”*Cryobiology*,vol.40,no.3,pp.277-282,200.

[16] H.A.Iglesias,J.Chirife and M.P.Buera,“Adsorption isotherm of amorphous trehalose,”*Journal of the Science of Food and Agriculture*,vol.75,no.2,pp.183-186,26 March 1999.

[17] K.D.Roe and T.P.Labuza,“Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures,”*International Journal of Food Properties*,vol.8,no.3,pp.559-574,2005.

[18] R.Vehring,W.R.Foss and D.Lechuga-Ballesteros,“Particle formation in spray drying,”*Aerosol Science*,vol.38,pp.728-746,2007.

[19] J.Ivey,P.Bhambri,D.Lewis,T.Church,W.Finlay and R.Vehring,“Dried corticosteroid particle formation from evaporating monodisperse propellant solution droplets,”in *AAPS Annual Meeting and Exposition,Denver,2016*.

[20] S.Hoe,J.W.Ivey,M.A.Boraey,A.Shamsaddini-Shahrbabak,E.Javaheri,M.Sadaf,W.H.Finlay and R.Vehring,“Use of a fundamental approach to spray-drying formulation design to facilitate the development of multi-component dry powder aerosols for respiratory drug delivery,”*Pharmaceutical Research*,vol.32,no.2,pp.449-465,February 2014.

[21] M.Y.Chan,Q.M.Dowling,S.J.Sivananthan and R.M.Kramer,“Particle sizing of nanoparticle adjuvant formulations by dynamic light scattering(DLS)and nanoparticle tracking analysis(NTA),”*Methods in Molecular Biology*,vol.1494,pp.239-252,2017.

[22] H.Wang,D.Barona,S.Oladepo,L.Williams,S.Hoe,D.Lechuga-Ballesteros and R.Vehring,“Macro-Raman spectroscopy for bulk composition and homogeneity analysis of multi-component pharmaceutical powders,”*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,vol.141,pp.180-191,2017.

[23] C.Krogsgard Nielsen,J.Kjems,T.Mygind,T.Snabe,K.Schwarz,Y.Serfert and R.L.Meyer,“Enhancing the antibacterial efficacy of isoeugenol by emulsion encapsulation,”*International Journal of Food Microbiology*,vol.229,pp.7-14,2016.

[24] N.Mlalila,H.Swai,L.Kalombo and A.Hilonga,“Effects of spray-drying on w/o/w multiple emulsions prepared from a stearic acid matrix,”*Nanotechnology,Science and Applications*,vol.7,pp.105-112,2014.

[25] C.Lee and C.D.Bain,“Raman spectra of planar supported lipid bilayers,”*Biochimica et Biophysica Acta*,vol.1711,no.1,pp.59-71,June 2005.

[26] M.Bringas-Lantigua,I.Exposito-Molina,G.A.Reineccius,O.Lopez-Hernandez and J.A.Pino,“Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil,”*Drying Technology*,vol.29,no.5,pp.520-526,2011.

[27]M.T.Orr,R.M.Kramer,L.V.Barnes,Q.M.Dowling,A.L.Desbien,E.A.Beebe,J.D.Laurance,C.B.Fox,S.G.Red ed,R.N.Coler and T.S.Vedvick,“Elimination of the cold-chain dependence of a nanoemulsion adjuvanted vaccine against tuberculosis by lyophilization,”*PMCID:PMC3956454*.

[28]R.M.Kramer,M.C.Archer,M.T.Orr,N.Dubois Cauwelaert,E.A.Beebe,P.D.Huang,Q.M.Dowling,A.M.Schwartz,D.M.Fedor,T.S.Vedvick,and C.B.Fox.“Development of a thermostable nanoemulsion adjuvanted vaccine against tuberculosis using a design-of-experiments approach,”*PMCID:PMC6028350*.

10

20

30

40

表 6 : I D 9 3 配列 (配列番号 1 - 8)

配列 任意の H i s タグを有する I D 9 3 融合ポリペプチド (配列番号 1)

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M T I N Y Q F G D V D A H G A M I R A Q
A G S L E A E H Q A I I S D V L T A S D F W G G A G S A A C Q G F I T Q L G R
N F Q V I Y E Q A N A H G Q K V Q A A G N N M A Q T D S A V G S S W A G T H L
A N G S M S E V M M S E I A G L P I P P I I H Y G A I A Y A P S G A S G K A W
H Q R T P A R A E Q V A L E K C G D K T C K V V S R F T R C G A V A Y N G S K Y
Q G G T G L T R R A A E D D A V N R L E G G R I V N W A C N E L M T S R F M T
D P H A M R D M A G R F E V H A Q T V E D E A R R M W A S A Q N I S G A G W S

50

GMAEATSLDTMTQMNQAFRNIVNML HGVRDGLVRDANNY
 EQQEQA SQQILSSVDINF AVLPPPEVNSARIFAGAGL GPM
 LAAASAWDGLAEELHAAAGSFASVTTGLAGDAWHGPASLA
 MTRAA SP YV G W L N T A A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L A A
 TVSPAMVAANRTRLASLV AANLLGQNAPAI AA AEAEYE Q
 IWAQDVAAMFGYHSAASAVATQLAPIQEG LQQQLQNVLA
 QLASGNLGS GNVGVGNIGNDNIGNANIGFGNRGDANIGIG
 NIGDRNLGIGNTGNWNIGIGITGNGQIGFGK PANPDV L V V
 GNGGPGVTAL VMGGTDSL LPLPNIP LLEYAARFITPVHP
 GYTATFLET PSQFFPFTGLNS LTYDVSVAQGV TNLHTAI
 MAQLAAGNEVVVFGTSQSATIATFEMRYLQSL PAHLRPG
 LDELSFTLTGNPNRPDGGILTRFGFSIPQLGFTLSGATPA
 DAY PTVDYAFQYDGVNDFPKYPLNVFATANAIAGILFLH
 SGLIALPPDLASGV VQPVSSPDVLT TYILLPSQD LPLL V
 PLRAIPLLLGNPLADLIQPDLRV LVE LGYDRTAHQDVPS P
 FGLFPDVDWAEVAADLQQGAVQGVNDALSGLGLPPP WQP
 ALPRLFST ID93

10

融合ポリペプチド (配列番号 2)

MTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASD
 FWGGAGS AAC QGFITQLGRNFQVIYEQANA HGQKVQAAG
 NNMAQTDSAVGSSWAGTHLAN GSMSEVMMSEIAGLPIPP
 IIHYGAIAYAPSGASGKA WHQRTPARAEQVAL EKCGDKT
 CKVVS R FTRCGAVAYNGSKYQGGTGLTRRAAEDDAVNRL E
 GGR IVNWACNELMTSRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVE
 DEARRMWASAQNIS GAGWSGMAEATSLDTMTQMNQAFRN
 IVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQA SQQILSSVDINF AV
 LPPEVNSARIFAGAGLGPMLAAASAWDGLAEELHAA AGS
 FASVTTGLAGDAWHGPASLAMTRAA SPYV G W L N T A A G Q A A
 QAAGQAR LAASA FEATLAATVSPAMVAANRTRLASLVAA
 NLLGQNAPAI AA AEAEYE QIWAQDVAAMFGYHSAASAVA
 TQLAPIQEG LQQQLQNVLAQLASGNLGS G NVGVGNIGND
 NIGNANIGFGNRGDANIGIGNIGNIGDRNLGIGNTGNWNIGIG
 ITGNGQIGFGK PANPDV L V V G N G G P G V T A L V M G G T D S L L P
 LPNIPLLEYA ARFITPVHPGYTATFLET PSQFFPFTGLN
 SLTYDVSVAQGV TNLHTAIMA QLAAGNEVVVFGTSQSAT
 IATFEMRYLQSLPAHLRPG LDELSFTLTGNPN RPDGGIL
 TRFGFSIPQLGFTLSGATPADAYPTVDYAFQYDGVNDFPK
 YPL NVFATANAIAGILFLHSGLIALPPDLASGVVQPVSS
 PDVLT TYILLPSQD LPLL V PLRAIPLLLGNPLADLIQPD L
 RVLVELGYDRTAHQDVPS PFGLFPD VDWAEVAADLQQGA
 VQGVNDALSGLGLPPP WQP ALPRLFST

20

30

40

任意のヒスタグを有するID83融合ポリペプチド (配列番号 3)

MGSSH H H H H H S S G L V P R G S H M G T H L A N G S M S E V M M S E I A G
 LPIPP I I H Y G A I A Y A P S G A S G K A W H Q R T P A R A E Q V A L E K
 CGDKTCKVVS R FTRCGAVAYN GSKYQGGTGLTRRAAEDD
 AVNRL EGGRI VNWACNELMTSRFMTDPHAMRD MAGRFEV
 HAQTVEDEARRMWASAQNISGAGWSGMAEATSLDTMTQMN
 QAF RNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQA SQQILSSVD
 INF AVLPPPEVNSAR IFAGAGLGPMLAAASAWDGLAEELH
 AAAGSFASVTTGLAGDAWHGPASLA MTRAA SPYV G W L N T

50

A A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L A A T V S P A M V A A N R T R L
 A S L V A A N L L G Q N A P A I A A A E A E Y E Q I W A Q D V A A M F G Y H S A
 A S A V A T Q L A P I Q E G L Q Q Q L Q N V L A Q L A S G N L G S G N V G V G
 N I G N D N I G N A N I G F G N R G D A N I G I G N I G D R N L G I G N T G N
 W N I G I G I T G N G Q I G F G K P A N P D V L V V G N G G P G V T A L V M G
 G T D S L L P L P N I P L L E Y A A R F I T P V H P G Y T A T F L E T P S Q F F
 P F T G L N S L T Y D V S V A Q G V T N L H T A I M A Q L A A G N E V V V F G T
 S Q S A T I A T F E M R Y L Q S L P A H L R P G L D E L S F T L T G N P N R P
 D G G I L T R F G F S I P Q L G F T L S G A T P A D A Y P T V D Y A F Q Y D G
 V N D F P K Y P L N V F A T A N A I A G I L F L H S G L I A L P P D L A S G V 10
 V Q P V S S P D V L T T Y I L L P S Q D L P L L V P L R A I P L L G N P L A D L
 I Q P D L R V L V E L G Y D R T A H Q D V P S P F G L F P D V D W A E V A A D
 L Q Q G A V Q G V N D A L S G L G L P P P W Q P A L P R L F S T

ID 83 融合ポリペプチド (配列番号 4)

H L A N G S M S E V M M S E I A G L P I P P I I H Y G A I A Y A P S G A S G K A
 W H Q R T P A R A E Q V A L E K C G D K T C K V V S R F T R C G A V A Y N G S
 K Y Q G G T G L T R R A A E D D A V N R L E G G R I V N W A C N E L M T S R F
 M T D P H A M R D M A G R F E V H A Q T V E D E A R R M W A S A Q N I S G A G
 W S G M A E A T S L D T M T Q M N Q A F R N I V N M L H G V R D G L V R D A N N
 Y E Q Q E Q A S Q Q I L S S V D I N F A V L P P E V N S A R I F A G A G L G P 20
 M L A A A S A W D G L A E E L H A A A G S F A S V T T G L A G D A W H G P A S
 L A M T R A A S P Y V G W L N T A A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L
 A A T V S P A M V A A N R T R L A S L V A A N L L G Q N A P A I A A A E A E Y
 E Q I W A Q D V A A M F G Y H S A A S A V A T Q L A P I Q E G L Q Q Q L Q N V L
 A Q L A S G N L G S G N V G V G N I G N D N I G N A N I G F G N R G D A N I G
 I G N I G D R N L G I G N T G N W N I G I G I T G N G Q I G F G K P A N P D V
 L V V G N G G P G V T A L V M G G T D S L L P L P N I P L L E Y A A R F I T P
 V H P G Y T A T F L E T P S Q F F P F T G L N S L T Y D V S V A Q G V T N L H T
 A I M A Q L A A G N E V V V F G T S Q S A T I A T F E M R Y L Q S L P A H L R P
 G L D E L S F T L T G N P N R P D G G I L T R F G F S I P Q L G F T L S G A T 30
 P A D A Y P T V D Y A F Q Y D G V N D F P K Y P L N V F A T A N A I A G I L F
 L H S G L I A L P P D L A S G V V Q P V S S P D V L T T Y I L L P S Q D L P L
 L V P L R A I P L L G N P L A D L I Q P D L R V L V E L G Y D R T A H Q D V P S
 P F G L F P D V D W A E V A A D L Q Q G A V Q G V N D A L S G L G L P P P W Q
 P A L P R L F S T

Rv 1813 (配列番号 5)

M I T N L R R R T A M A A A G L
 G A A L G L G I L L V P T V D A H L A N G S M S E V M M S E I A G L P I P P I
 I H Y G A I A Y A P S G A S G K A W H Q R T P A R A E Q V A L E K C G D K T C K
 V V S R F T R C G A V A Y N G S K Y Q G G T G L T R R A A E D D A V N R L E G
 G R I V N W A C N Rv 3620 (配列番号 6)

M T S R F M T D P H A M R D M A G R F E V H A Q T V E D E A R R M W A S A Q N I 40
 S G A G W S G M A E A T S L D T M T Q M N Q A F R N I V N M L H G V R D G L V
 R D A N N Y E Q Q E Q A S Q Q I L S S Rv 2608 (配列番号 7)

M N F A V L P P E V N S A R I F A G A G L G P M L A A A S A W D G L A E E L H A
 A A G S F A S V T T G L A G D A W H G P A S L A M T R A A S P Y V G W L N T A
 A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L A A T V S P A M V A A N R T R L A
 S L V A A N L L G Q N A P A I A A A E A E Y E Q I W A Q D V A A M F G Y H S A
 A S A V A T Q L A P I Q E G L Q Q Q L Q N V L A Q L A S G N L G S G N V G V G N
 I G N D N I G N A N I G F G N R G D A N I G I G N I G D R N L G I G N T G N W
 N I G I G I T G N G Q I G F G K P A N P D V L V V G N G G P G V T A L V M G G
 T D S L L P L P N I P L L E Y A A R F I T P V H P G Y T A T F L E T P S Q F F 50

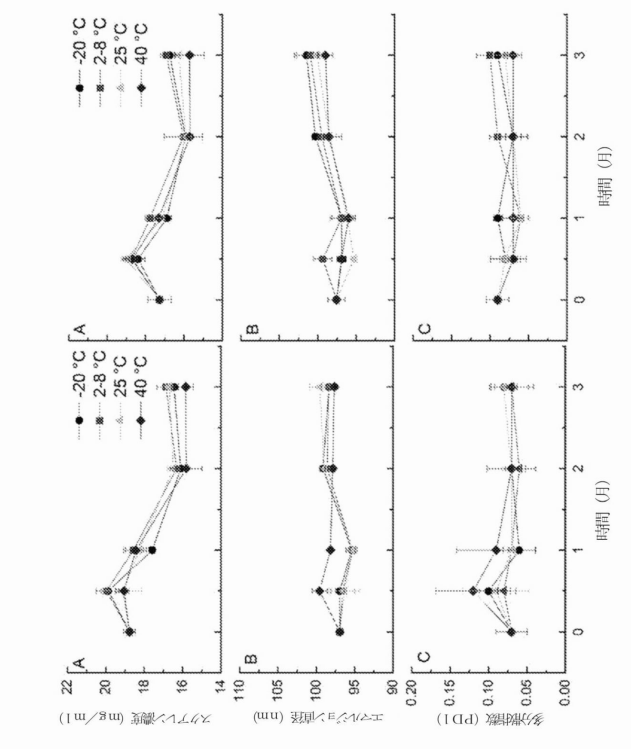
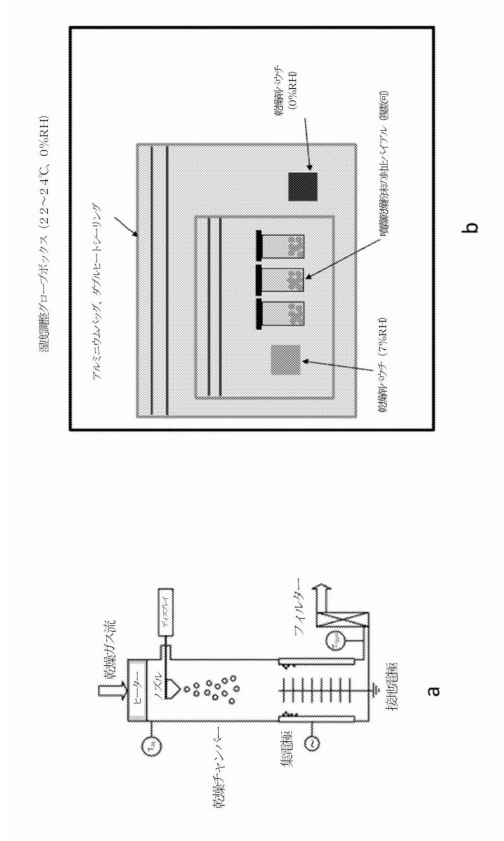
P F T G L N S L T Y D V S V A Q G V T N L H T A I M A Q L A A G N E V V V F G
 T S Q S A T I A T F E M R Y L Q S L P A H L R P G L D E L S F T L T G N P N R P
 D G G I L T R F G F S I P Q L G F T L S G A T P A D A Y P T V D Y A F Q Y D G
 V N D F P K Y P L N V F A T A N A I A G I L F L H S G L I A L P P D L A S G V
 V Q P V S S P D V L T T Y I L L P S Q D L P L L V P L R A I P L L G N P L A D
 L I Q P D L R V L V E L G Y D R T A H Q D V P S P F G L F P D V D W A E V A A D
 L Q Q G A V Q G V N D A L S G L G L P P P W Q P A L P R L F R v 3 6 1 9 (配 列
 番 号 8)
 M T I N Y Q F G D V D A H G A M I R A Q A G S L E A E H Q A I I S D V L T A S D
 F W G G A G S A A C Q G F I T Q L G R N F Q V I Y E Q A N A H G Q K V Q A A G
 N N M A Q T D S A V G S S W A

10

【 図 面 】

【 図 1 】

【 図 2 】



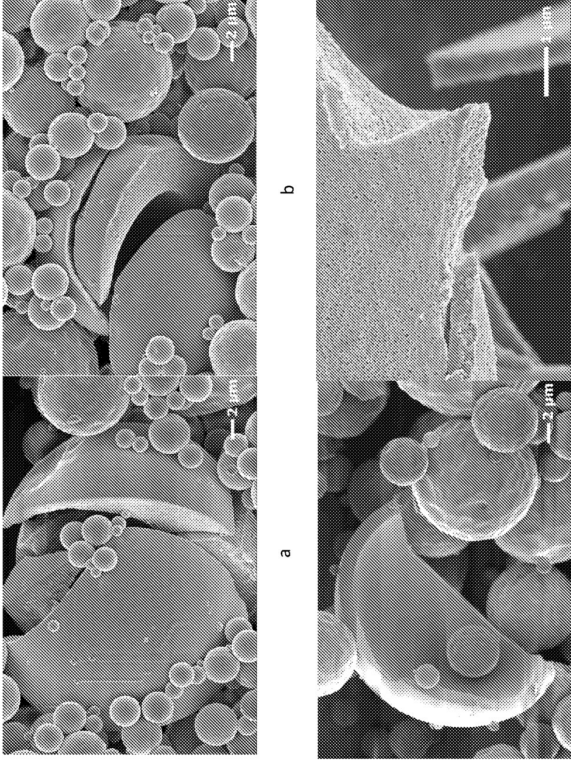
20

30

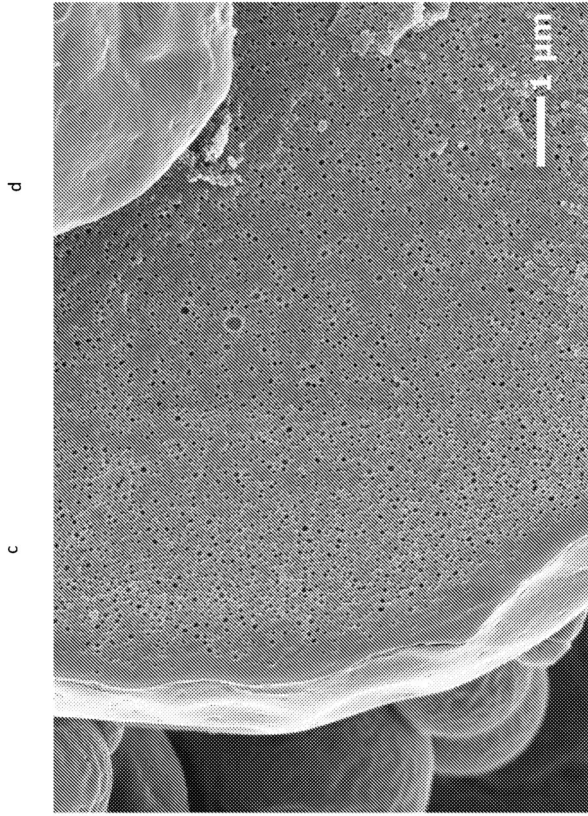
40

50

【 図 3 】



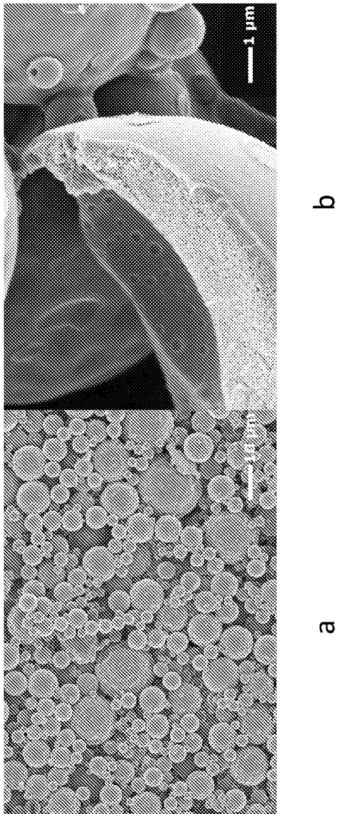
【 図 4 】



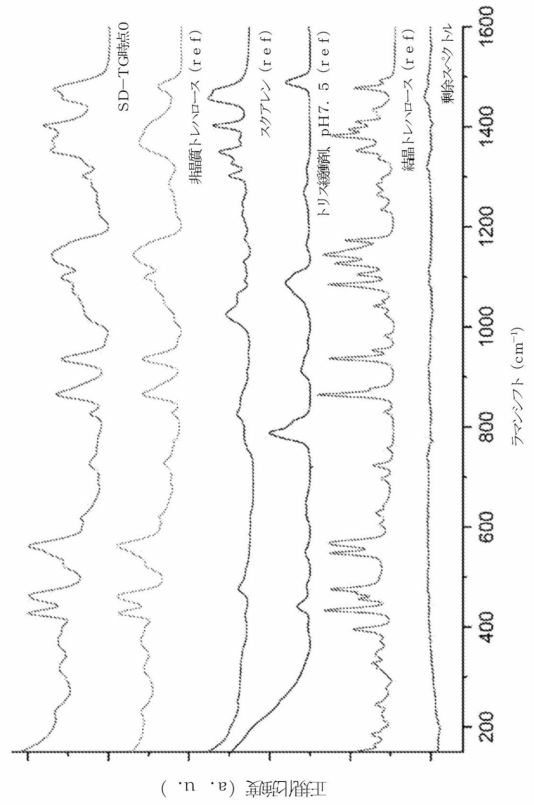
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

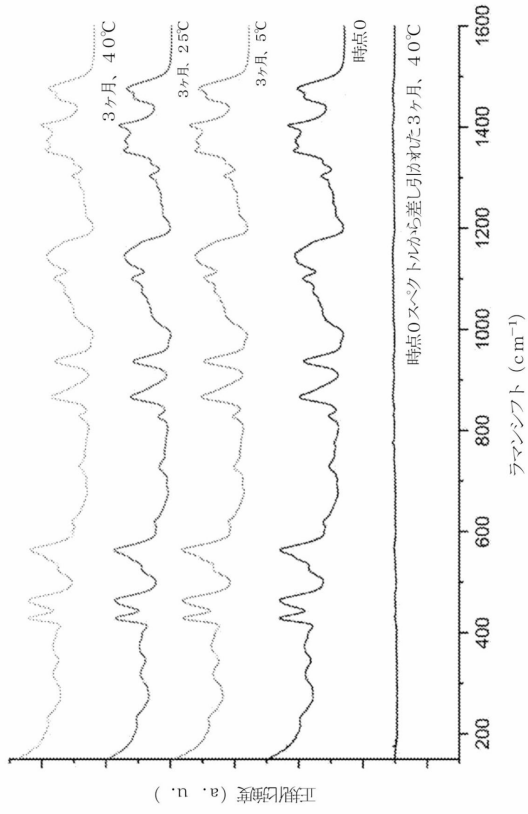


30

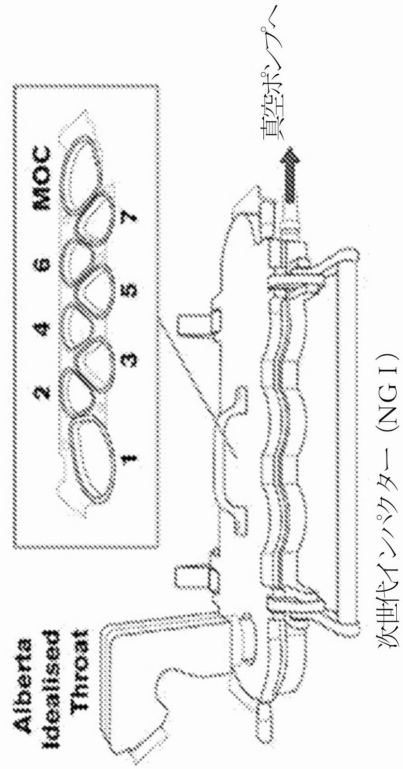
40

50

【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

【 配列表 】

202253294400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2020/034595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/04 A61K39/39 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, 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	WO 2009/046440 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; EDWARDS DAVID A [US] ET AL.) 9 April 2009 (2009-04-09) page 2, line 5 - line 30 page 3, line 31 - page 4, line 31 page 7, line 2 - page 9, line 17 page 13, line 14 - page 15, line 17 page 18, line 29 - page 19, line 12 page 29, line 22 - page 31, line 26 page 32, line 20 - page 36, line 3; examples 3, 5, 8-12, 14 ----- -/--	1-14, 18-40
<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 10 September 2020		Date of mailing of the international search report 22/09/2020
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

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2020/034595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2009/108689 A1 (NOVAVAX INC [US]; SHENOY DINESH [US]; ROBINSON JAMES [US]) 3 September 2009 (2009-09-03) page 3, paragraph 010 - page 4, paragraph 012 page 4, paragraph 016 page 7, paragraph 026 page 10, paragraph 035 - page 12, paragraph 043 page 16, paragraph 052 - page 17, paragraph 054; example 4</p>	1-22, 25, 36-40
X	<p>WO 2019/010560 A1 (IMMUNOVACCINE TECH INC [CA]) 17 January 2019 (2019-01-17) page 3, paragraph 0009 - page 4, paragraph 0016 page 7, paragraph 0043 - page 8, paragraph 0046 page 10, paragraph 0052 - paragraph 0054 page 22, paragraph 00110 - page 23, paragraph 00113 page 25, paragraph 00128 - page 26, paragraph 00129 page 27, paragraph 00138 - page 28, paragraph 00140 page 36, paragraph 00171 page 39, paragraph 00185 page 43, paragraph 00202 page 47, paragraph 00216 - paragraph 00217 page 56, paragraph 00260 - paragraph 00261 page 82, paragraph 00373 - page 84, paragraph 00381 page 106, paragraph 00493 - paragraph 00494 page 109, paragraph 00507; examples 1-8</p>	1-16
X	<p>L. GARCIA-CONTRERAS ET AL: "Immunization by a bacterial aerosol", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 105, no. 12, 25 March 2008 (2008-03-25), pages 4656-4660, XP055055946, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0800043105 abstract page 4656, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 page 4656, right-hand column, paragraph 4 - page 4658, left-hand column, paragraph 1 page 4656, right-hand column, paragraph 2</p>	32-36, 39, 40

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/034595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009046440 A1	09-04-2009	CA 2701719 A1	09-04-2009
		CN 101888831 A	17-11-2010
		EP 2200587 A1	30-06-2010
		US 2011045079 A1	24-02-2011
		WO 2009046440 A1	09-04-2009
WO 2009108689 A1	03-09-2009	BR P10908861 A2	06-02-2018
		CA 2716546 A1	03-09-2009
		CN 102014873 A	13-04-2011
		EP 2254554 A1	01-12-2010
		JP 2011514337 A	06-05-2011
		RU 2010139478 A	20-05-2012
		WO 2009108689 A1	03-09-2009
WO 2019010560 A1	17-01-2019	AU 2017423053 A1	23-01-2020
		CA 3069019 A1	17-01-2019
		CN 111093623 A	01-05-2020
		EP 3651733 A1	20-05-2020
		JP 2020526530 A	31-08-2020
		US 2020230057 A1	23-07-2020
		WO 2019010560 A1	17-01-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K 9/72	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 0 7 K 14/35 (2006.01)	C 0 7 K 14/35	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

州,シアトル, # 5 5 7, リーリー アベニュー ノースウエスト 5 4 5 0

(72)発明者 フォックス, クリストファー

アメリカ合衆国 9 8 3 9 0 ワシントン州, サムナー, 1 5 2 番 アベニュー イースト 6 4 1 3

(72)発明者 ベリング, ラインハルト

カナダ国 ティー6イー0ダブリュ3 アルバータ, エドモントン, 7 1 アベニュー ノースウ
エスト 9 6 2 6

(72)発明者 オルドゥバディ, マニ

カナダ国 ティー6イー 2ケイ6 アルバータ, エドモントン, 8 5 アベニュー ノースウエスト
1 0 2 - 1 0 6 3 5

(72)発明者 ゴメス, メリッサ

カナダ国 ティー9イー 5エス5 アルバータ, ルドゥーク, 4 6 エイ アベニュー 4 5 2 2

(72)発明者 カリギ, ニコラス

カナダ国 ティー8エイチ 1ピー5 アルバータ, シャーウッド パーク, ブルーベリー クレセン
ト 1 2 1

F ターム (参考) 4C076 AA30 AA93 BB25 BB27 CC15 CC27 CC32 CC35 DD08 DD34A

DD51H DD63 DD67A EE53A FF34 FF68 GG32

4C085 AA03 AA38 BA09 BA51 BA55 EE01 EE05 EE06 FF14 GG10

4H045 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA31 FA74