

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-532620

(P2014-532620A)

(43) 公表日 平成26年12月8日(2014.12.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-536398 (P2014-536398)	(71) 出願人 504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日 平成24年10月19日 (2012.10.19)	スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日 平成26年6月16日 (2014.6.16)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号 PCT/IB2012/055751	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号 W02013/057715	(72) 発明者 ツァイ, セオドア
(87) 国際公開日 平成25年4月25日 (2013.4.25)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 139, ケンブリッジ, シドニー ス トリート 45, ノバルティス ヴァク シンス
(31) 優先権主張番号 61/627, 995	Fターム(参考) 4C076 AA17 BB11 CC06 CC07 DD34
(32) 優先日 平成23年10月20日 (2011.10.20)	最終頁に続く
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

(54) 【発明の名称】 小児の初回免疫のためのアジュバント添加インフルエンザBウイルスワクチン

(57) 【要約】

インフルエンザB株は、小児集団において疫学的に意味がある。水中油型エマルジョンでアジュバント添加されたインフルエンザBワクチンでの小児の免疫原性初回免疫は、追加免疫がアジュバントを含むか否かに拘わらず、異なる株もしくは系統に由来するインフルエンザBウイルス抗原を含む追加免疫ワクチンに対する免疫応答を刺激する。一局面において、小児を免疫化するための方法が提供され、上記方法は、(i)上記小児に、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物を投与する工程、次いで、(ii)上記小児に、第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで上記第1のインフルエンザBウイルスおよび上記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

小児を免疫化するための方法であって、前記方法は、(i)前記小児に、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物を投与する工程、次いで、(ii)前記小児に、第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで前記第1のインフルエンザBウイルスおよび前記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある、方法。

【請求項 2】

小児を免疫化するための方法であって、前記方法は、前記小児に、第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで前記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物で予備免疫されており、前記第1のインフルエンザBウイルスおよび前記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある、方法。

10

【請求項 3】

異なる系統にある第1のインフルエンザBウイルス株および第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原を個々に含む、小児を免疫化するための方法において使用するための第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物であって、前記方法は、(i)前記小児に、前記第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む前記第1の免疫原性組成物を投与する工程、次いで、(ii)前記小児に、前記第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む前記第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含する、第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物。

20

【請求項 4】

第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原を含む、小児を免疫化するための方法において使用するための第2の免疫原性組成物であって、前記方法は、前記小児に、前記第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで前記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物で予備免疫化されており、前記第1のインフルエンザBウイルスおよび前記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある、第2の免疫原性組成物。

30

【請求項 5】

前記小児は、1回より多くの機会に、前記第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原を受容する、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法もしくは免疫原性組成物。

【請求項 6】

前記第1の免疫原性組成物は、アジュバントを含む、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項 7】

前記第2の免疫原性組成物は、アジュバントを含まない、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

40

【請求項 8】

前記第1の免疫原性組成物および/もしくは前記第2の免疫原性組成物は、H1N1型インフルエンザAウイルスに由来する抗原およびH3N2型インフルエンザAウイルスに由来する抗原を含む、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記水中油型エマルジョン中の油滴の大部分は、1 μ m未満の直径を有する、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項 10】

前記油滴は、スクアレンを含む、請求項9に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項 11】

50

前記小児は、72ヶ月齢未満である、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項12】

前記小児は、36ヶ月齢未満である、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項13】

前記小児は、少なくとも6ヶ月齢である、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項14】

前記小児は、少なくとも6ヶ月齢であるが、72ヶ月齢未満である、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

10

【請求項15】

前記小児は、少なくとも6ヶ月齢であるが、36ヶ月齢未満である、上述の請求項のいずれか1項に記載の方法または免疫原性組成物。

【請求項16】

小児を免疫化するためのインフルエンザワクチンの製造における第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原の使用であって、ここで(i)前記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントで予備免疫化されており、そして(ii)前記第1のインフルエンザBウイルスおよび前記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある、使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明は、小児におけるインフルエンザウイルス感染から防御するためのアジュバント添加(*adjuvanted*)ワクチンの分野にある。

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

現在一般に使用されるインフルエンザワクチンは、参考文献1の第17章および第18章に記載される。それらは、生ウイルスもしくは不活化ウイルスに基づき、不活化ワクチンは、完全ウイルス、「スプリット」ウイルスもしくは精製表面抗原(ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼを含む)に基づき得る。

30

【0003】

健康な幼児におけるインフルエンザの負荷量は、インフルエンザの医学的影響[2~7]および社会経済的影響[8]に関する新たな研究に加えて、いよいよ認識されてきた。さらに、小児は、流行期の間にインフルエンザに攻撃される率が最も高く、共同体の中のインフルエンザウイルスを高リスク群に伝播する[8、9]。

【0004】

米国予防接種諮問委員会(The American Advisory Committee on Immunization Practices)(ACIP)は2006年に、6~59ヶ月齢の全ての小児に毎年インフルエンザワクチン接種を推奨した。なぜなら、6~23ヶ月齢の小児は、インフルエンザ関連加療の実質的に増大したリスクがあり[2~7]、24~59ヶ月齢の小児は、インフルエンザ関連でクリニックおよび救急部門を訪れる増大したリスクがある[6]からである。2008年7月に、ACIPは、5~18歳の青年において季節性インフルエンザワクチン接種の推奨をさらに広げた[10]。欧州において、いくつかの国々では、類似の推奨が出されているが、欧州CDCは、24ヶ月齢未満の小児における効力は、不十分にしか証明されておらず、37%程度の低さであり得る[11]ことに注目して、幼児の普遍的な免疫化(*universal immunization*)に関して、より制限された立場をとっている。Coc

40

50

h r a n e 分析から、「幼児におけるインフルエンザワクチンのフィールド効力 (f i e l d e f f i c a c y) は、プラセボとは異なる」と述べられた [1 2]。

【 0 0 0 5 】

適度な効力に加えて、従来のワクチンは、初回免疫されていない (u n p r i m e d) 小児、特に、非常に若い小児において満足のいく防御抗体を誘導しないようである。より具体的には、従来のワクチンは、一般に、インフルエンザ A 株に対してよりインフルエンザ B 株に対して低い免疫原性を示す [1 3 , 1 4]。A C I P は、2 0 0 4 年以來、免疫学的にナイーブな非常に若い小児において 2 用量ワクチン接種レジメンを推奨してきたが、より最近になって、このような推奨は、2 用量がこの集団における防御に必要とされることを示す証拠が蓄積されたので、最大 8 歳までの小児に拡げられた [1 5]。

10

小児をインフルエンザに対して免疫化することにおけるさらなる問題は、「抗原ドリフト」に由来する。インフルエンザウイルスは、日常的に、宿主免疫系から逃れるために強い選択を受け、遺伝的変異および新たな株の生成 (「抗原ドリフト」) を生じる。ドリフトした株に対する既存の免疫のレベルは、ドリフトした株に対して低下するので、抗原ドリフトは、インフルエンザ流行のより重篤なかつ早期の開始と関連することが示唆された [1 6]。季節性インフルエンザワクチンに現在含まれている 3 つのウイルス株全てが、抗原ドリフトを受けやすい一方で、A / H 3 N 2 株は、より頻繁にドリフトすることが公知であり、新たな改変体は、古い株に取って代わる傾向にある [1 7 , 1 8]。

【 0 0 0 6 】

抗原ドリフトの速度は、ワクチン製造の速度を上まわり得る。従って、ワクチンが発売される時、そのワクチン株は、もはや、広まっている株に良好にマッチしない可能性がある。ワクチンミスマッチは、ワクチン有効性が低下するので、インフルエンザ関連死亡率の有意な過剰を生じ得る [1 9]。ワクチンミスマッチは、大部分のインフルエンザ感受性集団において、特に、いかなるインフルエンザウイルスに対しても既存の免疫を有しない幼児において、潜在的により大きな問題である。これは、より最近になって、2 0 0 3 / 2 0 0 4 年のシーズンに、ワクチンに含まれなかった、ドリフトしたミスマッチ株 (A / F u j i a n , H 3 N 2) の出現によって示され、前のシーズンと比較して、カリフォルニアにおいて集中治療を受けて入院している小児を 3 倍程度にした [2 0]。幼児とは対照的に、年配者は、少なくとも広まっているインフルエンザ株への以前の曝露の有意な病歴を有し、このことは、彼らにある程度の交叉防御 (c r o s s p r o t e c t i o n) を与える。1 9 9 7 年および 2 0 0 3 年に起こったように、ワクチン推奨が最終的に承認された後に出現したドリフトしたインフルエンザ株は、ワクチンに対してナイーブな幼児に対する重大な脅威である。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】Neuzilら、N E n g l J M e d (2 0 0 0) 3 4 2 : 2 2 5 ~ 3 1

【非特許文献 2】Peltolaら、C l i n I n f e c t D i s (2 0 0 3) 3 6 : 2 9 9 ~ 3 0 5

40

【非特許文献 3】Heikkinenら、J I n f e c t D i s (2 0 0 4) 1 9 0 : 1 3 6 9 ~ 7 3

【非特許文献 4】Izurietarら、N E n g l J M e d (2 0 0 0) 3 4 2 : 2 3 2 ~ 3 9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、小児において有効であり、適切なインフルエンザ B ウイルス免疫原性を与え (適切な免疫応答を誘導するために)、一般に広まっているインフルエンザウイルスに対して有効な防御を与え、そして / またはインフルエンザ B ウイルス株に対して小児

50

において有効であるインフルエンザワクチンを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

インフルエンザBウイルス抗原を含み、サブミクロン水中油型エマルジョンをアジュバント添加したインフルエンザワクチンが、等価なアジュバント添加されていないワクチンと比較して、異種株由来の、特に、異なる系統にある株に由来するインフルエンザB抗原へのその後の曝露によりよく応答し得るように免疫系を刺激することが、ここで見いだされた。

【0010】

従って、本発明は、小児を免疫化するための方法を提供し、上記方法は、(i)上記小児に、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む免疫原性組成物を投与する工程、次いで、(ii)上記小児に、第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および必要に応じて、水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで上記第1のインフルエンザBウイルスおよび上記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる株である(そして好ましくは、異なる系統にある)。

【0011】

本発明はまた、小児を再免疫化するための方法を提供し、上記方法は、上記小児に、第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで上記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物で予備免疫化されており、上記第1のインフルエンザBウイルスおよび上記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある。

【0012】

本発明はまた、異なる系統にある第1のインフルエンザBウイルス株および第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原を個々に含む、小児を免疫化するための方法において使用するための第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物を提供し、上記方法は、(i)上記小児に、上記第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む上記第1の免疫原性組成物を投与する工程、次いで、(ii)上記小児に、上記第2のインフルエンザBウイルスに由来する抗原を含む上記第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含する。

【0013】

本発明はまた、第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原を含む、小児を再免疫化するための方法において使用するための第2の免疫原性組成物を提供し、上記方法は、上記小児に上記第2の免疫原性組成物を投与する工程を包含し；ここで上記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントを含む第1の免疫原性組成物で予備免疫化されており、上記第1のインフルエンザBウイルスおよび上記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある。

【0014】

本発明はまた、小児を再免疫化するためのインフルエンザワクチンの製造における第2のインフルエンザBウイルス株に由来する抗原の使用を提供し、ここで(i)上記小児は、第1のインフルエンザBウイルスに由来する抗原および水中油型エマルジョンを含むアジュバントで予備免疫化されており、(ii)上記第1のインフルエンザBウイルスおよび上記第2のインフルエンザBウイルスは、異なる系統にある。

【0015】

免疫化されているかもしくは再免疫化されている最中の小児は、0ヶ月齢～36ヶ月齢の間、例えば、6ヶ月～35ヶ月の間、6ヶ月～30ヶ月の間、6ヶ月～24ヶ月の間、6ヶ月～23ヶ月の間(全て両端含む)の年齢であり得る。免疫化は、以下でより詳細に議論されるように、小児が6ヶ月齢になった後であるが、彼らの3歳の誕生日より前が理

10

20

30

40

50

想的である。本発明はまた、より年齢の高い小児（例えば、最大で72ヶ月齢まで）で使用され得る。従って、上記小児は、6ヶ月齢～72ヶ月齢の間、36ヶ月齢～72ヶ月齢の間などであり得るので、ワクチンは、小児の6歳の誕生日前に投与され得る。

【0016】

本発明に従って使用され得るアジュバント添加ワクチンは、FLUADTM製品であり、これは、既に利用可能であるが、年配の被験体（すなわち、少なくとも65歳（もしくはいくらかの地域では、少なくとも60歳）の被験体）においてのみ使用が承認されている。このワクチン中のアジュバントは、MF59として公知のサブミクロンの水中油型エマルジョンである。上記FLUADTM中のアジュバントは、年配者において認められる加齢性免疫老化（age-related immunosenescence）を克服する一助となる。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

（詳細な説明）

（インフルエンザウイルス抗原）

本発明は、小児を免疫化するために、インフルエンザウイルス抗原（代表的には、ヘマグルチニンを含む）を使用する。上記抗原は、代表的には、インフルエンザビリオンから調製されるが、代替として、抗原（例えば、ヘマグルチニン）は、組換え宿主において（例えば、バキュロウイルスベクターを使用する昆虫細胞株において）発現され得、精製形態において使用され得る[21、22]。しかし、一般に、抗原は、ビリオンに由来する。

20

【0018】

上記抗原は、生ウイルスの形態、またはより好ましくは、不活化ウイルスの形態をとり得る。ウイルスを不活化するための化学的手段は、以下の因子のうちの1種以上の有効量での処理を含む：洗剤、ホルムアルデヒド、ホルマリン、 β -プロピオラクトン、もしくはUV光。不活化のためのさらなる化学的手段は、メチレンブルー、ソラレン、カルボキシフラーレン(C60)もしくはこれらのうちのいずれかの組み合わせでの処理を含む。ウイルス不活化の他の方法は、当該分野で公知である（例えば、バイナリーエチレンアミン(binary ethylamine)、アセチルエチレンジアミン、もしくはガンマ線照射)。INFLEXALTM製品は、完全ビリオン不活化ワクチンである。

30

【0019】

不活化ウイルスが使用される場合、上記ワクチンは、完全ビリオン、スプリットビリオン、もしくは精製表面抗原（ヘマグルチニンを含み、通常は、ノイラミニダーゼを同様に含む）を含み得る。

【0020】

不活化されているが、完全ではない細胞の（非完全細胞）ワクチン（例えば、スプリットウイルスワクチンもしくは精製表面抗原ワクチン）は、この抗原内に位置するさらなるT細胞エпитープから利益を得るために、マトリクスタンパク質を含み得る。従って、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼを含む非完全細胞ワクチン（特に、スプリットワクチン）は、M1および/もしくはM2マトリクスタンパク質をさらに含み得る。有用なマトリクスフラグメントは、参考文献23に開示される。核タンパク質もまた、存在し得る。

40

【0021】

ビリオンは、ウイルス含有流体から、種々の方法によって採取され得る。例えば、精製プロセスは、上記ビリオンを破壊するために洗剤を含む線形スクロース勾配溶液を使用するゾーン遠心分離を含み得る。次いで、抗原は、ダイアフィルトレーションによって、必要に応じた希釈の後に精製され得る。

【0022】

スプリットビリオンは、精製されたビリオンを洗剤および/または溶媒で処理して、サブビリオン調製物を生成する（「Tween-エーテル」スプリットプロセスを含む）こ

50

とによって得られる。インフルエンザウイルスをスプリットするための方法は、当該分野で周知である（例えば、参考文献24～29などを参照のこと）。上記ウイルスのスプリットは、代表的には、感染性であろうと非感染性であろうと、破壊濃度の分割剤（splitting agent）で完全ウイルスを破壊するかもしくはフラグメント化することによって行われる。上記破壊は、上記ウイルスタンパク質の完全なもしくは部分的な可溶化を生じ、上記ウイルスの完全性を変化させる。好ましい分割剤は、非イオン性界面活性剤およびイオン性（例えば、カチオン性）界面活性剤である。適切な分割剤としては、エチルエーテル、ポリソルベート80、デオキシコレート、トリ-N-ブチルホスフェート、アルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル糖、スルホベタイン、ベタイン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、N,N-ジアルキル-グルカミド、Hecameg、アルキルフェノキシ-ポリエトキシエタノール、4級アンモニウム化合物、サルコシル、CTAB（セチルトリメチルアンモニウムブロミド）、トリ-N-ブチルホスフェート、Cetavlon、ミリスチルトリメチルアンモニウム塩、リポフェクチン、リポフェクタミン、およびDOT-MA）、オクチル-もしくはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えば、Triton界面活性剤（例えば、Triton X-100もしくはTriton N101）、ノノキシノール（nonoxynol）9（NP9）Sympatens-NP/090、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（Tween界面活性剤）、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンエステル（polyoxyethylene ester）などが挙げられるが、これらに限定されない。1つの有用なスプリット手順は、デオキシコール酸ナトリウムおよびホルムアルデヒドの連続的効果を使用し、スプリットは、最初のビリオン精製の間起こり得る（例えば、スクロース密度勾配溶液において）。よって、スプリットプロセスは、上記ビリオン含有材料の清澄化（非ビリオン材料を除去するために）、上記採取したビリオンの濃縮（例えば、吸着法（例えば、CaHPO₄吸着）を使用して）、非ビリオン材料からの完全ビリオンの分離、密度勾配遠心分離工程において分割剤を使用する（例えば、デオキシコール酸ナトリウムのような分割剤を含むスクロース勾配を使用する）ビリオンのスプリット、次いで、望ましくない物質を除去するための濾過（例えば、限外濾過）を含み得る。スプリットビリオンは、有用には、リン酸ナトリウム緩衝化等張性塩化ナトリウム溶液中で再懸濁され得る。BEGRIVACTM、FLUARIXTM、FLUZONETMおよびFLUSHIELDTM製品はスプリットワクチンである。

【0023】

精製された表面抗原ワクチンは、インフルエンザ表面抗原であるヘマグルチニン、および代表的には、同様にノイラミニダーゼを含む。精製形態でこれらタンパク質を調製するためのプロセスは、当該分野で周知である。上記FLUVIRINTM、AGRIPPALTMおよびINFLUVACTM製品は、サブユニットワクチンである。

【0024】

別の形態の不活化インフルエンザ抗原は、ピロソーム[30]（核酸を含まないウイルス様リボソーム粒子）である。ピロソームは、洗剤でのインフルエンザウイルスの可溶化、続いて、ヌクレオキャプシドの除去およびウイルス糖タンパク質を含む膜の再構成によって、調製され得る。ピロソームを調製するための代替法は、ウイルス膜糖タンパク質を過剰量のリン脂質に添加して、膜中にウイルスタンパク質を含むリボソームを生じることを含む。本発明は、INFLLEXALTM製品およびINVAVACTM製品のようにバルクのピロソームを保存するために使用することができる。一部の実施形態において、インフルエンザ抗原は、ピロソームの形態ではない。

【0025】

上記インフルエンザウイルスは、弱毒化され得る。上記インフルエンザウイルスは、温度感受性であり得る。上記ウイルスは、低温適合（cold-adapted）され得る。これら3つの特徴は、生のウイルスをワクチン抗原として使用する場合に特に有用である。

【0026】

10

20

30

40

50

HAは、現在の不活化インフルエンザワクチンにおける主要な免疫原であり、ワクチン用量は、HAレベルを参照することによって標準化されている（代表的には、SRIDによって測定される）。既存のワクチンは、代表的には、1株あたり約15 μ gのHAを含むが、より低用量が、使用され得る（例えば、小児に関して、もしくは汎流行的状況において、またはアジュバントを使用する場合）。分割用量（例えば、1/2（すなわち、7.5 μ g HA/株）、1/4および1/8）が使用されてきたことと同様に、より高い用量も使用されてきた（例えば、3 \times もしくは9 \times 用量[31、32]）。従って、ワクチンは、0.1~150 μ gの間のHA/インフルエンザ株、好ましくは、0.1~50 μ gの間（例えば、0.1~20 μ g、0.1~15 μ g、0.1~10 μ g、0.1~7.5 μ g、0.5~5 μ gなど）を含み得る。特定の用量としては、1株あたり、例えば、約45、約30、約15、約10、約7.5、約5、約3.8、約1.9、約1.5などが挙げられる。1株あたり、7.5 μ gの用量が、小児における使用のために理想的である。

10

【0027】

生ワクチンに関して、投与は、HA含有量よりむしろ、50%組織培養感染量（median tissue culture infectious dose）（TCID₅₀）によって測定され、1株あたり10⁶~10⁸の間の（好ましくは、10^{6.5}~10^{7.5}の間の）TCID₅₀が、代表的である。

【0028】

ワクチン中で使用されるインフルエンザウイルス株は、シーズンごとに変化する。現在の大流行間期において、ワクチンは、代表的には、2種のインフルエンザA株（H1N1およびH3N2）および1種のインフルエンザB株を含み、三価ワクチンは、本発明での使用に関して代表的である。本発明の組成物は、インフルエンザBウイルスに由来する抗原をふくみ、必要に応じて、少なくとも1種のインフルエンザAウイルスに由来する抗原を含む。本発明の組成物がインフルエンザAウイルスに由来する抗原を含む場合、本発明は、季節性および/もしくは汎流行性株を使用し得る。シーズンおよびワクチンに含まれる抗原の性質に依存して、本発明は、インフルエンザAウイルスのヘマグルチニンサブタイプH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15もしくはH16のうちの1種以上を含み（そしてこれらから防御し）得る。上記ワクチンは、NAサブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8もしくはN9のうちのいずれかのノイラミニダーゼをさらに含み得る。

20

30

【0029】

本発明は、従って、汎流行性インフルエンザAウイルス株とともに使用され得る。汎流行性株の特徴は、以下である：（a）それは、現在広まっているヒト株におけるヘマグルチニンと比較して、新たなヘマグルチニンを含む（すなわち、10年間にわたってヒト集団において顕性になっていないもの（例えば、H2）、またはヒト集団においてこれまで全く認められていないもの（例えば、一般にトリ集団においてのみ認められているH5、H6もしくはH9））、その結果、上記ワクチンレシピエントおよび一般的ヒト集団が、上記株のヘマグルチニンに対して免疫学的にナイーブである；（b）それは、ヒト集団において水平伝播している最中であり得る；および（c）それは、ヒトに対して病原性である。汎流行性株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：H2、H5、H7もしくはH9サブタイプの株（例えば、H5N1、H5N3、H9N2、H2N2、H7N1およびH7N7株）。H5サブタイプ内では、ウイルスは、多くのクレード（例えば、クレード1もしくはクレード2）に入り得る。クレード2のうちの6つのサブクレードは、異なる地理的分布を有するサブクレード1、2および3をともなって同定されており、ヒト感染におけるそれらの関与に起因して、特に関連する。

40

【0030】

インフルエンザBウイルスは、現在、異なるHAサブタイプを示さないが、インフルエンザBウイルス株は、2つの異なる系統に入る。これら系統は、1980年代後半に出現し、互いに抗原的にも遺伝的にも区別され得るHAを有し得る[33]。現在のインフル

50

エンザBウイルス株は、B/Victoria/2/87様もしくはB/Yamagata/16/88様のいずれかである。これら株は、通常、抗原的に区別されるが、アミノ酸配列における差異がまた、この2つの系統を区別するために記載されてきた(例えば、B/Yamagata/16/88様株は、しばしば(しかし常にではない)、「Lee40」HA配列に対して番号付けして、アミノ酸残基164において欠失を有するHAタンパク質を有する[34])。本発明は、いずれかの系統のBウイルスに由来する抗原とともに使用され得る。

【0031】

ワクチンが、インフルエンザの1種より多くの株を含む場合、その異なる株は、代表的には、別個に増殖させられ、上記ウイルスが採取されて抗原が調製された後に、混合される。従って、本発明の製造プロセスは、インフルエンザ株の1種より多くに由来する抗原を混合する工程を包含し得る。

10

【0032】

本発明で使用されるインフルエンザウイルスは、リアソータント株であり得、逆遺伝学技術によって得られたものであり得る。逆遺伝学技術[例えば、35~39]は、所望のゲノムセグメントを有するインフルエンザウイルスがプラスミドを使用してインビトロで調製されることを可能にする。代表的には、(a)所望のウイルスRNA分子(例えば、polIプロモーターもしくはバクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターに由来する)をコードするDNA分子、および(b)ウイルスタンパク質(例えば、polIプロモーターに由来する)をコードするDNA分子を発現させることを含み、その結果、細胞におけるDNAの両方のタイプの発現は、完全な無傷の感染性ビリオンのアセンブリをもたらす。上記DNAは、好ましくは、上記ウイルスRNAおよびタンパク質のうちの全てを提供するが、上記RNAおよびタンパク質のうちのいくつかを提供するためにヘルパーウイルスを使用することもまた、可能である。各ウイルスRNAを生成するために別個のプラスミドを使用するプラスミドベースの方法が使用され得[40~42]、これら方法はまた、上記ウイルスタンパク質のうちの全てもしくはいくつか(例えば、上記PB1、PB2、PAおよびNPタンパク質のみ)を発現するためにプラスミドの使用を含む(いくつかの方法においては、最大12個までのプラスミドが使用される)。必要とされるプラスミドの数を減らすために、近年のアプローチ[43]は、同じプラスミド上で複数のRNAポリメラーゼI転写カセット(ウイルスRNA合成のために)(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくは8個全てのインフルエンザA vRNAセグメントをコードする配列)および複数のタンパク質コード領域と、別のプラスミド上のRNAポリメラーゼIIプロモーター(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくは8個全てのインフルエンザA mRNA転写物をコードする配列)とを組み合わせる。参考文献43の方法の好ましい局面は、以下を伴う:(a)単一のプラスミド上のPB1、PB2およびPA mRNAコード領域;ならびに(b)単一のプラスミド上の8個全てのvRNAコードセグメント。一方のプラスミド上にNAセグメントおよびHAセグメントを、ならびにもう一方のプラスミド上に6つの他のセグメントを含めることはまた、事態(matter)を促進し得る。

20

30

【0033】

上記ウイルスRNAセグメントをコードするためにpolIプロモーターを使用する代替として、バクテリオファージポリメラーゼプロモーターを使用することが可能である[44]。例えば、SP6、T3もしくはT7ポリメラーゼのプロモーターは、便利に使用され得る。polIプロモーターの種特異性が原因で、バクテリオファージポリメラーゼプロモーターは、多くの細胞タイプ(例えば、MDCK)に関してより便利であり得るが、細胞はまた、外来のポリメラーゼ酵素をコードするプラスミドでトランスフェクトされなければならない。

40

【0034】

他の技術において、上記ウイルスRNAおよび単一テンプレートに由来する発現可能なmRNAを同時にコードするためにpolIおよびpolIIの二重プロモーターを使用

50

することは、可能である。[45 , 46] .

従って、インフルエンザ A ウイルスは、A / P R / 8 / 3 4 ウイルスに由来する 1 種以上の RNA セグメントを含み得る（代表的には、A / P R / 8 / 3 4 に由来する 6 種のセグメント、上記 H A および N セグメントは、ワクチン株に由来する（すなわち、6 : 2 リアソータント））。それはまた、A / W S N / 3 3 ウイルスに由来するか、またはワクチン調製のためのリアソータントウイルスを生成するために有用な任意の他のウイルス株に由来する 1 種以上の RNA セグメントを含み得る。インフルエンザ A ウイルスは、A A / 6 / 6 0 インフルエンザウイルス（A / A n n A r b o r / 6 / 6 0）に由来する 6 種より少ない（すなわち、0 種、1 種、2 種、3 種、4 種もしくは 5 種の）ウイルスセグメントを含み得る。インフルエンザ B ウイルスは、A A / 1 / 6 6 インフルエンザウイルス（B / A n n A r b o r / 1 / 6 6）に由来する 6 種より少ない（すなわち、0 種、1 種、2 種、3 種、4 種もしくは 5 種の）ウイルスセグメントを含み得る。代表的には、本発明は、ヒトからヒトへ伝播する能力がある株から防御するので、上記株のゲノムは、通常、哺乳動物（例えば、ヒト）インフルエンザウイルスが起源の少なくとも 1 種の RNA セグメントを含む。それは、トリインフルエンザウイルスに始まった NS セグメントを含み得る。

【 0 0 3 5 】

その抗原が組成物中に含まれ得る株は、耐性の汎流行性株 [4 8] を含め、抗ウイルス治療に耐性（例えば、オセルタミビル [4 7] および / もしくはザナミビルに耐性）であり得る。

【 0 0 3 6 】

本発明で使用される H A は、ウイルスにおいて見いだされたとおりの天然の H A であってもよいし、改変されたものであってもよい。例えば、H A を改変して、ウイルスがトリ種において非常に病原性であるようにする決定基（例えば、H A 1 と H A 2 との間の切断部位の周りにある超塩基性領域）を除去することは公知である。なぜなら、これら決定基は、さもなければウイルスが卵の中で増殖しないようにし得るからである。

【 0 0 3 7 】

上記抗原の供給源として使用されるウイルスは、卵（例えば、特定病原体を含まない卵）もしくは細胞培養物のいずれかで増殖させられ得る。インフルエンザウイルス増殖のための現在の標準法は、孵化鶏卵を使用する（ウイルスは、卵の内容物（尿膜腔液）から精製される）。しかし、より近年になって、ウイルスは、速度および患者アレルギーが理由で、動物細胞培養物中で増殖させられており、この増殖法は、好ましい。

【 0 0 3 8 】

細胞株は、代表的には、哺乳動物起源である。適切な起源の哺乳動物細胞としては、ハムスター、ウシ、霊長類（ヒトおよびサルを含む）およびイヌの細胞が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、霊長類細胞の使用は好ましくない。種々の細胞タイプが使用され得る（例えば、腎臓細胞、線維芽細胞、網膜細胞、肺細胞など）。適切なハムスター細胞の例は、B H K 2 1 もしくは H K C C という名称を有する細胞株である。適切なサル細胞は、例えば、アフリカミドリザル細胞（例えば、V e r o 細胞株のような腎臓細胞）である [4 9 ~ 5 1]。適切なイヌ細胞は、例えば、C L D K および M D C K 細胞株のような腎臓細胞である。

【 0 0 3 9 】

従って、適切な細胞株としては、M D C K ; C H O ; C L D K ; H K C C ; 2 9 3 T ; B H K ; V e r o ; M R C - 5 ; P E R . C 6 [5 2] ; F R h L 2 ; W I - 3 8 ; などが挙げられるが、これらに限定されない。適切な細胞株は、例えば、A m e r i c a n T y p e C e l l C u l t u r e (A T C C) c o l l e c t i o n [5 3]、C o r i e l l C e l l R e p o s i t o r i e s [5 4]、もしくは E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E C A C C) から広く入手可能である。例えば、A T C C は、カタログ番号 C C L - 8 1、C C L - 8 1 . 2、C R L - 1 5 8 6 および C R L - 1 5 8 7 の下で種々の異なる V e r o 細胞を供給しており

10

20

30

40

50

、それは、カタログ番号 C C L - 3 4 の下で M D C K 細胞を供給している。P E R . C 6 は、寄託番号 9 6 0 2 2 9 4 0 の下で E C A C C から入手可能である。

【 0 0 4 0 】

最も好ましい細胞株は、哺乳動物タイプのグリコシル化を有するものである。哺乳動物細胞株に対するあまり好ましくない代替としては、ウイルスを、アヒル（例えば、アヒル網膜）もしくはニワトリに由来する細胞株を含め、トリ細胞株で増殖させることができる [例 えば、参 考 文 献 5 5 ~ 5 7]。トリ細胞株の例としては、トリ胚性幹細胞 [5 5、5 8] およびアヒル網膜細胞 [5 6] が挙げられる。適切なトリ胚性幹細胞としては、ニワトリ胚性幹細胞に由来する E B x 細胞株、E B 4 5、E B 1 4、および E B 1 4 - 0 7 4 が挙げられる [5 9]。ニワトリ胚線維芽細胞 (C E F) もまた、使用され得る。しかし、トリ細胞を使用するよりむしろ、哺乳動物細胞の使用は、ワクチンが、トリ DNA および卵タンパク質 (例 えば、オボアルブミンおよびオボムコイド) を含まない可能性があり、それによって、アレルギー性を低下させることを意味する。

10

【 0 0 4 1 】

インフルエンザウイルスを増殖させるための最も好ましい細胞株は、M a d i n D a r b y イヌ腎臓に由来する M D C K 細胞株 [6 0 ~ 6 3] である。元の M D C K 細胞株は、C C L - 3 4 として A T C C から入手可能であるが、この細胞株の派生物もまた、使用され得る。例 えば、参 考 文 献 6 0 は、懸濁培養における増殖に適合させた M D C K 細胞株 (「 M D C K 3 3 0 1 6 」、D S M A C C 2 2 1 9 として寄託) を開示する。同様に、参 考 文 献 6 4 は、無血清培養において懸濁物中で増殖する M D C K 由来細胞株 (「 B - 7 0 2 」、F E R M B P - 7 4 4 9 として寄託) を開示する。参 考 文 献 6 5 は、非腫瘍形成性 M D C K 細胞 (「 M D C K - S 」 (A T C C P T A - 6 5 0 0)、 「 M D C K - S F 1 0 1 」 (A T C C P T A - 6 5 0 1)、 「 M D C K - S F 1 0 2 」 (A T C C P T A - 6 5 0 2) および 「 M D C K - S F 1 0 3 」 (P T A - 6 5 0 3) が挙げられる) を開示する。参 考 文 献 6 6 は、非常に感染しやすい M D C K 細胞株 (「 M D C K . 5 F 1 」 細胞 (A T C C C R L - 1 2 0 4 2) が挙げられる) を開示する。これら M D C K 細胞株のいずれも使用され得る。

20

【 0 0 4 2 】

ウイルスは、付着培養においてもしくは懸濁物中で、細胞で増殖させられ得る。マイクロキャリア培養もまた、使用され得る。いくつかの実施形態において、上記細胞は、従って、懸濁物中での増殖のために適合され得る。

30

【 0 0 4 3 】

細胞株は、好ましくは、無血清培養培地 / もしくは無タンパク質培地中で増殖させられる。培地は、ヒトもしくは動物が起源の血清に由来する添加物がない本発明の状況において、無血清培地といわれる。このような培養物において増殖している細胞は、天然には、それら自体のタンパク質を含むが、無タンパク質培地は、上記細胞の増殖がタンパク質、増殖因子、他のタンパク質添加物および非血清タンパク質を排除して起こるが、ウイルス増殖に必要であり得るトリプシンもしくは他のプロテアーゼのようなタンパク質を必要に応じて含み得るものを意味することが理解される。

【 0 0 4 4 】

インフルエンザウイルス複製を支援する細胞株は、好ましくは、ウイルス複製の間に、3 7 未満で [6 7] (例 えば、3 0 ~ 3 6、または約 3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6 において) 増殖させられる。

40

【 0 0 4 5 】

培養した細胞中でインフルエンザウイルスを増殖させるための方法は、一般に、細胞の培養物に、増殖する予定の株の接種物を接種する工程、上記感染細胞を、例えば、ウイルス力価もしくは抗原発現によって決定される場合、ウイルス増殖のための所望の期間にわたって (例 えば、接種後 2 4 ~ 1 6 8 時間の間) 培養する工程、および上記増殖したウイルスを集める工程を包含する。上記培養した細胞には、1 : 5 0 0 ~ 1 : 1、好ましくは、1 : 1 0 0 ~ 1 : 5、より好ましくは、1 : 5 0 ~ 1 : 1 0 のウイルス (P F U もしく

50

はTCID₅₀によって測定) 対細胞比で接種される。上記ウイルスは、上記細胞の懸濁物に添加されるかまたは上記細胞の単層に適用され、上記ウイルスは、少なくとも60分間、しかし通常は、300分間未満、好ましくは、90~240分間の間にわたって、25~40、好ましくは、28~37において、上記細胞に吸収される。上記感染した細胞培養物(例えば、単層)は、凍結融解もしくは酵素作用のいずれかによって除去されて、採取した培養上清のウイルス内容物を増大させ得る。上記採取した流体は、次いで、不活化されるか、または凍結して保存されるかのいずれかである。培養した細胞は、感染多重度(「m.o.i.」) 約0.0001~10、好ましくは、0.002~5、より好ましくは、0.001~2において感染させられ得る。なおより好ましくは、上記細胞は、m.o.i. 約0.01において感染させられる。感染した細胞は、感染後30~60時間で採取され得る。好ましくは、上記細胞は、感染後34~48時間で採取される。なおより好ましくは、上記細胞は、感染後38~40時間で採取される。プロテアーゼ(代表的には、トリプシン)は、一般には、ウイルス放出を可能にするために細胞培養の間に添加され、上記プロテアーゼは、上記培養の間の任意の適切な段階で、例えば、接種の前に、接種と同時に、もしくは接種後に、添加され得る[67]。

【0046】

好ましい実施形態において、特に、MDCk細胞では、細胞株は、マスター作業細胞バンク(master working cell bank)から40集団倍加レベル(population-doubling level)を超えて継代しない。

【0047】

上記ウイルス接種物およびウイルス培養物は、好ましくは、単純ヘルペスウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス3、SARSコロナウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、レオウイルス、ポリオーマウイルス、ビルナウイルス、サーコウイルス、および/もしくはパルボウイルスを含まない(すなわち、これらウイルスに関して試験されて、これらウイルスによる汚染の陰性結果が与えられる)[68]。単純ヘルペスウイルスの非存在は、特に好ましい。

【0048】

ウイルスが細胞株上で増殖させられた場合、最終ワクチン中に残っている細胞株DNAのあらゆる腫瘍形成活性を最小限にするために、上記DNAの量を最小限にすることは、標準的な実務である。

【0049】

従って、本発明に従って調製されるワクチン組成物は、好ましくは、1用量あたり10ng(好ましくは、1ng未満、より好ましくは、100pg未満)の残留宿主細胞DNAを含むが、微量の宿主細胞DNAが存在し得る。

【0050】

0.25ml容積あたり<10ng(例えば、<1ng、<100pg)の宿主細胞DNAを含むワクチンと同様に、15μgのヘマグルチニンあたり<10ng(例えば、<1ng、<100pg)の宿主細胞DNAを含むワクチンが好ましい。0.5ml容積あたり<10ng(例えば、<1ng、<100pg)の宿主細胞DNAを含むワクチンと同様に、50μgのヘマグルチニンあたり<10ng(例えば、<1ng、<100pg)の宿主細胞DNAを含むワクチンは、より好ましい。

【0051】

任意の残留宿主細胞DNAの平均長が500bp未満(例えば、400bp未満、300bp未満、200bp未満、100bp未満など)であることは、好ましい。

【0052】

混入したDNAは、標準的精製手順(例えば、クロマトグラフィーなど)を使用するワクチン調製の間に除去され得る。残留宿主細胞DNAの除去は、ヌクレアーゼ処理によって(例えば、DNaseを使用することによって)増強され得る。宿主細胞DNAの混入を減らすための便利な方法は、2工程処理(第1は、DNase(例えば、Benzonase)(これは、ウイルス増殖の間に使用され得る)を、次いで、カチオン性洗剤(例

10

20

30

40

50

えば、CTAB) (これは、ピリオン破壊の間に使用され得る) を使用する) を含む参考文献 69 および 70 において開示される。 - プロピオラクトン処理による除去はまた、使用され得る。

【0053】

残留する宿主細胞 DNA の測定は、今や、生物製剤に関する慣用的な規制上の要件であり、当業者の通常的能力範囲内である。DNA を測定するために使用されるアッセイは、代表的には、検証されたアッセイである [71, 72]。検証されたアッセイの性能特徴は、数学的および定量的用語において記載され得。その考えられる誤差要因は、同定される。上記アッセイは、一般に、正確性、精度、特異性のような特性について試験されるものである。アッセイが一旦較正され (例えば、宿主細胞 DNA の既知の標準的量に対して)、試験されると、定量的 DNA 測定が慣行的に行われ得る。DNA 定量の 3 つの主な技術が使用され得る: ハイブリダイゼーション法 (例えば、サザンブロットもしくはスロットブロット [73]); イムノアッセイ法 (例えば、ThresholdTM System [74]); および定量的 PCR [75]。これら方法は、全て当業者が精通しているものであるが、各方法の正確な特性は、問題の宿主細胞に依存し得る (例えば、ハイブリダイゼーションのためのプローブの選択、増幅のためのプライマーおよび/もしくはプローブの選択など)。Molecular Devices からの ThresholdTM システムは、全 DNA のピコグラムレベルの定量的アッセイであり、生物薬剤の汚染 DNA のレベルをモニターするために使用されてきた [74]。代表的アッセイは、ピオチン化 ssDNA 結合タンパク質と、ウレアーゼ結合体化抗 ssDNA 抗体、DNA の間の反応複合体の非配列特異的形成を伴う。全てのアッセイ成分は、製造業者から入手可能な完全な Total DNA Assay Kit に含まれる。種々の商業的製造業者は、残留宿主細胞 DNA を検出するために定量的 PCR アッセイを提供する (例えば、AppTecTM Laboratory Services、BioRelianceTM、Althea Technologies など)。ヒトウイルスワクチンの宿主細胞 DNA 汚染を測定するための化学発光ハイブリダイゼーションアッセイおよび全 DNA ThresholdTM system の比較は、参考文献 76 において見いだされ得る。

【0054】

(アジュバント)

本発明の組成物は、アジュバントを含む。これは、上記組成物を受ける患者において誘発される免疫応答 (液性および/もしくは細胞性) を高めるように機能し得る。本発明で使用するためのワクチンアジュバントは、水中油型エマルジョンを含む。

【0055】

水中油型エマルジョンは、ウイルスワクチンのアジュバント添加に使用するのに特に適していることが見出されている。種々のこのようなエマルジョンは公知であり、それらは、代表的には、少なくとも 1 種の油および少なくとも 1 種の界面活性剤を含み、上記油および界面活性剤は、生分解性 (代謝可能) かつ生体適合性である。上記エマルジョン中の油滴は、一般に、直径 5 μm 未満であり、エマルジョン中の油滴の大半は、理想的には、サブミクロンの直径を有し (例えば、油滴のうち、数の上で少なくとも 90% は、サブミクロンの直径を有する)、これら小さなサイズは、マイクロフルイダイザー (microfluidiser) で達成されて、安定なエマルジョンを提供する。220 nm 未満のサイズを有する液滴は、濾過滅菌に供され得るので、好ましい。

【0056】

前記エマルジョンは、動物 (例えば魚類) 供給源または植物供給源からのものなどの油を含むことができる。植物油の供給源としては、堅果、種子および穀類が挙げられる。ラッカセイ油、ダイズ油、ヤシ油およびオリーブ油が、最も一般的に利用できる堅果油の例である。例えばホホバ豆から得られる、ホホバ油を使用することができる。種子油としては、紅花油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ種子油およびこれらに類するものが挙げられる。穀類の群の中で、トウモロコシ油が最も容易に入手できるが、他の穀物粒 (cereal grain)、例えばコムギ、オートムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギお

よびこれらに類するものの油も使用することができる。グリセロールおよび1, 2-プロパンジオールの6~10炭素脂肪酸エステルは、種子油中に天然に存在しないが、堅果油および種子油から出発して適切な材料の加水分解、分離およびエステル化によって調製することができる。哺乳動物の乳からの脂肪および油は代謝性であり、従って、本発明の実施の際に使用することができる。動物供給源から純粋な油を得るために必要な分離、精製、鹸化および他の手段についての手順は、当該技術分野において周知である。殆どの魚類は、容易に回収できる代謝性の油を含有する。例えば、タラ肝油、サメ肝油、および鯨油、例えば鯨ろうが、ここで使用することができる魚油のいくつかの例である。多数の分岐鎖油が5炭素イソブレン単位で生化学的に合成されており、一般にテルペノイドと呼ばれる。サメ肝油は、スクアレン、2, 6, 10, 15, 19, 23-ヘキサメチル-2, 6, 10, 14, 18, 22-テトラコサヘキサン、として公知の、分岐した不飽和テルペノイドを含有し、これは、ここで特に好ましい(例えば、1用量あたり、< 11mgで使用される)。スクワラン、スクアレンの飽和類似体、も好ましい油である。スクアレンおよびスクワランを含む、魚油は、商業的供給源から容易に入手することができ、または当該技術分野において公知の方法によって得ることができる。他の好ましい油は、トコフェロール類(下記参照)である。油の混合物を使用することができる。

【0057】

界面活性剤をそれらの「HLB」(親水親油バランス)によって分類することができる。本発明の好ましい界面活性剤は、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、およびさらに好ましくは少なくとも16のHLBを有する。本発明は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(一般にTweenと呼ばれる)、特にポリソルベート20およびポリソルベート80;商品名DOWFAXTMで販売されている、エチレンオキシド(EO)、プロピレンオキシド(PO)および/またはブチレンオキシド(BO)のコポリマー、例えば、線状EO/POブロックコポリマー;反復するエトキシ(オキシ-1, 2-エタンジール)基の数が様々であり得るオクトキシノール、オクトキシノール-9(Triton X-100、すなわちt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)が特に興味深い;(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール(IGEPAL CA-630/NP-40);リン脂質、例えばホスファチジルコリン(レシチン);ノニルフェノールエトキシレート、例えばTergitolTMNPシリーズ;ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールから誘導されたポリオキシエチレン脂肪エーテル(Brij界面活性剤として公知)、例えばトリエチレングリコールモノラウリルエーテル(Brij 30);ならびにソルビタンエステル(一般にSPANとして公知)、例えばソルビタントリオレート(Span 85)およびソルビタンモノラウレートを含有(しかしこれらに限定されない)界面活性剤と共に用いることができる。非イオン性界面活性剤が好ましい。前記エマルジョンに含めるために好ましい界面活性剤は、Tween 80(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートまたはポリソルベート80)、Span 85(ソルビタントリオレート)、レシチンおよびTriton X-100である。

【0058】

界面活性剤の混合物、例えばTween 80/Span 85混合物、を使用することができる。ポリオキシエチレンソルビタンエステル、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(ポリソルベート80)、およびオクトキシノール、例えばt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール(Triton X-100)、の組み合わせも適する。別の有用な組み合わせは、ラウレス9とポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールを含む。

【0059】

界面活性剤の好ましい量(重量%)は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル(例えば、ポリソルベート80)0.01%から1%、特に約0.1%;オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール(例えば、Triton X-100、またはTritonシリーズの他の洗剤)0.001%から0.1%、特に0.005%から0.02

10

20

30

40

50

% ; ポリオキシエチレンエーテル (例えば、ラウレス 9) 0 . 1 % から 2 0 % 、 好ましくは 0 . 1 % から 1 0 % および特に 0 . 1 % から 1 % または約 0 . 5 % である。

【 0 0 6 0 】

好ましいエマルジョンアジュバントは、 $< 1 \mu\text{m}$ の平均液滴サイズ (例えば、750 nm、500 nm、400 nm、300 nm、250 nm、220 nm、200 nm、もしくはこれより小さい) を有し得る。これら液滴サイズは、便利なことには、微小流動化 (microfluidisation) のような技術によって達成され得る。

【 0 0 6 1 】

本発明で有用な特定の水中油型エマルジョンアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 2 】

・スクアレン、ポリソルベート 8 0、およびソルビタントリオレートのサブミクロンエマルジョン。これら 3 つの成分は、容積比 1 0 : 1 : 1 または重量比 3 9 : 4 7 : 4 7 で存在し得る。上記エマルジョンの容積での組成は、約 5 % スクアレン、約 0 . 5 % ポリソルベート 8 0 および約 0 . 5 % ソルビタントリオレートであり得る。重量では、これらの比は、4 . 3 % スクアレン、0 . 5 % ポリソルベート 8 0 および 0 . 4 8 % ソルビタントリオレートになる。このアジュバントは、引用文献 8 0 の第 1 0 章および引用文献 8 1 の第 1 2 章により詳細に記載されるように、「MF 5 9」として公知である [7 7 ~ 7 9]。上記 MF 5 9 エマルジョンは、有利なことには、クエン酸イオン (例えば、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液) を含む。

【 0 0 6 3 】

・スクアレン、トコフェロール、およびポリソルベート 8 0 のエマルジョン。このエマルジョンは、リン酸緩衝化食塩水を含み得る。これは、Span 8 5 (例えば、1 %) および/またはレシチンも含み得る。これらエマルジョンは、2 ~ 1 0 % スクアレン、2 ~ 1 0 % トコフェロールおよび 0 . 3 ~ 3 % ポリソルベート 8 0 を有し得、スクアレン : トコフェロールの重量比は、これがより安定なエマルジョンを提供するように、好ましくは、1 である。スクアレンおよびポリソルベート 8 0 は、約 5 : 2 の容積比もしくは約 1 1 : 5 の重量比において存在し得る。従って、上記 3 種の成分 (スクアレン、トコフェロール、ポリソルベート 8 0) は、1 0 6 8 : 1 1 8 6 : 4 8 5、もしくは約 5 5 : 6 1 : 2 5 の重量比において存在し得る。1 種のこのようなエマルジョン (「AS 0 3」) は、Tween 8 0 を PBS 中に溶解して、2 % 溶液を与え、次いで、この溶液の 9 0 ml と、(5 g の DL トコフェロールおよび 5 ml スクアレン) の混合物とを混合し、次いで、この混合物を微小流動化することによって、作製され得る。得られたエマルジョンは、例えば、1 0 0 ~ 2 5 0 nm の間、好ましくは、約 1 8 0 nm の平均直径を有するサブミクロン油滴を有し得る。上記エマルジョンはまた、3 - de - O - アシル化ものホスホリルリピド A (3 d - MPL) を含み得る。このタイプの別の有用なエマルジョンは、例えば、上記で考察した比において、ヒト用量あたり、0 . 5 ~ 1 0 mg スクアレン、0 . 5 ~ 1 1 mg トコフェロール、および 0 . 1 ~ 4 mg ポリソルベート 8 0 を含み得る [8 2]。

【 0 0 6 4 】

・スクアレン、トコフェロール、および Triton 洗剤 (例えば、Triton X - 1 0 0) のエマルジョン。上記エマルジョンはまた、3 d - MPL (下記を参照のこと) を含み得る。上記エマルジョンは、リン酸緩衝液を含み得る。

【 0 0 6 5 】

・ポリソルベート (例えば、ポリソルベート 8 0)、Triton 洗剤 (例えば、Triton X - 1 0 0) およびトコフェロール (例えば、トコフェロールスクシネート) を含むエマルジョン。上記エマルジョンは、約 7 5 : 1 1 : 1 0 (例えば、7 5 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリソルベート 8 0、1 1 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Triton X - 1 0 0 および 1 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トコフェロールスクシネート) の質量比でこれら 3 種の成分を含み

10

20

30

40

50

得、これら濃度は、抗原由来のこれら成分の何らかの寄与を含むはずである。上記エマルジョンはまた、スクアレンを含み得る。上記エマルジョンはまた、3d-MPL（下記を参照のこと）を含み得る。その水相は、リン酸緩衝液を含み得る。

【0066】

・スクアラン、ポリソルベート80およびポロキサマー401（「PluronicTM L121」）のエマルジョン。上記エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）中に処方され得る。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドの有用な送達ビヒクルであり、「SAF-1」アジュバント中でトレオニル-MDPとともに使用されてきた[83]（0.05~1% Thr-MDP、5% スクアラン、2.5% Pluronic L121および0.2% ポリソルベート80）。このエマルジョンはまた、「AF」アジュバントでのように[84]（5% スクアラン、1.25% Pluronic L121および0.2% ポリソルベート80）、上記Thr-MDPなしでも使用され得る。微小流動化が好ましい。

10

【0067】

・スクアレン、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテル親水性非イオン性界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレン（12）セトステアリルエーテル）および疎水性非イオン性界面活性剤（例えば、ソルビタンエステルもしくはマンニドエステル（mannide ester）（例えば、ソルビタンモノオレート（monooleate）もしくは「Span 80」））を含むエマルジョン。上記エマルジョンは、好ましくは、熱可逆性であり、そして/または上記油滴のうちの少なくとも90%（容積で）が、200nm未満のサイズを有する[85]。上記エマルジョンはまた、アルジトール；凍結保護剤（cryoprotective agent）（例えば、糖（例えば、ドデシルマルトシドおよび/もしくはスクロース））；および/またはアルキルポリグリコシドのうちの1種以上を含み得る。上記エマルジョンは、TLR4アゴニストを含み得る[86]。このようなエマルジョンは、凍結乾燥され得る。

20

【0068】

・スクアレン、ポロキサマー105およびAbil-Careのエマルジョン[87]。アジュバント添加ワクチン中のこれら成分の最終濃度（重量）は、5% スクアレン、4% ポロキサマー105（プルロニックポリオール）および2% Abil-Care 85（ビス-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16ジメチコン；カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド（caprylic/capric triglyceride））である。

30

【0069】

・0.5~50%の油、0.1~10%のリン脂質、および0.05~5%の非イオン性界面活性剤を有するエマルジョン。参考文献88に記載されるように、好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロン液滴サイズが有利である。

【0070】

・非代謝性の油（例えば、軽油（light mineral oil））および少なくとも1種の界面活性剤（例えば、レシチン、Tween 80もしくはSpan 80）のサブミクロン水中油型エマルジョン。添加剤が含まれ得る（例えば、QuilAサポニン、コレステロール、サポニン-親油性結合体（例えば、参考文献89に記載され、グルクロン酸のカルボキシル基を介して、脂肪族アミンを、デスアシルサポニン（desacylsaponin）に添加することにより生成されるGPI-0100）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（dimethyldioctadecyl ammonium bromide）および/もしくはN,N-ジオクタデシル-N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）プロパンジアミン）。

40

【0071】

50

・サポニン（例えば、Q u i l A もしくは Q S 2 1）およびステロール（例えば、コレステロール）が螺旋状ミセルとして会合されるエマルジョン [9 0]。

【 0 0 7 2 】

・鉱油、非イオン性親油性エトキシ化脂肪アルコール、および非イオン性親水性界面活性剤（例えば、エトキシ化脂肪アルコールおよび / もしくはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）を含むエマルジョン [9 1]。

【 0 0 7 3 】

・鉱油、非イオン性親水性エトキシ化脂肪アルコール、および非イオン性親油性界面活性剤（例えば、エトキシ化脂肪アルコールおよび / もしくはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）を含むエマルジョン [9 1]。

10

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、エマルジョンは、送達時に抗原と即座に混合され得、従って、上記アジュバントおよび抗原は、パッケージされたもしくは配布されたワクチン（使用時に最終的な処方物の準備ができてい）では別個に保持され得る。他の実施形態において、エマルジョンは、製造の間に抗原と混合され、従って、上記組成物は、F L U A D ^{T M} 製品のように液体アジュバント添加形態でパッケージされる。上記抗原は、一般に、水性形態にあり、その結果、上記ワクチンは、2種の液体を混合することによって最終的に調製される。混合するための上記2種の液体の容積比は、変動し得る（例えば、5 : 1 ~ 1 : 5の間）が、一般に、約1 : 1である。成分濃度が、上記の特定のエマルジョンの説明において与えられる場合、これら濃度は、代表的には、非希釈組成物に関するものであり、したがって抗原溶液と混合した後の濃度は低下する。

20

【 0 0 7 5 】

上記抗原およびアジュバントが混合された後、ヘマグルチニン抗原は、一般に、水性溶液中に残っているが、それ自体を上記油 / 水界面の周りに分布し得る。一般に、あるとしても、わずかなヘマグルチニンしか、上記エマルジョンの油相に入らない。

【 0 0 7 6 】

組成物がトコフェロールを含む場合、
、
、
、
、
もしくはxトコフェロールのうちいずれかが使用され得るが、
- トコフェロールが好ましい。上記トコフェロールは、いくつかの形態（例えば、種々の塩および / もしくは異性体）をとり得る。塩としては、有機塩（例えば、スクシネート、アセテート、ニコチネートなど）が挙げられる。D
-
- トコフェロールおよび D L -
- トコフェロールがともに使用され得る。トコフェロールは、有利なことには、年配の患者（例えば、60歳以上）における使用のためのワクチンに含まれる。なぜならビタミンEは、この患者群における免疫応答に対して正の効果をも有すると報告されたからである [9 2]。それらはまた、上記エマルジョンを安定化する一助となり得る抗酸化特性を有する [9 3]。好ましい
- トコフェロールは、D L
-
- トコフェロールであり、このトコフェロールの好ましい塩は、スクシネートである。上記スクシネート塩は、TNF関連リガンドとインビボで協働することが見いだされた。さらに、
- トコフェロールスクシネートは、インフルエンザワクチンと適合性であり、水銀化合物の代替として有用な保存剤であることが公知である [2 8]。

30

【 0 0 7 7 】

40

（小児）

本発明は、インフルエンザウイルス感染およびもしくは疾患に対して小児を免疫化するために使用される。

【 0 0 7 8 】

上記小児は、0ヶ月齢 ~ 72ヶ月齢の間、理想的には、0ヶ月齢 ~ 36ヶ月齢の間であり得る。従って、上記小児は、彼らの3歳もしくは6歳の誕生日より前に免疫化され得る。

【 0 0 7 9 】

代表的には、上記小児は、少なくとも6ヶ月齢、例えば、6 ~ 72ヶ月齢の範囲（両端を含む）もしくは6 ~ 36ヶ月齢の範囲（両端を含む）、または36 ~ 72ヶ月齢の範囲

50

(両端を含む)である。これらの年齢範囲の小児は、いくつかの実施形態において、30ヶ月齢未満、もしくは24ヶ月齢未満であり得る。例えば、組成物は、彼らに、6ヶ月齢、7ヶ月齢、8ヶ月齢、9ヶ月齢、10ヶ月齢、11ヶ月齢、12ヶ月齢、13ヶ月齢、14ヶ月齢、15ヶ月齢、16ヶ月齢、17ヶ月齢、18ヶ月齢、19ヶ月齢、20ヶ月齢、21ヶ月齢、22ヶ月齢、23ヶ月齢、24ヶ月齢、25ヶ月齢、26ヶ月齢、27ヶ月齢、28ヶ月齢、29ヶ月齢、30ヶ月齢、31ヶ月齢、32ヶ月齢、33ヶ月齢、34ヶ月齢、もしくは35ヶ月齢において；または37ヶ月齢、38ヶ月齢、39ヶ月齢、40ヶ月齢、41ヶ月齢、42ヶ月齢、43ヶ月齢、44ヶ月齢、45ヶ月齢、46ヶ月齢、47ヶ月齢、48ヶ月齢、49ヶ月齢、50ヶ月齢、51ヶ月齢、52ヶ月齢、53ヶ月齢、54ヶ月齢、55ヶ月齢、56ヶ月齢、57ヶ月齢、58ヶ月齢、59ヶ月齢、60ヶ月齢、61ヶ月齢、62ヶ月齢、63ヶ月齢、64ヶ月齢、65ヶ月齢、66ヶ月齢、67ヶ月齢、68ヶ月齢、69ヶ月齢、70ヶ月齢もしくは71ヶ月齢；または36ヶ月齢もしくは72ヶ月齢において投与され得る。

10

20

30

40

50

【0080】

小児がインフルエンザBウイルス抗原で予備免疫化されている場合、彼らは、免疫系がアジュバント添加された予備免疫抗原に対する免疫応答を既に開始した一般的集団のサブセットのメンバーであるので、一般に患者とは異なり、その結果、本発明に従う再免疫化は、上記アジュバント添加された予備免疫抗原に対する免疫応答を予め開始しなかった患者におけるものとは、上記サブセットにおいて異なる免疫応答を誘発する。彼らの免疫応答はまた、アジュバント添加されていない形態にある予備免疫抗原に対する免疫応答を予め開始している患者において認められるものとは異なっている。上記予備免疫化した小児は、一次免疫応答ではなく、上記投与したインフルエンザBウイルス抗原に対する追加免疫応答を開始する。

【0081】

(薬学的組成物)

本発明の組成物は、薬学的に受容可能である。それらは、上記抗原およびアジュバントに加えて、複数の成分を含み得、例えば、それらは、代表的には、1種以上の薬学的キャリアおよび/もしくは賦形剤を含む。このような成分の詳細な考察は、参考文献94において利用可能である。

【0082】

上記組成物は、チメロサルもしくは2-フェノキシエタノールのような保存剤を含み得る。しかし、上記ワクチンが水銀物質を実質的に含むべきでない(すなわち、5 μ g/ml未満)(例えば、チメロサルを含まない)ことは、好ましい[28、95]。水銀を含まないワクチンはより好ましく、トコフェロールスクシネートは、水銀化合物の代替として含まれ得る[28]。保存剤を含まないワクチンは、最も好ましい。

【0083】

張度をコントロールするために、生理学的な塩(例えば、ナトリウム塩)を含むことは、好ましい。塩化ナトリウム(NaCl)が好ましく、これは、1~20mg/mlの間において存在し得る。存在し得る他の塩としては、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム無水物(dipotassium phosphate dehydrate)、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどが挙げられる。

【0084】

組成物は、一般に、200mOsm/kg~400mOsm/kgの間、好ましくは、240~360mOsm/kgの間の質量オスモル濃度を有し、より好ましくは、290~310mOsm/kgの範囲内に入る。質量オスモル濃度は、ワクチン接種によって引き起こされる疼痛に対して影響を有しないと以前に報告された[96]が、にもかかわらず、この範囲に質量オスモル濃度を維持することは好ましい。

【0085】

組成物は、1種以上の緩衝液を含み得る。代表的な緩衝液としては、以下が挙げられる：リン酸緩衝液；Tris緩衝液；ホウ酸緩衝液；コハク酸緩衝液；ヒスチジン緩衝液(

特に、水酸化アルミニウムアジュバントとともに) ; もしくはクエン酸緩衝液。緩衝液は、代表的には、5 ~ 20 mM 範囲の中で含まれる。

【0086】

組成物のpHは、一般には、5.0 ~ 8.1の間、より代表的には、6.0 ~ 8.0の間、例えば、6.5 ~ 7.5の間、もしくは7.0 ~ 7.8の間である。本発明の製造プロセスは、従って、パッケージングする前に、バルクワクチンのpHを調節する工程を包含し得る。

【0087】

上記組成物は、好ましくは無菌である。上記組成物は、好ましくは、発熱物質を含まない(例えば、1用量あたり < 1 EU (エンドトキシユニット、標準尺度) を含み、好ましくは、1用量あたり < 0.1 EU を含む)。上記組成物は、好ましくは、グルテンを含まない。

10

【0088】

本発明の組成物は、洗剤(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(「Tween」として公知)、オクトキシノール(例えば、オクトキシノール-9 (Triton X-100) もしくはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(「CTAB」)、またはデオキシコール酸ナトリウム(特に、スプリット抗原ワクチンもしくは表面抗原ワクチンに関して)を含み得る。上記洗剤は、微量でのみ存在し得る。従って、上記ワクチンは、オクトキシノール-10およびポリソルベート80の各々の1mg/ml未満を含み得る。微量の他の残りの成分は、抗生物質(例えば、ネオマイシン、カナマイシン、ポリミキシンB)であり得る。

20

【0089】

上記組成物は、単回免疫化のための材料を含んでいてもよいし、複数回の免疫化のための材料を含んでいてもよい(すなわち、「複数用量」キット)。保存剤を含めることは、複数用量の構成(arrangement)において好ましい。複数用量組成物において保存剤を含める代替として(もしくはこれに加えて)、上記組成物は、材料を取り出すための無菌アダプタを有する容器中に含まれ得る。

【0090】

インフルエンザワクチンは、代表的には、約0.5mlの投与容積(単位用量)において投与されるが、半分の用量(すなわち、約0.25ml)は、本発明に従って小児に投与されてもよい。

30

【0091】

組成物およびキットは、好ましくは、2 ~ 8の間で貯蔵される。それらは、凍結されるべきではない。それらは、理想的には、遮光して保持されるべきである。

【0092】

組成物中の抗原およびエマルジョンは、代表的には、混合した状態にあるが、それらは、最初に、即座の混合のために別々の成分のキットの形態で提示されてもよい。組成物は、一般には、被験体へ投与される場合に水性形態にある。

【0093】

(本発明のキット)

40

本発明の組成物は、送達の際に、即座に調製され得る。従って、本発明は、混合する準備ができている種々の成分を含むキットを提供する。上記キットは、上記アジュバントおよび上記抗原が使用時まで別個に保持されることを可能にする。

【0094】

上記成分は、上記キット内で互いから物理的に分離して存在し、この分離は、種々の方法で達成され得る。例えば、2つの成分は、2つの別個の容器(例えば、バイアル)中に存在し得る。次いで、上記2つのバイアルの内容物は、例えば、一方のバイアルの内容物を取り出してこれを他方のバイアルに添加することによって、または両方のバイアルの内容物を別個に取り出してこれらを第3の容器中で混合することによって、混合され得る。

【0095】

50

好ましい構成において、上記キット成分のうち的一方は、シリンジ中に存在し、他方は、バイアルのような容器中に存在する。上記シリンジは、その内容物を混合するための第2の容器へと挿入するために（例えば、針とともに）使用され得、次いで、上記混合物は、上記シリンジの中へと引き抜かれ得る。次いで、上記シリンジの混合された内容物は、患者へと、代表的には、新しい滅菌針を介して投与され得る。シリンジの中に1つの成分をパックすることは、患者へ投与するための別個のシリンジを使用する必要性を排除する。

【0096】

別の好ましい構成において、上記2つのキット成分は、一緒に保持されるが、同じシリンジ、例えば、二重チャンバシリンジ（例えば、参考文献97～104などで開示されるもの）中で別個に、保持される。上記シリンジが作動されると（例えば、患者への投与の間に）、上記2つのチャンバの内容物が混合される。この構成は、使用時に別途混合する工程の必要性を回避する。

10

【0097】

上記キット成分は、一般には、水性形態にある。いくつかの構成において、成分（代表的には、アジュバント成分ではなく抗原成分）が、乾燥形態に（例えば、凍結乾燥された形態に）あり、他方の成分は、水性形態にある。上記2つの成分は、上記乾燥成分を再活性化して患者への投与のための水性組成物を与えるために、混合され得る。凍結乾燥された成分は、代表的には、シリンジではなく、バイアル内に位置づけられる。乾燥された成分は、安定化剤（例えば、ラクトース、スクロースもしくはマンニトール）、ならびにこれらの混合物（例えば、ラクトース/スクロース混合物、スクロース/マンニトール混合物など）を含み得る。1つの考えられる構成は、予め充填されたシリンジ中の水性アジュバント成分およびバイアル中の凍結乾燥された抗原成分を使用する。

20

【0098】

（組成物またはキット成分のパッケージング）

本発明の組成物（もしくはキット成分）に適した容器としては、バイアル、シリンジ（例えば、使い捨てシリンジ）、鼻スプレー（nasal spray）などが挙げられる。これら容器は、滅菌であるべきである。

【0099】

組成物/成分がバイアル中に配置される場合、上記バイアルは、好ましくは、ガラス材料もしくはプラスチック材料から作製され得る。上記バイアルは、好ましくは、上記組成物が上記バイアルに添加される前に、滅菌される。ラテックス感受性患者に伴う問題を回避するために、バイアルは、好ましくは、ラテックス非含有ストッパーでシールされ、全てのパッケージング材料中にラテックスが存在しないことが好ましい。上記バイアルは、ワクチンの単一用量を含んでいてもよいし、1用量より多い用量（「複数用量」バイアル）、例えば、10用量を含んでいてもよい。好ましいバイアルは、無色ガラスから作製される。

30

【0100】

バイアルは、あらかじめ充填されたシリンジがキャップに挿入され得るように適合されたキャップ（例えば、ルアーロック）を有し得、上記シリンジの内容物は、上記バイアルへと排出され得（例えば、その中の凍結乾燥された材料を再構成するために）、上記バイアルの内容物は、取り出されて上記シリンジへと戻され得る。上記バイアルから上記シリンジを取り出した後、次いで、ニードルが取り付けられ得、上記組成物が、患者へと投与され得る。上記キャップは、好ましくは、シールもしくはカバーの内部に配置され得る。その結果、上記シールもしくはカバーは、上記キャップに到達し得る前に除去されなければならない。バイアルは、特に、複数用量バイアルについては、その内容物の無菌的取り出しを可能にするキャップを有し得る。

40

【0101】

成分がシリンジにパッケージされる場合、上記シリンジは、これに取り付けられるニードルを有し得る。ニードルが取り付けられていない場合、別個のニードルが、組み立てお

50

よび使用のために、上記シリンジと共に供給され得る。このようなニードルは、鞘に入れられ得る。安全ニードル (s a f e t y n e e d l e) が好ましい。1 インチ 23 ゲージ、1 インチ 25 ゲージおよび 5 / 8 インチ 25 ゲージのニードルが代表的である。シリンジは、記録保持を容易にするために、ロット番号、インフルエンザシーズン、および内容物の使用期限がプリントされ得る剥離式ラベルとともに提供され得る。上記シリンジにおけるプランジャーは、好ましくは、上記プランジャーが吸引の間に偶発的に除去されてしまわないように、ストッパーを有し得る。上記シリンジは、ラテックスゴムキャップおよび/もしくはプランジャーを有し得る。使い捨てシリンジは、単一用量のワクチンを含む。上記シリンジは、一般に、ニードルの取り付け前に、先端をシールするために先端キャップを有し、上記先端キャップは、好ましくは、ブチルゴムから作製され得る。上記シリンジおよびニードルが別個にパッケージされる場合、上記ニードルは、好ましくは、ブチルゴムシールドに合され得る。有用なシリンジは、商品名「T i p - L o k」^{T M} の下で市販されるものである。

10

【0102】

容器は、例えば、小児への送達を容易にするために、半用量容積を示すために印が付けられ得る。例えば、0.5 ml 用量を含むシリンジは、0.25 ml 容積を示す印を有し得る。

【0103】

ガラス容器 (例えば、シリンジもしくはバイアル) が使用される場合、ソーダ石灰ガラスよりむしろホウケイ酸ガラスから作製された容器を使用することが好ましい。

20

【0104】

キットもしくは組成物は、(例えば、同じボックスの中に) 上記ワクチンの詳細 (例えば、投与の説明書、上記ワクチン内の抗原の詳細など) を含むリーフレットとともにパッケージされ得る。上記説明書はまた、警告 (例えば、ワクチン接種後のアナフィラキシー反応の場合に容易に利用可能なアドレナリン溶液を保持することなど) を含み得る。

【0105】

(処置方法、および上記ワクチンの投与)

本発明の組成物は、ヒト患者への投与に適しており、本発明は、患者に本発明の組成物を投与する工程を包含する、この患者における免疫応答を惹起する方法を提供する。上記されるように、この患者は、小児である。

30

【0106】

本発明はまた、医薬として使用するための本発明のキットまたは組成物を提供する。本発明はまた、上記で検討されたような医療上の使用を提供する。

【0107】

これら方法および使用は、一般に、抗体応答 (好ましくは、防御的抗体応答) を生成するために使用される。インフルエンザウイルスワクチン接種後の抗体応答、中和能力および防御を評価するための方法は、当該分野で周知である。ヒトでの研究から、ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対する抗体力価が、防御と相関する (約 30 ~ 40 の血清サンプル赤血球凝集抑制力価が、同種のウイルスによる感染から約 50 % 防御を与える) ことが示された [105]。抗体応答は、代表的には、赤血球凝集抑制 (H I) によって、マイクロ中和 (M i c r o - N T) によって、一元放射免疫拡散 (s i n g l e r a d i a l i m m u n o d i f f u s i o n) (S R I D) によって、および/もしくは単一放射溶血 (S R H) によって、測定される。これらアッセイ技術は、当該分野で周知である。

40

【0108】

本発明の組成物は、種々の方法において投与され得る。最も好ましい免疫化経路は、筋肉内注射 (例えば、腕もしくは脚への) によるが、他の利用可能な経路としては、皮下注射、鼻内 [106 ~ 108]、経口 [109]、皮内 [110、111]、経皮的 (t r a n s c u t a n e o u s)、経皮的 (t r a n s d e r m a l) [112] などが挙げられる。

50

【0109】

好ましい本発明の組成物は、各インフルエンザ株について、それらが小児に投与されたとしても、成人の効力についてC P M P基準のうちの1つ、2つもしくは3つを満たす。これら基準は、以下である：(1) 70%血清保有率(seroprotection)；(2) 40%セロコンバージョンまたは顕著な上昇；および/もしくは(3) GMT増大 2.5倍。高齢者(>60歳)において、これら基準は、以下である：(1) 60%血清保有率；(2) 30%セロコンバージョン；および/もしくは(3) GMT増大 2倍。これら基準は、少なくとも50名の患者でのオープンラベル研究に基づく。

【0110】

本発明は、種々のインフルエンザBウイルス株に対して防御する免疫応答を惹起するために特に有用である。本発明はまた、ドリフトした(ミスマッチの)インフルエンザAウイルス株(特に、ドリフトしたA/H3N2株)に対して有効であり得る。

10

【0111】

本発明の組成物での処置は、単一用量スケジュールもしくは複数用量スケジュールによるものであり得る。従って、任意の特定のインフルエンザシーズンにおいて(例えば、所定の12ヶ月間において、代表的には、秋もしくは冬において)、患者は、本発明の組成物の単一用量もしくは本発明の組成物の1より多くの用量(例えば、2用量)を受け得る。処置が、本発明の組成物の2以上の用量の投与を含む場合、各用量は、一般には、実質的に同時に与えられない。すなわち、それらは、ワクチン接種施設への同じ訪問の間に投与されない。本発明の組成物の逐次投与の間の時間は、代表的には、少なくともn日間(ここでnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、42、49、56以上から選択される)である。代表的には、2用量は、少なくとも1週間空けて(例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約12週間、約16週間など)投与される。25~30日間(例えば、28日間)だけ空けて2用量が与えられるのは、特に有用である。用量間の時間は、代表的には、6ヶ月より長くない。上記用量は、互いに約4週間空けて、例えば、0日目に、次はおよそ28日目に与えられ得る。この方法での投与の分離は、良好な免疫応答を与えることが見いだされた。

20

【0112】

本発明の組成物が一次免疫化スケジュールにおいて使用される場合、本発明の組成物での投与に続いて、1以上の追加免疫ワクチンの投与が行われる(例えば、1、2、3以上の追加免疫ワクチン)。上記追加免疫ワクチンは、本発明の組成物中のインフルエンザB抗原とは異なる株もしくは系統に由来する1種以上のインフルエンザウイルスB抗原を含む。上記追加免疫ワクチンは、アジュバント添加されていてもよいし、アジュバント添加されていなくてもよい。初回免疫(prime)と追加免疫ワクチンの投与との間の適切なタイミングは、慣用的に決定され得る。初回免疫用量の投与と追加免疫ワクチンの投与との間の時間は、代表的には、少なくともpヶ月(ここでpは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72以上から選択される)である。理想的には、pは、9以上であり、9~30の範囲内であり得る。

30

40

【0113】

本発明の組成物が追加免疫化スケジュールにおいて使用される場合、上記患者は、インフルエンザBウイルスの異なる株もしくは系統に由来するインフルエンザBウイルス抗原で、例えば、以前の季節性ワクチン接種レジメンの一部として予備免疫化されたことがある。

【0114】

50

複数用量スケジュールにおいて上記種々の用量は、同じ経路もしくは異なる経路によって与えられ得る（例えば、非経口の初回免疫および粘膜の追加免疫（boost）、粘膜の初回免疫および非経口の追加免疫など）。代表的に、複数用量は、同じ経路によって与えられる。本発明によって生成されるワクチンは、他のワクチン（例えば、麻疹ワクチン、ムンプス・ワクチン、風疹ワクチン、MMRワクチン、水痘ワクチン、MMRVワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチン、百日咳ワクチン、DTPワクチン、結合体化H. influenzaeタイプbワクチン、不活化ポリオウイルスワクチン、B型肝炎ウイルスワクチン、髄膜炎菌結合型ワクチン（例えば、四価A-C-W135-Yワクチン）、肺炎球菌結合型ワクチンなど）と実質的に同時（例えば、同じ医療相談の間に、またはヘルスケア専門家およびワクチン接種施設への訪問の間に）に患者に投与され得る。

10

【0115】

同様に、本発明のワクチンは、抗ウイルス化合物、および特に、インフルエンザウイルスに対して活性な抗ウイルス化合物（例えば、オセルタミビルおよびノモしくはザナミビル）と実質的に同時（例えば、同じ医療相談の間に、またはヘルスケア専門家への訪問の間に）に、患者に投与され得る。これら抗ウイルス剤としては、ノイラミニダーゼインヒビター（例えば、(3R, 4R, 5S) - 4 - アセチルアミノ - 5 - アミノ - 3 (1 - エチルプロポキシ) - 1 - シクロヘキセン - 1 - カルボン酸もしくは5 - (アセチルアミノ) - 4 - [(アミノイミノメチル) - アミノ] - 2, 6 - アンヒドロ - 3, 4, 5 - トリデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクトノン - 2 - エノン酸（そのエステル（例えば、そのエチルエステル）およびその塩（例えば、そのリン酸塩）を含む）が挙げられる。好ましい抗ウイルス剤は、(3R, 4R, 5S) - 4 - アセチルアミノ - 5 - アミノ - 3 (1 - エチルプロポキシ) - 1 - シクロヘキセン - 1 - カルボン酸、エチルエステル、ホスフェート（1:1）（オセルタミビルホスフェート（TAMIFLUTM）としても公知）である。

20

【0116】

（一般）

用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」および「からなる（consisting）」を含み、例えば、Xを「含む」組成物は、もっぱらXからなってもよいし、さらなる何かを含んでいてもよい（例えば、X + Y）。

30

【0117】

語「実質的に」は、「完全に」を排除しない。例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、完全にYを含まなくてもよい。必要であれば、語「実質的に」は、本発明の定義から省略され得る。

【0118】

数値xに関する用語「約」とは、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0119】

別段示されなければ、2種以上の成分を混合する工程を包含するプロセスは、いかなる具体的な混合する順序も必要としない。従って、成分は、任意の順序で混合され得る。3つの成分が存在する場合、2つの成分が、互いに合わされ得、次いで、その組み合わせが、第3の成分と合わせられ得るなど。

40

【0120】

動物（および特にウシ）の材料が、細胞培養において使用される場合、それらは、伝染性海綿状脳症（TSE）を含まない、特に、ウシ海綿状脳症（BSE）を含まない供給源から得られるべきである。全体として、動物由来材料が完全に存在しない状態で細胞を培養することが好ましい。

【0121】

化合物が、組成物の一部として身体に投与される場合、その化合物は、代替的に、適切なプロドラッグによって置換され得る。

【0122】

細胞基材がリアソータントもしくは逆遺伝学手順のために使用される場合、それは、好

50

もしくは、例えば、Ph Eur general chapter 5.2.3にあるように、ヒトワクチン製造における使用について承認されたものである。

【0123】

(発明を実施するための態様)

インフルエンザに対するワクチン接種を今まで一度も受けたことがない健康な小児(6ヶ月齢から<36ヶ月齢)に、治験に参加するように呼びかけた。被験体を無作為化して、2種の三価不活化インフルエンザワクチン:MF59.TM.でアジュバント添加されたサブユニットワクチン(FLUAD)、もしくはアジュバント添加されていないスプリットワクチン(Infli split SSW)のうち的一方を受けさせた。2用量(各0.25ml)を、利き腕でない方の三角筋部に筋肉内で与えるか、または三角筋の大きさが不十分であれば、大腿部の前外側に筋肉内で与えるかした。2回目のワクチン接種を、1回目のワクチン接種の4週間後に行った。

10

【0124】

上記ワクチンの抗原性組成物は、2008/09インフルエンザシーズンの間の北半球に関するWHO推奨に一致した。0.25mlワクチンの各用量は、3種のインフルエンザ抗原:A/Brisbane/59/2007(H1N1)様ウイルス、A/Brisbane/10/2007(H.sub.3N.sub.2)様ウイルス、B/Florida/4/2006様ウイルス各々の7.5µgを含んでいた。B/Florida/4/2006様ウイルスは、Victoria系統インフルエンザBウイルスである。

20

【0125】

初回免疫した小児に、アジュバント添加ワクチンもしくはアジュバント添加していないスプリットワクチンの追加免疫用量を約2年後に受けるように申し出た。2008/09シーズンの間に2回の筋肉内(IM)用量で初回免疫した健康な小児を再度無作為化し、それぞれのアジュバント添加(Fluad)もしくはアジュバント添加していない(Agrippal)ワクチン(2010/11北半球ワクチン処方)の3回目の筋肉内用量を、1回目の用量の約2年後に受けさせた。上記追加免疫ワクチンの抗原性組成物は、2010/11インフルエンザシーズンの間の北半球に関するWHO推奨と一致した。0.25mlワクチンの各用量は、3種のインフルエンザ抗原各々の7.5µgを含んでいた:A/California/7/2009(H1N1)様ウイルス、A/Perth/16/2009(H.sub.3N.sub.2)様ウイルス、B/Brisbane/60/2008様ウイルス。B/Brisbane/60/2008様ウイルスは、Yamagata系統インフルエンザBウイルスである。従って、2010/11シーズンに関しては、3種全てのインフルエンザ株は、追加免疫キャンペーンのワクチン処方と比較して変化していた。上記インフルエンザBウイルス抗原は、異なる系統に由来した。

30

【0126】

インフルエンザBウイルス抗原に関しては、ベースライン抗体力価(すなわち、GMT 1日目)は、アジュバント添加(FLUAD)ワクチンを受けた小児においてより高く、このことから、アジュバント添加していないワクチンでの初回免疫後よりも免疫原性の良好に持続することが確認された。

40

【0127】

上記追加免疫ワクチン接種を受けて3週間後、(アジュバント添加していない)ワクチンで初回免疫した小児には、追加免疫におけるインフルエンザBウイルス抗原(これは異なる系統に由来した)の単一投与に対して平凡な免疫応答が与えられた。上記平凡な応答は、上記追加免疫ワクチンがアジュバントを含んでいたか否かに関わらず、初回免疫していないコントロールに類似していたが、アジュバント添加された追加免疫を受けた小児は、わずかに良好に振る舞った。この結果は、免疫学的にナイーブな小児における2用量ワクチン接種レジメンに関する現在のACIP推奨を裏付ける(例えば、インフルエンザBウイルス系統における変化があった場合)。

【0128】

驚くべきことに、水中油型エマルジョンアジュバント添加ワクチンで初回免疫した小児

50

は、インフルエンザ B ウイルスの異なる系統（および株）に由来したとしても、上記追加免疫においてインフルエンザ B ウイルス抗原に対して強い免疫応答を与えた。この強い系統交叉免疫応答は、わずか 1 回の追加免疫ワクチン接種の後に達成され、上記追加免疫ワクチンがアジュバントを含むか否かに無関係であった。

【 0 1 2 9 】

従って、インフルエンザ B ウイルス抗原および水中油型エマルジョン（例えば、FLUAD のような季節性インフルエンザワクチン）を含む組成物での免疫原性初回免疫が、異なる系統に由来するインフルエンザ B ウイルス抗原に対する免疫応答を刺激する。従って、本発明に従う免疫原性組成物（例えば、FLUAD）で初回免疫した小児は、インフルエンザ B ウイルスの系統における変化があった場合に、1 回の追加免疫ワクチン接種しか必要としない可能性がある。従って、本発明は、ACIP が現在推奨している 2 回目のワクチン接種を回避する。

10

【 0 1 3 0 】

これらデータは、小児において、特に、72 ヶ月齢未満の小児において、インフルエンザ B を含む水中油型エマルジョンアジュバント添加ワクチンで初回免疫する重要性および利点を示す。水中油型エマルジョンを含むアジュバント添加インフルエンザ B ワクチンでの小児の免疫原性初回免疫は、追加免疫がアジュバントを含むか否かに関わらず、異なる株もしくは系統に由来するインフルエンザ B ウイルス抗原を含む追加免疫ワクチンに対する免疫応答を刺激する。

【 0 1 3 1 】

20

【表 1】

		A/California/2009 (A/H1N1)		A/Perth/2009 (A/H3N2)		B/Brisbane/ 2008	
		Fluad N=48	Agrippal N=30	Fluad N=48	Agrippal N=30	Fluad N=48	Agrippal N=30
FLUAD 初回免疫	GMT 1 日目	61 (42-89)	45 (28-72)	129 (84-197)	103 (60-177)	8.53 (6.42-11)	11 (7.48-15)
	GMT 22 日目	1157 (797-1679)	502 (313-804)	1836 (1460-2310)	770 (576-1029)	127 (94-171)	111 (76-162)
		N=57	N=31	N=57	N=31	N=57	N=31
(Influsplit SSW) 初回免疫	GMT 1 日目	54 (38-77)	53 (33-85)	45 (27-74)	26 (13-51)	6.69 (5.56-8.05)	6.11 (4.76-7.86)
	GMT 22 日目	1394 (1071-1814)	732 (512-1046)	745 (544-1021)	265 (173-406)	45 (32-64)	26 (16-41)
		N=27		N=27		N=27	
初回免疫していない コントロール	GMT 1 日目	63 (38-103)		122 (61-244)		6.63 (4.88-9.01)	
	GMT 22 日目	1720 (1174-2518)		1592 (1023-2477)		45 (24-86)	

10

20

30

表1. この研究から得られた幾何平均力価 (GMT)。小児を、2008/09北半球冬季インフルエンザ抗原を含む、Fluad (アジュバント添加)もしくはInflusplit SSW (アジュバント添加していない)で初回免疫した。初回免疫コントロールには、MenCワクチン (Encepur)を与えた。約2年後、小児には、2010/11北半球冬季インフルエンザ抗原を含む、アジュバント添加インフルエンザワクチン (Fluad)もしくはアジュバント添加していないインフルエンザワクチン (Agrippal)での追加免疫ワクチン接種を受けさせた。初回免疫コントロールは、アジュバント添加インフルエンザ (Fluad)のみの追加免疫を受けた。

【 0 1 3 2 】

本発明は、例示によって記載されてきたに過ぎず、本発明の範囲および趣旨の中にあるながら改変が行われ得ることは、理解される。

【 0 1 3 3 】

【化 1】

参考文献

- [1] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Neuzil *et al.* (2000) *N Engl J Med* 342:225–31.
- [3] Peltola *et al.* (2003) *Clin Infect Dis* 36:299–305.
- [4] Heikkinen *et al.* (2004) *J Infect Dis* 190:1369–73.
- [5] Izurieta *et al.* (2000) *N Engl J Med* 342:232–39.
- [6] Poehling *et al.* (2006) *N Engl J Med* 355:31–40.
- [7] Iskander *et al.* (2007) *Current Opin Infect Dis* 20:259–263. 10
- [8] Ghendon *et al.* (2006) *Epidemiol Infect* 134:71–78.
- [9] Principi *et al.* (2003) *Pediatr Infect Dis J* 22(10 Suppl):S207–10.
- [10] Fiore *et al.* (2008) *MMWR Early Release* 2008;57:1–60.
- [11] ECDC. Technical report on the scientific panel on vaccines and immunization. Infant and children seasonal immunization against influenza on a routine basis during inter-pandemic period. Stockholm, January 2007.
- [12] Demicheli *et al.* (2006) The Cochrane collaboration. Vaccines for preventing influenza in healthy children (Review). The Cochrane library, 2006, issue 3. Available at: www.thecochranelibrary.com
- [13] Walter *et al.* (2006) *Pediatrics* 118:e570–78.
- [14] Mitchell *et al.* (2005) *Pediatr Infect Dis J* 10:925–26. 20
- [15] Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza. *MMWR Early Release* 2007;56.June 29:1–53.
- [16] Treanor (2004). *N Engl J Med*. 350(3): 218-20.
- [17] Ferguson, *et al.* (2003). *Nature*. 422(6930): 428-33.
- [18] Kocle *et al.* (2006). *Science* 314(5807): 1898-903.
- [19] Skowronski *et al.* (2007). *Vaccine* 25(15): 2842-51.
- [20] Louie *et al.* (2006). *Pediatrics*. 117(4): e610-8.
- [21] WO96/37624.
- [22] WO98/46262.
- [23] WO2007/085969. 30
- [24] WO02/28422.
- [25] WO02/067983.
- [26] WO02/074336.

【 0 1 3 4 】

【化 2】

- [27] WO01/21151.
- [28] WO02/097072.
- [29] WO2005/113756.
- [30] Huckriede *et al.* (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [31] Treanor *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
- [32] Kcitel *et al.* (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
- [33] Rota *et al.* (1992) *J Gen Virol* 73:2737-42.
- [34] GenBank sequence G1:325176. 10
- [35] Hoffmann *et al.* (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [36] Subbarao *et al.* (2003) *Virology* 305:192-200.
- [37] Liu *et al.* (2003) *Virology* 314:580-590.
- [38] Ozaki *et al.* (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- [39] Webby *et al.* (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [40] WO00/60050.
- [41] WO01/04333.
- [42] US patent 6649372.
- [43] Neumann *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- [44] WO2006/067211. 20
- [45] WO01/83794.
- [46] Hoffmann *et al.* (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [47] Herlocher *et al.* (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- [48] Le *et al.* (2005) *Nature* 437(7062):1108.
- [49] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [50] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [51] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [52] Pau *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [53] <http://www.atcc.org/>
- [54] <http://locus.umdj.edu/> 30
- [55] WO03/076601.
- [56] WO2005/042728.
- [57] WO03/043415.
- [58] WO01/85938.
- [59] WO2006/108846.
- [60] WO97/37000.
- [61] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [62] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [63] Tree *et al.* (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [64] EP-A-1260581 (WO01/64846). 40
- [65] WO2006/071563.
- [66] WO2005/113758.
- [67] WO97/37001.
- [68] WO2006/027698.
- [69] EP-B-0870508.
- [70] US 5948410.
- [71] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.

【 0 1 3 5 】

【化3】

- [72] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- [73] Ji *et al.* (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [74] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- [75] Lahijani *et al.* (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [76] Lokteff *et al.* (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [77] WO90/14837.
- [78] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203. 10
- [79] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [80] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [81] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [82] WO2008/043774.
- [83] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [84] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [85] US-2007/014805.
- [86] US-2007/0191314. 20
- [87] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [88] WO95/11700.
- [89] US patent 6,080,725.
- [90] WO2005/097181.
- [91] WO2006/113373.
- [92] Han *et al.* (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005*.
- [93] US- 6630161.
- [94] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472. 30
- [95] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [96] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [97] WO2005/089837.
- [98] US patent 6,692,468.
- [99] WO00/07647.
- [100] WO99/17820.
- [101] US patent 5,971,953.
- [102] US patent 4,060,082.
- [103] EP-A-0520618.
- [104] WO98/01174. 40
- [105] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
- [106] Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [107] Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [108] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
- [109] Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- [110] Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- [111] Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [112] Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/055751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/145 A61P31/16 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, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Skowronski et al.: "Trivalent inactivated vaccine containing influenza B/Victoria induces strong recall of B/Yamagata but inadequate B/Victoria antibody responses in children primed with two doses of B/Yamagata", 18 May 2011 (2011-05-18), XP002691158, Retrieved from the Internet: URL: http://www.nfid.org/professional-education/archives/acvr/acvr11.pdf [retrieved on 2013-01-24] abstract -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 February 2013		12/03/2013
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 Weigl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/055751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	-& SKOWRONSKI DANUTA M ET AL: "Influenza B/Victoria Antigen Induces Strong Recall of B/Yamagata But Lower B/Victoria Response in Children Primed With Two Doses of B/Yamagata", PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, vol. 30, no. 10, October 2011 (2011-10), pages 833-839, XP009166541, the whole document	1-16
Y	----- WALTER EMMANUEL B ET AL: "Influenza vaccine immunogenicity in 6-to 23-month-old children: Are identical antigens necessary for priming?", PEDIATRICS, vol. 118, no. 3, September 2006 (2006-09), pages E570-E578, XP002691160, the whole document	1-16
Y	----- VESIKARI TIMO ET AL: "Enhanced Immunogenicity of Seasonal Influenza Vaccines in Young Children Using MF59 Adjuvant", PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, vol. 28, no. 7, July 2009 (2009-07), pages 563-571, XP009166530, ISSN: 0891-3668 the whole document	1-16
Y	----- US 2009/220546 A1 (PODDA AUDINO [IT] ET AL) 3 September 2009 (2009-09-03) paragraphs [0038], [0189]; claims 1-6, 9	1-16
Y	----- VESIKARI T ET AL: "MF59<(>R)-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD<(>R)) in children: Safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, no. 45, 23 October 2009 (2009-10-23), pages 6291-6295, XP026697587, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.02.004 [retrieved on 2009-10-17] the whole document	1-16
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/055751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GIOVANNI DELLA CIOPPA ET AL: "Trivalent and quadrivalent MF59-adjuvanted influenza vaccine in young children: A dose- and schedule-finding study", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 29, no. 47, 25 August 2011 (2011-08-25), pages 8696-8704, XP028325119, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.08.111 [retrieved on 2011-08-31] the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>DURANDO PAOLO ET AL: "MF59-adjuvanted vaccine: a safe and useful tool to enhance and broaden protection against seasonal influenza viruses in subjects at risk.", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY APR 2010, vol. 10, no. 4, April 2010 (2010-04), pages 639-651, XP009166537, ISSN: 1744-7682 the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2012/055751

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009220546	A1	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/06 (2006.01) A 6 1 K 47/06

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

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA04 BA55 BB11 CC08 CC21 FF30