

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4694745号
(P4694745)

(45) 発行日 平成23年6月8日(2011.6.8)

(24) 登録日 平成23年3月4日(2011.3.4)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/29
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/012 (2006.01)	A 6 1 K 39/012

請求項の数 14 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-521338 (P2001-521338)	(73) 特許権者	305060279
(86) (22) 出願日	平成12年9月6日(2000.9.6)		グラクソスミスクライン バイオリジカル
(65) 公表番号	特表2003-508494 (P2003-508494A)		ズ ソシエテ アノニム
(43) 公表日	平成15年3月4日(2003.3.4)		ベルギー ベー-1330 リクセンサー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/008728		ル リュ ドランスティテュ 89
(87) 国際公開番号	W02001/017550	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成13年3月15日(2001.3.15)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成19年8月15日(2007.8.15)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	9921147.6		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成11年9月7日(1999.9.7)	(74) 代理人	100108903
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 中村 和広
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の：

(a) B型肝炎ウイルス(HBV)表面抗原、及び

(b) ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原

を、TH1細胞応答の優先刺激剤であるアジュバントとともに含むワクチン組成物であって、単純ヘルペス・ウイルス抗原を含まず、該組成物は、ヒトパピローマウイルス感染及びB型肝炎ウイルス感染の治療又は予防に好適なものであり、該HPV抗原は、HPV16及び/又はHPV18由来のHPV主要キャプシド蛋白質L1、又はB型インフルエンザ菌(Haemophilus influenza B)蛋白質DとHPV16由来E7との融合物を含み、かつ、該TH1細胞応答の優先刺激剤は、3D-MPL、その粒子サイズが100nm未満である3D-MPL、QS21、QS21とコレステロールの混合物、及びCpGオリゴヌクレオチドからなるアジュバント群から選ばれる、前記ワクチン組成物。

【請求項2】

担体をさらに含む、請求項1に記載のワクチン組成物。

【請求項3】

前記TH1細胞応答の優先刺激剤が3-DMP Lである、請求項1又は2に記載のワクチン組成物。

【請求項4】

エプスタインバーウイルス(EBV)抗原がさらに存在する、請求項1~3のいずれか

1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

前記 E B V 抗原が g p 3 5 0 である、請求項 4 に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

A 型肝炎ウイルス (H A V) 抗原がさらに存在する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

前記 H A V 抗原が H M - 1 7 5 株に由来する、請求項 6 に記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

前記担体が水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、トコフェロール、及び水中油型エマルジョンからなる群から選択される、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

10

【請求項 9】

水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V) 抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

前記 V Z V 抗原が g p I である、請求項 9 に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

20

【請求項 12】

前記 H C M V 抗原が g B 6 8 5 ** または p p 6 5 である、請求項 11 に記載のワクチン組成物。

【請求項 13】

トキソプラズマゴンジ (Toxoplasma gondii) 抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

前記トキソプラズマゴンジ抗原が S A G 1 又は T G 3 4 である、請求項 13 に記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

本発明は、新規のワクチン処方物、それらの製造方法ならびに療法におけるそれらの使用に関する。特に本発明は、青年への投与のための混合ワクチンに関する。

【0002】

パピローマウイルスは小型 DNA 腫瘍ウイルスであって、これらは高度に種特異的である。今までのところ、70 を上回る個々のヒトパピローマウイルス (H P V) 遺伝子型が記載されている。H P V は一般に、皮膚 (例えば H P V - 1 および - 2) または粘膜表面 (例えば H P V - 6 および - 11) に特異的であり、通常は、数ヶ月または数年間存続する良性腫瘍 (いぼ) を生じる。このような良性腫瘍は、当該個体を悩ませている可能性はあるが、しかし 2 ~ 3 の例外を除いて、生命を脅かす傾向はない。

40

【0003】

いくつかの H P V は癌とも関連する。H P V とヒト癌との間の最強の正の関連は、H P V - 16 および H P V - 18 ならびに子宮頸癌との間に存在するものである。子宮頸癌は、発展途上国における最も一般的な悪性疾患であり、毎年世界中で約 500,000 例の新規症例が発生している。ワクチンを用いて、原発性 H P V - 16 感染を、そして確立された H P V - 16 含有癌をさえ相手にして活発に戦うことが、今日、技術的に実行可能である。H P V - 16 に対する予防的および治療的ワクチン接種の見込みに関する再検討のためには、Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 および Hagenessee M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564 を参照されたい。

【0004】

50

今日、種々の種類のHPVが単離されており、そして細菌におけるクローニングの助けを借りて、ならびにさらに近年ではPCR増幅により、特性化されてきた。HPVゲノムの分子編成は、十分に特性化されたウシ1型パピローマウイルス(BPV1)との比較に基づいて定義されてきた。

【0005】

その他の特定の当該HPV血清型は、31、33および45である。

【0006】

小変異は起こらないが、しかし記載された全てのHPVゲノムは少なくとも7つの初期遺伝子、即ちE1~E7と、2つの後期遺伝子、即ちL1およびL2を有する。さらに、上流調節領域は、HPVゲノムのほとんどの転写事象を制御すると思われる調節配列を保有する。

10

【0007】

E1およびE2遺伝子は、それぞれウイルス複製および転写制御に関与し、ウイルス取込みにより崩壊される傾向がある。E6およびE7、ならびに近年の証拠関連物であるE5も、ウイルス形質転換に関与する。

【0008】

子宮頸癌に関与するHPV、例えばHPV16および18では、腫瘍形成過程はウイルスDNAの組み込み後に開始する。組み込みは、キャプシドタンパク質L1およびL2をコードする遺伝子の不活性化を、ならびに正常細胞分化および癌腫の発症の漸次損失をもたらす2つの初期タンパク質E6およびE7の連続的過剰発現のインストールを生じる。

20

【0009】

子宮頸の癌腫は女性において一般的であり、前癌性中間段階を経て侵襲性癌腫に発達し、これはしばしば死に至る。疾患の中間段階は子宮頸上皮細胞新形成として知られており、漸増的重症度に換算してI~IIIに等級付けされる。

【0010】

臨床的には、女性肛門生殖器のHPV感染は、その特徴が子宮頸扁平上皮の主に浅在性および中間細胞に影響を及ぼす空胞細胞症である子宮頸部扁平コンジローマとして現れる。

【0011】

ウイルスの細胞変性効果の結果である空胞細胞は、核周囲透明輪を有する多核化細胞として現れる。上皮は、病変のいぼ状外見に関与する異常角質化により肥厚される。

30

【0012】

このような扁平コンジローマは、HPV16または18血清型に対して陽性である場合、それら自体が侵襲性子宮頸癌の前駆病変とみなされる子宮頸上皮内新形成(CIN)および癌腫in situ(CIS)に発達するための高危険因子である。

【0013】

W096/19496は、ヒトパピローマウイルスE6およびE7タンパク質の変異体、特にE6およびE7タンパク質の両方に欠失を有するE6/E7の融合タンパク質を開示する。これらの欠失融合タンパク質は、免疫原性であるといわれている。

【0014】

HPV L1ベースのワクチンは、W094/00152、W094/20137、W093/02184およびW094/05792に開示されている。このようなワクチンは、モノマー、キャプソメアまたはウイルス様粒子としてL1抗原を含み得る。このような粒子はさらに、L2タンパク質を含み得る。L2ベースのワクチンは、例えばW093/00436に記載されている。その他のHPVワクチンは、E7のような初期タンパク質またはL2-E7のような融合タンパク質を基礎にしている。

40

【0015】

1つまたはそれ以上のB型肝炎抗原を含むB型肝炎感染の予防のためのワクチンが周知である。例えば、SmithKline Beecham Biologicalsからのワクチンエンゲリックス-B(商標)が、B型肝炎を防止するために用いられる。このワクチンは、B型肝炎表面抗原(特に、Harford et al. in Postgraduate Medical Journal, 1987, 63(Suppl.2), p65-70に

50

記載されている226アミノ酸S抗原)を含み、アジュバントとして水酸化アルミニウムを用いて処方される。

【0016】

青年が特に罹患する傾向がある疾患を防止するために有効な混合ワクチンが必要とされている。

【0017】

本発明は、以下の：

(a) B型肝炎ウイルス(HBV)抗原、および

(b) ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原

を、TH1細胞応答の優先刺激剤であるアジュバントと組合せて含むワクチン組成物を提供する。

10

【0018】

本発明のワクチン組成物は、特にHBVおよび/またはHPV感染の恐れのある青年への投与のための大きな利点を有する。

【0019】

任意に、本発明のワクチン組成物はさらに、下記のような多数のその他の抗原のうちの1つまたはそれ以上を含む。

【0020】

本発明のワクチン組成物は意外にも干渉を示さない、即ち、本発明の組成物中の各抗原に対する免疫応答が、TH1細胞応答の優先刺激剤であるアジュバントとともに別々に投与された各抗原により得られる応答と本質的に同一である、ということが見出された。

20

【0021】

ワクチンハブリックス(商標)(これもSmithKline Beecham Biologicals)は、A型肝炎感染を防止するために用いられ得るワクチンの一例である。それは、アジュバントとして水酸化アルミニウムを用いて処方される。このワクチンは、ホルモル(ホルムアルデヒド)で不活性化されたHM-175A型肝炎ウイルスの弱毒化株を含む(Andre et al., Prog. Med. Virol., vol. 37, p1-24参照)。

【0022】

本明細書中で用いる場合、A型肝炎ウイルス(HAV)抗原という用語は、A型肝炎ウイルスからまたは例えばホルムアルデヒドにより任意に不活性化されたHAVの弱毒化株から得られるタンパク質をさすために用いられる。HAV抗原がA型肝炎ウイルス由来のタンパク質である場合、それは任意に組換え体タンパク質であり得る。

30

【0023】

ワクチントゥインリックス(商標)は、組換え体B型肝炎抗原と前記の不活性化弱毒化A型肝炎ウイルスの組合せである。本ワクチンは、A型肝炎およびB型肝炎を同時に防御するために用いられ得る。

【0024】

欧州特許第0 339 667号(Chemo Sero)は、A型肝炎抗原とB型肝炎抗原を組合せて混合ワクチンを作製する一般概念を記載する。その明細書には、用いられるアジュバントは重要ではない：それは免疫活性を所望程度に強化し得るだけでなければならず、いかなる副作用も引き起こしてはならない、と記述されている。アルミニウムゲル、特に水酸化アルミニウムゲルおよびリン酸アルミニウムゲルが用いられ得ると記述されている。

40

【0025】

さらに別の局面において、本発明は、以下の：

(a) B型肝炎ウイルス(HBV)抗原、

(b) ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原、および

(c) A型肝炎ウイルス(HAV)抗原

を、TH1細胞応答の優先刺激剤であるアジュバントと組合せて含むワクチン組成物を提供する。

【0026】

50

このようなワクチンは、特にHBVおよび/またはHPV感染および/またはHAV感染の恐れのある青年への投与のための大きな利点を有する。

【0027】

免疫応答は、大きく2つの両極端の種類に分けられる。即ち体液性免疫応答と細胞性免疫応答である（伝統的にそれぞれ、防御の抗体および細胞エフェクターメカニズムにより特性化される）。これらの種類の応答は、TH1型応答（細胞性応答）およびTH2型免疫応答（体液性応答）と呼ばれてきた。

【0028】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的ハプロタイプ制限細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞応答の発生により特性化され得る。マウスにおいては、TH1型応答はしばしばIgG2a亜型の抗体の生成により特性化されるが、一方、ヒトにおいては、これらはIgG1型抗体に対応する。TH2型免疫応答は、マウスにおけるIgG1を含めた一連の免疫グロブリンアイソタイプの生成により特性化される。

【0029】

これら2つの型の免疫応答の発現の背後の駆動力はサイトカインである、と考えられる。高レベルのTH1型サイトカインは、所定の抗原に対する細胞性免疫応答の誘導を援助する傾向があるが、一方、高レベルのTH2型サイトカインは、抗原に対する体液性免疫応答の誘導を援助する傾向がある。

【0030】

TH1型とTH2型の免疫応答の区別は、絶対的なものではない。実際は、個体は、主にTH1であるまたは主にTH2であると記載される免疫応答を支持する。しかしながら、MosmanとCoffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173) によりネズミCD4+ve T細胞クローンで説明されたものに関してサイトカインのファミリーを考えるのがしばしば便利である。伝統的に、TH1型応答は、Tリンパ球によるINF- サイトカインの産生に関連する。TH1型免疫応答の誘導にしばしば直接関連するその他のサイトカイン、例えばIL-12は、T細胞により産生されない。これに対比して、TH2型応答は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10および腫瘍壊死因子- (TNF-) の分泌に関連する。

【0031】

ある種のワクチンアジュバントはTH1またはTH2型サイトカイン応答の刺激に特に適していることが知られている。伝統的に、ワクチン接種または感染後の免疫応答のTH1:TH2平衡の最良の指標としては、抗原による再刺激後のin vitroのTリンパ球によるTH1またはTH2サイトカインの産生の直接測定、および/または抗原特異的抗体応答のIgG1:IgG2a比の（少なくともマウスにおける）測定が挙げられる。

【0032】

したがって、TH1型アジュバントは、インビトロにおいて抗原により再刺激された場合に高レベルのTH1型サイトカインを産生するよう単離T細胞集団を刺激するものであり、TH1型アイソタイプに関連した抗原特異的免疫グロブリン応答を誘導する。

【0033】

TH1細胞応答の優先刺激を可能にするアジュバントは、国際特許出願W094/00153およびW095/17209に記載されている。3De-O-アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) は、このようなアジュバントの1つである。これは、GB 2220211(Ribi)から既知である。化学的には、それは3De-O-アシル化モノホスホリルリピドAと4、5または6アシル化鎖の混合物であり、Ribi Immunochem, Montanaにより製造される。好ましい形態の3De-O-アシル化モノホスホリルリピドAは、欧州特許第0 689 454 B1号 (SmithKline Beecham Biologicals SA) に開示されている。

【0034】

好ましくは、3-DMP Lの粒子は、0.22μ膜を通して滅菌濾過されるために十分に小さい（欧州特許第0 689 454号に記載）。3-DMP Lは、10μg~100μg、好ましくは25~

10

20

30

40

50

50 µg / 用量の範囲で存在し、この場合、抗原は典型的には2 ~ 50 µg / 用量の範囲で存在する。

【 0 0 3 5 】

別の好ましいアジュバントは、セッケンボク (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮から得られる Q S 2 1、H p l c 精製非毒性分画を含む。任意に、これは、任意に担体と一緒に、3 D e - O - アシル化モノホスホリルリピド A (3 - D M P L) と混和され得る。

【 0 0 3 6 】

Q S 2 1 の製造方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。

【 0 0 3 7 】

Q S 2 1 を含有する非反応原性アジュバント処方物は、以前に記載されている (W O 96/33 739) 。 Q S 2 1 およびコレステロールを含むこのような処方物は、抗原と一緒に処方された場合に上首尾の T H 1 刺激アジュバントであることが示されている。したがって、本発明の一部を構成するワクチン組成物は、Q S 2 1 およびコレステロールの組合せを含み得る。

10

【 0 0 3 8 】

T H 1 細胞応答の優先刺激剤であるさらに別のアジュバントとしては、免疫調節性オリゴヌクレオチド、例えば W O 96/02555 に開示されているような非メチル化 C p G 配列が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

例えば本明細書中に前記されたもののような異なる T H 1 刺激アジュバントの組合せも、T H 1 細胞応答の優先刺激剤であるアジュバントを提供するとして意図される。例えば、Q S 2 1 は、3 - D M P L と一緒に処方され得る。Q S 2 1 : 3 - D M P L の比は、典型的には 1:10 ~ 10:1、好ましくは 1:5 ~ 5:1、そしてしばしば実質的には 1:1 のオーダーである。最適共同作用のための好ましい範囲は、2.5:1 ~ 1:1 の 3 - D M P L : Q S 2 1 である。

20

【 0 0 4 0 】

好ましくは、担体も本発明のワクチン組成物中に存在する。担体は、水中油型エマルション、またはアルミニウム塩、例えばリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムであり得る。

【 0 0 4 1 】

好ましい水中油型エマルションは、代謝性油、例えばスクアレン、トコフェロールおよびトウイン80を含む。さらに、水中油型エマルションは、スパン85および/またはレシチンおよび/またはトリカプリリンを含有し得る。

30

【 0 0 4 2 】

特に好ましい局面では、本発明のワクチン組成物中の抗原は、3 - D M P L およびミョウバンと併合される。

【 0 0 4 3 】

典型的には、ヒト投与のためには、Q S 2 1 および 3 - D M P L は、1 µg ~ 200 µg、例えば 10 µg ~ 100 µg、好ましくは 10 µg ~ 50 µg / 用量の範囲でワクチン中に存在する。典型的には、水中油は、2 ~ 10% のスクアレン、2 ~ 10% の トコフェロールおよび 0.3 ~ 3% のトウイン80を含む。好ましくは、スクアレン : トコフェロールは、これがより安定なエマルションを提供する場合、1またはそれ未満である。スパン85も、1% のレベルで存在し得る。いくつかの場合には、本発明のワクチンは安定剤をさらに含有するのが有益である。

40

【 0 0 4 4 】

非毒性水中油型エマルションは、好ましくは非毒性油、例えばスクアランまたはスクアレン、乳化剤、例えばトウイン80を水性担体中に含有する。水性担体は、例えばリン酸塩緩衝化食塩水であり得る。

【 0 0 4 5 】

水中油型エマルション中に Q S 2 1、3 - D M P L およびトコフェロールを包含する特に

50

効力のあるアジュバント処方物は、WO 95/17210に記載されている。

【0046】

本発明の組成物中のHPV抗原は、好ましくはHPV16および/または18から、あるいはHPV6および/または11から、あるいはHPV31、33または45から得られる。

【0047】

好ましい一実施態様では、本発明のワクチン組成物中のHPV抗原は、HPVの主要キャプシドタンパク質L1、ならびに任意に、特にHPVおよび/またはHPVからのL2タンパク質を含む。この実施態様では、好ましい形態のL1タンパク質は切頭化L1タンパク質である。好ましくは、L1は、ウイルス様粒子(VLP)の形態である。L1タンパク質は、別のHPVタンパク質と、特にE7と融合して、L1-E7融合体を形成し得る。L1-EまたはL1-L2-Eを含むキメラVLPが特に好ましい。

10

【0048】

別の好ましい実施態様では、本発明の組成物中のHPV抗原は、E6またはE7タンパク質、特にT細胞エピトープを有する免疫学的融合相手に連結されたE6またはE7から得られる。

【0049】

本発明のこの実施態様の好ましい形態では、免疫学的融合相手は、B型インフルエンザ菌のプロテインDから得られる。好ましくは、プロテインD誘導体は、タンパク質のおよそ最初の1/3、特におよそ最初のN末端100~110アミノ酸を含む。

20

【0050】

本発明のこの実施態様における好ましい融合タンパク質は、HPV16からのプロテインD-E6、HPV16からのプロテインD-E7、HPV18からのプロテインD-E7およびHPV18からのプロテインD-E6を含む。プロテインD部分は、好ましくはプロテインDの最初の1/3を含む。

【0051】

本発明のさらに別の実施態様では、HPV抗原は、特にHPV6および/またはHPV11からのL2-E7融合体の形態である。

【0052】

本発明のタンパク質は、好ましくは大腸菌中で発現される。好ましい実施態様では、5~9、好ましくは6個のヒスチジン残基を含むヒスチジン尾を有するタンパク質が発現される。これらは、精製を促進するのに有益である。このようなタンパク質の製造の説明は、同時係属中の英国特許出願第9717953.5号に詳細に説明されている。

30

【0053】

ワクチン組成物中のHPV抗原は、 $Al(OH)_3$ 上に吸着され得る。好ましくは、L1VLPが $Al(OH)_3$ 上に吸着される。

【0054】

本発明の組成物中のB型肝炎ウイルス(HBV)抗原は、典型的にはB型肝炎表面抗原である。

【0055】

B型肝炎表面抗原(HBsAg)の調製は、十分に実証されている(例えば、Harford et al. in *Develop. Biol. Standard* 54, page 125(1983)、Gregg et al. in *Biotechnology*, 5, page 479 (1987)、EP-A-0 226 846、EP-A-0 299 108およびそれらの中の参考文献参照)。

40

【0056】

本明細書中で用いる場合、本明細書中で「HBsAg」または「HBs」と略記される「B型肝炎表面抗原」という表現は、HBV表面抗原の抗原性を表示するあらゆるHBsAg抗原またはその断片を含む。HBsAgS抗原の226アミノ酸配列(Tiollais et al. *Nature*, 317, 489 (1985)およびその中の参考文献参照)のほかに、本明細書中に記載したようなHBsAgは、所望により、前記の参考文献中に、およびEP-A-0 278 940に記載

50

されたような前S配列の全部または一部を含有する、と理解される。本明細書中に記載されているようなHBsAgは、変異体、例えばW091/14703に記載された「エスケープ突然変異体」も指示し得る。さらに別の局面において、HBsAgは、欧州特許出願第0 414 374号にL*として記載されたタンパク質、即ち、そのアミノ酸配列がB型肝炎ウイルス大(L)タンパク質(adまたはay亜型)のアミノ酸配列の一部から成るタンパク質であって、タンパク質のアミノ酸配列が以下の：

(a) 前記のLタンパク質の残基12~52、その後の残基133~145、その後の残基175~400、あるいは

(b) 前記のLタンパク質の残基12、その後の残基14~52、その後の残基133~145、その後の残基175~400

いずれかから成ることを特徴とするタンパク質を含み得る。

【0057】

HBsAgは、欧州特許第0 198 474号または欧州特許第0 304 578号に記載されたポリペプチドも指示し得る。

【0058】

普通はHBsAgは粒子形態である。それは、Sタンパク質単独を含み得るし、あるいは複合粒子、例えば(L*, S)(ここで、L*は前記と同様であり、そしてSはB型肝炎表面抗原のS-タンパク質を意味する)として存在し得る。

【0059】

HBsAgは、W093/24148に記載されているように、リン酸アルミニウム上に吸着され得る。

【0060】

好ましくは、本発明の処方物中に用いられるB型肝炎(HBV)抗原は、市販製品エンゲリックス-B(商標; SmithKline Beecham Biologicals)に用いられるようなHBsAgS抗原である。

【0061】

B型肝炎表面抗原を3-DMP Lとともに含むワクチンは、欧州特許出願第0 633 784号に記載された。

【0062】

本発明の組成物中に含まれ得るさらに別の病原体からの抗原の例を、ここに記載する。

【0063】

ヘルペスウイルス群の一員であるエプスタイン-バーウイルス(EBV)は、ヒトにおける原発性疾患として感染性単核細胞症を引き起こす。主としてそれは小児または青年に影響を及ぼす。平均成人集団の90%より多くが、末梢Bリンパ球中に生涯存続するEBVに感染している。ウイルスは終生耳下腺中で産生され、主に、ウイルスを落とす個体からの唾液の交換により蔓延する。EBVに感染した小児は大部分は無症候性であり、あるいは非常に軽度の症状を有するが、一方、感染した青年および成人は、発熱、咽頭炎および腺症を特徴とする典型的感染性単核細胞症を発症する。感染していた人々は、彼らの余生の間、抗EBV抗体を維持し、したがってさらなる感染に対して免疫される。

【0064】

その感染性のほかに、EBVはリンパ球を迅速に分裂中細胞に変えることが示されており、したがって、アフリカパーキットリンパ腫(BL)を含めたいくつかの異なるリンパ腫に関係があった。EBVは、鼻咽頭癌(NPC)の発症にも関与し得る世界中で、80,000例の鼻咽頭癌が発生すると概算され、そしてそれは中国民族集団中においてより流行している。感染性単核細胞症は、EBVによる原発性感染の結果である。それは、さらに別の危険因子が存在しない場合、致命的疾患ではない。

【0065】

いわゆる膜抗原複合体を構成するEBVウイルスエンベロープの4つのタンパク質が記載されている。それらは通常は、gp220/350またはgp250/350あるいは単にgp250または350と呼ばれる(EP-A-151079参照)。gp350およびgp250に対する抗体は中和能力を

10

20

30

40

50

有する、という説得力のある証拠がある。したがってこれらのタンパク質は、考え得るEBVワクチンの候補である。EBV関連疾患の予防および治療のためのgp250/350の適用についてのさらなる情報に関しては、欧州特許第0 173 254号を参照されたい。

【0066】

主なEBV表面糖タンパク質gp350/220は、細胞膜タンパク質CD21との相互作用を介してヒト標的細胞に感染する。gp350/220は、ヒトにおけるEBV中和抗体の一次標的であり、gp350/220のいくつかの形態は、EBV関連疾患に対して防御することが示されている。好ましくは、本発明のワクチン組成物はEBVのgp350を含むが、しかしその他の防御抗原が使用され得る。

【0067】

HSV-2は、陰部ヘルペスの原発性病因作用物質である。HSV-2およびHSV-1（口唇ヘルペスの原因作用物質）は、主に神経節細胞における、急性疾患を誘導し、潜在性感染を確立するそれらの能力の両方により特性化される。

【0068】

陰部ヘルペスは、米国単独で約500万人に起こると概算され、毎年500,000の臨床例が報告されている（原発性および再発性感染）。原発性感染は、典型的には思春期後に生じ、2～3週間持続する疼痛性皮膚病変の限局性出現を特徴とする。一次感染後6ヶ月以内に、患者の50%が疾患の再発を経験する。患者の約25%は、毎年、疾患の10～15の再発エピソードを経験し得る。免疫無防備状態患者では、高頻度の再発の発生率は、正常患者集団よりも統計学的に高い。

【0069】

HSV-1およびHSV-2ウイルスはともに、ウイルスの表面に位置する多数の糖タンパク質構成成分を有する。これらは、gB、gC、gDおよびgE等として知られている。

【0070】

HSV抗原が本発明の組成物に含まれる場合、これは、好ましくはHSV-2から得られ、典型的には糖タンパク質Dである。糖タンパク質Dはウイルス膜上に位置し、感染細胞の細胞質中にも見出される（Eisenberg R.J. et al; J of Virol 1980, 35, 428-435）。それは、シグナルペプチドを含めた393のアミノ酸を含み、約60kDの分子量を有する。全てのHSVエンベロープ等タンパク質のうち、これはおそらくは最良に特性化されている（Cohen et al; J. of Virology, 60, 157-166）。インビボでは、細胞膜へのウイルス付着において中心的役割を演じることが知られている。さらに、糖タンパク質Dは、インビボで中和抗体を誘導し得ることが知られている（Eing et al J. Med. Virology 127:59-65）。しかしながら、患者の血清中の高中和抗体力価の存在にもかかわらず、潜在性HSV-2ウイルスは依然として再活性化され、そして疾患の再発を誘導し得る。

【0071】

本発明の一実施態様では、その膜アンカー領域を欠く切頭化タンパク質のC末端にアスパラギンおよびグルタミンの付加を伴う、アミノ酸1～306天然糖タンパク質を含む308アミノ酸の切頭化HSV-2糖タンパク質Dが存在する。この形態のタンパク質としては、切断されて成熟283アミノ酸タンパク質を産生するシグナルペプチドが挙げられる。チャイニーズハムスター卵巣細胞におけるこのようなタンパク質の産生は、EP-B-139 417(Genentech)に記載されている。

【0072】

組換え体成熟HSV-2糖タンパク質D切頭体は、好ましくは本発明のワクチン処方物中に用いられ、rgD2tと呼ばれる。アジュバント3-DMP Lとの組合せにおけるこのHSV-2抗原の組合せは、WO 92/16231に記載されている。

【0073】

好ましい一局面では、本発明のワクチン組成物はさらに、水痘帯状ヘルペスウイルス抗原（VZV抗原）を含む。ワクチン処方物中に含入するためのVZVの適切な抗原としては、Longnecker et al., Proc Natl Acad Sci USA 84, 4303-4307(1987)により記載された

10

20

30

40

50

g p I - V が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

好ましい実施態様では、g p I (米国特許第4,769,239号 (Ellis等) 参照) が用いられる。欧州特許第0 405 867 B1号も参照されたい。

【 0 0 7 5 】

別の好ましい局面では、本発明のワクチン組成物はさらに、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 抗原を含む。H C M V は、ヘルペスウイルスのファミリーに属するヒト D N A ウイルスである。H C M V は、世界のほとんどの地域において風土病性である。2つの集団の間で、H C M V は重篤な医学的症状に關与する。H C M V は、新生児の先天性欠陥の主因である。危険な状態にある第二の集団は、免疫無防備状態患者、例えばH I V感染に罹患した者、および移植を施されている患者である。臨床的疾患は、種々の症状、例えば発熱、肝炎、肺炎および感染性単核細胞症を引き起こす。H C M V に対するワクチンに用いるための好ましい抗原は、WO 95/31555に記載されているようなg B 685^{**}である。H C M V ワクチン中に用いるための免疫原は、WO 94/00150(City of Hope)に記載されたH C M V マトリックスタンパク質であるp p 65によっても提供される。

【 0 0 7 6 】

好ましい一実施態様では、本発明のワクチン組成物はさらに、V Z V およびH C M V 抗原の両方を、特に前記の抗原を含む。

【 0 0 7 7 】

別の好ましい局面では、本発明のワクチン組成物はさらに、トキソプラズマ抗原を含む。トキソプラズマは、温血動物、例えばヒトにおけるトキソプラズマ症に關与する真正の細胞内原生動物寄生虫である。それは健常個体においては一般に臨床的には無症候性であるが、しかしトキソプラズマ症は、妊娠女性および免疫無防備状態患者においては重症合併症を引き起こし得る。トキソプラズマに対するワクチン中に用いるための好ましい抗原は、WO96/02654に記載されたようなS A G 1 (P 30として知られている) またはWO92/11366に記載されたようなT g 34である。

【 0 0 7 8 】

好ましい一局面では、本発明のワクチン組成物はさらに、トキソプラズマ抗原と組合されたV Z V 抗原またはH C M V 抗原、特に前記の抗原を含む。

【 0 0 7 9 】

好ましい一局面において、本発明のワクチン組成物は、多価ワクチン、例えば4または5価ワクチンである。

【 0 0 8 0 】

本発明の処方物は、低用量の抗原 (例えば、5 μg r g D 2 t という低い値) を用いる場合でさえ、防御免疫を誘導するのに非常に有効である。

【 0 0 8 1 】

それらは原発性感染に対して優れた防御を提供し、特異的体液性 (中和抗体) およびエフェクター細胞性 (D T H) 免疫応答の両方を有益に刺激する。

【 0 0 8 2 】

本発明は、さらなる局面において、医学的療法に用いるための、特にヒトパピローマウイルス感染およびB型肝炎ウイルス感染に用いるための本明細書中に記載したようなワクチン処方物を提供する。

【 0 0 8 3 】

本発明のワクチンは、抗原の免疫防御性を含有し、慣用的技法により調製され得る。

【 0 0 8 4 】

ワクチン調製物は一般に、Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978に記載されている。リポソーム内封入は、例えば、米国特許第4,235,877号 (Fullerton) により記載されている。タンパク質と高分子と

10

20

30

40

50

の結合は、例えば米国特許第4,372,945号(Likhite等)および米国特許第4,474,757号(Armor等)に開示されている。

【0085】

各ワクチン中のタンパク質の量は、典型的ワクチン中の有意の副作用を伴わずに免疫防御応答を誘導する量として選択される。このような量は、用いられる特定の免疫原によって変わる。一般に、各用量は1~1000 µg、好ましくは2~100 µg、最も好ましくは4~40 µgのタンパク質を含む、と予測される。特定のワクチンのための最適量は、被験者における抗体価およびその他の応答の観察を含めた標準試験により確認され得る。初期ワクチン接種後、被験者は約4週間で追加免疫を受け得る。

【0086】

HPVまたはHVV感染に罹りやすい人々のワクチン接種のほか、本発明の製剤組成物は、前記のウイルス感染に罹患している患者を免疫療法的に治療するために用いられ得る。

【0087】

本発明のさらに別の局面では、本明細書中に記載したような製造方法であって、ヒトパピローマウイルス抗原およびB型肝炎ウイルス抗原をTH-1と混合して、アジュバント、例えば3-DMP L、ならびに好ましくは担体、例えばミョウバンを混合することを包含する方法が提供される。

【0088】

所望により、本明細書中に記載したような多価ワクチンを提供するために、その他の抗原が、任意の便利な順に付加され得る。

【0089】

以下の実施例で本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0090】

実施例1：ミョウバン / 3 - D M P L を用いて処方されたHPV Ags / HB組合せの比較免疫原性

序論

抗原の前吸着化モノバルクを用いたミョウバン / 3 - D M P L (A S 0 4) と、あるいは A l (O H)₃ または A l P O₄ 上の 3 - D M P L とともに処方された4つの異なる抗原：

- 1 . H P V 1 6 L 1 ウイルス様粒子 (V L P - 1 6)
- 2 . H P V 1 8 L 1 ウイルス様粒子 (V L P - 1 8)
- 3 . H P V - 1 6 (E 7) から P D 1 / 3 1 6 E 7 2 M
- 4 . H B s A g

を用いて、B a l b / C マウスにおいて免疫原性試験を実施した。

【0091】

3 - D M P L / A l (O H)₃ 処方物は A S 0 4 D と呼ばれ、一方、3 - D M P L / A l P O₄ ベースの処方物は A S 0 4 C と呼ばれる。

【0092】

以下のワクチン：

- 1 . V L P 1 6 + V L P 1 8 A S 0 4 D、
- 2 . E 7 ベースの処方物、
- 3 . H B s A S 0 4 C

を査定し、これらのワクチンを併用する効力を評価した。

【0093】

この実験の目的は、以下のようなものであった：

- 1) V L P 1 6 + V L P 1 8 または E 7 および H B s A g の異なる A S 0 4 組合せの免疫原性を比較すること。

【0094】

- 2) 一価ワクチンが A S 0 4 C または A S 0 4 D 中に処方される場合：A l P O₄ または A l P O₄ / A l (O H)₃ から作られる異なる H B s A S 0 4 処方物の免疫原性を異なる

10

20

30

40

50

比のミョウバン形態と比較すること、そして
VLPまたはE7抗原を含有する組合せにおけるAl(OH)₃およびAlPO₄の分画上の3-DMP Lの吸着対3-DMP L / Al(OH)₃の作用を比較すること。

【0095】

実験プロトコールは、材料と方法の項に詳細に記載されている。

【0096】

要するに、マウス10匹の群を、種々のAgベースの処方物(1/10HD)を用いて、3週間に2回、筋肉内投与で免疫感作した。HB、E7およびVLP Agに対する抗体応答、ならびにワクチン接種により誘導されるアイソタイププロファイルを、II後14日目にELISAによりモニタリングした。同時点で、CMI(リンパ増殖性応答またはサイトカイン生産(IFN / IL5))を、HB、VLPまたはE7抗原を用いた脾臓細胞のインビトロにおける再刺激後に分析した。

【0097】

材料と方法

処方物

処方物組成

AS04CまたはAS04D上のVLP16、VLP18、PD1/3-HPV16E7-HisおよびHB。

【0098】

使用構成成分

【0099】

【表1】

成分	濃度	バッファー
HPV 16 VLP	560 μg/ml	Tris 20mM/NaCl 500mM
HPV 18 VLP	550 μg/ml	NaCl 500mM/NaPO ₄ 20mM
AL(OH) ₃	10380 μg/ml	H ₂ O
PD1/3-HPV 16 E7-His	1170 μg/ml	PO ₄ 20mM
HBs	1219 μg/ml	PO ₄ 10mM/NaCl 150mM
3D-MPL	1170 μg/ml	注射用水
AlPO ₄	5 mg/ml	NaCl 150mM

【0100】

吸着

a) VLP吸着

VLP16およびVLP18精製バルクを、2 μgVLP / 10 μgAl(OH)₃でAl(OH)₃に付加する。最終処方まで、混合物を2~8 で貯蔵する。

【0101】

b) HB吸着

2 μgのHbを40 μgのAlPO₄と混合する。最終処方まで、混合物を2~8 で貯蔵する。

【0102】

2 μgのHbを10 μgのAlPO₄と混合する。最終処方まで、混合物を2~8 で貯蔵する。

【0103】

c) PD1/3-HPV16E7-His吸着

2 μgのE7を10 μgのAl(OH)₃と混合する。最終処方まで、混合物を2~8 で貯蔵

10

20

30

40

50

する。

【0104】

d) 3 - D M P L 吸着

5 μg の3 - D M P Lを10 μg の $\text{Al}(\text{OH})_3$ と混合する。最終処方まで、混合物を2~8で貯蔵する。

【0105】

5 μg の3 - D M P Lを10 μg の AlPO_4 と混合する。最終処方まで、混合物を2~8で貯蔵する。

【0106】

2.5 μg の3 - D M P Lを5 μg の $\text{Al}(\text{OH})_3$ と混合する。最終処方まで、混合物を2~8で貯蔵する。 10

【0107】

2.5 μg の3 - D M P Lを5 μg の AlPO_4 と混合する。最終処方まで、混合物を2~8で貯蔵する。

【0108】

処方物

H_2O および NaCl を混合(10x濃縮)し、室温で10分間攪拌後、異なる構成成分:即ち吸着化抗原、吸着化3 - D M P Lおよび $\text{Al}(\text{OH})_3$ を付加する(下表参照)。それらを室温で10分間振盪し、注入まで4で貯蔵する。次に処方物のインビトロにおける特性化を実施する。 20

【0109】

処方物の群および詳細についての表

【0110】

【表2】

群、及び配合細目の表

群	抗原		免疫刺激剤		媒体	
	タイプ	μg	タイプ	μg	タイプ	μg
A	VLP16	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
						20
B	HPV16E7	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
						30
C	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO ₄	40
					AlPO ₄	10
D	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO ₄	10
					AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	30
E	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30
F	E7	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	HBs	2			AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	20
G	VLP16	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
	HBs	2			AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
H	VLP16	2	3D-MPL	2.5	Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
	HBs	2			AlPO ₄	10
					Al(OH) ₃	5
					AlPO ₄	5
					Al(OH) ₃	10

【0111】

マウス血清学

抗HB血清学

コーティング抗原としてHB(Hep286)を用いたELISAにより、抗HB抗体の定量を実施した。抗原および抗体溶液は、50 μl/ウエルで用いた。抗原をPBS中1 μg/mlの最終濃度で希釈し、4℃で一晩、96ウエル微小滴定プレート(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)のウエルに吸着させた。次に、1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%トウイン20を含有するPBS(飽和緩衝液)とともにプレートを37℃で1時間インキュベ

10

20

30

40

50

ートした。飽和緩衝液中の血清の2倍希釈液（1/100希釈液で出発）をHB被覆プレートに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS 0.1% トウイン20で4回洗浄し、飽和緩衝液中に1/1500希釈したビオチン結合抗マウスIg（Amersham, UK）、あるいはそれぞれ1/4000、1/8000、1/4000で希釈したIgG1、IgG2a、IgG2b（IMTECH, USA）を各ウエルに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液中に1/1000希釈したストレプトタビジン - ビオチニル化ペルオキシダーゼ複合体（Amersham, UK）を37℃でさらに30分間付加した。プレートを前記と同様に洗浄し、o - フェニレンジアミン（Sigma）、0.04% H₂O₂、0.1% トウイン20中の0.03%の0.05 Mクエン酸塩緩衝液、pH 4.5の溶液とともに20分間インキュベートした。H₂SO₄を用いて反応を停止させて、490/630 nmで読取った。ソフトマックスプロ（4つのパラメーター方程式を使用）による参照からELISA力価を算定し、EU/mlで表した。

10

【0112】

抗E7血清学

コーティング抗原としてPD1/316E7 2Mを用いたELISAにより、抗E7抗体の定量を実施した。抗原および抗体溶液は、100 μl/ウエルで用いた。抗原をPBS中0.5 μg/mlの最終濃度で希釈し、4℃で一晩、96ウエル微小滴定プレート（Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark）のウエルに吸着させた。次に、1%ウシ血清アルブミンおよび0.1% トウイン20を含有するPBS（飽和緩衝液）とともにプレートを37℃で1時間インキュベートした。飽和緩衝液中の血清の2倍希釈液（1/100または1/400希釈液で出発）をE7被覆プレートに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS 0.1% トウイン20で4回洗浄し、飽和緩衝液中に1/1500希釈したビオチン結合抗マウスIg、IgG1、IgG2a、IgG2b（Amersham, UK）、を各ウエルに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液中に1/5000希釈したストレプトタビジン - ビオチニル化ペルオキシダーゼ複合体（Amersham, UK）を37℃でさらに30分間付加した。プレートを前記と同様に洗浄し、テトラメチルベンジジン（TMB）（Biorad, USA）の溶液とともに20分間インキュベートして、クエン酸塩緩衝液中に2倍希釈した（0.1 M、pH = 5.8）。H₂SO₄ 0.5 Nを用いて反応を停止させて、450/630 nmで読取った。ソフトマックスプロ（4つのパラメーター方程式を使用）による参照からELISA力価を算定し、EU/mlで表した。

20

【0113】

抗VLP16および抗VLP18血清学

コーティング抗原としてVLP16 503/1（20/12/99）およびVLP18 504/2（25/10/99F）を用いたELISAにより、抗VLP16および抗VLP18抗体の定量を実施した。抗原および抗体溶液は、50 μl/ウエルで用いた。抗原をPBS中0.5 μg/mlの最終濃度で希釈し、4℃で一晩、96ウエル微小滴定プレート（Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark）のウエルに吸着させた。次に、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBSとともにプレートを37℃で1時間インキュベートした。飽和緩衝液中の血清の2倍希釈液（1/400希釈液で出発）をVLP被覆プレートに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS 0.1% トウイン20で4回洗浄し、飽和緩衝液中に1/1500希釈したビオチン結合抗マウスIg（Amersham, UK）を各ウエルに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液中に1/1000希釈したストレプトタビジン - ビオチニル化ペルオキシダーゼ複合体（Amersham, UK）を37℃でさらに30分間付加した。プレートを前記と同様に洗浄し、o - フェニレンジアミン（Sigma）、0.04% H₂O₂、0.1% トウイン20中の0.03%の0.05 Mクエン酸塩緩衝液、pH 4.5の溶液とともに20分間インキュベートした。H₂SO₄ 2Nを用いて反応を停止させて、490/630 nmで読取った。ソフトマックスプロ（4つのパラメーター方程式を使用）による参照からELISA力価を算定し、EU/mlで表した。

30

40

【0114】

T細胞増殖

二次免疫感作の2週間後に、マウスを屠殺し、脾臓を無菌的に摘出して、プールした（5臓

50

器 / 群の1プール)。2 mMのL-グルタミン、抗生物質、 5×10^{-5} Mの2-メルカプトエタノールおよび1%同系正常マウス血清を含有するRPMI 1640培地(GIBCO)中に、細胞懸濁液を調製した。異なる濃度(10~0.03 $\mu\text{g/ml}$)の各Ag(VLP、E7またはHB抗原)を有する丸底96ウエルプレート中で、200 μl 中に 2×10^6 細胞/mlの最終濃度で脾臓細胞を培養した。3反復試験で各試験を実行した。5%CO₂下で37℃で96時間の培養後、0.5 μCi /ウエルで³H-チミジン(Amersham, UK、5Ci/mmol)を用いて18時間、細胞をパルス化し、次に細胞収穫器を用いてユニフィルタープレート(Packard)上に収穫した。取込み放射能をシンチレーションカウンター(トップカウント、Packard)で測定した。結果は、cpm(3反復試験ウエル中の平均cpm)で表すか、または刺激指数(抗原を有する細胞の培養中の平均cpm/抗原を含有しない細胞の培養中の平均cpm)として表す。

10

【0115】

サイトカイン生産

二次免疫感作の2週間後に、マウスを屠殺し、脾臓を無菌的に摘出して、プールした。2 mMのL-グルタミン、抗生物質、 5×10^{-5} Mの2-メルカプトエタノールおよび5%ウシ胎仔血清を含有するRPMI 1640培地(GIBCO)中に、細胞懸濁液を調製した。異なる濃度(10~1 $\mu\text{g/ml}$)の各Ag(VLP、E7またはHB抗原)を有する平底24ウエルプレート中で、 5×10^6 細胞/mlの最終濃度で脾臓細胞を培養した。上清を96時間後に収穫し、ElisaによりIFN およびIL5の存在に関して試験するまで凍結した。

【0116】

IFN (Genzyme)

Genzymeからの試薬を用いて、ElisaによりIFN の定量を実施した。試料および抗体溶液は、50 μl /ウエルで用いた。炭酸塩緩衝液、pH9.5中で1.5 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したハムスター抗マウスIFN 50 μl とともに4℃で一晩、96ウエル微小滴定プレート(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)を被覆した。次に、1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%トゥイーン20を含有するPBS(飽和緩衝液)100 μl とともにプレートを37℃で1時間インキュベートした。飽和緩衝液中のin vitro刺激からの上清の2倍希釈液(1/2で出発)を抗IFN 被覆プレートに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS0.1%トゥイーン(洗浄緩衝液)で4回洗浄し、最終濃度0.5 $\mu\text{g/ml}$ で飽和緩衝液中に希釈したビオチン結合ヤギ抗マウスIFN を各ウエルに付加し、37℃で1時間インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液中に1/10000希釈したAMDEX複合体(Amersham)を37℃で30分間付加した。プレートを前記と同様に洗浄し、50 μl のTMB(Biorad)とともに10分間インキュベートした。H₂SO₄0.4Nを用いて反応を停止させて、450/630 nmで読取った。ソフトマックスプロ(4つのパラメーター方程式を使用)により標準曲線(マウスIFN 標準)を用いて濃度を算定し、pg/mlで表した。

20

30

【0117】

IL5 (Pharmingen)

Pharmingenからの試薬を用いて、ElisaによりIL5の定量を実施した。試料および抗体溶液は、50 μl /ウエルで用いた。炭酸塩緩衝液、pH9.5中で1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したラット抗マウスIL5 50 μl とともに4℃で一晩、96ウエル微小滴定プレート(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)を被覆した。次に、1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%トゥイーン20を含有するPBS(飽和緩衝液)100 μl とともにプレートを37℃で1時間インキュベートした。飽和緩衝液中のin vitro刺激からの上清の2倍希釈液(1/2で出発)を抗IL5被覆プレートに付加し、37℃で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS0.1%トゥイーン(洗浄緩衝液)で4回洗浄し、最終濃度1 $\mu\text{g/ml}$ で飽和緩衝液中に希釈したビオチン結合ラット抗マウスIL5を各ウエルに付加し、37℃で1時間インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液中に1/10000希釈したAMDEX複合体(Amersham)を37℃で30分間付加した。プレートを前記と同様に洗浄し、50 μl のTMB(Biorad)とともに15分間インキュベートした。H₂SO₄0.4Nを用いて反応を停止させて、450/630 nmで読取った。ソフトマックスプロ(4つのパラメーター方程式を使用)により標準曲線(組換え体マウスIL5)を用いて濃度を算定し、pg/mlで表した。

40

50

【 0 1 1 8 】

群

以下の処方物を筋肉内に用いて、10匹のBalb/Cマウスの群を免疫感作した。

【 0 1 1 9 】

表1：群および処方物

【 0 1 2 0 】

【表3】

表1. 群、及び配合

群	配合
A	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 50 μ g
B	16E7 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 50 μ g
C	HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/AlPO ₄ 50 μ g
D	HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/AlPO ₄ 20 μ g/Al(OH) ₃ 30 μ g
E	HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/AlPO ₄ 10 μ g/Al(OH) ₃ 40 μ g
F	16E7 2 μ g/HBS 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 40 μ g/AlPO ₄ 10 μ g
G	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 40 μ g/ AlPO ₄ 10 μ g
H	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 35 μ g/ AlPO ₄ 15 μ g

10

20

【 0 1 2 1 】

処方物の詳細は、材料と方法の項の表に前記されている。

【 0 1 2 2 】

結果

30

1. 血清学的知見

a) 抗HB応答：

コーティング抗原としてHBsAg(He p286)を用いて、E l i s aにより体液性応答(Igおよびアイソタイプ)を測定した。I I後14日目に、血清を分析した。

【 0 1 2 3 】

図1は、I I後14日目に個々の血清に関して測定した抗HB抗体応答を示す。

【 0 1 2 4 】

3-DMP Lを吸着するために適用されたプロトコール間の抗HB抗体応答に、差異は観察されなかった。Al(OH)₃単独またはAlPO₄単独(群C、DE)で、異なる比のAl(OH)₃およびAlPO₄をワクチン中に用いて(27905 EU/ml対30832または26670 EU/mlのGMT)。

40

【 0 1 2 5 】

VLPおよびHB抗原を含有する組合せ群GおよびHにおいて、HB単独(群C)と比較して(それぞれ、10635または15589 EU/ml対27905 EU/mlのGMT)、わずかに低い抗HB抗体応答が観察された。E7/HB組合せで得られたGMTは、19235 EU/mlに達した。

【 0 1 2 6 】

統計学的分析の前に、データ排除のために各集団に関して、T-Grubbs検定を適用した。群C中の1匹のマウスを分析のために除去した。

【 0 1 2 7 】

50

II 後データの対数変換後に、抗HB力価に関して分散の一方分析を実施した。処方物間に有意差が観察された（ p 値=0.0108）。次に多重比較のためにStudent Newman Keuls検定を適用した。群H（VLP/HB）または群F（HB/E7）組合せ対群C（HBAS04C）間に、統計学的有意差は観察されなかった。統計学的有意差は、群G（VLP/HB）および群C（HBAS04C）間に示された（ p 値=0.0291）が、しかしながら2群の95%信頼区間は重複し、2.5比率に達するその差は、生物学的に関連がない。

【0128】

プール血清に関して分析されたアイソタイプ再分配は以下のとおりであって、6群間に大きな差異を示さなかった。

【0129】

【表4】

	アイソタイプ再分配 (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
群C	59	31	10
群D	69	19	12
群E	66	19	15
群F	61	22	17
群G	61	30	9
群H	46	29	25

【0130】

b) 抗E7応答:

コーティング抗原としてPD11/3 16E7 2Mを用いて、Eliisaにより体液性応答（Igおよびアイソタイプ）を測定した。II後14日目に、群BおよびFの血清を分析した。

【0131】

図2は、II後14日目に個々の血清に関して測定した抗E7抗体応答を示す。

【0132】

わずかな低減が抗E7応答で観察された。HB/E7組合せに関するGMTはE7単独と比較して、2倍低減した（9626対22447 EU/ml）。これは、Student Newman Keuls検定を用いて、統計学的に非有意であることが確定された。

【0133】

2つの処方物により誘導されたアイソタイププロフィールに差異は観察されなかった。下表に報告されるように、主としてIgG1応答（IgG1の97~98%）。

【0134】

プール血清に関して分析されたアイソタイプ再分配は以下のとおりであった。

【0135】

【表5】

10

20

30

40

	アイソタイプ再分配 (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
群B	98	0	1
群F	97	1	2

【0136】

10

c) 抗VLP16 応答:

コーティング抗原としてVLP16503-1(20/12/99)を用いて、Eliisaにより体液的応答(Ig)を測定した。II後14日目に、血清を分析した。

【0137】

図3は、II後14日目に個々の血清に関して測定した抗VLP16Ig抗体応答を示す。

【0138】

HBおよびVLPの組合せ(群GおよびH)を用いて免疫感作後に、一価VLP処方物(群A)を用いた場合と同様の抗VLP16力価を得た(19570または23448 EU/ml対30311 EU/mlのGMT)。

20

【0139】

3-DMP Lを吸着するための方法を用いて調製にされた2つの組合せ間に、等価力価が観察された。Al(OH)₃単独(群G)をAl(OH)₃およびAlPO₄(群H)上での混合吸着と比較(19570 EU/ml対23448 EU/mlのGMT)。

【0140】

分散検定の一方分析を用いて、これらの差は統計学的に有意でないことが示された。

【0141】

d) 抗VLP18 応答:

コーティング抗原としてVLP18504-2(25/10/99)を用いて、Eliisaにより体液的応答(Ig)を測定した。II後14日目に、血清を分析した。

30

【0142】

図4は、II後14日目に個々の血清に関して測定した抗VLP18Ig抗体応答を示す。

【0143】

HBおよびVLPの組合せ(群GおよびH)または一価VLP処方物(群A)を用いて免疫感作後に、同様の抗VLP18力価を得た(37285または51202 EU/ml対56504 EU/mlのGMT)。

【0144】

3-DMP Lを吸着するための方法を用いて調製にされた組合せ間に、等価力価(群GおよびH)が観察された。Al(OH)₃単独(群G)をAl(OH)₃およびAlPO₄(群H)上での混合吸着と比較。

40

【0145】

分散検定の一方分析を用いて、これらの差は統計学的に有意でないことが示された。

【0146】

2. 細胞性免疫応答

細胞性免疫応答(リンパ増殖、IFN / IL5産生)を、HB、E7またはVLP抗原を用いた脾臓細胞のインビトロにおける再刺激後、II後14日目に評価した。各群のマウスに関しては、5つの臓器のプールを設定した。

【0147】

実験手法は、材料と方法の項に詳述されている。

【0148】

50

3. サイトカイン生産

a) HBによるインビトロにおける再刺激

図5は、HBによる96時間インビトロにおける再刺激後の脾臓細胞においてモニタリングされたサイトカイン生産を示す。

【0149】

全群に関して低IFN- γ およびIL-5生産が観察されたが、しかし表2に示されているように、IL-5生産と比較してより高いIFN- γ の生産が観察され、IFN- γ /IL-5比は、匹敵するTH1応答が一価および混合ワクチンを用いて誘導されることを示す。閾値より低いデータは再刺激に対する抗原の非存在を示し得るので、群C結果は、考慮に入れるべきでない。

【0150】

【表6】

表2：HBsによるインビトロにおける再刺激後のIFN- γ /IL-5比

比 IFN/IL-5	群C	群D	群E	群F	群G	群H
HBs 10 μ g/ml	0.3	4.0	9.4	7.9	7.9	6.6
HBs 1 μ g/ml	0.4	3.7	1.5	4.0	4.0	5.0

【0151】

b) E7によるインビトロにおける再刺激

図6は、E7抗原による96時間インビトロにおける再刺激後の脾臓細胞においてモニタリングされたサイトカイン生産を示す。

【0152】

用量範囲効果は、再刺激のための10 μ gおよび1 μ g Ag用量と比較した場合、観察されなかった。

【0153】

再刺激のための10 μ g Agを用いて、HPV16/18L1 VLP免疫感作群に関して、非特異的応答が観察された。

【0154】

IFN- γ は、IL-5に比して非常に高濃度で産生され(表3)、これは、評価された全群における免疫応答の明らかなTH-1プロフィールを示す(一価対組合せ)。

【0155】

【表7】

表3：E7によるインビトロにおける再刺激後のIFN- γ /IL-5比

比 IFN/IL-5	群B	群F
E7 10 μ g/ml	17.7	12.9
E7 1 μ g/ml	8.9	1.2

【0156】

c) VLP16および18によるインビトロにおける再刺激

図7および8は、II後14日目のVLP16またはVLP18によるインビトロにおける再刺激後のリンパ増殖を示す。

【0157】

10 μg Ag 再刺激用量に関して約30000cpmでVLP (組込み刺激指数12~29) を含有する全処方物に関して、比較可能プロフィールが観察されたが、これは、この読取り時の異なる処方物間の干渉の非存在を示す。

【0158】

図9は、VLP16による96時間インビトロにおける再刺激後の脾臓細胞でモニタリングされたサイトカイン生産を示す。

【0159】

図10は、VLP18による96時間インビトロにおける再刺激後の脾臓細胞でモニタリングされたサイトカイン生産を示す。

【0160】

用量範囲効果は、両サイトカイン生産に関していずれかのVLP抗原による再刺激のための10 μgおよび1 μg Ag用量を用いて観察されなかった。

【0161】

全処方物に関して、明らかなTH-1プロフィールが観察された。

【0162】

【表8】

10

表5 : VLP16とVLP18によるインビトロにおける再刺激後のIFN-γ/IL-5比

比 IFN/IL-5	群A	群G	群H
VLP16 10 μg/ml	12.0	19.9	16.5
VLP16 1 μg/ml	22.1	37.9	23.2

20

比 IFN/IL-5	群A	群G	群H
VLP18 10 μg/ml	20.5	17.9	13.4
VLP18 1 μg/ml	21.8	23.7	21.0

30

【0163】

結論

免疫原性に及ぼすAS04中に処方されたVLP/HBまたはE7/HBAgの組合せの作用を、Balb/Cマウスで評価した。

【0164】

血清学的分析に関しては、Ag組合せの干渉は、抗HB、抗E7および抗VLP血清学的知見に関しては観察されなかった。

【0165】

VLPおよびHBまたはE7およびHB抗原の組合せは、一価ワクチンにより表示される抗体応答のアイソタイププロフィールを妨げなかった。

40

【0166】

3-DMP L (Al(OH)₃、AlPO₄またはAl(OH)₃およびAlPO₄の混合物)の吸着方法は、血清学的結果を妨害しない。

【0167】

リンパ増殖検定では、結果は、VLPによる再刺激後に入手可能であった。これらの群では、Agの組合せの負の作用は、増殖性応答に関しては観察されなかった。

【0168】

サイトカイン評価に関しては、HB Agによる再刺激後に低サイトカイン生産(IL-5およびIFN-)を得たが、しかし応答は、一価および混合ワクチンにおいて比較可能であった。E7による、またはVLPによる再刺激後、一価群と比較して、E7/HB

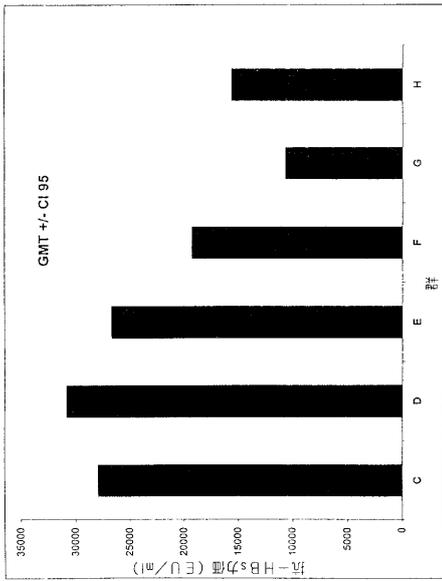
50

において、またはVLP/HB組合せにおいてそれぞれ匹敵するサイトカインレベルを生じた。各一価ワクチンを用いて観察されたTH-1プロフィールは、混合ワクチン群に保存された。

【 図 1 】

FIGURE 1: 11 後 14 日 目 に お け る M E D 1 9 9 0 4 / P I M S 1 9 9 5 0 7 3 9
抗-HB 抗体

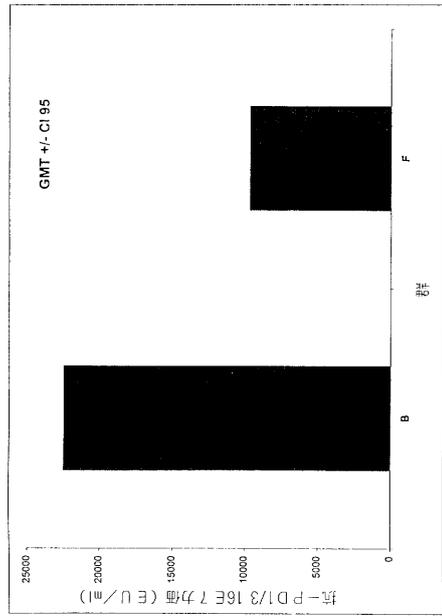
個体血清についての結果 (E.U./ml)



【 図 2 】

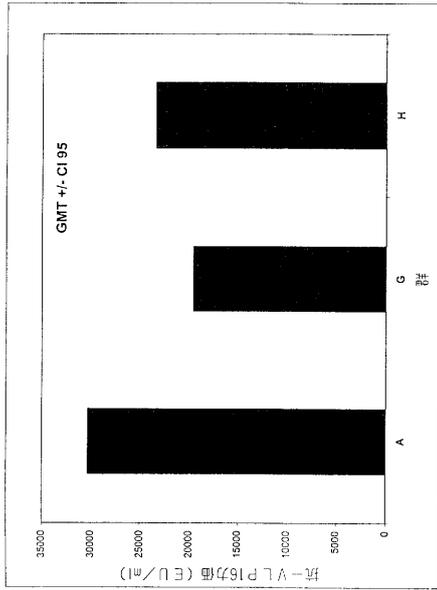
FIGURE 2: 11 後 14 日 目 に お け る M E D 1 9 9 0 4 / P I M S 1 9 9 5 0 7 3 9
抗-PD1/318E7 抗体

個体血清についての結果 (E.U./ml)



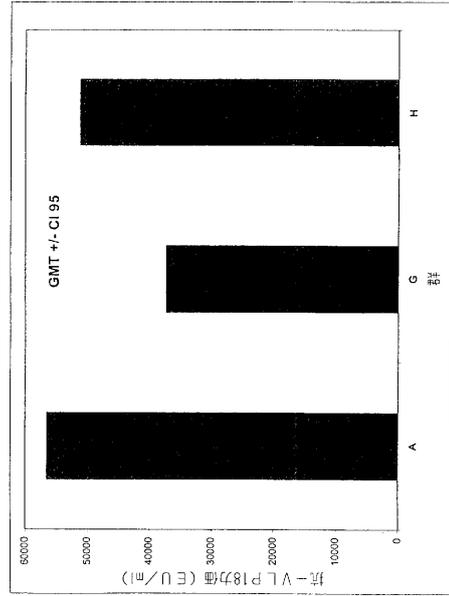
【 図 3 】

FIGURE 3: Ⅱ後14日目におけるMEDI9904/PIMS19990739
抗-VLP16抗体
個体血清についての結果 (EU/ml)



【 図 4 】

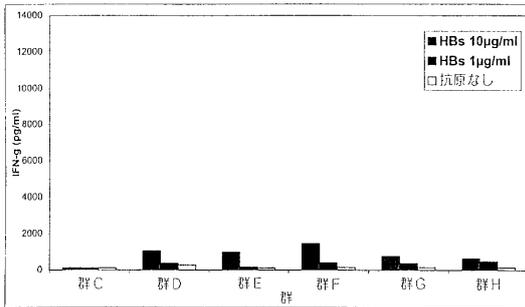
FIGURE 4: Ⅱ後14日目におけるMEDI9904/PIMS19990739
抗-VLP18抗体
個体血清についての結果 (EU/ml)



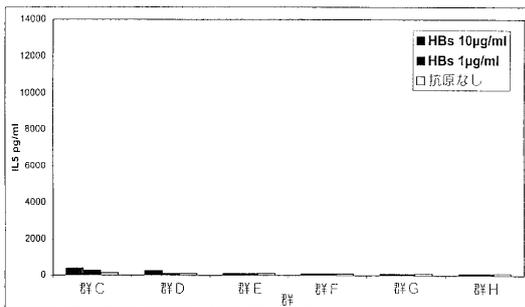
【 図 5 】

FIGURE 5: Ⅱ後14日目におけるMEDI9904/PIMS19990739
サイトカイン結果

HBsによるインビトロにおける刺激後のIFN- γ 生産



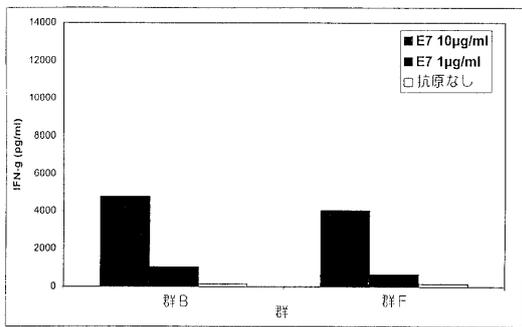
HBsによるインビトロにおける刺激後のIL-5生産



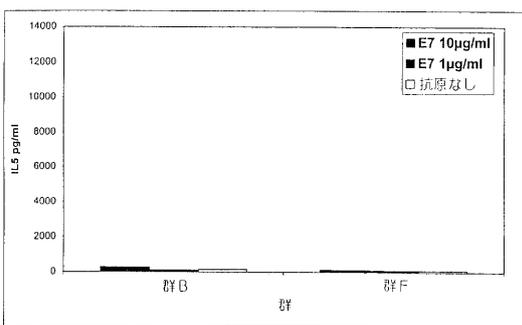
【 図 6 】

FIGURE 6: Ⅱ後14日目におけるMEDI9904/PIMS19990739
サイトカイン結果

PD 1/3 E7によるインビトロにおける刺激後のIFN- γ 生産



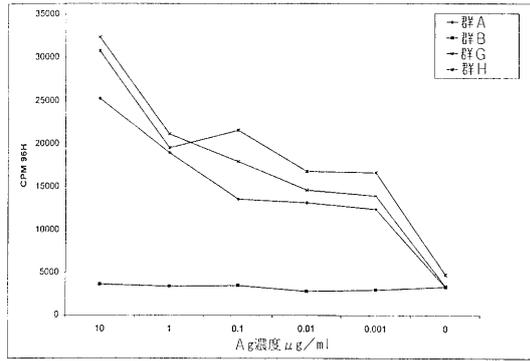
PD 1/3 16E7によるインビトロにおける刺激後のIL-5生産



【 図 7 】

FIGURE 7: MED I 9904/P I M S19990739リンパ球増殖結果

II後14日目におけるVLP16によるインビトロにおける刺激

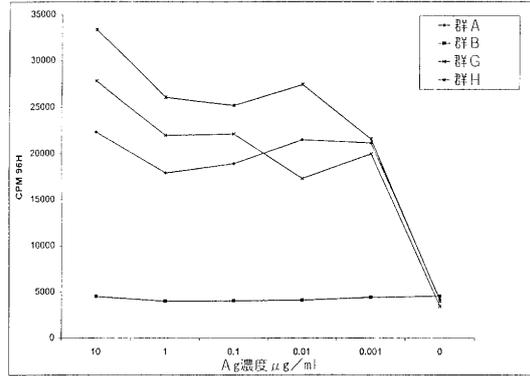


	Group A	Group B	Group C	Group D
10	32241	2626	2121	3072
1	1846	3100	2124	1928
0.1	1768	2495	1915	2151
0.01	1118	2297	1478	1017
0.001	1281	266	1981	1926
0	1286	2116	222	424

【 図 8 】

FIGURE 8: MED I 9904/P I M S19990739リンパ球増殖結果

II後14日目におけるVLP18によるインビトロにおける刺激

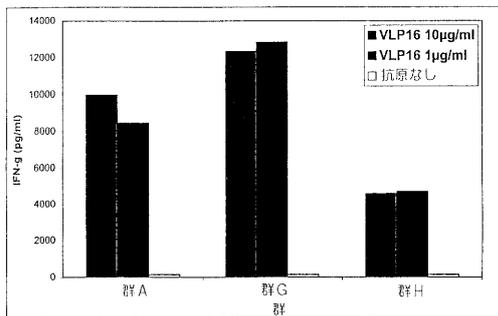


	Group A	Group B	Group C	Group D
10	33241	4428	2724	3124
1	17410	3019	2145	2807
0.1	1864	4121	2246	2113
0.01	2128	406	17213	2726
0.001	2706	4261	16261	2122
0	4113	4561	3396	3996

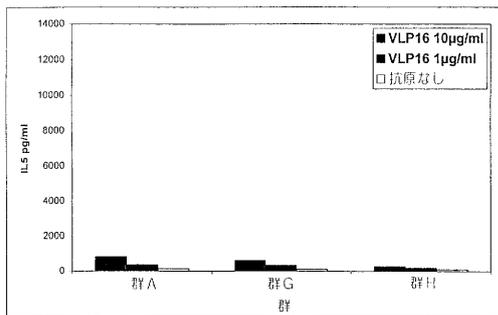
【 図 9 】

FIGURE 9: II後14日目におけるMED I 9904/P I M S19990739 サイトカイン結果

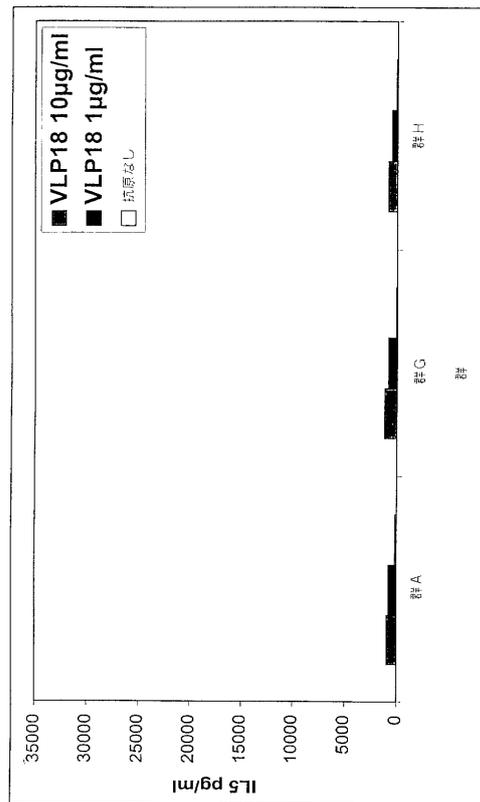
VLP16によるインビトロにおける刺激後のIFN-γ生産



VLP16によるインビトロにおける刺激後のIL-5生産



【 図 10 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22

(72)発明者 ウェッテンドルフ, マルティーン アンヌ セシール
 ベルギー国, ベー - 1 3 3 0 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 8 9, スミスクラ
 イン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第98/040100(WO, A1)
 国際公開第98/015287(WO, A1)
 特表平07-505372(JP, A)
 Vaccine, 1996年, vol.14, no.16, p.1485-1494
 Biologija, 1997年, no.1, p.44-46

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/29
 A61K 39/012
 A61K 39/02
 A61K 39/12
 A61K 39/39
 A61K 47/22
 A61K 47/24
 A61K 47/28
 A61K 47/36
 A61P 31/12
 A61P 31/22
 BIOSIS(STN)
 CAplus(STN)
 EMBASE(STN)
 MEDLINE(STN)