

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601823号
(P4601823)

(45) 発行日 平成22年12月22日 (2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日 (2010.10.8)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 G
A 6 1 K 9/50 (2006.01)	A 6 1 K 9/50
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51
A 6 1 K 39/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/10
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 12 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-567236 (P2000-567236)	(73) 特許権者	508326460
(86) (22) 出願日	平成11年8月31日 (1999.8.31)		メリオン リサーチ スリー リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-523470 (P2002-523470A)		Merrion Research I I
(43) 公表日	平成14年7月30日 (2002.7.30)		l Limited
(86) 国際出願番号	PCT/IE1999/000086		アイルランド国 2 ダブリン トリニテ
(87) 国際公開番号	W02000/012124		ィー カレッジ エンタープライズ セン
(87) 国際公開日	平成12年3月9日 (2000.3.9)		ター バイオテクノロジー ビルディング
審査請求日	平成18年8月31日 (2006.8.31)		サード フロア
(31) 優先権主張番号	60/098,759	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成10年9月1日 (1998.9.1)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089705
前置審査			弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経口ワクチン組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬学的に許容できる担体、及び少なくとも50%のマイクロパーティクルの直径が5µmより小さくなるようにサイズ調整されている、少なくとも2つの亜集団のマイクロパーティクル(マイクロパーティクルの各亜集団は乳酸及びグリコール酸又はそれらの鏡像異性体のコポリマーを含む生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された異なる抗原を含み、ここで、該抗原が不活化百日咳毒素(P T d)及び線維状赤血球凝集素(F H A)である)の薬学的に有効な量を含む、経口投与用のワクチン製剤。

【請求項 2】

マイクロパーティクルが、少なくとも50%の該マイクロパーティクルの直径が3µmより小さくなるようにサイズ調整された、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 3】

マイクロパーティクルが溶媒蒸発法を用いて形成される、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 4】

薬学的に許容できる担体、及び少なくとも50%のナノパーティクルの直径が600nmより小さくなるようにサイズ調整されている、少なくとも2つの亜集団のナノパーティクル(ナノパーティクルの各亜集団は乳酸及びグリコール酸又はそれらの鏡像異性体のコポリマーを含む生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された異なる抗原を含み、ここで、該抗原が不活化百日咳毒素(P T d)及び線維状赤血球凝集素(F H A)で

ある)の薬学的に有効な量を含む、経口投与用のワクチン製剤。

【請求項5】

ナノパーティクルが、少なくとも50%の該ナノパーティクルの直径が500nmより小さくなるようにサイズ調整された、請求項4に記載のワクチン製剤。

【請求項6】

ナノパーティクルがコアセルベーション法を用いて形成される、請求項4に記載のワクチン製剤。

【請求項7】

少なくとも50%のマイクロパーティクルの直径が5 μ mより小さくなるようにサイズ調整されている、少なくとも2つの亜集団のマイクロパーティクル(マイクロパーティクルの各亜集団は乳酸及びグリコール酸又はそれらの鏡像異性体のコポリマーを含む生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された異なる抗原を含み、ここで、該抗原が不活化百日咳毒素(PTd)及び線維状赤血球凝集素(FHA)である)の薬学的に有効な量を対象に経口的に投与することによって特徴づけられる、百日咳菌抗原に対する防御免疫応答を誘導するためのワクチン製剤。

10

【請求項8】

マイクロパーティクルが、少なくとも50%の該マイクロパーティクルの直径が3 μ mより小さくなるようにサイズ調整された、請求項7に記載のワクチン製剤。

【請求項9】

マイクロパーティクルが溶媒蒸発法を用いて形成される、請求項7に記載のワクチン製剤。

20

【請求項10】

少なくとも50%のナノパーティクルの直径が600nmより小さくなるようにサイズ調整されている、少なくとも2つの亜集団のナノパーティクル(ナノパーティクルの各亜集団は乳酸及びグリコール酸又はそれらの鏡像異性体のコポリマーを含む生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された異なる抗原を含み、ここで、該抗原が不活化百日咳毒素(PTd)及び線維状赤血球凝集素(FHA)である)の薬学的に有効な量を対象に経口的に投与することによって特徴づけられる、百日咳菌抗原に対する防御免疫応答を誘導するためのワクチン製剤。

【請求項11】

30

ナノパーティクルが、少なくとも50%の該ナノパーティクルの直径が500nmより小さくなるようにサイズ調整された、請求項10に記載のワクチン製剤。

【請求項12】

ナノパーティクルがコアセルベーション法を用いて形成される、請求項10に記載のワクチン製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、経口ワクチン製剤に関する。詳細には、本発明は、ポリマーパーティクル内に取り込まれた、又はカプセル化された抗原を含む経口マイクロパーティクル及びナノパーティクルワクチン製剤に関する。

40

【0002】

技術背景

放出制御された抗原輸送システムは、ワクチン担体の継続的な探索において、相当な関心を引き付けていた。抗原の徐放性におけるポリママトリックスの効果は、1979年、皮下移植用にウシ血清アルブミンを非分解性エチレン-ビニルアセテートコポリマーのペレットに取り込ませたものを用いて最初に示された(Preisら、J. Immunol. Methods 28, 193-197 (1979))。この組成物は、投与後6ヶ月間、抗体産生応答を誘導し、完全フロイントアジュバント内の抗原全量を同量にした2回の接種に類似した抗体レベルを与えた。

【0003】

50

より最近になって、アルミニウム塩（例えば、W094/15636 (CSL Ltd.)参照）、及びポリ（L-ラクチド）（以降、PLA）及びポリ（DL-ラクチド-グリコリド）（以降、PLGA）のような生分解性ポリマーがワクチン抗原の担体として使用されるようになった。W095/11008 (Genentech Inc.) は、マイクロスフィア中のラクチドとグリコリドの比が100:0から0:100の重量パーセントの範囲で変化し、PLGAポリマー固有の粘性が0.1 - 1.2dl/gの範囲で変化し、及びマイクロスフィアの直径の中央値が20 - 100 μm の範囲で変化する、抗原をカプセル化するPLGAのマイクロスフィアの用途について開示している。抗原は、延長された期間中、3段階様式でマイクロスフィアから連続して放出される。抗原をマイクロスフィアにカプセル化する方法もまた開示している。

【0004】

Eldridgeらは、ブドウ状球菌の腸毒素B (SEB) ワクチンを含む、生分解性PLA又はPLGAマイクロスフィアの経口投与が小腸のパイエル板に吸収されることを報告している (J. Controlled Release 11, 205-214 (1990))。取り込みは、直径が10 μm 以下のパーティクルに制限される。5 μm 未満のマイクロスフィアの大部分は、放出された抗原が血清抗体産生応答を刺激する全身性リンパ様組織（脾臓のような）に輸送されることが観察された。5 μm より大きいマイクロスフィアの大部分は、パイエル板に保持されることが見出された。EP0266119 (The UAB Research Foundation & Southern Research Institute) は、パイエル板によって選択的に捕獲され得る10 μm 未満か、又は10 μm に等しいマイクロカプセルを形成するために、生分解性ポリマー賦形剤にカプセル化された、抗原のような生理活性物質を含む経口組成物を教示している。同様に、EP0333523 (The UAB Research Foundation & Southern Research Institute) 及びそれから分割したEP0706792は、抗原のような生理活性物質を粘膜関連リンパ組織 (MALT) に輸送するための組成物であって、MALTへの選択的吸収、及び保持用に、1 - 5及び5 - 10 μm の間のサイズを有するマイクロカプセルを含む組成物を教示している。

【0005】

EP0686030 (Gesellschaft zur Förderung der Industrieorientierten Forschung) は、体液性応答及び細胞性応答を誘発するために、モデル抗原を生分解性バイオポリマーに包埋すること、及び分散形状をとってそれを接種することによって、免疫応答を増す方法を教示している。この事例において、PLGAに取り込まれた抗原は、長期継続的なTヘルパー、抗体及び細胞障害性T細胞応答を引き起こすことが示された。Mooreらは、PLGA溶媒を蒸発したマイクロスフィアに取り込まれたHIV gp120が点鼻、皮下又は腹腔内投与でマウスの脾臓T細胞において細胞溶解活性 (CTL) を誘導し得ることを開示している (Vaccine 18, 1741-1749 (1995))。この抗原に対して、抗HIV特異的CD4+及びCD8+ T細胞が誘導され、それぞれ T_H1 細胞及びCTLの誘導を導く。卵白アルブミン (OVA) を腹腔内に免疫した場合、Maloyらは、OVA - PLGAマイクロスフィアを用いた1回の皮下免疫は有意なOVA特異的応答を感作し、及び強力なOVA特異的CTL応答はマウスに腹腔内免疫後に見い出されたことを開示している (Immunology 81, 661-667 (1994))。Newmanらは、マウスに皮下輸送後 T_H1 型免疫応答を誘導するために、PLGAマイクロスフィアに組み込まれたOVAペプチドの用途を開示している (J. Controlled Release 54, 49-59 (1998))。

【0006】

T_H1 （細胞を媒介した）及び T_H2 （体液性/抗体）型応答に関する免疫応答の型の区別は、それぞれ細胞内病原体又は細胞外毒素によって誘導される感染症に対しての防御にとって重要である。抗体のサブクラス及びサイトカインの形状に従って、CD4+リンパ球を T_H1 及び T_H2 に分類することは、結果的にアジュバントを類別する試みへと導いた。例えば、水酸化アルミニウム（ミョウバンとも呼ばれる）は、 T_H1 より T_H2 免疫を誘導する能力が高いと考えられる（例えば、Menら、Vaccine 13, 683-689 (1995)参照）。US5,417,986 (US Army) は、CFA（完全フロイントアジュバント）及びHepB sAg（B型肝炎表面抗原）のような抗原を有し、しかも動物の体内で抗体とT細胞増殖の両方を与えるために接種したPLGAマイクロスフィアの充填について記載している。

【0007】

10

20

30

40

50

上記引用文献及び当該技術分野における他の文献のレビューは、所定のアジュバントと組み合わせた抗原によって誘導される免疫応答の特性を予測し、又は予測するための一般的な方法はないことを示している。

【0008】

百日咳菌、フィムブリエ (fimbriae)、線維状赤血球凝集素 (FHA)、不活化百日咳毒素 (PTd) 及びパータクチン (pertactin) 抗原に関しては、全てPLGAマイクロスフィアに組み込み、様々な経路で個別に投与し、及び抗原全てが百日咳のマウスモデルにおける攻撃 (challenge) に応じて、感染に対して防御することが示された (例えば、Shahinら、Infection and Immunity 63, 1195-1200 (1995); Jonesら、Infection and Immunity 64, 489-494 (1996); Cahillら、Vaccine 13, 455-462 (1995)を参照)。WO93/21950 (Roberts及びDougan) は、FHA及びパータクチン抗原が混合物として、又はPLGAに組込まれ、粘膜部位に輸送された場合に免疫原性となることを教示している。Singhら、同じポリマーパーティクル内に同時に取り込まれた2つの抗原をラットに非経口輸送後、それぞれの試薬に対する抗体産生応答を誘導し得ることについて記載している (Vaccine 16, 346-352 (1998))。百日咳を空気感染したマウスモデルは、子供における百日咳ワクチンの効力と一致し (Millsら、Infection and Immunity 66, 594-602 (1998))、及び T_H1 細胞が細菌クリアランスにおいて重要な役割を果たす (Millsら、Infection and Immunity 61, 399-410 (1993)) という証拠がある。Ryanらによるさらに進んだ研究は、子供において強力な全細胞の百日咳ワクチンの長期の防御免疫が T_H1 細胞によって主として媒介されることを示している (Immunology 93, 1-10 (1998))。無細胞の百日咳ワクチンは、 T_H1 細胞と T_H2 細胞の混在した集団に関連するらしく、及びそれらの長期の効験は知られていない。

10

20

【0009】

上述した公知技術にもかかわらず、所定のワクチン製剤によって生ずる免疫応答の型を予測し、及び制御し得ることが免疫学研究の中心的な目的として残っている。これは、免疫応答の T_H1 及び T_H2 成分の相対的な重要性の、疾患から疾患への変化を与えているので、とりわけ真実である。例えば、 T_H1 応答は、ウイルス、細胞内病原体及びいくつかの癌のクリアランスにおいて重要である細胞障害性T細胞活性に加わることができる。

【0010】

したがって、特定の試薬、例えば感染性又は病原性試薬に対する防御免疫を提供し得る経口ワクチンを提供することが本発明の目的である。生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された少なくとも1つの抗原を有するマイクロパーティクルを含む経口防御ワクチン製剤を提供することも付加的な目的である。

30

【0011】

本発明の更なる目的は、百日咳菌ワクチンの調製に使用する改良した組成物、及び百日咳菌に対するワクチンの方法を含む。

発明の開示

本発明により、効果的で防御免疫応答が、ポリマータイプ、充填方法及びサイズの適当な組み合わせを用いて生分解性ポリマーに取り込まれた、又はカプセル化された抗原を含むマイクロパーティクル及び/又はナノパーティクルの経口投与によって誘導され得ることが、驚くべきことに見い出された。

40

【0012】

したがって、本発明は、試薬 (agent)、例えば、感染性試薬 (infectious agent)、病原性試薬 (pathogenic agent)、又は癌試薬 (cancer agent) に対する防御免疫を誘導する方法を提供するものであり、患者 (哺乳動物等、好ましくはヒト) に、少なくとも50%のマイクロパーティクルが $5\mu\text{m}$ より小さく、好ましくは $3\mu\text{m}$ より小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された抗原を含むマイクロパーティクルを経口投与することを含む方法を提供する。経口投与用ワクチン製剤であって、少なくとも50%のマイクロパーティクルが $5\mu\text{m}$ より小さく、好ましくは $3\mu\text{m}$ より小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれ

50

た、又はカプセル化された抗原を含むマイクロパーティクルを含む該ワクチン製剤も提供する。

【0013】

したがって、本発明は、試薬、例えば、感染性試薬、病原性試薬、又は癌試薬のような試薬に対する防御免疫を誘導する方法を提供するものであり、患者（哺乳動物等、好ましくはヒト）に、少なくとも50%のナノパーティクルが600nmより小さく、好ましくは500nmより小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された抗原を含むナノパーティクルを経口投与することを含む方法を提供する。経口投与用ワクチン製剤であって、少なくとも50%のナノパーティクルが600nmより小さく、好ましくは500nmより小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された抗原を含むナノパーティクルを含む該ワクチン製剤も提供する。

10

【0014】

本発明はまた、百日咳菌に対する防御免疫を与える方法を提供するものであって、患者に、少なくとも50%のマイクロパーティクルが5 μ mより小さく、好ましくは3 μ mより小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された少なくとも1つの百日咳菌を含むマイクロパーティクルを経口投与することを含む前記方法も提供する。また、本発明は百日咳菌に対する防御免疫を与える方法を提供するものであって、患者に、少なくとも50%のナノパーティクルが600nmより小さく、好ましくは500nmより小さくなるようにサイズ調整されており、生分解性ポリマーによって取り込まれた、又はカプセル化された少なくとも1つの百日咳菌を含むナノパーティクルを経口投与することを含む前記方法も提供する。好ましくは、マイクロパーティクル又はナノパーティクルが、少なくとも2つの百日咳抗原、例えば不活化百日咳毒素又はFHAを含む。

20

【0015】

好ましくは、抗原は投与時に免疫応答を誘発することができ、該抗原が生体適合性、生分解性ポリマー担体材料内に取り込まれる、及び/又はカプセル化される。好ましくは、抗原をポリマー担体材料内に取り込み、及び/又はカプセル化する方法には、溶媒蒸発法又はコアセルベーション法がある。

【0016】

さらに、本発明は、百日咳菌から予防する方法に関連するものであり、該方法はポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）パーティクルにカプセル化された少なくとも1つの百日咳菌抗原、例えば、不活化百日咳毒素及び/又はFHAを含む組成物の投与を含み、ここで、ポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）パーティクルへの百日咳菌抗原のカプセル化は、溶媒蒸発法又はコアセルベーション法によって実行され、及び投与は経口である。

30

【0017】

ポリマーパーティクルに充填された抗原を含むワクチン製剤は、当該技術分野において知られているが、一方、本発明によって、生体適合性担体材料の選択、生物学的活性試薬を充填する方法（即ち、生物学的活性試薬を生体適合性、生分解性ポリマー材料上、及び/又はその中に吸着する、及び/又はカプセル化する方法）、及び投与経路は、全て、生じる免疫応答の特性を決定するための要素を与えていることが見い出された。上記に列挙した決定因子の適切な組み合わせによって、極性免疫応答を誘発する組成物を調製することができる。免疫応答の分極化は、 T_H1 及び T_H2 指標、典型的には T_H1 及び T_H2 応答それぞれに特異的な IFN- γ 、TNF、IL-2若しくは IL-12、及び IL-5、IL-4、IL-6若しくは IL-10のようなサイトカインの相対的な割合を決定することによって特徴付けることができる。

40

【0018】

本発明の実施に適した生物学的活性試薬は、典型的には、分極した T_H1 免疫応答、分極した T_H2 応答、又は混在した T_H1 / T_H2 応答を投与に基づいて誘発することが可能な抗原である。好ましい抗原は、PTd、不活化百日咳毒素又はパータクチン；FHA、線維状赤

50

血球凝集素；TT、破傷風菌トキソイド；HIV gp-120；B型肝炎表面抗原；DT、ジフテリアトキソイド；HSV、単純疱疹1型；HPV、ヒトパピローマウイルス；ポリオ；インフルエンザエピトープ；H.ピロリ；赤痢菌；コレラ菌；サルモネラ菌；ロタウイルス；RSV、呼吸器ウイルス；黄熱病；A型及びC型肝炎；髄膜炎菌A-C型；肺炎球菌；リーシュマニア属のような寄生虫；結核のようなマイコバクテリア；及び癌ワクチン抗原からなるリストより選択される抗原を含む。

【0019】

本明細書で使用される「防御免疫」という用語は、感染性試薬のような攻撃する試薬の導入後、好ましくは3週間以内に、より好ましくは2週間以内に、最も好ましくは数日以内に、患者からの、該攻撃する試薬の少なくとも75%、より好ましくは90%クリアランスを示す。

10

【0020】

本明細書で使用される「薬学的に有効な量」という用語は、その抗原に対する防御免疫を誘発するのに必要な抗原量を示す。例えば、マウスにおいて、防御免疫は、3回投与するといった多段階投与、又は1回投与で経口的に与えられるそれぞれの抗原について、100µgまでの範囲の百日咳菌抗原量で達成される。

【0021】

本明細書で使用されるマイクロパーティクル及び/又はナノパーティクルのサイズの言及は、走査電子顕微鏡及び/又は、指示があれば、レーザー光回折計の視覚評価によって決定されるようなサイズを示す。

20

【0022】

抗原の担体として使用される生体適合性、生分解性ポリマー材料の選択、及び担体を抗原で充填する方法は、到達される免疫応答の特性を明らかにすることにおいて重要であるということが見出された。好ましくは、生体適合性、生分解性ポリマーは、乳酸及びグリコール酸のコポリマーであり、例えば、50:50のポリ(D,L-ラクチド-コグリコリド)、ポリ(ラクチド-コグリコリド)、及びそれらの鏡像異性体、又は乳酸のポリマーであり、例えば、ポリ(ラクチド)及びその鏡像異性体ある。抗原は、溶媒蒸発型の工程又は噴霧乾燥の工程によって、好ましくは溶媒蒸発型の工程によって充填され得る。さらに、使用され得る充填工程の詳細を示す。

【0023】

発明を実施するための方法

下記の実施例からさらに正しく認識されるであろうけれども、抗原を充填したポリマーパーティクルによって誘発される免疫応答の特性は、1つの要素に依存するものではなく、多数の要素の組み合わせによって決定される。

30

【0024】

【実施例】

すべての百分率は、特に断りのない限り、重量(w/w)による。次の省略形は本実施例を通して使用される：KLH、スカシガイヘモシアニン；PTd、不活化百日咳毒素；FHA、線維状赤血球凝集素；PLA、ポリラクチド；PLGA、ポリラクチド-コグリコリド；DCM、ジクロロメタン；PVA、ポリビニルアルコール；PBS、リン酸緩衝溶液。

40

【0025】

実施例1 溶媒蒸発法を用いたKLH-PLGAマイクロパーティクルの調製

ジクロロメタン中のPLGA〔ポリ(D,L-ラクチド-コグリコリド)、50:50；i.v.=0.94d l/g；Boehringer Ingelheimによる供給〕のポリマー溶液（DCM10ml中、10%PLGA）を使用2時間前に調製し、続いて使用30分前に冷却した。抗原であるKLH（粉末としてCalbiochemによる供給）を2%PVAを含む水溶液（水1ml中、5.1mgのKLH）として調製した。第一の油中水滴型エマルジョンは、抗原溶液をポリマー溶液に添加し、氷上、24,000rpmで1分間ホモジナイズすることによって調製された。第二のウォーター-オイル-ウォーター(water-oil-water)型エマルジョンを形成するために、この第一の油中水滴型エマルジョンをPVA水溶液（40ml、3%PVA）中にゆっくり注入し、ホモジナイゼーションを15秒中断〔1分；15

50

秒中断；1分）で2分間継続した。ジクロロメタンを蒸発するために、得られたエマルジョンを2時間攪拌した。抗原を充填したパーティクルを遠心分離（10,000rpm、15分間）によって回収した（収率75％）。

【0026】

KLH - PLGAパーティクルの形態及びパーティクルサイズは、Leica Cambridge S360使用による走査性電子顕微鏡（SEM）によって検査された。試料をスタブに載せ、金被覆し、3,000 - 10,000倍の倍率で走査した。SEMによるパーティクルサイズの評価は、5,000倍又は10,000倍の顕微鏡写真を異なる場所に区分けし、3ミクロン及び5ミクロンより大きいか、小さいかによりパーティクル数をカウントすることによって行った。パーティクルサイズの決定、Malvern Mastersizer S Ver.2.14使用によるレーザー回折計によって行った。マイクロパーティクルは、ろ過した0.1% Tween 20に懸濁させ、5分間の超音波処理し、及び連続的に攪拌しながら解析した。上記で詳述したように調製したKLH - PLGAパーティクルは、滑らかな球表面、及び2.5 μmのD50%を有していることが見いだされた。SEMによって、少なくとも50%のパーティクルが5ミクロン未満の直径を有していることが見いだされた。

10

【0027】

マイクロパーティクルへの抗原の充填は、3mlの5% SDS / 0.1M NaOH中で10mgの充填したマイクロパーティクルを室温で連続的に振とうしながら、60時間まで分解することによって測定された。パーティクルはこの期間で完全に分解された。溶液のpHを0.1M HClでpH11.2に合わせ、蛋白質含有量をBicinchoninic酸（BCA）蛋白質アッセイキットを用いて測定した。抗原を含まない同量の対照パーティクルも分解した。充填を次のように計算した：

20

充填の実測値（μg/mg） = { 試料中の濃度（μg/ml） × 分解した全体積（ml） } / { パーティクル重量（mg） }

% 取り込み効率 = { 充填の実測値（μg/mg） × 100 } / { 充填の理論値（μg/mg） }

ここで、充填の理論値は、製剤に添加した抗原量を使用したポリマー量で割ることによって計算される。

【0028】

本実施例に従って調製したKLH - PLGAパーティクルは、パーティクル1mg当たり抗原3.1 μgという充填を有し、94%の取り込み効率であることが見いだされた。

充填したパーティクルからの抗原のin vitro放出は、次のように測定した：抗原を充填したマイクロパーティクル、及び対照マイクロパーティクル（同様な手法で調製され、抗原を含まない）を正確に秤り取り、静菌試薬としてのアジ化ナトリウム0.02%を含むPBS中に分散した。試料を37 °Cで水浴中に浸し、連続的に振とうした。適当な時間間隔で、2.2mlのアリコートを取注射器で採取し、ろ過した後、蛋白質含有量をBCAアッセイによって、二重に測定した。本実施例に従って調製したKLH - PLGAパーティクルは、1時間後には充填した抗原の80%を放出し、24時間後には充填した抗原の100%を放出することが見いだされた。

30

【0029】

上記で詳述した手順を繰り返して、KLH - PLGAマイクロパーティクルの第2バッチを形成した。この第2バッチのマイクロパーティクルは滑らかな球面のようであり、その少なくとも50%が5ミクロン未満であって、D50%が2.2 μmと測定され；充填は3.5 μg/mgであり、94%の取り込み効率を示していることが見出され；及び、測定により抗原の76%が1時間後に放出され、24時間後には90%が放出されていた。

40

【0030】

これらの2つのバッチより得られた抗原を充填したマイクロパーティクルは、下記の実施例5において検討したように、マウスにおける免疫原性の試験用に一緒にプールした。

【0031】

実施例2 溶媒蒸発法を用いたPTd - PLGAマイクロパーティクルの調製

上記の実施例1において記載した方法と本質的に同様の方法を用いて、PTd（Katetsukenにより供給）を充填したPLGAパーティクルを調製した。ポリマー溶液は15ml DCM中の6.7

50

%PLGAであり、抗原溶液は0.9%PVAを含む2ml水中の744 μg PTdであった。ウォーター - オイル - ウォータ型エマルジョンを形成するために、80mlのPVA水溶液（3%PVA）に第一の油中水滴型エマルジョンを注いだ。エマルジョンを一晩放置し、DCMを蒸発させた。回収後（収率88%）、冷却した高圧滅菌水（30ml）でマイクロパーティクルを洗浄した。

【0032】

これらのパーティクルの特徴は、下記の表1のPTd-1として認められるものであり、形成したマイクロパーティクルは、少なくとも50%のパーティクルが直径5ミクロン未満であり、外見上、滑らかな球面であることを示した。レーザー光回折は、マイクロパーティクルが2.5 μm のD50%を有していることを示した。マイクロパーティクルには、0.12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の抗原が充填されており、取り込み効率15%を示した。

10

【0033】

PTdを充填したマイクロパーティクルのin vitro放出は、次の方法に従ってされた：0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS（4.0ml）に30mgのマイクロパーティクルを分散した。試料を37℃で水浴に置き、連続的に振とうした。適当な時間間隔で、試料を水浴から取り出し、パーティクルをペレットにするために遠心分離した。上清を取り除き、蛋白質含有量を二重で測定した。新鮮なPBS3mlをマイクロパーティクルに添加し、沈殿状態を維持し、インキュベーションを続けた。本実施例に従って調製したPTd - PLGAパーティクル（PTd - 1）は1時間後、充填した抗原の22%を放出し、24時間後、充填した抗原の56%を放出していることが見い出され、その後、20日以上、2段階放出した。

20

【0034】

下記の表1にまとめたとように、種々の要素の数量を用いて、上記したような実質上同じ手順に従って、PTd - PLGAマイクロパーティクルの追加バッチを作製した。PTd - 2ないしPTd - 6バッチにおいて、初期の抗原溶液にPVAを添加せず、40mlの冷却した高圧滅菌水を使用して、回収したマイクロパーティクルを洗浄した。各場合において、得られた抗原を充填したマイクロパーティクルは、そのうち少なくとも50%が直径5ミクロン未満であり、外見上、滑らかな球面を有していることが見い出された。

【0035】

【表1】

バッチ No.	PTd (μg)	水溶液 体積 (ml)	% PLGA	DCM (ml)	3% PVA (ml)	充填 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	% EE	D50% (μm)	1時間 (%)	24時間 (%)
PTd-1	744	2	6.7	15	80	0.12	15	2.5	22	56
PTd-2	1536	1.0	4	10	40	1.2	31	3.0	30	
PTd-3	2760	1.5	4	20	80	1.3	33	3.3	*	*
PTd-4	3130	1.5	4	20	80	1.3	34	2.4	*	*
PTd-5	2140	2.0	4	20	80	1.1	42	3.2	*	*
PTd-6*	-	-	-	-	-	-	-	-	17	21

30

40

【0036】

3%PVAは、抗原/PLGA油中水滴型エマルジョンが添加されるPVA溶液の体積である；充填はマイクロパーティクルの抗原充填である；%EEは%取り込み効率である；D50%はマイクロパーティクルの平均直径である；1時間は1時間後に放出された抗原である；24時間は24時間後に放出された抗原である。*PTd - 3、PTd - 4及びPTd - 5から得られた充填したマイクロパーティクルを抗原放出アッセイ及びi.p.プロテクション試験用にプールした（下記の実施例7を参照）。

【0037】

実施例3 溶媒蒸発法を用いたFHA - PLGAマイクロパーティクルの調製

50

実施例 2 で使用した手順と実質上類似手順を使用して、FHAを充填したPLGAマイクロパーティクルを調製した。FHA - PLGAマイクロパーティクルの2つのバッチを調製した。これらの2つのバッチ（下記、表 2 においてFHA - 1及びFHA - 2）に対して、ポリマー溶液は、20ml DCM中の4%PLGAであり、抗原溶液はPVAを含まない2ml水中の0.87 µg FHAとした。第一の油中水滴型エマルジョンをPVA水溶液80ml（3%PVA）に滴加し、ウォーター - オイル - ウォ - タ型エマルジョンを形成した。これら2つのバッチの特徴は、下記の表 2 に示した。FHA - 1及びFHA - 2は抗原放出測定及びi.p. 防御試験用にプールされた（プールしたマイクロパーティクルは表 2 中でFHA - 3と示された）（下記の実施例 6 を参照）。SEM解析では、少なくとも50%のパーティクルが直径5ミクロンを有し、本質的に滑らかな球体であることを示した。

10

【 0 0 3 8 】

【表 2】

実施例No.	充填 (mg/mg)	%EE	D50% (µm)	1時間 (%)	24時間 (%)
FHA-1	0.94	87	3.0	*	*
FHA-2	1.09	100	4.3	*	*
FHA-3*	—	—	—	25	49

20

【 0 0 3 9 】

実施例 4 抗原を取り込んだ、又はカプセル化したナノパーティクルの調製

ポリマー、表面活性化試薬、表面安定化若しくは修飾試薬又は塩、又は界面活性化剤、好ましくは%加水分解率が50 - 100%であり、分子量範囲500 - 500,000を有し、最も好ましくは80 - 100%の加水分解率及び10,000 - 150,000の分子量を有するポリビニルアルコール（PVA）又は誘導体の水溶液（A）を容器に導入した。混合物（A）は、低いせん断条件下、10 - 2000rpm、好ましくは100 - 600rpmで攪拌された。この溶液のpH及び/又はイオン強度を、塩、緩衝液又は他の修飾試薬を用いて変化させてもよい。この溶液の粘性は、ポリマー、塩、又は他の粘性強化試薬若しくは修飾試薬を用いて変化してもよい。

【 0 0 4 0 】

30

ポリマー、好ましくはポリ（ラクチド - コグリコリド）、ポリラクチド、ポリグリコリド又はそれらの組み合わせ、又は任意の鏡像異性体を水混和有機溶媒に溶解し、有機相（B）を形成する。最も好ましくは、アセトン及びエタノールの組み合わせを、使用するポリマーに依存して、0 : 100のアセトン : エタノールから100 : 0のアセトン : エタノールの比率の範囲内で使用する。追加するポリマー、ペプチド、糖、塩、天然の/生物学的ポリマー、又は他の試薬も有機相（B）に添加し、得られるパーティクル産物の物理的及び化学的特性を変化させることができる。

【 0 0 4 1 】

抗原又は生理活性物質は水相（A）又は有機相（B）のいずれか一方に導入されてもよい。有機相（B）は、攪拌した水相（A）に連続的な速度で添加される。溶媒は、好ましくは周囲の温度の上昇、及び/又は真空ポンプの使用によって蒸発される。パーティクルは懸濁液（C）として得られる。

40

【 0 0 4 2 】

次に、パーティクル（D）は、標準的なコロイド分離技術を用いて、好ましくは高い'g'力（重量）による遠心分離、ろ過、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー又は電荷分離技術によって懸濁液（C）から分離される。上清を捨て、パーティクル（D）を洗浄溶液（E）、好ましくは水、塩溶液、緩衝液又は有機溶媒中に再懸濁する。パーティクル（D）は前述したような同じ手法で洗浄液から分離し、通常は2回再洗浄する。

【 0 0 4 3 】

50

その後、パーティクルを乾燥させてもよい。次に、パーティクルをさらに加工処理し、例えば、タブレット化、カプセル化又は噴霧乾燥してもよい。

上記で形成したパーティクルの放出様式は、使用される、及び/又は望まれる製剤に応じて、即効的な放出から制御的又は遅延的放出まで変化させることができる。

【0044】

抗原の充填は0 - 90%w/wの範囲内であってよい。

具体的な実施例は下記を含む：

PTd (168 µg/ml) 又はFHA (264 µg/ml) 溶液は最初に、25 で温度セットし、400rpmで攪拌しながら、PVA (mw=13000 - 23000 ; 98%加水分解) 溶液に分散させた。ポリマー溶液 (PLGAと、Boehringer Ingelheimによって供給されるRG504の50:50を有機相に溶解することによって調製される) をゆっくりと水相に添加するとコアセルベートが形成し、続く有機溶媒の蒸発によって硬化した。その後、ナノパーティクルを30分間、15,000rpmで遠心分離によって採取し、高圧滅菌した脱イオン水で3回洗浄した。湿性ペレットは、真空下、周囲の温度で乾燥させた。理論的な充填値が1.2%PTd (RG504H) 及び1.0%FHA (RG504) であるバッチを表3に従って調製した。

【0045】

【表3】

バッチ	5%w/v PVA soln.	PLGAポリ マー(g)	アセトン (ml)	エタノール (ml)	抗原 (ml)
1.2%PTd	257.1	1.976	45	5	142.9
1.0%FHA	243.2	1.485	33.33	4.17	56.8

【0046】

走査顕微鏡を使用して、ナノパーティクルの形態とサイズを評価した。ナノパーティクルをSEMのスタブに載せ、Emitech K550スパッターコーターを用いて25mA、3分にセットしてスパッターコートし、Leica Cambridge S360を用いて走査した。顕微鏡写真を500 - 20,000倍で撮影した。SEMによるパーティクルサイズ評価は、15,000倍の顕微鏡写真を異なる場所で分けし、600nm及び500nmより大きい、及び小さいパーティクル数をカウントすることによって行った。SEM解析は、ナノパーティクルが滑面を有する形態でほぼ球体であることを示した。少なくとも50%のパーティクルは、15kの倍率で600nm未満であったが、いくつか集合化している形跡があった。

【0047】

抗原充填は、実施例1で記述したように、ナノパーティクルの総蛋白質含有量をBCA蛋白質アッセイを用いて測定することにより測定した。本実施例に従って調製したナノパーティクルは、表4に示したように、力価及びカプセル化効率を有することが見出された。

【0048】

【表4】

バッチ	力価 (µg/ml)	カプセル化効率 (%)
1.2%PTd-RG504	3.3	27.5
1.0%FHA-RG504	4.6	45.6

【0049】

充填したパーティクルからの抗原のin vitro放出は、50mgのナノパーティクルを、ガラス管中において0.02%w/vアジ化ナトリウム含有PBS (pH7.4) 10ml中に懸濁し、37 でインキュベートすることによって測定した。予定した時間間隔で、試料3mlを採取し、放出し

た総蛋白質を上述したBCA蛋白質アッセイによって測定した。PTd - PLGA製剤は、最初の1時間で約45%の大きなバースト効果を示し、その後、24時間までは55%まで非常に緩やかな放出を示した。対比的に、FHA - PLGA製剤は1時間で14%、24時間後で18%までのかなり低いバースト放出を示した。

【0050】

実施例5 balb/cマウスへのKLH - PLGAパーティクルの経口投与における免疫応答

生分解性マイクロパーティクルに取り込まれたKLHの免疫原性は、経口胃管栄養法による経口免疫後のマウスにおいて評価し、空のマイクロパーティクルと組み合わせた溶液の同じ抗原の経口免疫と比較した。さらに、対照群には、可溶性抗原のみ及び空のPLGAマイクロパーティクルのみを含めた。実施例1の2つのバッチから得たマイクロパーティクルはプールされ、1ml当たり100 μ gの抗原に等しい濃度になるようPBS中に懸濁させ、又は低い投与量用に適宜希釈した。それぞれのマウスを第0週及び第4週で免疫し、最終免疫2週間後に免疫応答を評価した。

【0051】

【表5】

免疫原	応答	血清IgGタイター 平均値 (SD)
KLH-PLGA (100 μ g)	5/8	3.30 (0.4)
KLH-PLGA (10 μ g)	0/4	NA
KLH-PLGA (1 μ g)	0/4	NA
可溶性KLH (100 μ g) +空のPLGA	12/14	3.65 (0.5)
空のPLGA	0/14	NA

【0052】

血清及び粘液分泌作用（肺のホモジネート）をELISAによって抗KLH IgG及びIgA抗体レベルについて試験した。KLHマイクロパーティクルを用いた経口免疫は、肺分泌物中において、表3に示したような循環しているKLH特異的IgG、及び低レベルのIgAを生じた。細胞性免疫応答は、免疫したマウスの脾臓を用いて評価した。各実験群の4ないし6の別々のマウスから得た脾臓細胞を、ある範囲の抗体濃度（0.16~100 μ g/ml）で、二重の96ウェルマイクロプレートの三重のウェルで培養した。マイトジェンであるコンカナバリンA若しくはPMA及び抗CD3抗体、又は培養液のみをそれぞれポジティブ及びネガティブコントロールとして含めた。24及び72時間後、1枚のプレートから上清を採取し、サイトカイン解析用に-70 $^{\circ}$ Cで保存した。インターフェロン（IFN- γ ）及びインターロイキン-5（IL-5）は、それぞれ抗原特異的なT_H1及びT_H2サブポピュレーションの誘導の定量化マーカーとしてイムノアッセイにより測定された。加えて、培養T細胞の増殖を培養4日後、³H]-チミジン取り込みによって評価した。

【0053】

PLGAマイクロパーティクルに取り込まれた100 μ gのKLHを用いた経口免疫は、幅広い投与量の範囲でKLHを用いたin vitro刺激後、有意なT細胞増殖応答、及び脾臓細胞によって産生されたIFN- γ の高いナノグラムレベルを誘導した。ピコグラムレベルのIL-5もまた抗原で刺激した脾臓細胞の上清で検出されたが、そのレベルは相対的に低く、可溶性KLHを空のマイクロパーティクルと組み合わせて免疫した動物から得られた脾臓細胞で観察されるレベルに匹敵していた。全般的に、応答は、はっきりと、空のマイクロパーティクルと組み合わせた可溶性KLHを用いた場合にはT_H2に分極し、マイクロカプセル化したKLHを用いた場合にはT_H1に分極していた。図1は、第4週に2度目の免疫化後の免疫応答を示す。マイクロカプセル化したKLHに対するIL-5のレベルは、可溶性抗原+空のマイクロ

パーティクルを用いて観察されるレベルと匹敵したが、IFN- γ の産生は顕著に高かった。

【0054】

これらの結果は、PLGマイクロパーティクルへの可溶性抗原KLHの取り込みは、経口投与した場合、空のマイクロパーティクルと組み合わせた可溶性抗原で観察された場合よりもT細胞の増殖応答を増強することを示している。さらに、PLGAへの抗原KLHのカプセル化はT_H1細胞の誘導に有利であるらしい。

【0055】

投与量の効果は、経口経路による免疫後に明白となった。10 μ g以上の抗原（約2.8mgマイクロパーティクル中）の投与量は、検出可能な免疫応答を生じるのに必要とされた。高レベルのIFN- γ 産生及び中低レベルのIL-5は、PLGマイクロパーティクルに取り込んだ100 μ gのKLHで免疫したマウスから得た脾臓細胞の抗原刺激後に検出された。対象的に、T細胞サイトカイン産生及び抗体産生応答は、10又は1 μ gのマイクロカプセル化したKLHを用いた免疫後、弱く又は検出できなかった。

【0056】

実施例6 balb/cマウスへのPTd - PLGAパーティクルの経口投与に基づく免疫応答

実施例5の免疫強化と同様に、実施例2のPTd - 1バッチを経口免疫試験に使用し、5匹のbalb/cマウス群を、PLGAマイクロパーティクルに取り込んだ100 μ gのPTd、可溶性抗原のみ、及び空のPLGAマイクロパーティクルと混合した可溶性抗原を用いて、経口胃管栄養法によって免疫した。対象のマウスには、空のPLGAマイクロパーティクルを与えた。2回の免疫（第0週及び第4週）それぞれ2週間後に、マウスを屠殺し、血清及び肺を抗体解析用に回収し、及び脾臓をCMI試験用に回収した。PTd - PLGA群のマウス1匹は死亡し、群の残り4匹は実験を進めた。

【0057】

図2に示したように、T細胞の増殖応答の結果は、PLGAに取り込まれたPTdで免疫した4匹のマウスのそれぞれがin vitroでPTに対するポジティブな細胞増殖応答を与えたことを示している。その応答は、4匹全てのマウスにおいて、抗原の高い投与量で相対的に強く、また、4匹中3匹のマウスにおいて、抗原の低い投与量で高い有意差（刺激指標 > 3）であった。可溶性PTdで免疫したマウス5匹中2匹が、及び空のマイクロパーティクルと組み合わせた可溶性PTdで免疫した5匹中3匹が、ポジティブPT特異的応答を示した。空のPLGAで免疫したマウス5匹中1匹が、不活化PTに対してポジティブな応答を示し、しかし、それは高い抗原濃度に対するものであった。全てのマウスから得た脾臓細胞は、ポリクローナル活性PMA及び抗CD3抗体に応答した。

【0058】

図3に示したように、血清IgG応答の結果は、PLGAに取り込まれたPTdで免疫したマウス4匹のうち3匹が、PTに対して応答する血清抗体産生応答を発現したことを示している。終了点のタイターは、3.5 - 4.5の範囲であった。可溶性PTdで免疫したマウス4匹中2匹が、及び空のマイクロパーティクルと組み合わせた可溶性PTdで免疫した5匹中4匹が、4.0以上のタイターを有するポジティブなPT特異的抗体産生応答を示した。

【0059】

図5及び6は、第6週でのマウスの脾臓T細胞のサイトカイン解析を示し、マウスは、第0週及び第4週に経口胃管栄養法によって、PLGAに取り込まれた100 μ gのPTd、空のPLGAマイクロパーティクルを組み合わせた100 μ gの可溶性PTd、100 μ gの可溶性PTd、及び空のPLGAマイクロパーティクルで免疫された。個々のマウスから得た脾臓細胞は、不活化PT（百日咳菌）及びポジティブコントロールのPMA/抗CD3抗体で刺激された。培養3日後、上清をIL-5及びIFN- γ について特異的イムノアッセイにより試験した。T_H1及びT_H2の明白な分極は観察されなかった。脾臓T細胞の使用は、例えば、パイエル板又はメゾメンテリックなリンパ節に比べて、サイトカイン産生応答を観察することを困難にするかもしれない。しかしながら、上記で検討したように、T細胞増殖及び抗体産生応答は実在していた。

【0060】

実施例7 PTd + FHAの抗原組み合わせによるbalb/cマウスの経口免疫後の百日咳の攻撃 (challenge) 試験 (マイクロパーティクル)

20匹のbalb/cマウス群を、第0週、第4週及び第8週に3回、下記の製剤で経口免疫した：対照PLG (空のPLGAマイクロパーティクル)、PTd - PLG (PLGAマイクロパーティクルに取り込まれた100 µgのPTd)、PTd溶液 (溶液中のPTd100 µg)、及びPTd - FHA - PLG (PLGAマイクロパーティクルに取り込まれたPTd及びFHA各100 µg)。PLGAに取り込まれた抗原の百日咳菌に対する防御能を、呼吸器系攻撃モデルで調べた。簡単には、抗原の3回投与 (4週間あけた) 後、呼吸器系百日咳菌感染を、2度目の免疫2週間後、約 2×10^{10} cfu/ml (マウス肺当たり約 $10^4 - 10^5$ cfu) のエアゾール攻撃によって実験群当たり16匹のマウスにおいて開始した。2週間の期間内に異なる時点でマウスを屠殺し、肺のホモジネートを培養し、培養5日後、コロニー形成単位 (CFU) 数について調べた。攻撃の当日の免疫応答を試験するため、各群からの4匹のマウスを攻撃前に屠殺した。

10

【0061】

攻撃後の2時間、3、7、10及び14日のCFU数の結果を図6に示し、この結果は、PLGAマイクロパーティクルに取り込まれたPTd及びFHAの組み合わせを用いた高レベルの防御を示している。この処理は、3度目の免疫後、攻撃14日目から続く攻撃第2週までに百日咳菌のクリアランスを与えた。PLGAに取り込まれたPTd及びFHAを含む製剤は、対照と比べて、第14日で肺におけるCFU数を、logで2単位以上減少した。抗原の溶液も防御的であったものの、それらは、PLGAマイクロパーティクルを取り込んだ混合製剤より小さな効能であった。

【0062】

20

実施例8 PTd + FHAの抗原組み合わせによるbalb/cマウスの経口免疫後の免疫原性及び攻撃試験 (コアセルベート化パーティクル)

マウス21匹の3群を、第0、4及び8週で、下記の処理により免疫した：

処理1：溶液のPTd + FHA (抗原各100 µg)

処理2：PLGA中のPTd + FHA (実施例4に従ってナノパーティクルに取り込まれた抗原各100 µgを混合した)

処理3：空のナノパーティクル

少なくとも3時間絶食させたマウスに、投与間を1時間おいて、0.75mlの2回の投与量で経口胃管栄養法によって抗原を投与した。

【0063】

30

免疫応答を第10週で評価した。個々の5匹のマウスから得た脾臓細胞、ブールした腸間膜のリンパ節又はパイエル板を抗原誘導細胞増殖及びサイトカイン産生について調べた。血清及び肺のホモジネートを、攻撃当日、及び攻撃後3、4、10及び14日に、抗PT及び抗FHA IgG及びIgAそれぞれについて評価した (血液試料はCFU数用の肺の除去前に各群の屠殺した4匹のマウスから取り出した)。マウス (処理1及び処理2を受けた各群当たり16匹；対照群の20匹) は、実施例7で記載した呼吸器系攻撃モデルにに従い、第10週で攻撃され、及びCFU数は、攻撃後3、7、10及び14日で個別の肺ホモジネート (群当たり4匹のマウス) で行った。追加した4匹の非免疫対照マウスは、第0日のCFU数を確定するために、攻撃後2 - 3時間のCFUレベルについて評価された。

【0064】

40

血清IgG抗体産生応答を攻撃当日並びに攻撃後様々な間隔で評価することで、動物間の変化度を測定し、及び経口感作後の既往性抗体産生応答の可能性について調べた。PLGAナノパーティクルに取り込まれた、又は溶液のPTd及びFHAで経口経路により3回の免疫後、誘導した血清IgG産生応答の全体のパターンは、マウス間、とりわけ、溶液の抗原で免疫したマウス間で相当の変化しやすさを示した。一般に、同様なPT応答は、PLGAナノパーティクルに取り込まれた可溶性百日咳抗原で誘導された。応答しているマウスの数は両製剤について同じであったが、FHAに特異的な血清IgGの平均タイターは、溶液の抗原で免疫したマウスの割合の方が顕著に強かった。空のPLGAナノパーティクルを受けた対照群での抗体産生応答は、攻撃後14日まで検出されないままであった。Log₁₀3.0より大きい抗FHA抗体のタイターは、溶液の抗体で免疫したマウスの16匹中12匹に、及びPLGAに取り込まれた抗

50

原で免疫したマウスの16匹中13匹において観察され、ところが、3.0より大きい抗PTタイターは、いずれかの製剤で免疫したマウスの16匹中15匹において観察された。PLGAに取り込まれた抗原で免疫したマウスへの攻撃後、既往性抗体産生応答、とりわけ抗PT産生応答のいくつかの証拠がある。

【0065】

驚くべきことに、高レベルの抗原特異的IgAは、PLGAに取り込まれた、又は溶液のPTd及びFHAで免疫したマウスについて、攻撃の当日に肺において観察された。調べた4匹のマウスのそれぞれは、PTに対するIgAタイターが2.0ないし3.0の範囲で有していた。しかしながら、抗FHAタイターは、溶液の抗原で免疫したマウスにおいて有意に強かった。

【0066】

有意なPT及びFHA特異的T細胞増殖は、PLGAに取り込まれたPTd及びFHAで免疫した4匹のマウスのうち3匹の個々の脾臓細胞において観察された。同様の応答が、溶液の抗原で免疫したマウスにおいて観察された。対照マウスの脾臓細胞は、ポリクロール活性因子(PMA/抗CD3)及び死滅細菌のより高い投与に対するものを除いて、バックグランド増殖を与えた。サイトカイン産生の試験は、溶液の、又はPLGAに取り込まれたPTd及びFHAで免疫した4匹のマウスのそれぞれからの脾臓細胞調製物が、FHA、PT又は死滅した百日咳菌を用いたin vitroの刺激に応答して、相対的に高いレベル(500pg/mlより大きい)のIL-5を分泌したことを示している。そのレベルは、全てのマウス及び全ての抗原調製物で一貫してポジティブではなかったけれども、IFN- γ はいずれかの製剤で免疫したマウスの脾臓細胞において検出された。しかしながら、いくつかのバックグランド応答があり、特に、空のPLGAナノパーティクルで免疫した対照マウスにおいて死滅した百日咳菌及び高い投与量のFHAに対するバックグランドである。対照的に、抗原刺激によるIL-5は、空のPLGAナノパーティクルを受けたマウスにおいて検出できなかった。全体のパターンは、経口経路で与えた場合、溶液の、又はPLGAに取り込まれた抗原に対する T_H2 であり、又は T_H2 により分極した混在した T_H1 / T_H2 であった。

【0067】

腸間膜のリンパ節は、PLGAに取り込まれた、又は溶液のPTd及びFHAで免疫したマウスからプールしたものであり、FHA及び死滅した細菌に対する細胞増殖アッセイにおいて応答した。対照マウスから得た細胞は、死滅した細菌に応答するが、FHAには応答しなかった。有意なレベルのIL-5は、FHAによるin vitroの刺激後、免疫したマウスから得た腸間膜のリンパ節細胞の上清において検出され、PTの場合より小さい程度であった。対照的に、非免疫の対象マウスから得た細胞は、PMA及び抗CD3に応答してIL-5のみを産生した。IFN- γ は、死滅した百日咳菌に応答して、腸間膜のリンパ節の上清で検出された。しかしながら、同様のレベルは免疫したマウス及び非免疫の対象マウスにおいて検出され、及びIFN- γ は精製したFHA又はPTを用いた刺激後に検出されなかった。これらの結果は、溶液の、又はPLGAナノパーティクルに取り込まれた百日咳抗原を用いた経口免疫が腸間膜のリンパ節において T_H2 応答を誘導することを示している。

【0068】

プールしたパイエル板細胞のT細胞応答は、一般的に非常に弱かった。、全ての実験群において、顕著なレベルの細胞増殖、IL-5及びIFN- γ がPMA及び抗CD3に対して検出され、及び低レベルは死滅した百日咳菌に対して検出されたが、T細胞活性を誘導したPT及びFHAは弱く検出されなかった。

【0069】

マウスは、3回目の免疫から2週間後に攻撃された。CFUにおいて初期の急激な降下は、PLGAナノパーティクルに取り込まれたFHA及びPTdで免疫したマウスで観察された(図7)。3日で、CFU数は、溶液の抗原で免疫したマウスの場合よりlogで1.5低くなり、対照よりはlogで3大きかった。CFU数の典型的な跳ね返りは、第7日に観察された。PLGAに取り込まれた百日咳抗原を用いた全体の防御は、溶液の抗原を用いた場合よりも有意に良かった。力価指標を製剤に応じた防御に当てはめることは、Miller, Dev. Biol. Std. 95:31-41 (1998)に記載されており、62.8及び44.8の値はそれぞれ、PLGAに取り込まれた抗原及び可溶

10

20

30

40

50

性抗原に帰属するされ得る。相関曲線からの外挿は、子供における73%及び48%効能に置き換わる。それらは、PTd及びFHAそれぞれを取り込んでいるナノパーティクルの混合物で経口免疫した動物における防御の高レベルを示す。可溶性抗原もまた防御的であるが、クリアランス効果は、各時点でのPLG製剤よりも低かった。FHA及びPTdを取り込んだナノパーティクルの効能は、実施例7に従って、経口経路により輸送された溶媒蒸発したマイクロパーティクルについて観察された効能に、大まかに匹敵している（子供の67%効能）。

【0070】

実施例9 噴霧乾燥法によるKLH - PLAマイクロパーティクルの調製（比較例）

PLA（ポリD,Lラクチド；分子量16,000の溶液；i.v. = 0.27dl/g；Boehringer Ingelheimによる供給、R203）エチルアセテート溶液（150mlエチルアセテート中、5%PLA）を使用2時間前に調製した。ポリマー溶液は、IKA Ultra Turrax T25ホモジナイザーを使用して、S1ヘッドでホモジネート（24,000rpmで）し、一方、KLH抗原溶液（MES（2-[n-モルフィリノ]エタンスルホノイック酸）中、62mgKLH）を徐々に添加した。エマルジョンを氷上で冷却し、ホモジナイゼーションを1分間続けた。このように調製した単一のエマルジョンをBuchi 191ミニスプレードライヤーを用いて噴霧乾燥させ、マグネティックスターラーを用いて連続的に攪拌した。次のパラメータは、噴霧乾燥の工程で使用した：

【0071】

【表6】

表6			
パラメータ	値	パラメータ	値
引入口温度 (°C)	60	アスピレータ (%)	100
吹出口温度 (°C)	45	ポンプ速度* (ml/分)	5
流速	700-800	圧力 (mbar)	-40

【0072】

*ポンプ速度を25%にセットし、溶媒の吸出し実速度は5から6ml/分で変化した。パーティクルは、回収容器及びサイクロンの両方から即座に回収した。抗原を充填したマイクロパーティクルは、先の実施例について上記で概説した方法に従って特徴付けた。本発明に従って形成したマイクロパーティクル（収率33%）は、実際に、滑らかな球面であることが見い出された。充填（ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ）は7.4であり、取り込み効率は91%、レーザー光回折によるD50%は4.6 μm であった。KLHのin vitro放出は、1時間以内で10%であり、第23日で49%であった。

【0073】

上記実施例と同様に、マウスを、PLAマイクロパーティクルに取り込むか、又は溶液のKLH 100 μg の経口接種を2回（第0週及び第4週）を行い免疫した。これらのパーティクルは、経口投与した場合、免疫原性を示してはなかったが、おそらくは、実施例1のマイクロパーティクルに比べて、よりゆっくりとした放出様式若しくはより大きなパーティクルサイズによるものであり、又は、噴霧乾燥過程中のKLHの起こり得る分解による。

【0074】

実施例10 噴霧乾燥法によるPTd - PLAマイクロパーティクルの調製（比較例）

PTd - PLAマイクロパーティクルを、実施例9と同様の噴霧乾燥法によって形成したが、但し、噴霧乾燥中の相分離を避けるため、ホモジネーション速度を24,000rpmまで増加させ、ポリマー粘度を5%R203を用いて増加させ、w/oエマルジョンを乾燥中攪拌した。得られたパーティクルの放出様式は、最初の1時間で50 - 60%の著しいバースト、続く3ヶ月に渡る非常にゆっくりとした放出段階によって特徴付けられる。

【0075】

血清の抗PTd IgGレベルは、噴霧乾燥したPLAマイクロパーティクルのPTd100 μ gで経口免疫したマウスにおいて測定し、空のPLAマイクロパーティクル、空のマイクロパーティクル、及び溶液のPTdと組み合わせて可溶性PTdで免疫した場合と比較した。しかしながら、噴霧乾燥したPLAマイクロパーティクル中のPTdで経口免疫したマウスでは、抗体産生応答もT細胞応答も観察されなかった。

【0076】

溶媒蒸発（上記実施例を参照）又は噴霧乾燥方法によるPTd、FHA及びKLHの元の状態を、半定量的にPAGEゲル解析によって調べた。噴霧乾燥したパーティクルと比較して、溶媒蒸発法によって調製したパーティクルから抽出した場合、より多くのPTdが完全な状態のままである。つまり、PTdは、噴霧乾燥の過程において、部分的に分解したのかもしれない。データは、噴霧乾燥は、PTdの場合において抗原構造を維持することについて問題を含む一方、これはより変化の少ない抗原に対して推測することができず、したがって、その時その時で評価することが必要であろうということを示唆している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、PLGAに取り込まれたKLHを用いた経口免疫後の T_H1 / T_H2 応答を示す。4匹のマウスの群は、PLGAマイクロパーティクル（KLH - PLGA）に取り込まれた100 μ gのKLH、又は空のPLGAマイクロパーティクルと組み合わせた100 μ gの可溶性KLH（KLH + PLGA）を用いて経口接種された。マウスを2回（第0週及び第4週）免疫し、2週間後に屠殺した。それぞれのマウスから得た脾臓細胞を0.03 - 20 μ g/mlのKLHで刺激し、又は培養液のみで刺激した。3日後、培養上清を特異的なイムノアッセイによりIL - 5及びIFN - γ について試験した。各バーは、各群のマウス4匹に対する平均的な応答を示している。IL - 5（pg/ml）及びIFN - γ （ng/ml）に対するスケールが異なっていることに注意のこと。

【図2】 図2は、実施例5に従いT細胞増殖アッセイの結果を示す。balb/cマウスの4群は、第0週及び第4週に、PLGAに取り込まれた100 μ gのPTd（PLG中のPTd）；空のPLGAマイクロカプセルと組み合わせた100 μ gの可溶性PTd（可溶性PTd + ePLG）；100 μ gの可溶性PTd（可溶性Ptd）；及び空のPLGAマイクロパーティクル（空のPLG）を用いて経口胃管栄養法により免疫された。第6週でマウスを屠殺し、4日培養のT細胞増殖を $[^3H]$ チミジン取り込みによってアッセイした。

【図3】 図3は、実施例5に記載したように、PLGAに取り込まれた100 μ gのPTd（PLG中のPTd）；空のPLGAマイクロカプセルと組み合わせた100 μ gの可溶性PTd（可溶性PTd + ePLG）；100 μ gの可溶性PTd（可溶性Ptd）；及び空のPLGAマイクロパーティクル（空のPLG）の経口投与後、PTdに対する血清抗体のタイターを示す。

【図4】 図4は、実施例5に従い脾臓T細胞のサイトカイン解析を示す。balb/cマウスの4群を、第0週及び第4週に、PLGAに取り込まれた100 μ gのPTd（PLG中のPTd）；空のPLGAマイクロカプセルと組み合わせた100 μ gの可溶性PTd（sPTd + 空のPLG）；100 μ gの可溶性PTd（可溶性Ptd）；及び空のPLGAマイクロパーティクル（空のPLG）で経口胃管栄養法によって免疫し、第6週にアッセイした。個々のマウスから得た脾臓細胞を不活化PT（iPT）、百日咳菌（B.Pert）、及びポジティブコントロールの抗CD3抗体 / ホルボール12 - ミリステート - 13アセテート（PMA/aCD3）で刺激した。3日後、培養上清を特異的なイムノアッセイでIL - 5及びIFN - γ について試験した。

【図5】 図5は、実施例5に従い脾臓T細胞のサイトカイン解析を示す。balb/cマウスの4群を、第0週及び第4週に、PLGAに取り込まれた100 μ gのPTd（PLG中のPTd）；空のPLGAマイクロカプセルと組み合わせた100 μ gの可溶性PTd（sPTd + 空のPLG）；100 μ gの可溶性PTd（可溶性Ptd）；及び空のPLGAマイクロパーティクル（空のPLG）で経口胃管栄養法によって免疫し、第6週にアッセイした。個々のマウスから得た脾臓細胞を不活化PT（iPT）、百日咳菌（B.Pert）、及びポジティブコントロールの抗CD3抗体 / ホルボール12 - ミリステート - 13アセテート（PMA/aCD3）で刺激した。3日後、培養上清を特異的なイムノアッセイでIL - 5及びIFN - γ について試験した。

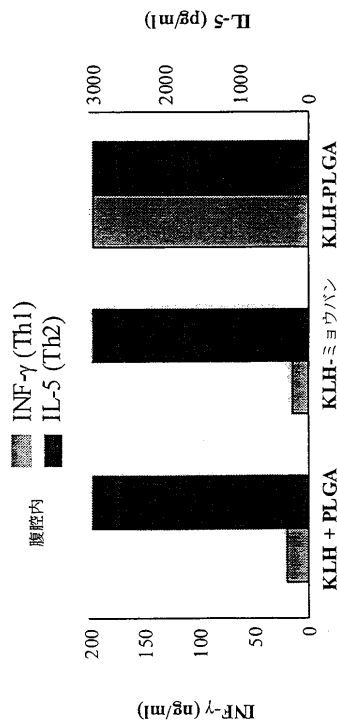
【図6】 図6は、実施例6で示した呼吸器系攻撃試験から得た次の肺ホモジネートの培養試料について、攻撃後の日数に対して、肺当たりの Log_{10} CFU数のプロットを示す：対照

PLG (空のPLGAで免疫したマウス)、PTd - PLG (PLGAマイクロパーティクルに取り込まれた100 μgのPTdで免疫したマウス)、PTd溶液 (溶液の100 μgのPTdで免疫したマウス)、及びPTd - FHA - PLG (PLGAマイクロパーティクルに取り込まれた各100 μgのPTd及びFHAで免疫したマウス)。マウスに、各投与間で4週の間隔をおいて、3回投与し、3回目の投与2週間後、エアゾール攻撃を与えた。

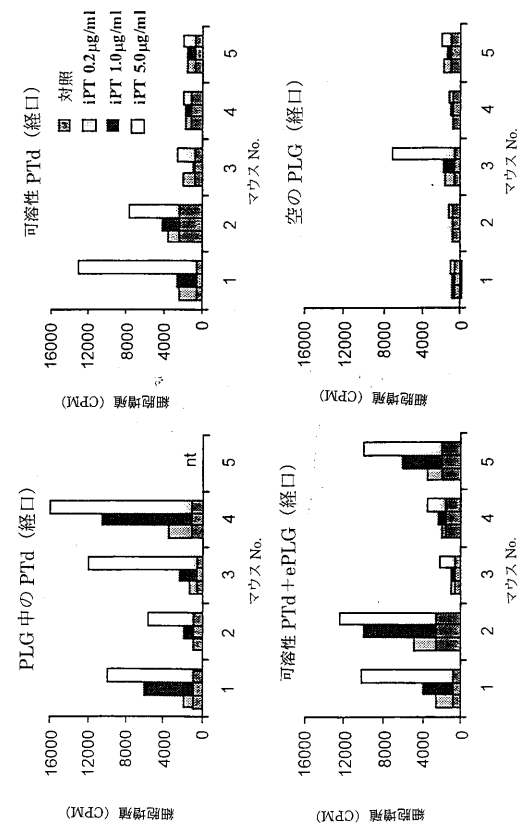
【図7】 図7は、実施例8で示した呼吸器系攻撃試験から得た次の肺ホモジネートの培養試料について、攻撃後の日数に対して、肺当たりのLog₁₀CFU数のプロットを示す：対照 (空のPLGAコアセルベート化ナノパーティクルで免疫したマウス)、可溶性PTd + FHA (溶液の100 μgのPTd及びFHAで免疫したマウス)、及びPTd - FHA - PLG (PLGAコアセルベート化ナノパーティクルに取り込まれた各100 μgのPTd及びFHAで免疫したマウス)。マウスに、各投与間で4週の間隔をおいて、3回投与し、3回目の投与2週間後、エアゾール攻撃を与えた。

10

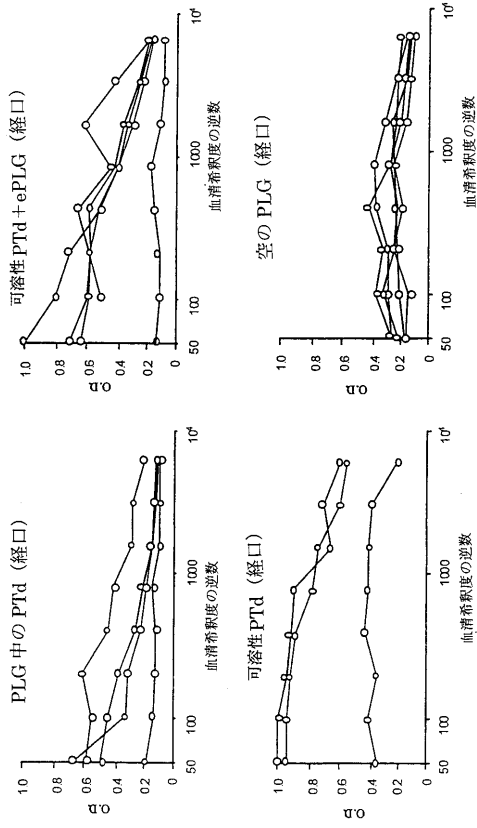
【図1】



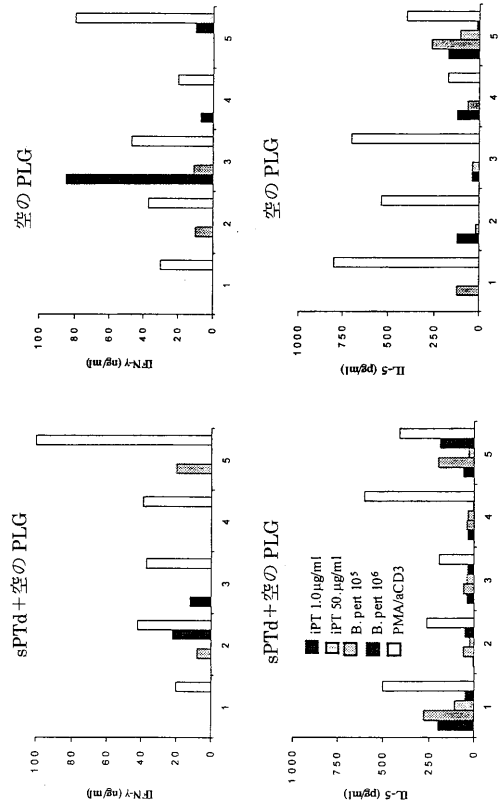
【図2】



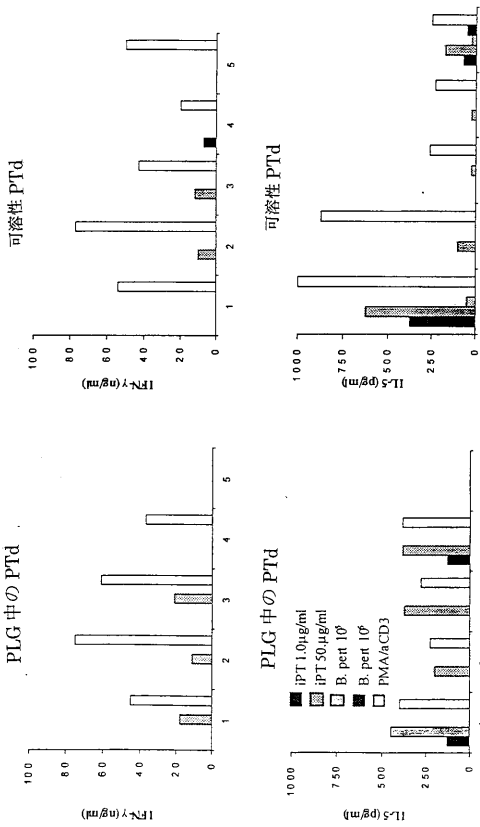
【 図 3 】



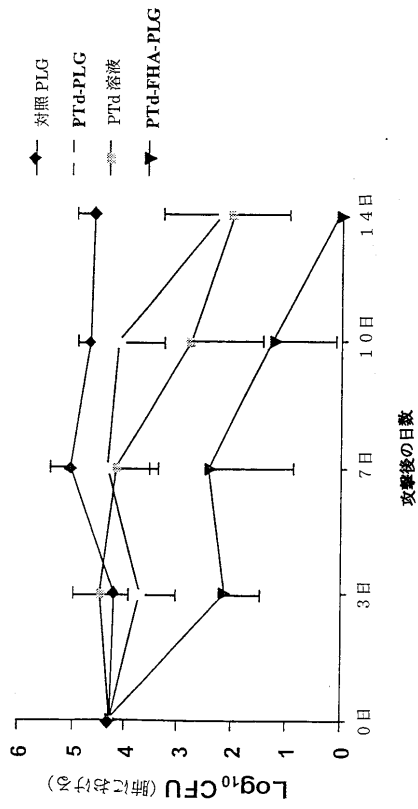
【 図 4 】



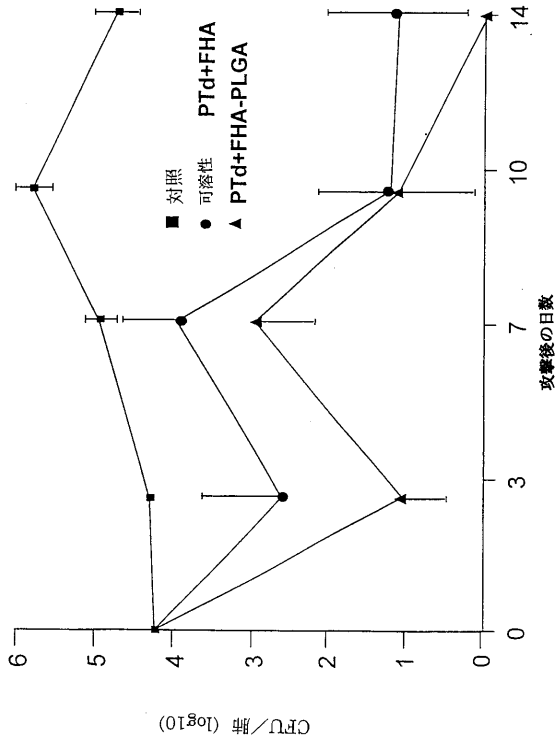
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 P 31/04

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 ブライデン, デビッド・ジェイムス

アイルランド国カウンティ・ダブリン, ブラックロック, クロイスター・アヴェニュー 31

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 国際公開第96/020698(WO, A1)
特開平08-009980(JP, A)
特表平05-503936(JP, A)
特開昭64-034925(JP, A)
Infect. Immun., 1996年, Vol.64, pp.489-94
Vaccine, 1995年, Vol.13, pp.455-62
Pharm. Res., 1996年, Vol.13, pp.1838-45

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00

A61K 9/50

A61K 9/51

A61K 39/10

A61K 47/34

A61P 31/04

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed