

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-129148

(P2015-129148A)

(43) 公開日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
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 有 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-22097 (P2015-22097)
 (22) 出願日 平成27年2月6日(2015.2.6)
 (62) 分割の表示 特願2011-504455 (P2011-504455) の分割
 原出願日 平成21年4月16日(2009.4.16)
 (31) 優先権主張番号 61/045,291
 (32) 優先日 平成20年4月16日(2008.4.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 305060279
 グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
 ベルギー ベー-1330 リクセンサー
 ル リュ ドランスティテュ 89
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】 (修正有)

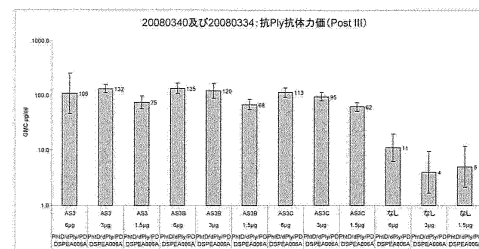
【課題】肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患の予防的治療又は治療における使用のための免疫原性組成物の提供

【解決手段】ポリヒスチジントライアドファミリー (Ph tX) のメンバーである非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質、及び水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物 (AS03) とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10mgの代謝可能油、0.5~11mgのトコール及び0.1~4mgの乳化剤を含む、免疫原性組成物。前記代謝可能油がスクアレニであり、前記トロールが -トロフェロールであり、前記乳化剤が、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートである、免疫原性組成物。

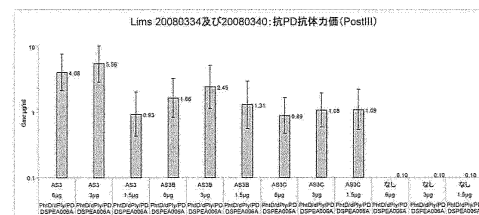
【選択図】 図14-1

種々のAS03希釈液における肺炎連鎖球菌タンパク質に対する免疫応答を示すELISA結果

A ニューモリンに対する免疫応答



B インフルエンザ菌由来のプロテインDに対する免疫応答



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

【請求項 2】

非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンからなるアジュバント組成物とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

10

【請求項 3】

非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、1種以上のさらなる免疫刺激剤を含む水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

【請求項 4】

非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含むワクチン組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記ワクチン組成物。

20

【請求項 5】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、1~10、2~10、3~9、4~8、5~7、又は5~6 mg（例えば、2~3、5~6、又は9~10 mg）の代謝可能油を含む、請求項 1~4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、0.5~11、1~11、2~10、3~9、4~8、5~7、5~6 mg（例えば、10~11、5~6、2.5~3.5又は1~3 mg）のトコールを含む、請求項 1~5 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、0.1~5、0.2~5、0.3~4、0.4~3又は2~3 mg（例えば、0.4~1.2、2~3又は4~5 mg）の乳化剤を含む、請求項 1~6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 8】

代謝可能油の量がヒト用量あたり5.35 mgである、請求項 1~7 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

代謝可能油の量がヒト用量あたり2.14 mgである、請求項 1~8 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

トコールの量がヒト用量あたり5.94 mgである、請求項 1~9 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 11】

トコールの量がヒト用量あたり2.38 mgである、請求項 1~10 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

乳化剤の量がヒト用量あたり2.425 mgである、請求項 1~11 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

乳化剤の量がヒト用量あたり0.97 mgである、請求項 1~12 のいずれか 1 項に記載の

50

免疫原性組成物。

【請求項 14】

代謝可能油がスクアレンである、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

トコールが α -トコフェロールである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

乳化剤がポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートである、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 17】

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートがPolysorbate(登録商標)80又はTween(登録商標)80を含む群より選択される、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

ワクチン組成物の容量が0.4~1.5 mlである、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

前記用量の容量が0.5 mlである、請求項 18 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

前記用量の容量が0.7 mlである、請求項 18 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 21】

前記用量の容量が1.0 mlである、請求項 18 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質が、PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、ニューモリシン、LytB、LytC、LytA、Sp125、SP101、Sp128、Sp130、Sp133、又は米国特許第6699703号の配列番号5225、5200、3166、4360、5137、4263、3166、5226、3716、4360、5243、3964、5179、3850、4263、5137、5226、5325、3850、5179若しくは5325により示される若しくはコードされる肺炎連鎖球菌タンパク質を含む米国特許第6699703号に開示されるタンパク質、あるいはそれらの免疫学的機能等価物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 23】

2以上の非コンジュゲートタンパク質を含む、請求項 22 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

非コンジュゲート肺炎球菌PhtD及び非コンジュゲート肺炎球菌ニューモリシンを含む、請求項 23 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物を、肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患に罹患しているか又は罹りやすい患者に投与することを含む、肺炎球菌性疾患を治療又は予防する方法。

40

【請求項 26】

肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患の予防的治療又は治療における使用のための請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 27】

肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患の予防的治療又は治療において使用するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項 28】

アジュバント組成物がさらに1以上の免疫刺激剤を含む、請求項 27 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、改良されたワクチン及び免疫原性組成物、並びに医学におけるその使用に関する。特に、本発明は、トコール、代謝可能油及び乳化剤を含む水中油型エマルジョンアジュバントを含むワクチン又は免疫原性製剤、並びに医学におけるその使用、特に肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 抗原を含む種々の抗原に対する免疫応答の増加におけるその使用、並びにその調製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

改善された免疫原性を有する新規組成物又はワクチンは常に必要とされている。1つの戦略として、アジュバントを用いて、任意の所与の抗原に対する免疫応答を改善し、及び/又は宿主における反応原性/毒性を低下させようとするものである。

10

【0003】

水中油型エマルジョン自体は当業界で公知であり、アジュバント組成物として有用であると提唱されている (EP 399843 ; WO 95/17210号)。

【0004】

WO 95/17210号は、2~10%のスクアレン、2~10%の -トコフェロール及び0.3~3%の tween 80を含む水中油型エマルジョン、並びに単独で、又はQS21及び/若しくは3D-MPLとの組合せでのその使用を開示している。

【0005】

WO 99/12565号は、代謝可能油、サポニン及びステロールを含む水中油型エマルジョン組成物を開示している。この水中油型エマルジョンは、3D-MPLをさらに含む。

20

【0006】

WO 99/11241号は、代謝可能油とサポニンが1:1~200:1の比率で存在する、代謝可能油とサポニンを含む水中油型エマルジョンを開示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

好適な免疫応答を提供し、宿主における反応原性が低い、改良されたワクチン及び免疫原性組成物の必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、組成物内の抗原又は抗原組成物 (抗原性組成物) に対して同等の免疫応答を依然として維持しながら、用いることができる水中油型エマルジョンの各成分をより低量で含むワクチン又は免疫原性組成物を見出した。これは、宿主レシピエント内の反応原性を低下させながら、抗原に対する免疫原性のレベルを維持する利点を有する。

30

【0009】

従って、本発明の第1の態様においては、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 抗原と、ヒト用量あたり、0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.4~4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物と、を含む免疫原性組成物が提供される。

【0010】

本発明の別の態様においては、肺炎連鎖球菌抗原と、ヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.4~4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物と、を含むワクチン組成物が提供される。

40

【0011】

本発明のさらなる態様においては、肺炎球菌感染症又は疾患の治療、緩和又は予防のための免疫原性組成物の製造における、肺炎連鎖球菌抗原と、0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.4~4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含むワクチン又は免疫原性組成物の使用が提供される。

【0012】

さらなる態様においては、免疫原性組成物中の抗原が誘導される病原体の変異体である

50

病原体により引き起こされる感染症又は疾患に対する防御のための、上記で定義された方法又は使用が提供される。別の実施形態においては、免疫原性組成物中のその抗原の変異体である抗原を含む病原体により引き起こされる感染症又は疾患に対する防御のための上記で定義された方法又は使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】臨床試験：様々な時点での抗HA抗体に関する幾何学的平均力価（GMT）（免疫原性に関するATPコホート）を示す。

【図2】臨床試験：0日目及び21日目でのHI抗体力価に関する血清防御率（SPR）（95%信頼区間と共に）（免疫原性に関するATPコホート）を示す。

【図3】臨床試験：21日目でのHI抗体力価に関する血清変換率（SCR）（95%信頼区間と共に）（免疫原性に関するATPコホート）を示す。

【図4】臨床試験：21日目でのHI抗体力価に関する血清変換係数（SCF）（95%信頼区間と共に）（免疫原性に関するATPコホート）を示す。

【図5-1】マウス試験：ヘテロサブタイプ株（用量範囲AS03）でプライミングされたBALB/cマウスにおける血球凝集抑制試験（GMT +/- IC95）を示す。図5A：抗A/ニューカレドニア/20/99 HI力価。図5B：抗A/パナマ/2007/99 HI力価。

【図5-2】図5C：抗B/山東/7/97 HI力価。

【図6】マウス試験：ヘテロサブタイプ株（用量範囲AS03）でプライミングされたC57Bl/6マウスにおける血球凝集抑制試験（GMT +/- IC95）を示す。

【図7】マウス試験：ヘテロサブタイプ株（用量範囲AS03）でプライミングされたC57Bl/6マウスに由来するPBMCにおける細胞性免疫応答（CD4+ T細胞）を示す。

【図8】マウス試験：ヘテロサブタイプ株でプライミングされ、用量範囲AS03のアジュバントを添加された低用量抗原（0.5 μg）で免疫されたC57Bl/6マウスに由来するPBMCにおける細胞性免疫応答（CD4+ T細胞）を示す。

【図9-1】マウス試験：2つの異なる抗原用量：1.5 μg（A、C及びE）又は0.38 μg（B、D及びF）に関する、免疫後14日目のH5N1特異的血清Ig ELISA力価（A及びB）並びに抗H5N1 IgG1（C及びD）及びIgG2b（E及びF）アイソタイプ応答（GMT +/- IC95）を示す。

【図9-2】図9-1の続きである。

【図9-3】図9-2の続きである。

【図10】マウス試験：2つの異なる抗原用量：1.5 μg（A）又は0.38 μg（B）に関する、免疫後21日目（GMT +/- IC95）の血球凝集抑制試験（GMT +/- IC95）を示す。

【図11-1】マウス試験：用量範囲AS03のアジュバントを添加された異なる用量のH5N1ワクチン（1.5又は0.38 μg）（（A）1.5 μgのHA Ag（抗原）又は（B）0.38 μgのHA Ag（抗原））で免疫されたナイーブなC57Bl/6マウスにおける細胞性免疫応答（CD4+ T細胞）を示す。

【図11-2】図11-1の続きである。

【図12】ブタ試験：相同株（用量範囲AS03）でプライミングされたブタにおける血球凝集抑制試験（GMT +/- IC95）を示す。

【図13-1】マウス試験：250、125又は62.5 μgのSB62を含有するAS03アジュバント中のそれぞれ3 μgのdPly、PhdD及びプロテインDで免疫したC57blマウスにおいてELISAにより測定した液性免疫応答を示す。

【図13-2】図13-1の続きである。

【図14-1】マウス試験：250、125又は62.5 μgのSB62を含有するAS03アジュバント中の6、3又は1.5 μgのdPly、PhdD及びプロテインDで免疫したC57blマウスにおいてELISAにより測定した液性免疫応答を示す。

【図14-2】図14-1の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書における用語「含む（comprising、comprise及びcomprises）」は、全ての例

10

20

30

40

50

において、それぞれ、用語「からなる (consisting of、consist of及びconsists of)」と必要に応じて置換可能であることが本発明者らにより意図される。

【0015】

本発明の「ワクチン組成物」に関する本明細書に記載の実施形態はまた、本発明の「免疫原性組成物」に関する実施形態に対しても適用可能であり、またその逆もある。

【0016】

本発明の一実施形態においては、抗原又は抗原組成物と、ヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.4~4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンからなるアジュバント組成物と、を含むワクチン又は免疫原性組成物が提供される。

【0017】

本発明のさらなる実施形態においては、抗原又は抗原組成物と、ヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油 (スクアレンなど)、0.5~11 mgのトコール (トコフェロールなど) 及び0.4~4 mgの乳化剤 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートなど) を含む水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物と、を含むワクチン又は免疫原性組成物が提供される。

【0018】

水中油型エマルジョン成分

本発明のアジュバント組成物は、水中油型エマルジョンアジュバントを含み、好ましくは、該エマルジョンは0.5~10 mgの量の代謝可能油、0.5~11 mgの量のトコール及び0.4~4 mgの量の乳化剤を含み、強度少なくとも70%の油滴が1 µm未満の直径を有する油滴を有する。

【0019】

任意の水中油型組成物をヒト投与にとって好適なものとするために、エマルジョン系の油相は代謝可能油を含む必要がある。用語「代謝可能油」の意味は当業界でよく知られている。代謝可能性は、「代謝により変換され得ること」と定義することができる (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company、第25版(1974))。この油は、レシピエントに対して毒性ではなく、代謝により変換され得る任意の植物油、魚油、動物油又は合成油であってよい。ナッツ類、種子、及び穀物は、植物油の一般的な供与源である。合成油もまた本発明の一部であり、NEOBEE (登録商標) 及び他のものなどの市販の油が挙げられる。特に好適な代謝可能油は、スクアレンである。スクアレン (2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエン) は、サメの肝油中に大量に認められ、オリーブ油、小麦胚種油、ぬか油、及び酵母中に少量に認められる不飽和油であり、本発明における使用にとって特に好ましい油である。スクアレンは、それがコレステロールの生合成における中間体であるという事実により、代謝可能油である (Merck index、第10版、エントリー番号8619)。

【0020】

好適には、代謝可能油は、0.5~10 mg、好ましくは、1~10、2~10、3~9、4~8、5~7、又は5~6 mg (例えば、2~3、5~6、又は9~10 mg)、具体的には、5.35 mg又は2.14 mgの量でアジュバント組成物中に存在する。本発明のさらなる実施形態においては、代謝可能油は、0.5~10 mg、好ましくは、1~10、2~10、3~9、4~8、5~7、又は5~6 mg (例えば、2~3、5~6、又は9~10 mg)、具体的には、5.35 mg又は2.14 mgの量でワクチン (又は免疫原性) 組成物中に存在する。

【0021】

ワクチン又は免疫原性組成物中の代謝可能油の量を、全組成物の割合として表すことができる。好適には、代謝可能油は、全組成物容量の0.5%~2%、好ましくは0.25~2、又は0.25~1.75、又は0.5~1.65、又は0.6~1.5、又は0.8~1.4又は1~1.25% (v/v) の油の量でワクチン組成物中に存在する。

【0022】

別の特定の実施形態においては、代謝可能油は、ワクチン (又は免疫原性) 組成物の全量の約1.25%の最終量で存在する。別の特定の実施形態においては、代謝可能油は、全組

10

20

30

40

50

成物容量の0.25% (v/v)の最終量で存在する。

【0023】

明確にするために、v/vで示される濃度を、以下の変換係数：5% (v/v)のスクアレン濃度は4.28% (w/v)スクアレン濃度と等価である、を適用することにより、w/vでの濃度に変換することができる。

【0024】

水中油型エマルジョンは、トコールを含む。トコールは当業界でよく知られており、EP 0382271に記載されている。好適には、トコールは α -トコフェロール又はコハク酸 γ -トコフェロール(コハク酸ビタミンEとしても知られる)などのその誘導体である。好適には、前記トコールは、0.5~11 mg、好ましくは1~11、2~10、3~9、4~8、5~7、5~6(例えば、10~11、5~6、2.5~3.5又は1~3 mg)の量でアジュバント組成物中に存在する。特定の実施形態においては、トコールは5.94 mg又は2.38 mgの量で存在する。さらなる実施形態においては、好適には、前記トコールは0.5~11 mg、好ましくは1~11、2~10、3~9、4~8、5~7、5~6(例えば、10~11、5~6、2.5~3.5又は1~3 mg)の量でワクチン(又は免疫原性)組成物中に存在する。特定の実施形態においては、トコールは5.94 mg又は2.38 mgの量で存在する。

10

【0025】

トコールの量は、ワクチン又は免疫原性組成物の全容量の割合として表すことができる。好適には、トコールは免疫原性組成物の全量の0.25%~2% (v/v)の量でワクチン組成物中に存在し、好ましくは、0.25~2で、全量の0.25~2、又は0.25~1.75、又は0.5~1.65、又は0.6~1.5、又は0.8~1.4又は1~1.25% (v/v)のトコールを含む。

20

【0026】

好ましくは、トコールはワクチン(又は免疫原性)組成物の全量の0.2%~2% (v/v)の量で存在し、より好ましくは、0.5 ml用量中に1.25% (v/v)の量で存在する。

【0027】

特定の実施形態においては、トコールはワクチン又は免疫原性組成物の全量の約1.25%の最終量で存在する。別の特定の実施形態においては、トコールは全量の0.25% (v/v)又は0.5 ml用量中の1.25% (v/v)又は0.7 ml用量中の0.9% (v/v)、又は0.5 ml用量中の0.5% (v/v)又は0.7 mlのワクチン若しくは免疫原性用量中の0.35~0.37%、好ましくは0.36%の最終量で存在する。

30

【0028】

明確にするために、v/vで示される濃度を、以下の変換係数：5% (v/v)の α -トコフェロール濃度は4.8% (w/v) γ -トコフェロール濃度と等価である、を適用することにより、w/vでの濃度に変換することができる。

【0029】

水中油型エマルジョンはさらに、乳化剤を含む。好適には、乳化剤はポリオキシエチレンソルビタンモノオレートである。特定の実施形態においては、乳化剤をPolysorbate(登録商標)80又はTween(登録商標)80を含む群より選択することができる。

【0030】

前記乳化剤は、好適には0.1~5、0.2~5、0.3~4、0.4~3又は2~3 mg(例えば、0.4~1.2、2~3又は4~5 mg)の乳化剤の量でアジュバント組成物中に存在する。特定の実施形態においては、乳化剤は0.97 mg又は2.425 mgの量で存在する。

40

【0031】

さらに、前記乳化剤は、好適には0.1~5、0.2~5、0.3~4、0.4~3又は2~3 mg(例えば、0.4~1.2、2~3又は4~5 mg)の乳化剤の量でワクチン又は免疫原性組成物中に存在する。特定の実施形態においては、乳化剤は0.97 mg又は2.425 mgの量で存在する。

【0032】

乳化剤の量を、ワクチン又は免疫原性組成物の全容量の割合として表すことができる。好適には、乳化剤は、前記組成物の全量の0.125~0.8% (v/v)の量、好ましくは、全量の0.08~0.5、又は0.1~0.7、又は0.2~0.6、又は0.25~0.55、又は0.3~0.52又は0.4~0.5

50

% (v/v)でワクチン(又は免疫原性)組成物中に存在する。特定の実施形態においては、乳化剤はワクチン又は免疫原性組成物の全容量の1%、0.5%又は0.2%(v/v)の量で存在する。

【0033】

明確にするために、v/vで示される濃度を、以下の変換係数：1.8%(v/v)のPolysorbate 80濃度は1.91%(w/v)のPolysorbate 80濃度と等価である、を適用することにより、w/vでの濃度に変換することができる。

【0034】

特定の実施形態においては、0.5 mlのワクチン又は免疫原性用量は、0.45%(v/v)のTween 80を含み、0.7 mlの用量は0.315%(v/v)のTween 80を含む。別の特定の実施形態においては、0.5 mlの用量は0.18%(v/v)の乳化剤を含み、0.7 mlのワクチン又は免疫原性組成物の用量は0.126%(v/v)の乳化剤を含む。

【0035】

用語「ヒト用量」とは、ヒトにおける使用にとって好適な容量にある用量を意味する。一般的には、これは0.25~1.5 mlである。一実施形態においては、ヒト用量は0.5 mlである。さらなる実施形態においては、ヒト用量は0.5 mlより高く、例えば、0.6、0.7、0.8、0.9又は1 mlである。さらなる実施形態においては、ヒト用量は1 ml~1.5 mlである。別の実施形態においては、特に、免疫原性組成物が小児集団のためのものである場合、ヒト用量は0.25~0.5 mlなどの0.5 ml未満であってよい。本発明は、免疫原性組成物内のアジュバントの個々の成分の各々又は全部が、以前には有用であると考えられていたものよりも低いレベルであり、典型的には上記で記載したものであることを特徴とする。特に好適な組成物は、0.5 mlのヒト用量の最終容量中に以下の量の以下のアジュバント成分を含む。

【0036】

表1

	アジュバント A	アジュバント B	アジュバント E	アジュバント F	アジュバント C	アジュバント G	アジュバント D
o/w型エマルジョン	125 µl	100 µl	83.33 µl	62.5 µl	50 µl	31.25 µl	25 µl
成分:							
トコフェロール	5.94 mg	4.28 mg	3.57 mg	2.68 mg	2.38 mg	1.34 mg	1.19 mg
スクアレン	5.35 mg	4.75 mg	3.96 mg	2.97 mg	2.14 mg	1.49 mg	1.07 mg
Polysorbate 80	2.43 mg	1.94 mg	1.62 mg	1.21 mg	0.97 mg	0.61 mg	0.48 mg

【0037】

本発明はさらに、例えば、表1に例示されたものだけでない、上記で定義された量の上記で定義された個々の成分を含むアジュバント組成物を提供する。典型的には、そのようなアジュバント組成物は、ヒト用量に好適な容量にあるであろう。アジュバントが液体形態の抗原性組成物と混合される液体形態にある場合、アジュバント組成物は、例えば、ヒト用量の意図される最終容量の約半分、例えば、0.7 mlの意図されるヒト用量については350 µl容量、又は0.5 mlの意図されるヒト用量については250 µl容量などの、ヒト用量の意図される最終容量の一部(fraction)であるヒト用量に好適な容量であろう。抗原組成物と混合して最終ヒト用量のワクチンを提供する場合、アジュバント組成物を希釈する。そのような用量の最終容量は勿論、アジュバント組成物の最初の容量及びアジュバント組成物に添加される抗原組成物の容量に応じて変化するのである。別の実施形態においては、液体アジュバントを用いて、凍結乾燥された抗原組成物を再構成する。この実施形態においては、アジュバント組成物のヒト用量に好適な容量は、ヒト用量の最終容量とほぼ等しい。液体アジュバント組成物を、凍結乾燥された抗原組成物を含むバイアルに添加する。最終ヒト用量は0.5~1.5 mlの間で変化してもよい。

【0038】

水中油型エマルジョンを製造する方法は当業者にはよく知られている。一般的には、その方法は、トコールを含有する油相と、PBS/TWEEN80(商標)溶液などの界面活性剤とを混合した後、ホモジナイザーを用いてホモジナイズすることを含み、少量の液体をホモジナイズするには、シリンジ針を通して混合物を2回通過させることを含む方法が好適であることが当業者には明らかであろう。同じく、マイクロフルイダイザー(M110S Microfluidics装置、最大50回通過、6パールの最大圧入力(約850パールの出力圧)で2分間)における乳化プロセスを当業者により適合させて、少量又は大量のエマルジョンを製造することができる。この適合化は、調製が必要な直径の油滴と共に達成されるまで、得られるエマルジョンの測定を含む慣用的な実験により達成することができる。

【0039】

水中油型エマルジョンにおいては、油と乳化剤は水性担体中にあるべきである。水性担体は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水であってよい。

【0040】

好ましくは、本発明の水中油型エマルジョン系は、マイクロメートル以下の範囲の小さい油滴サイズを有する。好適には、液滴サイズは直径120~750 nm、より好ましくは120~600 nmの範囲にあるであろう。最も好ましくは、水中油型エマルジョンは、強度少なくとも70%の油滴が直径500 nm未満であり、より好ましくは、強度少なくとも80%が直径300 nm未満であり、より好ましくは強度少なくとも90%が直径120~200 nmの範囲にある、当該油滴を含有する。

【0041】

本発明において油滴サイズ(すなわち直径)は、強度により表す。油滴サイズの直径を強度により決定するいくつかの方法が存在する。強度を、サイズ決定装置の使用、好適には、Malvern Zetasizer 4000又は好ましくはMalvern Zetasizer 3000HSなどの動的光散乱により測定する。詳細な手順を実施例11.2に示す。第1の可能性は、動的光散乱によりz平均直径ZADを決定することである(PCS-光子相関分光法)。この方法はさらに、多分散性指数(PDI)を示し、ZAD及びPDIは共にキュムラントアルゴリズムを用いて算出される。これらの値は粒子屈折率の知識を必要としない。第2の手段は、別のアルゴリズム、Contin若しくはNNLS、又は自動「Malvern」のもの(サイズ決定装置により提供されるデフォルトアルゴリズム)により全粒子径分布を決定することにより、油滴の直径を算出することである。多くの場合、複合体組成物の粒子屈折率は未知であるので、強度分布のみを考慮に入れ、必要に応じて、強度はこの分布から生じることを意味する。

【0042】

任意的な免疫刺激剤

本発明のさらなる実施形態においては、抗原又は抗原組成物と、0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.4~4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョン及び必要に応じて1種以上のさらなる免疫刺激剤を含むアジュバント組成物と、を含むワクチン又は免疫原性組成物が提供される。

【0043】

一実施形態においては、アジュバント組成物は、本明細書に記載の油及び水のエマルジョンを含む。さらなる実施形態においては、アジュバント組成物はさらに、1種以上のさらなるアジュバント又は免疫刺激剤を含んでもよい。さらなる実施形態においては、アジュバント組成物は、必要に応じてQS21及び/又はMPL以外の、1種以上のさらなるアジュバント又は免疫刺激剤を含む。

【0044】

任意的な追加のアジュバントは、サポニン、リピドA若しくはその誘導体、免疫刺激オリゴヌクレオチド、アルキルグルコサミニドホスフェート、金属塩、Toll様受容体アゴニスト又はそれらの組合せからなる群より選択する。このアジュバントは、Toll様受容体アゴニスト、特に、Toll様受容体2、3、4、7、8若しくは9のアゴニスト、又はサポニンであることが好ましい。アジュバント系は上記一覧からの2種以上のアジュバントを含むことがさらに好ましい。好ましくは、組合せは、サポニン(特に、QS21)アジュバント及び/

10

20

30

40

50

又は3D-MPLなどのToll様受容体4アゴニスト若しくはCpG含有免疫刺激オリゴヌクレオチドなどのToll様受容体9アゴニストを含む。他の好ましい組合せは、サポニン（特に、QS21）、並びにサポニン（特に、QS21）などのToll様受容体4アゴニスト及び3D-MPL又はアルキルグルコサミニドホスフェートなどのToll様受容体4リガンドを含む。

【0045】

一実施形態においては、追加のアジュバントは、Toll様受容体（TLR）4リガンド、好ましくは、リピドA誘導体、特にモノホスホリルリピドA又はより具体的には3-脱アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）などのアゴニストである。

【0046】

3D-MPLは、GlaxoSmithKline Biologicals North Americaにより商標MPL（登録商標）の下で入手可能であり、主にIFN-g（Th1）表現型を有するCD4+ T細胞応答を促進する。それを、GB 2 220 211 Aに開示された方法に従って製造することができる。化学的には、それは3-脱アシル化モノホスホリルリピドAと、3、4、5又は6アシル化鎖との混合物である。好ましくは、本発明の組成物においては、小粒子3D-MPLを用いる。小粒子3D-MPLは、それを0.22 µmフィルターを通して滅菌濾過することができるような粒子径を有する。そのような調製物は国際特許出願WO 94/21292号に記載されている。リピドAの合成誘導体は公知であり、限定されるものではないが、

OM174（2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ-D-グルコピラノシル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-D-グルコピラノシルジヒドロゲンホスフェート）（WO95/14026号）、

OM 294 DP（3S,9R）-3--[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(ジヒドロゲンホスフェート）（WO99/64301号及びWO00/0462号）、

OM 197 MP-Ac DP（3S-,9R）-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1-ジヒドロゲンホスフェート10-(6-アミノヘキサノエート）（WO01/46127号）、などのTLR4アゴニストであると考えられる。

【0047】

用いることができる他のTLR4リガンドは、WO 9850399号若しくは米国特許第6303347号（AGPの調製のためのプロセスも開示されている）に開示されたものなどのアルキルグルコサミニドホスフェート（AGP）、又は米国特許第6764840号に開示されたAGPの製薬上許容される塩である。いくつかのAGPはTLR4アゴニストであり、いくつかはTLR4アンタゴニストである。両方ともアジュバントとして有用であると考えられる。

【0048】

TLR-4を介するシグナル伝達応答を引き起こすことができる他の好適なTLR-4リガンド（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）は、例えば、グラム陰性細菌に由来するリポ多糖及びその誘導体、又はその断片、特に、LPSの非毒性誘導体（3D-MPLなど）である。他の好適なTLRアゴニストは、熱ショックタンパク質（HSP）10、60、65、70、75若しくは90；界面活性剤プロテインA、ヒアルロン酸オリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノゲンペプチド及びb-デフェンシン-2、ムラミルジペプチド（MDP）又は呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質である。一実施形態においては、TLRアゴニストはHSP 60、70又は90である。

【0049】

Toll様受容体（TLR）は、昆虫とヒトの間で進化的に保存されたI型膜貫通受容体である。今までのところ、10種のTLR（TLR 1-10）が確立されている（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。TLRファミリーのメンバーは類似する細胞外及び細胞内ドメインを有する。その細胞外ドメインはロイシンリッチ反復配列を有することが示されており、その細胞内ドメインはインターロイキン-1受容体（IL-1R）の細胞内領域と類似している。TLR細胞は免疫細胞及び他の細胞（血管上皮細胞、脂肪細胞、心筋細胞及び腸上皮細胞など）の間で示差的に発現される。TLRの細胞内ドメインはアダプタータンパク質Myd88と相互作用し、その細

10

20

30

40

50

胞質領域中にIL-1Rドメインをも有し、サイトカインのNF-KB活性化を誘導することができる。このMyd88経路は、サイトカイン放出がTLR活性化により行われる一方通行である。TLRは、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージなど）などの細胞型において主に発現される。

【0050】

TLRを介する刺激による樹状細胞の活性化は、樹状細胞の成熟、及びIL-12などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。今までのところ行われた研究により、TLRは異なる型のアゴニストを認識するが、いくつかのアゴニストはいくつかのTLRにとって共通であることが見出された。TLRアゴニストは主に細菌又はウイルスから誘導され、フラゲリン又は細菌リポ多糖（LPS）などの分子が挙げられる。

10

【0051】

「TLRアゴニスト」とは、直接的リガンドとして、又は内因性若しくは外因性リガンドの生成を介して間接的に、TLRシグナル伝達経路を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができる成分を意味する（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。

【0052】

別の実施形態においては、TLR分子の他の天然又は合成アゴニストを、任意的な追加の免疫刺激剤として用いる。これらのものとしては、限定されるものではないが、TLR2、TLR3、TLR7、TLR8及びTLR9に対するアゴニストが挙げられる。

【0053】

本発明の一実施形態においては、TLR-1を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-1を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、トリアシル化リポペプチド（LP）；フェノール可溶性モジュリン；結核菌（マイコバクテリウム・ツベルクロシス）のLP；S-(2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-(2-RS)-プロピル)-N-パルミトイル-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH、細菌リポタンパク質のアセチル化アミノ末端を模倣するトリヒドロクロリド（Pam₃Cys）LP及びボレリア・ブルグドルフェリ（*Borrelia burgdorferi*）に由来するOspA LPから選択される。

20

【0054】

別の実施形態においては、TLR-2を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-2を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、1種以上のリポタンパク質、ペプチドグリカン、結核菌（*M. tuberculosis*）、*B. burgdorferi*（*B. burgdorferi*）、梅毒トレポネーマ（*T. pallidum*）に由来する細菌リポペプチド；黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）などの種に由来するペプチドグリカン；リポテイコ酸、マンヌロン酸、ナイセリアポリン、細菌線毛、エルシニア病原性因子、CMVビリオン、麻疹ヘマグルチニン、及び酵母由来ザイモサンである。

30

【0055】

別の実施形態においては、TLR-3を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-3を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、二本鎖RNA（dsRNA）、又はポリイノシン-ポリシチジル酸（ポリIC）、ウイルス感染に関連する分子核酸パターンである。

40

【0056】

別の実施形態においては、TLR-5を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-5を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、細菌線毛である。

【0057】

別の実施形態においては、TLR-6を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-6を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、マイコバクテリアリポタンパク

50

質、ジアシル化LP、及びフェノール可溶性モジュリンである。さらなるTLR6アゴニストはWO2003043572号に記載されている。

【 0 0 5 8 】

別の実施形態においては、TLR-7を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-7を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、一本鎖RNA（ssRNA）、ロキソリビン、N7及びC8位でのグアノシン類似体、若しくはイミダゾキノリン化合物、又はその誘導体である。一実施形態においては、TLRアゴニストはイミキモッドである。さらなるTLR7アゴニストはWO02085905号に記載されている。

【 0 0 5 9 】

別の実施形態においては、TLR-8を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを用いる（Sabroeら、JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-8を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、一本鎖RNA（ssRNA）、抗ウイルス活性を有するイミダゾキノリン分子、例えば、レシキモッド（R848）である。レシキモッドもTLR-7により認識することができる。用いることができる他のTLR-8アゴニストとしては、WO2004071459号に記載のものが挙げられる。

【 0 0 6 0 】

免疫刺激オリゴヌクレオチド又は任意の他のToll様受容体（TLR）9アゴニストを用いることもできる。本発明のアジュバント又はワクチン若しくは免疫原性組成物における使用にとって好ましいオリゴヌクレオチドは、CpG含有オリゴヌクレオチド、好ましくは、少なくとも3個、より好ましくは、少なくとも6個以上のヌクレオチドにより分離された2個以上のジヌクレオチドCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドである。CpGモチーフは、シトシンヌクレオチド、次いで、グアニンヌクレオチドである。本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、典型的にはデオキシヌクレオチドである。好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチド中のインターヌクレオチドは、ホスホロジチオエート、又はより好ましくは、ホスホロチオエート結合であるが、ホスホジエステル及び他のヌクレオチド間結合も本発明の範囲内にある。また、混合ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドも本発明の範囲内に含まれる。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド又はホスホロジチオエートを製造する方法は、米国特許第5,666,153号、同第5,278,302号及びWO 95/26204号に記載されている。

【 0 0 6 1 】

好ましいオリゴヌクレオチドの例は、以下の配列を有する。この配列は好ましくは、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド間結合を含む：

OLIGO 1（配列番号1）： TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT（CpG 1826）

OLIGO 2（配列番号2）： TCT CCC AGC GTG CGC CAT（CpG 1758）

OLIGO 3（配列番号3）： ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4（配列番号4）： TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT（CpG 2006）

OLIGO 5（配列番号5）： TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT（CpG 1668）

OLIGO 6（配列番号6）： TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G（CpG 5456）。

【 0 0 6 2 】

別のCpGオリゴヌクレオチドは、それらが重要でない欠失又は付加を有する点で上記の好ましい配列を含んでもよい。本発明において用いられるCpGオリゴヌクレオチドは、当業界で公知の任意の方法（例えば、EP 468520参照）により合成することができる。便利には、そのようなオリゴヌクレオチドを自動化合成装置を用いて合成することができる。

【 0 0 6 3 】

従って、別の実施形態においては、アジュバント組成物はさらに、TLR-1アゴニスト、TLR-2アゴニスト、TLR-3アゴニスト、TLR-4アゴニスト、TLR-5アゴニスト、TLR-6アゴニスト、TLR-7アゴニスト、TLR-8アゴニスト、TLR-9アゴニスト、又はその組合せからなる群より選択される追加の免疫刺激剤を含む。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

本発明における使用のための別の好ましい免疫刺激剤は、Quil A及びその誘導体である。Quil Aは、南米の樹木キラヤ・サポナリア・モリナ (Quilaja Saponaria Molina) から単離されたサポニン調製物であり、Dalsgaardら、1974 (「Saponin adjuvants」、Archiv . fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) によってアジュバント活性を有すると初めて記載された。Quil Aの精製断片、例えば、QS7及びQS21 (QA7及びQA21としても知られる) は、HPLCにより単離され、Quil Aに関連する毒性なしにアジュバント活性を保持する (EP 0 362 278)。QS-21は、CD8+細胞傷害性T細胞 (CTL)、Th1細胞及び主なIgG2a抗体応答を誘導するキラヤ・サポナリア・モリナの樹皮から誘導された天然サポニンであり、本発明の内容において好ましいサポニンである。

【0065】

特に好ましいものであるQS21の特定の製剤が記載されており、これらの製剤はさらにステロールを含む (WO 96/33739号)。スクアレン及びサポニン (必要に応じて、QS21) を含有させる場合、エマルジョン中の油の全体レベルを減少させることができるため、ステロール (必要に応じて、コレステロール) を製剤に含有させることも有益である。これは、製造費用の削減、ワクチン接種の全体的な快適性の改善、並びにまた、IFN- 産生の改善などの、得られる免疫応答の定性的及び定量的改善をもたらす。従って、本発明のアジュバント系は、典型的には、200:1~300:1の範囲の比の代謝可能油:サポニン (w/w) を含み、また、本発明を1:1~200:1、必要に応じて20:1~100:1、又は実質的には48:1である任意の範囲の「低油 (low oil)」形態で用いることができ、このワクチンは、かなり低下した反応原性プロフィールを有する、全ての成分の有益なアジュバント特性を保持する。従って、いくつかの実施形態は、1:1~250:1、又は20:1~200:1、又は20:1~100:1、又は実質的には48:1の範囲のスクアレン:QS21 (w/w) の比率を有する。必要に応じて、本明細書に記載のサポニン:ステロール比で存在するステロール (例えば、コレステロール) も含有させる。

【0066】

抗原及び抗原組成物

ワクチン又は免疫原性製剤は、ヒト又は動物病原体に対して免疫応答を誘起することができる肺炎連鎖球菌抗原 (Streptococcus pneumoniae) を含む。肺炎球菌抗原がタンパク質である場合、そのタンパク質は、必要に応じてコンジュゲート、例えば糖とのコンジュゲートであってもよい。また必要に応じて、タンパク質は、非コンジュゲートであるか、又は免疫原性組成物中に遊離タンパク質として存在してもよい。非コンジュゲートタンパク質は、キャリアタンパク質として糖と共有結合していない。

【0067】

本発明の一実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、必要に応じてポリヒスチジントライアドファミリー (Pht) タンパク質のメンバー、その断片又は融合タンパク質又はその免疫学的機能等価物である、肺炎球菌タンパク質を含む。PhtA、PhtB、PhtD又はPhtEタンパク質は、WO 00/37105号又はWO 00/39299号に開示された配列 (例えば、PhtDについてはWO 00/37105号の配列番号4のアミノ酸配列1~838又は21~838) と80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有してもよい。例えば、融合タンパク質は、PhtA、PhtB、PhtD、PhtEの2、3又は4の完全長又は断片から構成される。融合タンパク質の例は、N末端で最初に言及されたものと連結された、PhtA/B、PhtA/D、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/D、PhtB/E、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/E、PhtE/A、PhtE/B及びPhtE/Dである (例えば、WO 01/98334号を参照)。

【0068】

Phtタンパク質の断片を用いる場合 (別々に、又は融合タンパク質の一部として)、それぞれの断片は必要に応じて、そのようなポリペプチドの1個以上のヒスチジントライアド (triad) モチーフ及び/又はコイルドコイル領域を含む。ヒスチジントライアドモチーフは、配列HxxHxH (式中、Hはヒスチジンであり、xはヒスチジン以外のアミノ酸である) を有するポリペプチドの一部である。コイルドコイル領域は、「Coils」アルゴリズム (Lupas, Aら (1991) Science 252; 1162-1164) により予測される領域である。一実施形

10

20

30

40

50

態においては、その断片又はそれぞれの断片は、1個以上のヒスチジントライアドモチーフ並びに少なくとも1個のコイルドコイル領域を含む。一実施形態においては、その断片又はそれぞれの断片は、正確に、又は少なくとも2、3、4若しくは5個のヒスチジントライアドモチーフ（必要に応じて、2個以上のトライアド間の天然Pht配列、又は天然の肺炎球菌トライアド内Pht配列、例えば、PhtDについては、WO 00/37105号の配列番号4に示されるトライアド内配列と50、60、70、80、90%以上若しくは100%の同一性を有するトライアド内配列と共に）を含む。一実施形態においては、その断片又はそれぞれの断片は、正確に、又は少なくとも2、3若しくは4個のコイルドコイル領域を含む。一実施形態においては、本明細書に開示されたPhtタンパク質には、シグナル配列が結合した完全長タンパク質、シグナルペプチド（例えば、N末端の20個のアミノ酸）が除去された成熟完全長タンパク質、Phtタンパク質の天然変異体及びPhtタンパク質の免疫原性断片（例えば、上記の断片、又はWO 00/37105号若しくはWO 00/39299号におけるアミノ酸配列に由来する少なくとも15若しくは20個の連続するアミノ酸を含むポリペプチドであって、WO 00/37105号若しくはWO 00/39299号における該アミノ酸配列に特異的な免疫応答を誘起することができるポリペプチド）が含まれる。

10

【0069】

特に、本明細書で用いられる用語「PhtD」は、シグナル配列が結合した完全長タンパク質、シグナルペプチド（例えば、N末端の20個のアミノ酸）が除去された成熟完全長タンパク質、PhtDの天然変異体及びPhtDの免疫原性断片（例えば、上記の断片、又はWO 00/37105号若しくはWO 00/39299号におけるPhtDアミノ酸配列に由来する少なくとも15若しくは20個の連続するアミノ酸を含むポリペプチドであって、WO 00/37105号若しくはWO 00/39299号における該PhtDアミノ酸配列に特異的な免疫応答を誘起することができるポリペプチド（例えば、PhtDについては、WO 00/37105号の配列番号4））を含む。

20

【0070】

一実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、ポリヒスチジントライアドファミリー（PhtX）、コリン結合タンパク質ファミリー（CbpX）、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質（若しくは融合物）、ニューモリシン（Ply）、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125及びSp133からなる群より選択される少なくとも1種のタンパク質を含む。別の実施形態においては、免疫原性組成物は、ポリヒスチジントライアドファミリー（PhtX）、コリン結合タンパク質ファミリー（CbpX）、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質（若しくは融合物）、ニューモリシン（Ply）、PspA、PsaA、及びSp128からなる群より選択される2種以上のタンパク質を含む。またもう1つの実施形態においては、免疫原性組成物は、ポリヒスチジントライアドファミリー（PhtX）、コリン結合タンパク質ファミリー（CbpX）、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質（若しくは融合物）、ニューモリシン（Ply）、及びSp128からなる群より選択される2種以上のタンパク質を含む。

30

【0071】

Pht（ポリヒスチジントライアド）ファミリーは、タンパク質PhtA、PhtB、PhtD、及びPhtEを含む。このファミリーは、脂質化配列、プロリンリッチ領域により分離された2つのドメイン、及びおそらく、金属若しくはヌクレオシド結合又は酵素活性に関与するいくつかのヒスチジントライアド、（3-5）コイルドコイル領域、保存されたN末端、並びに異種性C末端を特徴とする。それは試験した全ての株の肺炎球菌に存在する。他の連鎖球菌及びナイセリア菌においては、相同タンパク質も見出されている。本発明の一実施形態においては、本発明のPhtタンパク質はPhtDである。しかしながら、用語「PhtA、B、D及びE」は、以下に記載の引用物に開示された配列を有するタンパク質、並びに参照タンパク質と少なくとも90%の同一性を有する配列同一性を有するその天然の（及び人工の）変異体を指すことが理解される。必要に応じて、それは少なくとも95%の同一性を有し、又は少なくとも97%の同一性を有する。

40

50

【 0 0 7 2 】

PhtXタンパク質に関して、PhtAはWO 98/18930号に開示されており、Sp36とも呼ばれる。上記のように、それはポリヒスチジントライアドファミリーに由来するタンパク質であり、LXXCのII型シグナルモチーフを有する。PhtDはWO 00/37105号に開示されており、Sp036Dとも呼ばれる。上記のように、それもポリヒスチジントライアドファミリーに由来するタンパク質であり、II型LXXCシグナルモチーフを有する。PhtBはWO 00/37105号に開示されており、Sp036Bとも呼ばれる。PhtBファミリーの別のメンバーは、WO 00/17370号に開示されたC3-分解ポリペプチドである。このタンパク質もポリヒスチジントライアドファミリーに由来し、II型LXXCシグナルモチーフを有する。例えば免疫学的機能等価物は、WO 98/18930号に開示されたタンパク質Sp42である。PhtBトランケート（約79 kD）はWO 99/15675号に開示されており、PhtXファミリーのメンバーであるとも考えられる。PhtEはWO 00/30299号に開示されており、BVH-3とも呼ばれる。本明細書で任意のPhtタンパク質に言及する場合、それはPhtタンパク質の免疫原性断片又はその融合物を用いることができることを意味する。例えば、PhtXに対する参照は、Phtタンパク質に由来する免疫原性断片又はその融合物を含む。PhtD又はPhtBに対する参照はまた、例えば、WO 0198334号に見出されるように、PhtDE又はPhtBE融合体に対する参照でもある。

10

【 0 0 7 3 】

ニューモリシンは、異なる細胞溶解活性（溶血活性）及び補体活性化活性を有する多機能トキシンである（Rubinsら、Am. Respir. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)）。このトキシンは肺炎球菌によって分泌されないが、それはオートリシンの影響下での肺炎球菌の溶解の際に放出される。その効果としては、例えば、ヒト単球による炎症性サイトカインの産生、ヒト気道上皮での繊毛の脈動の阻害、並びに好中球の殺菌活性及び移動の低下が挙げられる。ニューモリシンの最も明らかな効果は、赤血球の溶解におけるものであり、それはコレステロールへの結合を含む。これはトキシンであるため、それを解毒する必要がある（すなわち、防御にとって好適な用量で提供された場合、ヒトに対して非毒性である）、その後、in vivoで投与することができる。野生型又は天然のニューモリシンの発現及びクローニングは当業界で公知である。例えば、Walkerら（Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)）、Mitchellら（Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989)）及びMitchellら（NAR, 18:4010 (1990)）を参照されたい。plyの解毒は、化学的手段により、例えば、ホルマリン若しくはグルタルアルデヒド処理又は両方の組合せに供することにより行うことができる（WO 04081515号、PCT/EP2005/010258号）。そのような方法は、様々なトキシンについて当業界でよく知られている。あるいは、plyを遺伝的に解毒することができる。かくして、本発明は、例えば、変異型タンパク質であってよい、肺炎球菌タンパク質の誘導体を包含する。本明細書で用いられる用語「変異型」とは、部位特異的突然変異誘発などの周知の技術又は任意の他の慣用的な方法を用いて、1個以上のアミノ酸の欠失、付加又は置換を受けた分子を意味する。例えば、上記のように、変異型plyタンパク質を、それがその免疫原性エピトープを維持しながら、生物学的に不活性となるように改変することができる。例えば、WO90/06951号、Berryら（Infect Immun, 67:981-985 (1999)）及びWO99/03884号を参照されたい。

20

30

【 0 0 7 4 】

本明細書で用いられる場合、用語「Ply」とは医学的用途にとって好適な変異型の又は解毒された（すなわち、非毒性である）ニューモリシンを指すことが理解される。

40

【 0 0 7 5 】

コリン結合タンパク質ファミリー（CbpX）に関しては、そのファミリーのメンバーは元々、コリンアフィニティクロマトグラフィーにより精製することができる肺炎球菌タンパク質として同定されたものである。コリン結合タンパク質は全て、細胞壁のテイコ酸及び膜に結合したリポテイコ酸のホスホリルコリン部分に非共有結合している。構造的に、それらはファミリー全体にわたって一般的にいくつかの領域を有するが、このタンパク質の正確な性質（アミノ酸配列、長さなど）は変化してもよい。一般的には、コリン結合タンパク質は、N末端領域（N）、保存された反復領域（R1及び/若しくはR2）、プロリンリッ

50

チ領域 (P)、並びに該タンパク質の約半分を含む、複数の反復からなる、保存されたコリン結合領域 (C) を含む。本明細書で用いられるように、用語「コリン結合タンパク質ファミリー (CbpX)」は、WO 97/41151号で同定されたコリン結合タンパク質、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD及びCbpGからなる群より選択される。CbpAはWO 97/41151号に開示されている。CbpD及びCbpGはWO 00/29434号に開示されている。PspCはWO 97/09994号に開示されている。PbcAはWO 98/21337号に開示されている。SpsAはWO 98/39450号に開示されたコリン結合タンパク質である。必要に応じて、コリン結合タンパク質は、CbpA、PbcA、SpsA及びPspCからなる群より選択される。

【0076】

本発明の実施形態は、「CbpX」が上記に定義されたものであり、「トランケート」がコリン結合領域 (C) の50%以上を欠くCbpXタンパク質を指す、CbpXトランケートを含む。必要に応じて、そのようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠く。必要に応じて、そのようなタンパク質トランケートは、(i) コリン結合領域及び(ii) 該タンパク質のN末端半分の部分を欠き、並びに少なくとも1個の反復領域 (R1又はR2) を保持する。必要に応じて、該トランケートは、2つの反復領域 (R1及びR2) を有する。そのような実施形態の例は、WO 99/51266号又はWO 99/51188号に例示されたNR1xR2及びR1xR2であるが、同様のコリン結合領域を欠く他のコリン結合タンパク質も本発明の範囲内に意図される。

【0077】

LytXファミリーは、細胞溶解に関連する膜結合タンパク質である。そのN末端ドメインはコリン結合ドメインを含むが、LytXファミリーは上記のCbpAファミリーにみとめられる全ての特徴を有さず、かくして、本発明については、LytXファミリーはCbpXファミリーとは異なると考えられる。CbpXファミリーとは対照的に、C末端ドメインは、LytXタンパク質ファミリーの触媒ドメインを含む。前記ファミリーは、LytA、B及びCを含む。LytXファミリーに関して、LytAはRondaら、Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)に開示されている。LytBはWO 98/18930号に開示されており、Sp46とも呼ばれる。LytCもWO 98/18930号に開示されており、Sp91とも呼ばれる。本発明の実施形態はLytCを含む。

【0078】

別の実施形態は、「LytX」が上記に定義され、「トランケート」がコリン結合領域の50%以上を欠くLytXタンパク質を指す、LytXトランケートを含む。必要に応じて、そのようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠く。本発明のさらに別の実施形態は、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質 (又は融合物) を含む。必要に応じて、これはCbpXのNR1xR2 (又はR1xR2) とLytX (例えば、LytCCterm又はSp91Cterm) のC末端部分 (Cterm、すなわち、コリン結合ドメインを欠く) とを含む。必要に応じて、CbpXは、CbpA、PbcA、SpsA及びPspCからなる群より選択される。必要に応じて、それはCbpAである。必要に応じて、LytXはLytC (Sp91とも呼ばれる) である。本発明の別の実施形態は、コリン結合ドメイン (C) を欠くPspA又はPsaAトランケートであり、LytXとの融合タンパク質として発現される。必要に応じて、LytXはLytCである。

【0079】

PsaA及びPspAに関しては、両方とも当業界で公知である。例えば、PsaA及びその膜貫通欠失変異体は、Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62により記載されている。PspA及びその膜貫通欠失変異体は、例えば、米国特許第5,804,193号、WO 92/14488号、及びWO 99/53940号に開示されている。

【0080】

Sp128及びSp130は、WO 00/76540号に開示されている。Sp125は、LPXTG (式中、Xは任意のアミノ酸である) の細胞壁アンカーモチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質の例である。このモチーフを有するこのクラスの肺炎球菌表面タンパク質のうちの任意のタンパク質は、本発明において有用であることがわかっており、従って、本発明のさらなるタンパク質であると考えられる。Sp125自体は、WO 98/18930号に開示されており、ZmpB (亜鉛メタロプロテイナーゼ) としても知られる。Sp101はWO 98/06734号に開示されている (それは参照番号y85993を有する)。それはI型シグナル配列を特徴とする。Sp133はWO 98/0673

10

20

30

40

50

4号に開示されている（それは参照番号y85992を有する）。それもI型シグナル配列を特徴とする。

【0081】

本発明のタンパク質を有益に組み合わせることもできる。組み合わせるとは、免疫原性組成物が、キャリアタンパク質として、又は遊離タンパク質として、又は2つの混合物として、以下の組合せのうちからタンパク質の全てを含むことを意味する。例えば、本明細書の以後に記載する2つのタンパク質の組合せにおいては、両タンパク質をキャリアタンパク質として用いてもよいし、又は両タンパク質を遊離タンパク質として存在させてもよいし、又は両方をキャリアとして、及び遊離タンパク質として存在させてもよいし、又は一方をキャリアタンパク質及び遊離タンパク質として存在させるが、他方をキャリアタンパク質としてのみ、若しくは遊離タンパク質としてのみ存在させてもよいし、又は一方をキャリアタンパク質として存在させ、他方を遊離タンパク質として存在させてもよい。3種のタンパク質の組合せを与える場合、同様の可能性が存在する。組合せとしては、限定されるものではないが、PhtD + NR1xR2、PhtD + NR1xR2-Sp91Ctermキメラ若しくは融合タンパク質、PhtD + Ply、PhtD + Sp128、PhtD + PsaA、PhtD + PspA、PhtA + NR1xR2、PhtA + NR1xR2-Sp91Ctermキメラ若しくは融合タンパク質、PhtA + Ply、PhtA + Sp128、PhtA + PsaA、PhtA + PspA、NR1xR2 + LytC、NR1xR2 + PspA、NR1xR2 + PsaA、NR1xR2 + Sp128、R1xR2 + LytC、R1xR2 + PspA、R1xR2 + PsaA、R1xR2 + Sp128、R1xR2 + PhtD、R1xR2 + PhtAが挙げられる。必要に応じて、NR1xR2（又はR1xR2）はCbpA又はPspCに由来する。必要に応じて、それはCbpAに由来するものである。他の組合せとしては、PhtD + NR1xR2 + Ply、及びPhtA + NR1xR2 + PhtDなどの3種のタンパク質の組合せが挙げられる。一実施形態においては、ワクチン組成物は、キャリアタンパク質として解毒ニューモリシン及びPhtD又はPhtDEを含む。さらなる実施形態においては、ワクチン組成物は、遊離タンパク質として解毒ニューモリシン及びPhtD又はPhtDEを含む。

【0082】

PhtD又はその融合タンパク質に対する有効な免疫応答は、例えば、実施例15に記載のものなどの防御アッセイにより測定する。有効な免疫応答は、異種株によるチャレンジの7日後に、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%又は90%の生存を提供する。チャレンジ株が異種であるとするれば、提供される防御は、PhtD又はその融合タンパク質に対する免疫応答に起因するものである。

【0083】

あるいは、PhtDに対する有効な免疫応答は、実施例14に記載のELISAにより測定する。有効な免疫応答は、少なくとも250、300、350、400、500、550又は600 µg/mlのGMCの抗PhtD IgG応答を与える。

【0084】

一実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、ニューモリシンを含む。

【0085】

一実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、米国特許第6699703号に開示された肺炎球菌タンパク質、例えば、米国特許第6699703号の配列番号1～5326の配列を有する又は該配列によりコードされる肺炎球菌タンパク質を含む。

【0086】

本発明の一実施形態において、免疫原性組成物はPCT/EP2007/060743号に開示されていない肺炎球菌タンパク質を含む。

【0087】

本発明はさらに、本発明の免疫原性組成物と製薬上許容される賦形剤とを含むワクチンを提供する。

【0088】

一実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、米国特許第6699703号に開示されたPhtA、PhtD、PhtB、PhtE、LytB、LytC、LytA、Sp125、SP101、Sp128、Sp130、Sp133又はタンパク質、例えば米国特許第6699703号の配列番号5225、5200、3166、4360、5137、4263

10

20

30

40

50

、3166、5226、3716、4360、5243、3964、5179、3850、4263、5137、5226、5325、3850、5179又は5325に示される又は該配列によりコードされる肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）タンパク質、あるいはそれらの免疫学的機能等価物からなる群より選択される肺炎球菌タンパク質を含む。免疫学的機能等価物には、上記配列と少なくとも80、90、95、98又は99%の同一性を有する配列が含まれる。免疫学的機能等価物にはまた、上記配列の少なくとも6、10、20、30、40又は50個の連続するアミノ酸を有する断片が含まれる。免疫学的機能等価物は、天然の抗原を認識する免疫応答を誘起することができる。

【0089】

ワクチン接種

本発明の免疫原性組成物を含むワクチン調製物を用いて、全身又は粘膜経路を介して該ワクチンを投与することにより、感染症に罹りやすい哺乳動物を保護又は治療することができる。これらの投与としては、筋肉内、腹腔内、皮内若しくは皮下経路を介する注入；又は口/消化器、呼吸器若しくは尿生殖器への粘膜投与が挙げられる。本発明のワクチンを単回用量として投与することができるが、その成分を同時に又は異なる時点で一緒に同時投与してもよい（例えば、肺炎球菌糖コンジュゲートを、互いに関して免疫応答の最適な調整のために、別々に、同時に、又はワクチンの任意の細菌タンパク質成分の投与の1~2週間後に、投与することができる）。さらに、本発明のワクチンを、プライミング用量については1Mで、追加免疫用量については1Nで投与することができる。

【0090】

ワクチン中のタンパク質抗原の含量は、典型的には1~100 µg、好ましくは5~50 µg、最も典型的には5~25 µgの範囲にあるであろう。初回ワクチン接種後、被験体は十分に間隔を空けた1回又は数回の追加免疫を受けてもよい。

【0091】

ワクチン調製物は、一般的にはVaccine Design（「サブユニット及びアジュバント手法（The subunit and adjuvant approach）」）（Powell M.F. & Newman M.J.（編）（1995）Plenum Press New York）に記載されている。リボソーム内の封入は、Fullerton, 米国特許第4,235,877号に記載されている。

【0092】

本発明のワクチンを溶液中で保存するか、又は凍結乾燥することができる。好ましくは、この溶液をスクロース又はラクトースなどの糖の存在下で凍結乾燥する。それらを凍結乾燥し、使用前に即時に再構成させるのがさらに好ましい。

【0093】

本発明の一態様においては、必要に応じて凍結乾燥形態の本発明の免疫原性組成物を含むバイアル、及び本明細書に記載のアジュバントを含むバイアルを含むワクチンキットが提供される。本発明のこの態様においては、アジュバントを用いて凍結乾燥された免疫原性組成物を再構成できると想定される。

【0094】

本発明のワクチンは任意の経路により投与することができるが、皮膚への記載のワクチンの投与（ID）は、本発明の一実施形態を形成する。ヒトの皮膚は、表皮の上にある角質層と呼ばれる外側の「角質」上皮を含む。この表皮の下は、真皮と呼ばれる層であり、次いで皮下組織がある。研究者らにより、皮膚、特に真皮へのワクチンの注入が免疫応答を刺激し、いくつかのさらなる利点と関連することも示された。本明細書に記載のワクチンを用いる皮内ワクチン接種は、本発明の好ましい特徴を形成する。

【0095】

皮内注入の従来技術である「マントゥー法」は、皮膚を洗浄した後、一方の手を伸ばし、狭いゲージの針（26~31ゲージ）の斜角を上に向け、針を10~15°の角度で挿入するステップを含む。針の斜角が挿入された後、針の円筒部を低くし、皮膚の下でそれを上昇させるためにわずかに圧力をかけながらさらに進行させる。次いで、液体を非常にゆっくりと注入することによって、皮膚表面上に水疱又は隆起を形成させた後、針をゆっくりと引き抜く。

10

20

30

40

50

【0096】

より最近では、液体薬剤を皮膚の中又は皮膚を横切って投与するように特別に設計されたデバイス、例えば、WO 99/34850号及びEP 1092444に記載のデバイス、また、例えばWO 01/13977号；米国特許第5,480,381号、同第5,599,302号、同第5,334,144号、同第5,993,412号、同第5,649,912号、同第5,569,189号、同第5,704,911号、同第5,383,851号、同第5,893,397号、同第5,466,220号、同第5,339,163号、同第5,312,335号、同第5,503,627号、同第5,064,413号、同第5,520,639号、同第4,596,556号、同第4,790,824号、同第4,941,880号、同第4,940,460号、WO 97/37705号及びWO 97/13537号に記載のジェット注入デバイスが記載されている。ワクチン調製物の皮内投与の別の方法としては、従来のシリンジ及び針、又は固体ワクチンの弾道送達のために設計されたデバイス（WO 99/27961号）、又は経皮パッチ（WO 97/48440号；WO 98/28037号）；又は皮膚の表面への適用（皮内若しくは経皮送達、WO 98/20734号；WO 98/28037号）がある。

10

【0097】

本発明のワクチンを皮膚、又はより具体的には真皮に投与しようとする場合、ワクチンは少ない液体容量、特に、約0.05 ml ~ 0.2 mlの容量にある。

【0098】

本発明の皮膚又は皮内ワクチン中の抗原の含量は、筋肉内ワクチンにみとめられるものと同様の慣用的な用量であってよい（上記参照）。しかしながら、製剤が「低用量」であってよいことが皮膚又は皮内ワクチンの特徴である。従って、「低用量」ワクチン中のタンパク質抗原は、用量あたり0.1 ~ 10 µg、好ましくは0.1 ~ 5 µgのできるだけ少ない量で存在することが好ましい。糖（好ましくは、コンジュゲートされた）抗原は、用量あたり0.01 ~ 1 µg、好ましくは0.01 ~ 0.5 µgの範囲の糖で存在してもよい。

20

【0099】

本明細書で用いられる用語「皮内送達」とは、皮膚中の真皮の領域へのワクチンの送達を意味する。しかしながら、ワクチンは真皮のみに局在化する必要はない。真皮はヒトの皮膚の表面から約1.0 ~ 約2.0 mmに位置する皮膚中の層であるが、個体間及び身体の異なる部分において一定量の変動が存在する。一般的には、皮膚の表面から1.5 mm下に行くことにより真皮に到達すると期待することができる。真皮は表面の角質層と表皮と、下の皮下層との間に位置する。送達方法に応じて、最終的にはワクチンを真皮内のみ、若しくは主に真皮内に局在化させるか、又は最終的には表皮と真皮内に分布させることができる。

30

【0100】

各ワクチン用量中の各抗原の量を、典型的なワクチン被接種者において有意な有害副作用をもたらさずに免疫防御応答を誘導する量として選択する。そのような量は、特定の免疫原を使用し、それを提供する方法に応じて変化するであろう。

【0101】

さらなる実施形態においては、実質的に本明細書に記載の組成物の投与による、疾患に罹りやすいか又は疾患に罹患している個体の治療の方法が提供される。

【0102】

また、個体が、感染性細菌及びウイルス疾患、寄生虫疾患、特に、細胞内病原体疾患、増殖性疾患、例えば前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌若しくはメラノーマ癌など；非癌性慢性障害、アレルギーを含む群から選択される疾患に罹ることを予防する方法であって、該個体への実質的に本明細書に記載の組成物の投与を含む方法も提供される。

40

【0103】

さらなる実施形態においては、抗原又は抗原組成物と、ヒト用量あたり0.5 ~ 10 mgの代謝可能油、0.5 ~ 11 mgのトコール及び0.1 ~ 4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンからなるアジュバント組成物とを含む、症状又は疾患の予防的治療又は治療における使用のためのワクチン組成物が提供される。

【0104】

50

さらなる実施形態においては、症状又は疾患の予防的治療又は治療における使用のための医薬の製造における、抗原又は抗原組成物と、ヒト用量あたり0.5～10 mgの代謝可能油、0.5～11 mgのトコール及び0.1～4 mgの乳化剤を含む水中油型エマルジョンからなるアジュバント組成物とを含むワクチン組成物の使用が提供される。

【実施例】

【0105】

本発明を、以下の、非限定的な実施例を参照することによりさらに説明する。

【0106】

実施例Iは、マウス、フェレット、ブタ及びヒト試験において用いられる免疫学的読み出し方法を記載する。

実施例IIは、例示された試験において用いられた水中油型エマルジョン及びアジュバント製剤の調製を記載する。

実施例IIIは、スプリットインフルエンザ抗原調製物及び様々な用量のAS03アジュバントを含むワクチンを用いた18～59歳の成人集団における臨床試験を示す。

実施例IVは、プライミング（初回投与）されたBALB/cマウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン（様々な用量のAS03アジュバントを含む）の前臨床評価を示す。

実施例Vは、プライミング（初回投与）されたC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン（様々な用量のAS03アジュバントを含む）の前臨床評価を示す。

実施例VIは、プライミングされたC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン（様々な用量のAS03アジュバント及び低用量の抗原を含む）の前臨床評価を示す。

実施例VIIは、ナイーブなC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットH5N1ワクチン（様々な用量のAS03アジュバント及び抗原を含む）の前臨床評価を示す。

実施例VIIIは、プライミングされた巨大白ブタにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加インフルエンザワクチンの前臨床評価を示す。

【0107】

実施例I - 免疫学的読み出し方法

1.1. マウスの方法

1.1.1. 血球凝集抑制試験

試験原理（古典的手順）

3種の（季節性）インフルエンザウイルス株に対する抗ヘマグルチニン抗体力価を、血球凝集抑制試験（HI）を用いて決定する。HI試験の原理は、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）による赤血球（RBC）の血球凝集を阻害する特定の抗インフルエンザ抗体の能力に基づく。熱不活化血清をKaolin及びRBCにより処理して、非特異的阻害因子を除去する。予備処理後、血清の2倍希釈液を、4血球凝集単位の各インフルエンザ株と共にインキュベートする。次いで、赤血球を添加し、凝集の阻害をスコア化する。血球凝集を完全に阻害した血清の最も高い希釈率の逆数として、力価を表す。血清の最初の希釈率が1:20である場合、検出不可能なレベルを10に等しい力価としてスコア化する。

【0108】

H5N1への適合（ウマ赤血球を用いるHIの具体的説明）：

抗HA抗体を決定するための古典的HIアッセイはH5N1株についてはよく機能しないと記録されているため、ウマRBCを用いて適合化されたプロトコルを用いた。ウマの赤血球を、H5N1パンデミック株のために用いた。0.5%BSA（ウシ血清アルブミン、最終濃度）を含むリン酸バッファー中の0.5%（最終濃度）のウマ赤血球細胞懸濁液。この懸濁液を、同じリン酸バッファーを用いて赤血球を洗浄し、次いで遠心分離工程（10分、2000 rpm）を行って毎日調製する。この洗浄工程を、1回繰り返す必要がある。血清とウイルス懸濁液の反応混合物へのウマ赤血球の添加後、ウマ赤血球の低い沈降速度に起因して、室温（RT、

10

20

30

40

50

20 +/-2)で2時間、プレートインキュベーターに必要がある。

【0109】

統計学的分析

統計学的分析を、UNISTATを用いてワクチン接種後のHI力価に対して実施した。分散の分析のために適用したプロトコルを、以下のように簡単に説明することができる：

- ・データのLog変換、
- ・群分布の正規性を検証するための各集団（群）に対するShapiro-Wilk検定、
- ・異なる集団（群）間の分散の均一性を検証するためのCochran検定、
- ・選択されたデータに対する分散の分析、
- ・2方向ANOVAの相互作用に関する検定、
- ・複数比較のためのTukey-HSD検定。

10

【0110】

1.1.2. 細胞内サイトカイン染色

この技術は、サイトカイン産生に基づいて抗原特異的Tリンパ球の定量化を可能にする：エフェクターT細胞及び/若しくはエフェクター記憶T細胞はIFN- γ を産生し、並びに/又は中央記憶T細胞はIL-2を産生する。PBMCを、免疫の7日後に回収する。

【0111】

リンパ球を、分泌阻害剤（ブレフェルジン）の存在下でin vitroで再刺激する。次いで、これらの細胞を、蛍光抗体（CD4、CD8、IFN- γ 及びIL-2）を用いる慣用の免疫蛍光手順により処理する。結果を、CD4/CD8 T細胞内のサイトカイン陽性細胞の頻度として表す。T細胞のサイトカインの細胞内染色を、2回目の免疫の7日後にPBMCに対して実施した。血液をマウスから回収し、ヘパリン添加培地RPMI+Add中にプールした。血液については、RPMI+Addで希釈されたPBL懸濁液を、推奨されたプロトコルに従ってLympholyte-Mammal勾配（2500 rpm、室温で20分間遠心分離）上で層化した。境界面の単核細胞を取り出し、RPMI+Add中で2回洗浄し、PBMC懸濁液をRPMI 5%ウシ胎仔血清中、 2×10^6 細胞/mlに調整した。

20

【0112】

PBMCのin vitroでの抗原刺激を、Whole FI（ $1 \mu\text{gHA/株}$ ）と共に 1×10^7 細胞/ml（チューブFACS）の最終濃度で実行した後、抗CD28及び抗CD49d（両方とも $1 \mu\text{g/ml}$ ）を添加して37°Cで2時間インキュベーターした。

30

【0113】

抗原再刺激工程の後、PBMCを、37°CのBrefeldin（ $1 \mu\text{g/ml}$ ）の存在下で37°Cで一晩インキュベーターして、サイトカイン分泌を阻害する。

【0114】

IFN- γ /IL-2/CD4/CD8染色を以下のように実施した：細胞懸濁液を洗浄し、2%Fcブロック試薬（1/50；2.4G2）を含む50 μl のPBS 1%FCS中に再懸濁した。4°Cで10分間インキュベーターした後、抗CD4-PE（2/50）及び抗CD8 perCp（3/50）の混合物50 μl を添加し、4°Cで30分間インキュベーターした。PBS 1%FCS中で洗浄した後、200 μl のCytotfix-Cytoperm（Kit BD）中に再懸濁することにより細胞を透過処理し、4°Cで20分間インキュベーターした。次いで、細胞をPerm Wash（Kit BD）で洗浄し、Perm Wash中に希釈した抗IFN- γ APC（1/50）+抗IL-2 FITC（1/50）の混合物50 μl で再懸濁した。4°Cで最小で2時間、最大で一晩インキュベーターした後、細胞をPerm Washで洗浄し、PBS 1%FCS + 1%パラホルムアルデヒド中に再懸濁した。サンプル分析をFACSにより実施した。生細胞をゲーティング（FSC/SSC）、CD4+T細胞上で約20,000事象（リンパ球）又は35,000事象について獲得した。IFN- γ +又はIL2+の割合を、CD4+及びCD8+ゲーティング集団について算出した。

40

【0115】

1.1.3. 抗H5N1 ELISA

抗H5N1 Ig、IgG1及びIgG2b抗体力価の定量を、コーティングとしてスプリットH5N1を用いるELISAにより実施した。ウイルス及び抗体溶液を、100 μl /ウェルで用いた。スプリットウイルスH5N1を、PBS中、 $1 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度で希釈し、96穴マイクロタイタープレート

50

(Maxisorb Immunoplate Nunc 439454)のウェルに4 で一晩かけて吸着させた。次いで、プレートを、200 μ l/ウェルの1%BSA及び0.1%Tween 20(飽和バッファー)を含むPBSと共に37 で1時間インキュベートした。飽和バッファー中の血清の12個の2倍希釈液をH5 N1被覆プレートに添加し、37 で1時間30分インキュベートした。プレートをPBS 0.1% Tween 20で4回洗浄した。1/500に希釈されたビオチン化コンジュゲート化抗マウスIg(Prozan-E0413)若しくはビオチン化コンジュゲート化抗マウスIgG1(Imtech 1070-08)、又はPBS 1%BSA 0.1%Tween 20中に1/4000に希釈されたビオチン化抗マウスIgG2b(Imtech 1090-08)を各ウェルに添加し、37 で1時間30分インキュベートした。洗浄工程の後、PBS 1%BSA Tween 20中で1/10000に希釈されたストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲート(Prozan P0397)と共に30分間インキュベートした。

10

【0116】

比色的明示のために、プレートを、0.1 Mクエン酸バッファーpH 4.2中の0.04% o-フェニルジアミン(Sigma P4664)及び0.03% H_2O_2 の溶液と共に22 で20分間インキュベートした。反応を2N H_2SO_4 を用いて停止させ、マイクロプレートを490~630 nmで読み取った。

【0117】

1.2. フェレットの方法

1.2.1. 血球凝集抑制試験(HI)

試験手順

3種のインフルエンザウイルス株に対する抗ヘマグルチニン抗体力価を、血球凝集抑制試験(HI)を用いて決定した。HI試験の原理は、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)によるニワトリ赤血球(RBC)の血球凝集を阻害する特定の抗インフルエンザ抗体の能力に基づく。最初に血清を25%ノイラミニダーゼ溶液(RDE)で処理し、熱不活化して、非特異的阻害因子を除去した。予備処理後、血清の2倍希釈液を、4血球凝集単位の各インフルエンザ株と共にインキュベートした。次いで、ニワトリ赤血球を添加し、凝集の阻害をスコア化した。血球凝集を完全に阻害した血清の最も高い希釈率の逆数として、力価を表した。血清の最初の希釈率が1:10である場合、検出不可能なレベルを5に等しい力価としてスコア化した。

20

【0118】

統計学的分析

統計学的分析を、UNISTATを用いてHI力価(41日目、チャレンジ前)に対して実施した。分散の分析のために適用したプロトコルを、以下のように簡単に説明することができる：

30

- ・データのLog変換、
- ・群分布の正規性を検証するための各集団(群)に対するShapiro-Wilk検定、
- ・異なる集団(群)間の分散の均一性を検証するためのCochran検定、
- ・1方向ANOVAの相互作用に関する検定、
- ・複数比較のためのTuckey-HSD検定。

【0119】

1.2.2. 体温モニター

個体の温度を、トランスミッターを用いて、及びテレメトリー記録によりチャレンジ期間の間にモニターした。全ての埋込み物を調べ、改造し、新しい補正をDSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands)により実施した後、腹腔中に入れた。全ての動物を、これらの実験の間に1個のケージ中で個々に飼育した。温度をチャレンジの4日前からチャレンジの7日後まで15分毎に記録した。

40

【0120】

1.2.3. 鼻洗浄

覚醒した動物の両方の鼻孔に5 mlのPBSを投与することにより、鼻洗浄を行った。接種物をペトリ皿中に回収し、ドライアイス上のサンプル容器中に入れた。

【0121】

50

鼻洗浄液中のウイルス力価測定

全ての鼻サンプルを最初にSpin Xフィルター (Costar) を通して滅菌濾過して、細菌夾雑物を除去した。鼻洗浄液の連続10倍希釈液50 µlを、50 µlの培地を含むマイクロタイタープレート (10ウェル/希釈液) に移した。100 µlのMDCK細胞 (2.4 x 10⁵細胞/ml) を各ウェルに添加し、35 °Cで5~7日間インキュベートした。

【0122】

インキュベーションの5~7日後、培養培地を穏やかに除去し、100 µlの1/20 WST-1を含有する培地を添加し、さらに18時間インキュベートした。

【0123】

生細胞によるWST-1の還元の際に産生された黄色ホルマジン色素の強度は、ウイルス力価測定アッセイの終わりにウェル中に存在する生細胞数に比例し、好適な波長 (450ナノメートル) での各ウェルの吸光度を測定することにより定量する。カットオフを、未感染対照細胞のOD平均を0.3 ODと定義する (0.3 ODは未感染対照細胞のODの+/-3 標準偏差に対応する)。ODがカットオフより小さい場合、正のスコアを定義し、対照的に、ODがカットオフより大きい場合、負のスコアを定義する。ウイルス出芽力価を、「Reen及びMuench」により決定し、Log TCID50/mlとして表した。

10

【0124】

1.3. プタの方法1.3.1. 血球凝集抑制試験 (HI)試験手順

3種のインフルエンザウイルス株に対する抗ヘマグルチニン抗体力価を、血球凝集抑制試験 (HI) を用いて決定した。HI試験の原理は、インフルエンザウイルスヘマグルチニン (HA) によるニワトリ赤血球 (RBC) の血球凝集を阻害する特定の抗インフルエンザ抗体の能力に基づく。最初に血清を25% ノイラミニダーゼ溶液 (RDE) で処理し、熱不活化して、非特異的阻害因子を除去した。予備処理後、血清の2倍希釈液を、4血球凝集単位の各インフルエンザ株と共にインキュベートした。次いで、ニワトリ赤血球を添加し、凝集の阻害をスコア化した。血球凝集を完全に阻害した血清の最も高い希釈率の逆数として、力価を表した。血清の最初の希釈率が1:10である場合、検出不可能なレベルを5に等しい力価としてスコア化した。

20

【0125】

統計学的分析

統計学的分析を、UNISTATを用いてHI力価 (41日目、チャレンジ前) に対して実施した。分散の分析のために適用したプロトコルを、以下のように簡単に説明することができる：

30

- ・データのLog変換、
- ・群分布の正規性を検証するための各集団 (群) に対するShapiro-Wilk検定、
- ・異なる集団 (群) 間の分散の均一性を検証するためのCochran検定、
- ・1方向ANOVAの相互作用に関する検定、
- ・複数比較のためのTuckey-HSD検定。

【0126】

40

1.4. ヒトにおける免疫応答を評価するためのアッセイ1.4.1. 血球凝集抑制アッセイ

免疫応答を、WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, USA (1991) により記載された方法を用いてHI抗体を測定することにより決定した。

【0127】

4血球凝集抑制単位 (4 HIU) の好適な抗原及び0.5%トリ赤血球懸濁液を用いる標準化されかつ徹底的に検証された微小化方法を用いて、解凍された凍結血清サンプルの抗体力価測定を行った。非特異的血清阻害因子を、熱処理及び受容体破壊酵素により除去した。

【0128】

50

得られた血清を、HI抗体レベルについて評価した。最初の1:10の希釈率から開始して、連続希釈液（2倍ずつ）を、1:20480の最終希釈率まで調製した。

【0129】

力価測定を終点を、血球凝集の完全な阻害（100%）を示す最も高い希釈率として取った。全てのアッセイを二重で行った。

【0130】

1.4.2. ノイラミニダーゼ阻害アッセイ

このアッセイをフェツイン被覆マイクロタイタープレート中で実施した。抗血清の2倍連続希釈液を調製し、標準化された量のインフルエンザA H3N2、H1N1又はインフルエンザBウイルスと混合した。この試験は、フェツインからノイラミン酸を酵素的に放出するノイラミニダーゼの生物学的活性に基づくものであった。末端ノイラミン酸の切断後、 α -D-ガラクトース-N-アセチル-ガラクトサミンを脱マスクングした。ガラクトース構造に特異的に結合する、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ラッカセイ由来ピーナッツ凝集素をウェルに添加した。結合した凝集素の量を検出し、テトラメチルベンジジン（TMB）との基質反応において定量することができる。ウイルスノイラミニダーゼ活性を依然として少なくとも50%阻害する最も高い抗体希釈率を示し、これがNI力価である。

10

【0131】

1.4.3. 中和抗体アッセイ

中和抗体測定を、解凍された凍結血清サンプルで行った。血清中に含まれる抗体によるウイルスの中和を、微小中和アッセイにおいて決定した。該アッセイにおけるさらなる処理を行わずに、血清を用いた。各血清を3回試験した。標準化された量のウイルスを、血清の連続希釈液と混合し、抗体とウイルスとの結合を可能にするためにインキュベートした。次いで、規定量のMDCK細胞を含む細胞懸濁液をウイルスと抗血清の混合物に添加し、33℃でインキュベートした。インキュベーション期間の後、ウイルスの複製を、ニワトリ赤血球の血球凝集により可視化した。血清の50%の中和力価を、Reed及びMuenchの方法により算出した。

20

【0132】

1.4.4. 細胞媒介性免疫をサイトカインフローサイトメトリー（CFC）により評価した

末梢血抗原特異的CD4及びCD8 T細胞を *in vitro* で再刺激して、その対応する抗原と共にインキュベートした場合、IL-2、CD40L、TNF- α 及びIFN γ を産生することができる。結果として、抗原特異的CD4及びCD8 T細胞を、細胞表現型並びに細胞内サイトカイン産生の慣用的な免疫蛍光標識を用いたフローサイトメトリーにより数えることができる。本研究においては、インフルエンザワクチン抗原並びに特定のインフルエンザタンパク質から誘導されたペプチドを抗原として用いて、インフルエンザ特異的T細胞を再刺激した。結果を、CD4又はCD8 T細胞亜集団内のサイトカイン陽性CD4又はCD8 T細胞の頻度として表した。

30

【0133】

1.4.5. 統計学的方法

1.4.5.1. 主要評価項目

・ワクチン接種後の7日間の追跡期間（すなわち、ワクチン接種日及びその後の6日間）と全体にわたる応答型局所及び全身兆候及び徴候の割合、強度及びワクチン接種との関係

40

・ワクチン接種後の21日間の追跡期間（すなわち、ワクチン接種日及びその後の20日間）と全体にわたる非応答型局所及び全身兆候及び徴候の割合、強度及びワクチン接種との関係。

・試験全体にわたる重篤な有害事象の発生。

【0134】

1.4.5.2. 二次評価項目

液性免疫応答について：

観察される変数：

・0及び21日目：ワクチン中に示される3種のインフルエンザウイルス株（抗H1N1、抗H3

50

N2及び抗B抗体)の各々に対して別々に試験された、血清血球凝集抑制(HI)及びNI抗体力価。

・0及び21日目：ワクチン中に示される3種のインフルエンザウイルス株の各々に対して別々に試験された、中和抗体力価。

【0135】

誘導される変数(95%信頼区間と共に)：

- ・ワクチン接種の前後における血清HI抗体の幾何学的平均力価(GMT)(95%信頼区間(95%CI))
- ・21日目における血清変換率^{*}(95%CIと共に)
- ・21日目における変換係数^{**}(95%CIと共に)
- ・21日目における血清防御率^{***}(95%CIと共に)
- ・全ての時点における血清NI抗体GMT(95%信頼区間と共に)。

^{*}各ワクチン株につき、0日目と比較した21日目における血清HI力価の少なくとも4倍の増加を有するワクチン被接種者の割合として定義された血清変換率。

^{**}各ワクチン株につき、0日目と比較した21日目における血清HI GMTの増加倍数として定義された変換係数。

^{***}通常は防御を示すと許容されるワクチン接種後(各ワクチン株につき)の血清HI力価=40であるワクチン被接種者の割合として定義された防御率。

【0136】

いくつかの臨床試験については、反応原性/安全性が二次評価項目であり、免疫原性が主要評価項目であってよいことが理解されるべきである。

【0137】

細胞媒介性免疫(CMI)応答について：

観察される変数：

0及び21日目：異なる試験における 10^6 個あたりのサイトカイン陽性CD4/CD8細胞の頻度。

各試験は以下のものに対するCD4/CD8 T細胞の応答を定量するものである：

- ・ペプチドインフルエンザ(pf)抗原(これらの抗原の正確な性質及び起源を与える/説明する必要がある)
- ・スプリットインフルエンザ(sf)抗原
- ・全インフルエンザ(wf)抗原。

【0138】

誘導される変数：

- ・少なくとも2種の異なるサイトカイン(CD40L、IL-2、IFN、TNF)を産生する細胞
- ・少なくともCD40L及び別のサイトカイン(IL-2、TNF、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIL-2及び別のサイトカイン(CD40L、TNF、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIFN及び別のサイトカイン(IL-2、TNF、CD40L)を産生する細胞
- ・少なくともTNF及び別のサイトカイン(IL-2、CD40L、IFN)を産生する細胞。

【0139】

1.3.5.3. 免疫原性の分析

免疫原性分析は全ワクチン接種コホートに基づいていた。各処置群について、以下のパラメーター(95%信頼区間と共に)を算出した：

- ・0及び21日目でのHI及びNI抗体の幾何学的平均力価(GMT)
- ・0及び21日目での中和抗体力価の幾何学的平均力価(GMT)
- ・21日目での変換係数
- ・0日目と比較した21日目における血清HI力価の少なくとも4倍の増加を有するワクチン被接種者の割合として定義された21日目での血清変換率(SC)
- ・血清HI力価=1:40を有するワクチン被接種者の割合として定義された21日目の防御率
- ・各ワクチン接種群、各時点(0日目、21日目)並びに各抗原(ペプチドインフルエンザ(pf)、スプリットインフルエンザ(sf)及び全インフルエンザ(wf))について、応

10

20

30

40

50

答におけるCD4/CD8 Tリンパ球分泌の頻度をまとめた（記述統計）

・それぞれ5つの異なる試験における各ワクチン接種群と各抗原（pf、sf、及びwf）に関する時点（前後）間の応答の個々の差異における記述統計

・ノンパラメトリック検定（Kruskall-Wallis検定）を用いて3群間の位置の差異を比較し、それぞれ5つの異なる試験における各抗原について統計学的p値を算出した。全ての有意差検定は両側検定であった。0.05以下のP値を、統計学的に有意であると考えた。

【0140】

実施例II - 水中油型エマルジョン及びアジュバント製剤の調製

特に指摘しない限り、以後の実施例で用いられる油/水型エマルジョンは、2種の油（
-トコフェロール及びスクアレン）からなる有機相と、乳化剤としてTween 80を含むPBS
の水相とから構成される。特に指摘しない限り、以下の水中油型エマルジョン成分（最終
濃度で示される）：2.5%スクアレン(v/v)、2.5% -トコフェロール(v/v)、0.9%ポリオ
キシエチレンソルビタンモノオレエート(v/v)（Tween 80）（WO 95/17210号を参照）を含
む、以後の実施例で用いられる水中油型エマルジョンアジュバント製剤を作製した。以後
の実施例においてはAS03と呼ばれるこのエマルジョンを、2倍濃縮物として以下のように
調製した。

【0141】

II.1. エマルジョンSB62の調製

この方法を、臨床及び前臨床実施例の節で報告される試験において用いた。SB62エマル
ジョンの調製物は、疎水性成分（DL- -トコフェロール及びスクアレン）から構成される
油相と、水溶性成分（陰イオン系界面活性剤Tween 80及びPBS mod(改質)、pH 6.8）を含
有する水相とを強力な攪拌下で混合することにより作製する。攪拌しながら、油相（1/10
全量）を水相（9/10全量）に移し、混合物を室温で15分間攪拌する。次いで、得られる混
合物を、マイクロフルイダイザー（15000 PSI-8サイクル、又は実施例IIIに報告される臨
床試験において用いられるアジュバントで3サイクル）の相互作用チャンパー中で剪断、
衝撃及びキャピテーション力にかけて、マイクロメートル以下の液滴（100～200 nmの分
布）を製造する。得られるpHは 6.8 ± 0.1 である。次いで、SB62エマルジョンを0.22 μm の
膜を通す濾過により滅菌し、滅菌バルクエマルジョンを2～8 でCupac容器中で冷蔵して
保存する。滅菌不活性ガス（窒素又はアルゴン）を、少なくとも15秒間、SB62エマルジ
ョンの最終バルク容器の死容積中にフラッシュする。

【0142】

SB62エマルジョンの最終的な組成は以下の通りである：

Tween 80：1.8% (v/v) 19.4 mg/ml；スクアレン：5% (v/v) 42.8 mg/ml； -トコフェロ
ール：5% (v/v) 47.5 mg/ml；PBS-mod：NaCl 121 mM、KCl 2.38 mM、 Na_2HPO_4 7.14 mM、 K
 H_2PO_4 1.3 mM；pH 6.8 ± 0.1 。

【0143】

実施例III - スプリットインフルエンザ抗原調製物と種々の用量のAS03アジュバントを含 むワクチン（Flu-LD-004）を用いる18～59歳の成人集団における臨床試験

III.1. はじめに

第IIフェーズの制御化無作為化単盲検を、2006年に18～59歳の成人集団において行って
、2つの用量のAS03アジュバントを含むGlaxoSmithKline Biologicalsの低用量インフル
エンザ候補ワクチン（すなわち、株あたり5 μg のHAを含む）の免疫原性、安全性及び反応原
性を評価した。液性免疫応答（すなわち、抗ヘマグルチニン）を、1用量のAS03アジュバ
ント添加ワクチンの筋肉内投与の21日後に測定した。Fluarix(商標)を参照として用いた
。

【0144】

III.2. 試験設計

3群の被験者に並行して以下のワクチンを筋肉内投与した：

・100人の被験者の1群には、AS03をアジュバント添加された5 μg のHAを含む低用量のス
プリットウイルスインフルエンザワクチン（FluLD1/1）の1回の注入を行う

・100人の被験者の1群には、半量のAS03 (AD03 1/2) をアジュバント添加された5 µgのHAを含む低用量のスプリットウイルスインフルエンザワクチン (FluLD1/2) の1回の注入を行う

・100人の被験者の1群には、1用量のFluarix(商標) (Fluarix) を投与する。

【0145】

スケジュール：0日目にインフルエンザワクチンの1回のIM注入、0日目及び21日目に試験所訪問、血液サンプル回収 (HI抗体決定)、並びに30日目にさらに電話連絡 (試験結果)。

【0146】

この試験において用いた標準三価スプリットインフルエンザワクチン-Fluarix(商標)は、GlaxoSmithKline Biologicalsにより開発及び製造され、2006年から市販されているワクチンである。

10

【0147】

III.3. 試験評価項目

III.3.1. 主要評価項目

・抗ヘマグルチニン抗体力価に関して試験ワクチンにより誘導される液性免疫応答を評価すること：

0及び21日目の観察される変数：血清血球凝集抑制抗体力価

誘導される変数 (95%信頼区間と共に)：

- ・0及び21日目の血清抗体の幾何学的平均力価 (GMT)
- ・21日目の血清変換率^{*}
- ・21日目の変換係数^{**}
- ・0及び21日目の防御率^{***}

20

^{*}ヘマグルチニン抗体応答の血清変換率を、ワクチン接種前の力価1:10未満かつワクチン接種後の力価1:40以上を有するか、又はワクチン接種前の力価1:10以上かつワクチン接種後の力価の少なくとも4倍の増加、を有するワクチン被接種者の割合と定義する。

^{**}0日目と比較してワクチン接種後の血清HI GMTの増加倍数として定義された変換係数；

^{***}通常は防御を示すと許容されるワクチン接種後40以上の血清HI力価を有するワクチン被接種者の割合として定義される防御率。

30

【0148】

III.3.2. 二次評価項目

・応答型局所及び全身有害事象、非応答型有害事象及び重篤な有害事象に関して試験ワクチンの安全性及び反応原性を評価すること：

1. 各群における各ワクチン接種後の7日間の追跡期間 (すなわち、ワクチン接種日及びその後の6日間) の間の応答型局所及び全身兆候及び徴候の発生、強度及びワクチン接種との関係、

2. 各群における各ワクチン接種後の30日間の追跡期間 (すなわち、ワクチン接種日及びその後の29日間) の間の非応答型局所及び全身兆候及び徴候の発生、強度及びワクチン接種との関係、

40

3. 各群における全試験期間の間の重篤な有害事象の発生及び関係。

【0149】

III.4. ワクチン組成物及び投与

III.4.1. ワクチン調製物

アジュバント非添加インフルエンザワクチンは、3種の一価ウイルス抗原バルク (それぞれ、インフルエンザA/H1N1株、A/H3N2株及びB株から調製) からなる三価スプリットビリオン不活化インフルエンザワクチンである。このワクチン中に存在する抗原は、1992年以来Fluarix(商標) (-Rix(登録商標)) として市場で入手可能であるライセンスされたFluarix(商標) ワクチンと同じであり、用量あたり15 µgのHA/株を含む。FluLD臨床ロットに含まれるインフルエンザ株は、2006/2007年の北半球のために選択された株である：

50

・ A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 様株 : A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) IVR-116

・ A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2) 様株 : A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2) NYMCX-161

・ B/マレーシア/2506/2004。

【 0 1 5 0 】

抗原は卵中で増殖させたウイルスから誘導されたものである。スプリッティングをデオキシコール酸ナトリウムを用いて実行した後、不活化工程を、デオキシコール酸ナトリウム及びホルムアルデヒドのその後の作用を介して実施する。

【 0 1 5 1 】

AS03アジュバント添加低用量インフルエンザ (FluLD) ワクチン (臨床ロット) は、市販のFluarix(商標)ワクチン (それぞれ、インフルエンザA/H1N1株、A/H3N2株及びB株から調製) に基づくものであるが、より少量の抗原含量を有し、GSKアジュバント系AS03を用いてアジュバント添加されたものである。AS03は、2種の生分解性油、スクアレン及びトコフェロール (ビタミンE) と、界面活性剤Polysorbate 80 (Tween 80) とを含む水中油型エマルジョン (SB62) からなる。インフルエンザ抗原を、エマルジョンと単純に混合することによりアジュバント系の水相中に組み入れる。ワクチンロット中のFlu抗原を用いて導入されたアジュバントの量が異なる2種の製剤を試験した。アジュバント添加ワクチンは、アジュバント系AS03の全用量 (AS03) 又は半分の用量 (AS03 1/2) と混合された、用量あたり各インフルエンザウイルス株の5 µgのヘマグルチニン (HA) を含む。賦形剤は以下のもの : Polysorbate 80 (Tween 80)、オクトキシノール10 (Triton X-100)、コハク酸水素トコフェリル、塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化カリウム、注射用水である。AS03アジュバント添加低用量インフルエンザワクチン (FluLD、AS03の全用量又は半用量) は保存剤を含まないワクチンである。しかしながら、それらは、初期段階の製造プロセスに由来する微量のチオメルサール (用量あたり1.25 µg未満のHg) を含む。それらを両方とも、0.5 ml / 用量の容量で予備充填されたガラス (I型) シリンジ中の単回用量ワクチンとして提供する。

【 0 1 5 2 】

III.4.1.1. AS03アジュバント添加インフルエンザワクチンの組成

1用量のFluLD (AS03の全用量又は半用量) は0.5 ml に一致する。その組成を表3に提供する。用量あたりのHA含量は、両製剤について5 µgであり、唯一の差異は最終的な容器中に存在するAS03の量である。

【 0 1 5 3 】

10

20

30

表 3: AS03 アジュバント添加低用量インフルエンザワクチンの組成
(AS03 の全用量及び半用量)

成分	用量(0.5 ml)あたりの量
不活化スプリットビリオン	
-A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) IVR-116	5 µg HA
-A/ウイスコンシン/67/2005 (H3N2) NYMCX-161	5 µg HA
-B/マレーシア/2506/2004	5 µg HA
アジュバント(全用量/半用量)	
-SB62 エマルジョン(全容量)	0.250 mL
・スクアレン	10.70 mg / 5.35 mg
・DL- α -トコフェロール	11.88 mg / 5.94 mg
・Polysorbate 80(Tween 80)	4.85 mg / 2.425 mg
Polysorbate 80(Tween 80)	0.122 mg
オクトキシノール 10(Triton X-100)	0.0283 mg
コハク酸水素 α トコフェリル	0.01665 mg
塩化ナトリウム	4 mg
リン酸二ナトリウム	0.575 mg
リン酸二水素カリウム	0.100 mg
塩化カリウム	0.101mg
注射用水	0.50 ml になるよう加える

略語: HA=ヘマグルチニン

Polysorbate 80 中の総含量は、AS03 全用量を用いる場合には
用量あたり 4.972 mg に相当し、AS03 半用量を用いる場合には
用量あたり 2.547 mg に相当する。

【 0 1 5 4 】

III.4.1.2. スプリット不活化インフルエンザ抗原調製物の製造

インフルエンザ抗原は、Fluarix(商標) (インフルエンザウイルスワクチン) に含まれるものと同一である。一価バルクは、孵化鶏卵中に個々に増殖させた、インフルエンザウイルスの3種の株、すなわちA型 (H1N1及びH3N2) 並びにB型の種株から調製された精製不活化スプリットウイルスからなる。これらの種株は、年1回のWHO推奨後にWHO共同センターから受領した株に由来する。抗原参照物を調製するためのプロセスについては、例えば、WO 02/097072号に示されている。3種の一価バルクの容量は、製剤化の前の各一価バルク中で測定されたHA含量及び標的製造容量に基づく。

【 0 1 5 5 】

10倍濃縮されたリン酸緩衝生理食塩水 (1倍濃縮の場合、pH 7.4) 並びにTween 80とコハク酸水素 -トコフェリルの予備混合物を、注射用水に希釈した後、室温で5~30分間攪拌する。次いで、3種の濃縮された一価バルクを、得られるリン酸緩衝生理食塩水/Tween 80-コハク酸水素 -トコフェリル溶液中、中間三価バルク1 mLあたり、

それぞれA株1価バルク (H1N1、H3N2) の20 µgのHA

B株1価バルクの23.32 µgのHA

の濃度に連続希釈する (5 µg HAの各A株一価バルク及び5.83 µg HAのB株/500 µl三価最終バルク)。

【 0 1 5 6 】

各一価バルクの添加の間に、混合物を室温で10~30分間攪拌し、最後の1価バルクの添加後15~30分間攪拌する。「プレプール」とも呼ばれるこの中間三価バルクを+2~+8 で保持するか、又は同じ日に最後の製剤化工程に処理することができる。プレプールの最終容量は、用量あたり250 µlである。

【 0 1 5 7 】

III.4.1.3. AS03アジュバントを含むワクチン組成物の調製

10

20

30

40

50

アジュバント添加ワクチン：LD AS03 1/1 (表4)

PBS mod 10倍濃縮液（1倍濃縮の場合、pH 7.4；137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄、pH 7.4）、並びにTween 80、Triton X-100及びVESを含む混合物（株中に存在する界面活性剤を考慮に入れた量）を、注射用水に添加する。5～30分間攪拌した後、1 mlの各H1N1株及びH3N2株あたり20 µgのHA並びに1 mlのB株あたり23.32 µgのHAを、各添加の間に10～30分間攪拌しながら添加する。15～30分間攪拌した後、少量のいわゆる「中間バルク」を分析のために廃棄し、+2～+8 で保存する。中間バルクはPBS mod中、1倍濃縮されたものである。標的の界面活性剤濃度は、1 mlあたり488 µgのTween 80、1 mlあたり73.6 µgのTriton X-100及び1 mlあたり66.6 µgのVESである。

【0158】

次いで、最終的な製剤を調製する：等量のSB62（実施例IIにおける調製を参照）を、それぞれ250 µlのプレプール中間バルクに添加し、室温で30～60分間混合する。pHをチェックして6.8～7.5の範囲とする。製剤を窒素でフラッシュした後、+2～8 で保存した後、充填する。

【0159】

表4: AS03 アジュバント添加低用量ワクチン

成分	濃度	容量 (ml)
工程 1: プレプール		
A/ニューカレドニア一価バルク	104µg/ml	302.88
A/ウイスコンシン一価バルク	85µg/ml	370.59
B/マレーシア一価バルク	110 µg/ml	333.90
PBS mod (1)	説明文参照	56.76
Tween 80	48000 µg/ml	5.24
Triton X-100		H3N2 株からの残留物
コハク酸水素α-トコフェリル	26480 µg/ml	1.2
ろ過水		504.43
全容量 = 1575(ml) 75mlのプレプールサンプルを試験のために回収する 残留プレプール容量 = 1500(ml)		
工程 2: プレプールへの添加		
エマルジョン SB62		1500
最終バルクの全容量 = 3000(ml)		

(1): バッファー最終バルク組成は、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄、pH 7.4である。

【0160】

アジュバント添加ワクチン：LD AS03 1/2 (表5)

PBS modの10倍濃縮液（1倍濃縮の場合、pH 7.4- 上記組成を参照）並びにTween 80、Triton X-100及びVESを含む混合物（株中に存在する界面活性剤を考慮に入れた量）を、注射用水に添加する。5～30分間攪拌した後、1 mlの各H1N1株及びH3N2株あたり20 µgのHA並びに1 mlのB株あたり23.32 µgのHAを、各添加の間に10～30分間攪拌しながら添加する。15～30分間攪拌した後、少量のいわゆる「中間バルク」を分析のために廃棄し、+2～+8 で保存する。PBS modは中間バルク中、1倍濃縮されたものである。標的の界面活性剤濃度は、1 mlあたり488 µgのTween 80、1 mlあたり73.6 µgのTriton X-100及び1 mlあたり66.6 µgのVESである。

【0161】

次いで、最終製剤を調製する：SB62をPBS modバッファーで最初に希釈し、室温で15～30分間攪拌する。次いで、等量のこの希釈されたSB62を、それぞれ250 µlの中間バルクのプレプールに添加する。室温で30～60分間攪拌した後、pHを調べて6.8～7.5の範囲とする

。製剤を窒素でフラッシュした後、+2~8 で保存した後、充填する。

【0162】

両製剤の最終容量は、用量あたり500 μ lであり、最終HA濃度は、三価最終バルク1 mlあたり、10 μ gの各A株一価バルク及び11.66 μ gのB株一価バルクである。最終的なTween 80、Triton X-100 (H3N2一価バルク製造の残留物)及びコハク酸水素 -トコフェリル (コハク酸水素 -トコフェリルはRRR (D異性体) - -トコフェロールのエステル型である) 標的濃度は、それぞれ、244 μ g/ml、58.6 μ g/ml及び33.3 μ g/mlである。

【0163】

表 5: AS03 アジュバント添加低用量ワクチン(アジュバントの半用量)

成分	濃度	容量 (ml)
工程 1: プレプール		
工程 1: プレプール		
A/ニューカレドニア一価バルク	104 μ g/ml	300.96
A/ウィスコンシン一価バルク	85 μ g/ml	368.24
B/マレーシア一価バルク	110 μ g/ml	331.78
PBS mod (1)	説明文参照	56.4
Tween 80	48000 μ g/ml	5.2
Triton X-100		H3N2 株からの残留物
コハク酸水素 α -トコフェリル	26480 μ g/ml	1.2
ろ過水		501.22
全量 = 1565(ml) 65ml のプレプールサンプルを試験のために回収する 残留プレプール容量 = 1500(ml)		
工程 2: プレプールへの添加		
エマルジョン SB62		750
PBS mod(1)	説明文参照	75
ろ過水		675
最終バルクの全容量 = 3000(ml)		

(1): バッファー最終バルク組成は、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄、pH 7.4 である。

【0164】

III.4.2. ワクチン投与

ワクチンを、1.25 mlの滅菌I型 (Ph. Eur.) ガラスシリンジ中に充填する。各シリンジを、0.57 mlの標的に充填する (範囲: 0.54~0.60 ml)。ワクチンを、利き腕と逆の腕の三角筋領域中に筋肉内投与した。全てのワクチンを、予め充填されたシリンジ (0.5 ml) として提供した。ワクチンの適切なIM注射を確保するために、少なくとも25G及び少なくとも長さ2.5 cmの針を用いた。

【0165】

III.5 試験集団結果

合計300人の被験者をこの試験に登録した: それぞれ3群の100人の被験者。ワクチン接種の時点での全ワクチン接種コホートの平均年齢は、13.67歳の標準偏差を有する36.7歳であった。3つのワクチン群における被験者の平均年齢及び性別分布は類似していた。

【0166】

III.6. 免疫原性結果

免疫原性の分析を、免疫原性に関するATPコホートに対して実施した (297人の被験者)。

【0167】

液性免疫応答

AS03アジュバントを添加された低用量インフルエンザ候補ワクチンにより誘導された液性免疫応答を評価するために、以下のパラメーター (95%信頼区間と共に) を各処置群に

ついて算出した：

- ・0及び21日目でのHI抗体力価の幾何学的平均力価（GMT）；
- ・21日目での血清変換率（SC）；
- ・21日目での変換係数；
- ・0及び21日目での防御率。

【 0 1 6 8 】

III.6.1 HI幾何学的平均力価（GMT）

HI抗体のGMT（95%CIと共に）を表10及び図1に示す。群間で調整されたGMT比を表11に示す。

【 0 1 6 9 】

全部で3種のワクチン株に関するHI抗体のワクチン接種前のGMTは、3つの処置群において同じ範囲内にあった。アジュバント添加された群について21日目に観察されるGMTは、A/ウィスコンシンワクチン株についてFluLD1/1とFluarixとの間で統計学的差異（95%CIの重複なし、調整されたGMT比は値1を含まなかった）を有する全部で3種の株について、Fluarix群よりも高い傾向を有する。B/マレーシアワクチン株についてFluLD1/2とFluarixとの間でも統計学的差異（調整されたGMT比は値1を含まなかった）が観察された。

【 0 1 7 0 】

表 10: 0 日目及び 21 日目における抗 HA 抗体に関する血清陽性率及び
幾何学的平均力価(GMT) (免疫原性に関する ATP コホート)

抗体	群	タイミング	N	≥ 10 1/DIL		GMT			Min	Max		
				n	%	1/DL	95% CI					
						LL	UL		LL	UL		
A/ニュー カレドニア	FluLD1/1	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	31.9	23.5	43.4	<10.0	2560.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	475.4	352.2	641.6	20.0	7240.0
	FluLD1/2	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	36.1	26.9	48.5	<10.0	3620.0
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100	399.0	294.7	540.2	<10.0	7240.0
	Fluarix	PRE	98	85	86.7	78.4	92.7	26.1	20.5	33.2	<10.0	1280.0
		PI(D21)	98	98	100	96.3	100	380.6	274.2	528.4	10.0	7240.0
A/ウィスコ ンシン	FluLD1/1	PRE	99	61	61.6	51.3	71.2	16.8	13.1	21.5	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	276.2	223.5	341.3	28.0	5120.0
	FluLD1/2	PRE	99	66	66.7	56.5	75.8	19.9	15.2	25.9	<10.0	640.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	241.9	192.9	303.4	20.0	5120.0
	Fluarix	PRE	98	58	59.2	48.8	69.0	14.7	11.6	18.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	172.3	136.4	217.6	<10.0	5120.0
B/マレー シア	FluLD1/1	PRE	99	72	72.7	62.9	81.2	20.4	15.9	26.1	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	268.6	221.3	326.0	28.0	2560.0
	FluLD1/2	PRE	99	76	76.8	67.2	84.7	22.2	17.6	27.9	<10.0	320.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	301.5	246.1	369.4	28.0	3620.0
	Fluarix	PRE	98	76	77.6	68.0	85.4	26.5	20.9	33.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	219.2	171.4	280.2	<10.0	5120.0

10

20

FluLD1/1 = 全用量の AS03 アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン (5 ug HA/株)

FluLD1/2 = 半分の用量の AS03 アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン (5 ug HA/株)

Fluarix = Fluarix ワクチン

GMT = 幾何学的平均抗体力価

N = 利用可能な結果を有する被験者数

n/% = 血清陽性被験者の数/割合 (HI 力価 >= 1:10)

95% CI = 95%信頼区間、LL = 下限、UL = 上限

MIN/MAX = 最小/最大

PRE = 0 日目におけるワクチン接種前

PI (D21) = 21 日目におけるワクチン接種後

30

【 0 1 7 1 】

表 11: 21 日目における各ワクチン株に関する群間の調整した GMT 比
(免疫原性に関する ATP コホート)

抗体	群の説明	N	調整した GMT	群の説明	N	調整した GMT	調整した GMT 比			
							比オーダー	値	95% CI LL UL	
A/ニューカレドニア (1/DIL)	FluLD1/1	99	472.4	FluLD1/2	99	385.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.23	0.80	1.88
	FluLD1/1	99	472.3	Fluarix	98	396.9	FluLD1/1 /Fluarix	1.19	0.78	1.82
	FluLD1/2	99	385.0	Fluarix	98	397.0	FluLD1/2 /Fluarix	0.97	0.63	1.49
A/ウィスコンシン (1/DIL)	FluLD1/1	99	277.3	FluLD1/2	99	230.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.21	0.90	1.62
	FluLD1/1	99	277.5	Fluarix	98	180.8	FluLD1/1 /Fluarix	1.54	1.14	2.06
	FluLD1/2	99	230.0	Fluarix	98	180.6	FluLD1/2 /Fluarix	1.27	0.95	1.71
B/マレーシア (1/DIL)	FluLD1/1	99	275.1	FluLD1/2	99	303.4	FluLD1/1 /FluLD1/2	0.91	0.68	1.22
	FluLD1/1	99	275.2	Fluarix	98	212.7	FluLD1/1 /Fluarix	1.29	0.96	1.74
	FluLD1/2	99	303.4	Fluarix	98	212.6	FluLD1/2 /Fluarix	1.43	1.06	1.92

10

20

30

40

50

FluLD1/1=全用量の AS03 アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン (5 ug HA/株)

FluLD1/2=半分の用量の AS03 アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン (5 ug HA/株)

Fluarix=Fluarix ワクチン

調整した GMT=基線力価について調整した幾何学的平均抗体力価

N=ワクチン接種前後の利用可能な結果の両方を有する被験者数

95% CI=調整した GMT 比に関する 95%信頼区間 (Ancova モデル; 基線力価について調整-3 群以上のプールされた分散)、LL=下限、UL=上限

【 0 1 7 2 】

III.6.2. 抗HI抗体力価の変換係数、血清防御率及び血清変換率 (ヒトにおけるインフルエンザワクチンについて確立された防御について相関する)

結果を、血清防御率については表6-図2、血清変換率については表7-図3に、及び変換係数については表8-図4に提供する。

【 0 1 7 3 】

全ての群において、血清防御率に関する欧州当局により要求される閾値 (70%) に到達した (少なくとも94.9%)。各ワクチン株について、3群に関する21日目の血清防御率は同じ範囲内であった。

【 0 1 7 4 】

全ての群において、血清変換率に関する欧州当局により要求される閾値 (40%) に到達した (少なくとも65%)。

【 0 1 7 5 】

A/ニューカレドニアワクチン株について、3群に関する21日目のSCRは同じ範囲内であった。

【 0 1 7 6 】

A/ウィスコンシンワクチン株について、FluLD1/1群に関する21日目のSCRは、Fluarix群と比較してより高い傾向があった。FluLD1/2群に関する21日目のSCRは、Fluarix群と比較

して同じ範囲内にあった。

【0177】

B/マレーシアワクチン株について、FluLD1/2群に関する21日目のSCRは、Fluarix群と比較してより高い傾向があった。FluLD1/1群に関する21日目のSCRは、Fluarix群と比較して同じ範囲内にあった。

【0178】

全ての群において、血清変換係数に関する欧州当局により要求される閾値(2.5)に到達した(少なくとも6.2)。

【0179】

A/ニューカレドニアワクチン株について、3群に関する21日目のSCFは、同じ範囲内にあるようであった。FluLD1/2群について観察された値は、Fluarix群について観察された値より低かったが、FluLD1/2群における高い方のワクチン接種前の血清防御率により説明することができた。

10

【0180】

A/ウィスコンシンワクチン株について、FluLD1/1群に関する21日目のSCFは、Fluarix群と比較してより高い傾向があった。FluLD1/2群に関する21日目のSCFは、Fluarix群と比較して同じ範囲内にあった。

【0181】

B/マレーシアワクチン株について、2つのアジュバント添加群に関する21日目のSCFは、Fluarix群と比較してより高いものである傾向があった。

20

【0182】

表6: 0日目及び21日目におけるHI抗体力価に関する血清防御率(SPR)
(免疫原性に関するATPコホート)

ワクチン株	群	タイミング	N	SPR		95% CI	
				n	%	LL	UL
A/ニューカレドニア	FluLD1/1	PRE	99	41	41.4	31.6	51.8
		PI(D21)	99	95	96.0	90.0	98.9
	FluLD1/2	PRE	99	55	55.6	45.2	65.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	35	35.7	26.3	46.0
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
A/ウィスコンシン	FluLD1/1	PRE	99	32	32.3	23.3	42.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	37	37.4	27.9	47.7
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	25	25.5	17.2	35.3
		PI(D21)	98	93	94.9	* 8.5	*
B/マレーシア	FluLD1/1	PRE	99	31	31.3	22.4	41.4
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	39	39.4	29.7	49.7
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44.9	34.8	55.3
		PI(D21)	98	94	95.9	89.9	98.9

10

20

30

FluLD1/1=全用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

FluLD1/2=半分の用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

Fluarix=Fluarixワクチン

N=利用可能な結果を有する被験者数

n/%=血清防御被験者の数/割合(HI力価 ≥ 40 I/DIL)

95% CI=95%信頼区間、LL=下限、UL=上限

PRE=0日目におけるワクチン接種前

PI(D21)=21日目におけるワクチン接種後

データ供与源=添付の表 IIIA

【 0 1 8 3 】

表7: 21日目におけるHI抗体力価に関する血清変換率(SCR)
(免疫原性に関するATPコホート)

ワクチン株	群	N	SCR			
			n	%	95% CI	
					LL	UL
A/ニューカレドニア	FluLD1/1	99	69	69.7	59.6	78.5
	FluLD1/2	99	64	64.6	54.4	74.0
	Fluarix	98	66	67.3	57.1	76.5
A/ウィスコンシン	FluLD1/1	99	88	88.9	81.0	94.3
	FluLD1/2	99	79	79.8	70.5	87.2
	Fluarix	98	73	74.5	64.7	82.8
B/マレーシア	FluLD1/1	99	76	76.8	67.2	84.7
	FluLD1/2	99	82	82.8	73.9	89.7
	Fluarix	98	65	66.3	56.1	75.6

10

FluLD1/1=全用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

FluLD1/2=半分の用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

Fluarix=Fluarix ワクチン

血清変換を以下のように定義:

最初に血清陰性の被験者については、ワクチン接種後の抗体力価 ≥ 40 1/DIL

最初に血清陽性の被験者については、ワクチン接種後の抗体力価 \geq ワクチン接種前の抗体力価の4倍

N=ワクチン接種前後の利用可能な結果を有する被験者数

n/%=血清変換被験者の数/割合

95% CI=95%信頼区間、LL=下限、UL=上限

【0184】

表8: 21日目におけるHI抗体力価に関する血清変換係数(SCF)
(免疫原性に関するATPコホート)

ワクチン株	群	N	SCF 値	95% CI	
				LL	UL
A/ニューカレドニア	FluLD1/1	99	14.9	10.4	21.3
	FluLD1/2	99	11.0	7.7	15.9
	Fluarix	98	14.6	9.9	21.6
A/ウィスコンシン	FluLD1/1	99	16.5	13.0	20.9
	FluLD1/2	99	12.2	9.2	16.1
	Fluarix	98	11.7	8.8	*
B/マレーシア	FluLD1/1	99	13.2	10.0	17.4
	FluLD1/2	99	13.6	10.2	18.0
	Fluarix	98	8.3	6.2	11.0

30

40

FluLD1/1=全用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

FluLD1/2=半分の用量のAS03アジュバントを含む低用量インフルエンザワクチン(5 ug HA/株)

Fluarix=Fluarix ワクチン

N=ワクチン接種前後の利用可能な結果を有する被験者数

SCF=血清変換係数又は幾何学的平均比(平均 $[\log_{10}(\text{PI}(\text{D}21)/\text{PRE})]$)

95% CI=95%信頼区間、LL=下限、UL=上限

【0185】

50

III.7. 安全性結論

Fluarix群と比較したアジュバント添加ワクチン群における応答型（局所／全身）及び非応答型徴候に関するより高い反応原性は、この試験において観察された全体的な傾向であった。

【0186】

アジュバント添加ワクチン中のAS03含量の低減は、全ての全身及び局所等級3徴候に対する有意な影響を有する。

【0187】

非応答型徴候の発生は、Fluarix群（35%）と比較して、アジュバント添加ワクチン群（55%及び47%の被験者）においてより高い傾向があった。

10

【0188】

これらの結果から、候補ワクチンの反応原性及び安全性プロファイルが満足のいくものであり、臨床的に許容し得ると結論付けることができる。

【0189】

III.8. 全体の結論

III.8.1. 免疫原性結果

この試験の主要評価項目は、2つの異なる濃度のAS03アジュバントを含む低用量のインフルエンザワクチンにより、及びFluarixにより引き出される液性免疫応答（抗HI抗体力価）を評価することであった。

【0190】

21日目に、3種のワクチンは、スプリットビリオンインフルエンザワクチンの毎年の登録に関する欧州当局の要件を超えた（毎年の株の変化の免疫学的評価に関する「Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for influenza Vaccines」-CPMP/BWP/214/96）。GMTは、A/ウィスコンシン（FluLD1/1対Fluarix）及びB/マレーシアワクチン株（FluLD1/2対Fluarix）について観察された統計学的に有意な差異と共に、Fluarix群と比較してアジュバント添加群においてより高い傾向にあった。3種全部のワクチン群において、94.9%～99%の範囲で、同様の血清防御率が観察された。血清変換率及び血清変換係数は、Fluarix群よりもアジュバント添加群においてより高いことが観察された。この試験からのデータはまた、AS03アジュバントの用量の半分を含むワクチンにより誘導された免疫原性が、当該アジュバントの全用量により誘導されるものに匹敵することを明らかにした。

20

30

【0191】

III.8.2. 反応原性及び安全性結果

AS03のアジュバントを添加された低用量インフルエンザ候補ワクチンの投与は安全であり、試験集団、すなわち、18～59歳の年齢の成人において臨床的によく寛容された。半量のアジュバント添加ワクチンは、全用量のアジュバント添加ワクチンと比較して、応答型局所及び全身徴候の発生の顕著な低下を示した。

【0192】

実施例 IV - プライミングされたBALB/cマウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン（様々な用量のAS03アジュバントを含む）の前臨床評価

40

IV.1. 実験設計及び評価項目

インフルエンザでプライミングされたマウスにおける実験を実施して、この水中油型アジュバントを用いて製剤化されたインフルエンザワクチンにより誘導されたAS03による液性応答の増加を評価した。ヒトの状況をシミュレートするために、ヘテロサブタイプ株でプライミングされたマウスを用いて実験を行った。

【0193】

IV.1.1. 処置／群（表9）

27匹の成体雌BALB/cマウスの群を、三価全ホルマリン不活化インフルエンザウイルス（各株につき5µgのHA）を用いて0日目に鼻内に（20µl容量）プライミングした。プライミ

50

ング株は、ワクチン中に含まれるものよりも早いドリフト変異体（5 µgのHA全不活化H1N1 A/ヨハネスブルグ/82/96、H3N2 A/シドニー/5/97、B/ハルビン/7/94）からなっていた。28日後、合計容量50 µlで筋肉内に単回用量のワクチン候補をマウスにワクチン接種した。スプリット抗原のみ（三価スプリットプレーン）を含む製剤又は2つの用量のAS03（全量若しくは1/5）のアジュバントを添加されたスプリット抗原を含む製剤を用いて、マウスを免疫した。免疫に用いた株は、H1N1 A/ニューカレドニア/20/99、H3N2 A/パナマ/2007/99、B/山東/7/97ウイルス抗原（1.5 µg/株、ヒト用量の1/10）を含んでいた。

【0194】

表9

群	抗原 / 製剤	他の処置
1	三価スプリット / プレーン (アジュバント非添加)	異種プライミング D0
2	三価スプリット / AS03	異種プライミング D0
3	三価スプリット / AS03 1/5	異種プライミング D0

10

【0195】

IV.1.2. ワクチン製剤の調製

Tween 80、Triton X-100及びコハク酸ビタミンE (VES) のプレミックスを調製して、75 0 µg/mlのTween 80、110 µg/mlのTriton X100及び100 µg/mlのVESのワクチン中の最終濃度を達成する。プレミックス中で用いられる量を、株中に既に存在する界面活性剤及びVESの量を考慮に入れて算出する。

20

【0196】

1リットルの10倍濃縮された塩水バッファー（PBS pH 7.4）の調製：0.800Lの注射用水に、NaCl 80 g、KCl 2 g、Na₂HPO₄ 11.44 g、KH₂PO₄ 2 gを添加する。溶解させた後、注射用水で1.0 Lに調整する。10倍希釈した場合、pHは7.4であろう。

【0197】

三価スプリット / プレーン

1回分の50 µl用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ プレミックス、室温で5分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA H1N1株、室温で10分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA H3N2株、室温で10分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA B株、室温で15分間磁気攪拌。この製剤を、その調製の終了後1時間以内に注入する。

30

【0198】

三価スプリット / AS03

Tween 80、Triton X100及びコハク酸ビタミンE (VES) のプレミックスを調製して、750 µg/mlのTween 80、110 µg/mlのTriton X100及び100 µg/mlのVESのワクチン中の最終濃度を達成する。プレミックス中で用いられる量を、株中に既に存在する界面活性剤及びVESの量を考慮に入れて算出する。

【0199】

1回分の50 µl用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ プレミックス、室温で5分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA H1N1株、室温で10分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA H3N2株、室温で10分間磁気攪拌、+ 1.5 µg HA B株、室温で15分間磁気攪拌、+ 全用量AS03については25 µlのSB62エマルジョン又は1/5用量のAS03については5 µlのSB62エマルジョン、室温で15分間磁気攪拌。この製剤を、その調製の終了後1時間以内に注入する。

40

【0200】

IV.1.3. 読み出し (表10)

ワクチン接種に対する液性免疫応答を、免疫の前（28日目）及び免疫の14日後に測定した（27匹のマウス / 群）。血清サンプルを、血球凝集抑制（HI）試験により試験した。

【0201】

50

表10

読み出し	時点	サンプル種類	分析方法
液性応答	D28、D42	血清	IHA

【 0 2 0 2 】

IV.2. 結果

IV.2.1. 液性免疫

結果を図5に提供する。ヘテロサブタイププライミング、次いで1回のワクチン接種のこのマウスモデルにおいては、AS03及びその希釈液はプレーンワクチンと比較してより高いHI力価を誘導することが示された。全てのインフルエンザA株について、HI力価の統計学的に有意な増加が観察された ($p < 0.05$)。また、H1N1株については、HI力価の有意差がAS03とAS03 1/5の間で観察された ($p < 0.05$)。少量のAS03は、プレーンワクチンと比較して3種全部の株についてHI力価を増加させることができなかった。B株 (B/山東) に対しては、非常に低い応答が観察された。これは、プライミングに用いられたB株とワクチンとの間での有意な抗原ドリフトに起因するものである可能性がある。

【 0 2 0 3 】

IV.3. 結果及び結論のまとめ

結論として、プレーンワクチンと比較して、AS03アジュバント添加ワクチンを用いる場合、ヘテロサブタイプ株でプライミングされた動物において、HI力価の増加が観察された。全用量のAS03は、3種全部のインフルエンザワクチン株に対して強固なHI力価を得るのに最適であった。

【 0 2 0 4 】

実施例V - プライミングされたC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン (様々な用量のAS03アジュバントを含む) の前臨床評価

V.1. 実験設計及び評価項目

インフルエンザでプライミングされたマウスにおける実験を実施して、この水中油型アジュバントを用いて製剤化されたAS03誘導インフルエンザワクチンによる液性及び細胞性応答の増加を評価した。

【 0 2 0 5 】

ヒトの状況をシミュレートするために、ヘテロサブタイプ株でプライミングされたマウスを用いて実験を行った。

【 0 2 0 6 】

V.1.1. 処置 / 群 (表11)

25匹の成体雌C57Bl/6マウスの群を、三価全ホルマリン不活化インフルエンザウイルス (各株につき5 µgのHA) を用いて0日目に鼻内 (20 µl容量) にプライミングした。プライミング株は、ワクチンに含まれるものよりも早いドリフト変異体 (5 µg HA全不活化H1N1 A/北京/262/95、H3N2 A/パナマ/2007/99、B/山東/7/97) からなっていた。28日後、合計容量100 µlで筋肉内に単回用量のワクチン候補をマウスにワクチン接種した。スプリット抗原のみ (三価スプリットプレーン) を含む製剤又は3種の用量のAS03 (全量、1/2若しくは1/5) のアジュバントを添加されたスプリット抗原を含む製剤を用いて、マウスを免疫した。免疫に用いた株は、H1N1 A/ニューカレドニア/20/99、H3N2 A/ニューヨーク/55/2004、B/江蘇/10/2003ウイルス抗原 (1.5 µg/株、ヒト用量の1/10) を含んでいた。

【 0 2 0 7 】

表11

群	抗原 / 製剤	他の処置
1	三価スプリット / プレーン (アジュバント非添加)	異種プライミング D0
2	三価スプリット / AS03	異種プライミング D0
3	三価スプリット / AS03 1/2	異種プライミング D0
4	三価スプリット / AS03 1/5	異種プライミング D0
5	PBS	異種プライミング D0

【0208】

10

V.1.2. ワクチン製剤の調製

三価スプリット / プレーン

100 µl 用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（実施例 IV に教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ Fluarix 臨床ロットDFLUA014（最終用量中に、株あたり1.5 µg）。

【0209】

三価スプリット / AS03

100 µl 用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（実施例 IV に教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ Fluarix 臨床ロットDFLUA014（最終用量中に、株あたり1.5 µg）+ 全用量については25 µl のSB62エマルジョン又は1/2用量については12.5 µl のSB62エマルジョン又は1/5用量については5 µl のSB62エマルジョン。この製剤を、調製の終了後1時間以内に注入する。

20

【0210】

V.1.3. 読み出し（表12）

ワクチン接種に対する液性免疫応答を、免疫の21日後に測定し（10匹のマウス / 群）、血清サンプルを、血球凝集抑制（HI）試験により試験した。細胞性免疫応答を、細胞内サイトカイン染色（ICS）により免疫の7日後に試験した。

【0211】

表12

読み出し	時点	サンプル種類	分析方法
液性応答	D49	血清	IHA
細胞性応答	D35	PBMC	ICS

30

【0212】

V.2. 結果

V.2.1. 液性免疫（10匹のマウス / 群）

結果を図6に提供する。ヘテロサブタイププライミング、次いで1回のワクチン接種のこのマウスモデルにおいては、AS03及びその希釈液（1/2及び1/5）はプレーンワクチンと比較してより高いHI力価を誘導することが示された。3種全部の株について、全用量AS03又は低用量のAS03のアジュバントを添加されたワクチンを受容するマウス間でHI力価の差異は観察されなかった。

40

【0213】

V.2.2. 細胞性免疫（15匹のマウス / 群）

結果を図7に提供する。AS03の希釈率に関わらず、三価スプリットプレーンで免疫されたマウスと比較して、AS03アジュバントを添加された三価スプリットワクチンで免疫されたマウスにおいて、より高いCD4+ T細胞応答が観察された。全用量AS03アジュバントを添加された三価スプリットで免疫されたマウスにおいて誘導された応答と比較して、マウスをより低用量のAS03のアジュバントを添加された三価スプリットで免疫した場合、より少ない細胞性応答の傾向が観察された。

50

【0214】

V.3. 結果及び結論のまとめ

結論として、プレーンワクチンと比較して、AS03アジュバント添加ワクチンを用いる場合、ヘテロサブタイプ株でプライミングされた動物において、液性及び細胞性応答の増加が観察された。全用量又は分画用量のAS03アジュバントで免疫されたマウス間で、類似する規模の液性応答が観察された。しかしながら、アジュバント用量の減少は、CD4+ T細胞応答の低下した規模に関する傾向と関連していた。

【0215】

実施例VI - プライミングされたC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットインフルエンザワクチン（様々な用量のAS03アジュバント及び低用量の抗原を含む）により誘導される細胞性免疫応答の前臨床評価

10

VI.1. 実験設計及び評価項目

インフルエンザでプライミングされたマウスにおける実験を実施して、低用量の抗原（0.5 µg/株、1/30ヒト用量）を含み、この水中油型アジュバントと共に製剤化されたインフルエンザワクチンにより誘導されるAS03による細胞性免疫応答の増加を評価した。ヒトの状況をシミュレートするために、ヘテロサブタイプ株でプライミングされたマウスを用いて実験を行った。

【0216】

VI.1.1. 処置/群（表13）

15匹の成体雌C57Bl/6マウスの群を、三価全ホルマリン不活化インフルエンザウイルス（各株につき5 µg HA）を用いて0日目に鼻内に（20 µl容量）プライミングした。プライミング株は、ワクチンに含まれるものよりも早いドリフト変異体（5 µg HA全不活化H1N1 A/北京/262/95、H3N2 A/パナマ/2007/99、B/山東/7/97）からなっていた。28日後、合計容量50 µlで筋肉内に単回用量のワクチン候補をマウスにワクチン接種した。スプリット抗原のみ（三価スプリットプレーン）を含む製剤又は3種の用量のAS03（全量、1/2若しくは1/5）のアジュバントを添加されたスプリット抗原を含む製剤を用いて、マウスを免疫した。免疫に用いた株は、H1N1 A/ニューカレドニア/20/99、H3N2 A/ニューヨーク/55/2004、B/江蘇/10/2003ウイルス抗原（1.5 µg/株、ヒト用量の1/30）を含んでいた。

20

【0217】

表13

30

群	抗原/製剤	他の処置
1	三価スプリット/プレーン(アジュバント非添加)	異種プライミング D0
2	三価スプリット/AS03	異種プライミング D0
3	三価スプリット/AS03 1/2	異種プライミング D0
4	三価スプリット/AS03 1/5	異種プライミング D0
5	PBS	異種プライミング D0

【0218】

VI.1.2. ワクチン製剤の調製

40

三価スプリット/プレーン

50 µl用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（実施例IVに教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ Fluarix臨床ロットDFLUA014（最終用量中に、株あたり0.5 µg）。

【0219】

三価スプリット/AS03

50 µl用量の製剤を、以下の順番に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（実施例IVに教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ Fluarix臨床ロットDFLUA014（最終用量中に、株あたり0.5 µg）+ 全用量については25 µlのSB62エマルジョン又は1/2用量については12.5 µlのSB62エマルジョン又は1/5用量については5 µlのS

50

B62エマルジョン。この製剤を、調製の終了後1時間以内に注入する。

【0220】

V.1.3. 読み出し (表14)

細胞性免疫応答を、細胞内サイトカイン染色により免疫の7日後に試験した。

【0221】

表14

読み出し	時点	サンプル種類	分析方法
細胞性応答	D35	PBMC	ICS

10

【0222】

VI.2. 結果

VI.2.1. 細胞性免疫

結果を図8に提供する。三価スプリットプレーンで免疫したマウスと比較して、AS03 (全用量若しくは1/2用量) のアジュバントを添加された三価スプリットワクチンで免疫したマウスにおいて、わずかにより高いCD4+ T細胞応答が観察された。三価スプリットプレーン又は全用量若しくは半用量のAS03のアジュバントを添加されたワクチンで免疫されたマウスにおいて誘導された応答と比較して、マウスを1/5用量のAS03のアジュバントを添加された三価スプリットで免疫した場合、より高い細胞性応答が観察された。

20

【0223】

VI.3. 結果及び結論のまとめ

結論として、プレーンワクチンと比較して、AS03アジュバントを添加されたワクチンを用いる場合、ヘテロサブタイププライミング動物において、CD4+ T細胞応答の最小的な増加が観察された。この実験においては、アジュバント用量応答は観察されなかったが、実際に1/5のAS03用量により、より高いアジュバント用量を用いる場合に認められるものよりも高い頻度の抗原特異的CD4+ T細胞が誘導された。これらのデータは、全体として他の前臨床試験と一致しなかったが、これはこの特定の実験に関する技術的な問題を示唆するものである。

【0224】

実施例VII - ナイープなC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加スプリットH5N1ワクチン (様々な用量のAS03アジュバント及び抗原を含む) の前臨床評価

30

VII.1. 実験設計及び評価項目

この水中油型アジュバントと共に製剤化されたH5N1スプリットワクチンにより誘導されるAS03による液性及び細胞性免疫応答の増加を評価するためにH5N1にナイープなマウスにおける実験を実施した。パンデミックの場合、世界全体の集団が新規に広まるパンデミックインフルエンザ株に対して免疫学的にナイープであると予想される。このナイープな免疫状態に起因して、パンデミックワクチンは新しいインフルエンザ株により引き起こされる感染症及び重篤な疾患から個人を防御するための2回のワクチン用量を必要とする可能性が高い。この以前の曝露の欠如を表すために、ナイープなマウスモデルを開発して、ワクチンの免疫原性を評価した。

40

【0225】

VII.1.1. 処置 / 群 (表15)

15匹の成体雌ナイープC57Bl/6マウスの群を、全量50 µlで筋肉内にパンデミックH5N1ワクチン候補を用いて0日目及び28日目に免疫した。マウスを、スプリットH5N1抗原のみ (H5N1スプリットプレーン) を含む製剤又は様々な用量のAS03 (2倍、全量、1/2若しくは1/5) のアジュバントを添加されたスプリット抗原を含む製剤で免疫した。免疫に用いた株は、H5N1 A/ベトナム/1194/04ウイルス抗原 (ヒト用量の1/10に相当する1.5又は0.38 µg/株) を含んでいた。2倍のAS03用量を用いて製剤化を行わず、むしろ1回の50 µlのH5N1スプリット/AS03全用量 + 1回の50 µlのAS03用量の同時注入とした。

【0226】

50

表15

群	抗原 / 製剤	抗原用量
1	H5N1 スプリット / プレーン (アジュバント非添加)	1.5 µg
2	H5N1 スプリット / 二倍用量 AS03	1.5 µg
3	H5N1 スプリット / AS03	1.5 µg
4	H5N1 スプリット / AS03 1/2	1.5 µg
5	H5N1 スプリット / AS03 1/5	1.5 µg
6	H5N1 スプリット / プレーン (アジュバント非添加)	0.38 µg
7	H5N1 スプリット / 二倍用量 AS03	0.38 µg
8	H5N1 スプリット / AS03	0.38 µg
9	H5N1 スプリット / AS03 1/2	0.38 µg
10	H5N1 スプリット / AS03 1/5	0.38 µg
11	PBS	

10

【 0 2 2 7 】

VII.1.2. ワクチン製剤の調製

1リットルの最終バルクバッファー (PBS pH 7.2 ± 0.2) の調製 : 0.800Lの注射用水に、NaCl 7.699 g、KCl 0.200 g、MgCl₂ × 6H₂O 0.100 g、Na₂HPO₄ × 12 H₂O 2.600 g、KH₂PO₄ 0.373 gを添加する。溶解後、注射用水で1.0 Lに調整する。

【 0 2 2 8 】

20

H5N1スプリット / プレーン

50 µl用量の調製 :

チオメルサル (株中でのその濃度を考慮に入れた量) 及びTriton X100を、最終バルクバッファーに添加する。Tween 80を内容物として添加せず、製剤中の標的を、株のTween濃度により達成する。最終濃度は、1.5 µg製剤用量中、10 µg/mlのチオメルサル、368 µg/mlのTween 80及び35 µg/mlのTriton X100である。それらは、0.38 µgの製剤用量中では、チオメルサルについては10 µg/ml、Tween 80については93 µg/ml及びTriton X100については8.9 µg/mlである。5~30分間磁気攪拌した後、1.5又は0.38 µgのHA (H5N1株) を添加する。製剤を30~60分間攪拌する。pHを調べる。製剤化の終了後1時間以内に注入を行う。

30

【 0 2 2 9 】

H5N1スプリット / AS03

50 µl用量の調製 :

チオメルサル (株中でのその濃度を考慮に入れた量) 及びTriton X100を、最終バルクバッファーに添加する。Tween 80を内容物として添加せず、製剤中の標的を、株のTween濃度により達成する。最終濃度は、1.5 µg製剤用量中、10 µg/mlのチオメルサル、368 µg/mlのTween 80及び35 µg/mlのTriton X100である。それらは、0.38 µgの製剤用量中では、チオメルサルについては10 µg/ml、Tween 80については93 µg/ml及びTriton X100については8.9 µg/mlである。5~30分間磁気攪拌した後、1.5又は0.38 µgのHA (H5N1株) を添加する。30~60分間攪拌した後、25又は12.5又は5 µlのSB62エマルジョンを添加する。製剤を30~60分間攪拌する。pHを調べる。製剤化の終了後1時間以内に注入を行う。

40

【 0 2 3 0 】

VII.1.3. 読み出し (表16)

抗Ig、IgG1及びIgG2b抗体力価 (図9A~F) により、免疫の14日後 (10匹のマウス / 群) に液性免疫応答を測定した。また、抗H5N1血球凝集抑制アッセイにより、免疫の21日後 (10匹のマウス / 群) に液性免疫応答を測定した (図10A~B)。

【 0 2 3 1 】

細胞性免疫応答を、フローサイトメトリーにより数えた抗原特異的CD4+ T細胞の細胞内サイトカイン染色 (ICS) により免疫の6日後 (3匹のマウス / 群の5つのプール) に細胞性免疫応答を試験した (図11A~B)。

50

【 0 2 3 2 】

表16

読み出し	時点	サンプル種類	分析方法
液性応答	D39	血清	ELISA、アイソタイプ及びHI力価
細胞性応答	D34	PBMC	ICS

【 0 2 3 3 】

VII.2. 結果

10

VII.2.1. 液性免疫応答：ELISA及びアイソタイプ

結果を図9に提供する。

【 0 2 3 4 】

各用量のH5N1スプリットワクチンで、全てのアジュバント添加群は、アジュバント非添加H5N1スプリットワクチンと比較して、より高い抗H5N1 Ig、IgG1及びIgG2b抗体力価を誘導した（図9A～F）。

【 0 2 3 5 】

各用量のH5N1スプリットワクチンで、抗H5N1 IgG1抗体応答は、抗H5N1 IgG2b抗体応答よりも4～5倍高かった（図9C～F）。1.5 µg HA用量のH5N1スプリットワクチンと各用量のアジュバントを混合した場合、抗H5N1 Ig、IgG1及びIgG2b抗体応答の差異は観察されなかった（図9A、C及びE）。

20

【 0 2 3 6 】

0.38 µg HA用量のH5N1スプリットワクチンを用いる場合、AS03/2 ($p=0.7315$) 及びAS03/1/5 ($p=0.9744$) のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンにより誘導される応答と比較して、2倍～全用量のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンによる免疫後に、より高い抗H5N1 Ig力価に関する傾向が得られた（図9B）。また、この傾向は抗H5N1 IgG1抗体応答についても観察された（図9D）。しかしながら、この力は統計学的有意差を観察するには十分ではなかった（1.7倍の差異については25%の力、又は2倍の差異については47%）。

【 0 2 3 7 】

30

VII.2.2. 液性免疫応答：HI力価

1.5 µg HA用量 / マウスの場合

各アジュバント用量で、AS03アジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫された全てのマウスは、アジュバント非添加H5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスにおいて得られる応答と比較して、より高いHI力価を誘導した（図10A）。H5N1スプリットワクチンを一定用量範囲のAS03のアジュバントを添加した場合、HI力価の差異は観察されなかった（図10A）。

【 0 2 3 8 】

0.38 µg HA用量 / 用量の場合

各アジュバント用量で、AS03アジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫された全てのマウスは、アジュバント非添加H5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスにおいて得られる応答と比較して、より高いHI力価を誘導した（図10B）。

40

【 0 2 3 9 】

AS03/2のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンを用いて得られる応答と比較して、2倍全用量のAS03のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンを用いる場合、有意に高いHI力価が観察された（4倍の差異については $p=0.032$ ）（図10B）。

【 0 2 4 0 】

2倍全用量のAS03若しくは全用量のAS03のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスにおいて、又はAS03/2若しくはAS03/5のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウス間で、HI力価の差異は観察されなかった

50

(図10B)。

【 0 2 4 1 】

抗原用量間での比較 (1.5 μ g又は0.38 μ g)

AS03/5のアジュバントを添加された1.5 μ g HAスプリットH5N1で免疫されたマウスと、2倍全用量のAS03のアジュバントを添加された0.38 μ g HAスプリットH5N1で免疫されたマウスとの間を除いて、AS03、AS03/2又はAS03/5のアジュバントを添加されたそれぞれのHA用量のH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウス間で、HI力価の差異は観察されなかった (図10)。より低いアジュバント用量と混合したより高い抗原用量と比較して、2倍全用量AS03のアジュバントを添加された0.38 μ g HAスプリットH5N1による免疫後に、HI力価は有意に高かった (AS03/5について1.5 μ g HA、4倍の差異については $p=0.0193$) (図10)。

10

【 0 2 4 2 】

VII.2.3. 細胞性免疫応答

結果を図11に提供する。

【 0 2 4 3 】

各用量のH5N1スプリットワクチン (1.5又は0.38 μ g) で、アジュバント非添加H5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスと比較して、様々な用量のAS03のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスにおいて、より高いCD4+ T細胞応答が観察された (図11)。

【 0 2 4 4 】

1.5 μ g用量のH5N1スプリットワクチンで、AS03用量の減少はCD4+ T細胞頻度の低下に一致した (図11A)。しかしながら、0.38 μ g用量のH5N1スプリットワクチンで、AS03アジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウスにおける異なるアジュバント用量間でCD4+ T細胞応答の差異は観察されなかった (図11B)。

20

【 0 2 4 5 】

VII.3. 結果及び結論のまとめ

マウスにおける免疫原性試験により、アジュバント添加H5N1スプリットワクチンは、アジュバント非添加H5N1スプリットワクチンにより誘導されるものよりも、有意により高い液性 (抗H5N1 ELISA及びHI力価) 並びに細胞性 (CD4+ T細胞) 応答を誘導することが示された。

【 0 2 4 6 】

1.5 μ g及び0.38 μ gのアジュバント添加されたH5N1スプリットワクチンで免疫されたマウス間で、液性免疫応答について抗原用量応答効果は観察されなかったが、これは、このモデルにおいて用量応答効果を観察するためには、アジュバントの存在下で、より低用量のHAでも必要であることを示唆している。

30

【 0 2 4 7 】

プレーンH5N1ワクチンと比較して、AS03アジュバント添加H5N1パンデミックワクチンを用いる場合、ナイーブなマウスにおいてCD4+ T細胞応答の強力な増加が観察された。0.38 μ g用量のH5N1スプリットワクチンをワクチン候補として用いる場合、AS03希釈液の影響は観察されなかったが、1.5 μ gのH5N1スプリットワクチンを少量のAS03のアジュバント添加した場合、CD4 T細胞応答の低下が観察された。

40

【 0 2 4 8 】

以前に観察されたように、全用量のAS03又はAS03/2のアジュバントを添加されたH5N1スプリットワクチン (いずれかの抗原用量) で免疫されたマウス間で、液性及び細胞性免疫応答の差異は観察されなかった。2倍全用量のAS03をワクチン製剤中で用いる場合、免疫応答のいくらかの増強が検出され、従って、AS03/5をワクチン製剤中で用いる場合、免疫応答の低下が検出された。

【 0 2 4 9 】

全体として、ここで報告されたデータは、このワクチン製剤におけるこの新規アジュバント系の効力を支持している。

【 0 2 5 0 】

50

実施例VIII - プライミングされた巨大白ブタにおけるアジュバント添加及びアジュバント非添加インフルエンザワクチンの前臨床評価

VIII.1. 実験設計及び評価項目

この水中油型アジュバントと共に製剤化されたAS03により誘導されたインフルエンザワクチンによる液性応答の増加を評価するために、インフルエンザでプライミングされたブタにおける実験を実施した。

【0251】

ヒトに近い動物モデルにおけるAS03の用量範囲を評価するために、ブタを用いた。ブタは、ごくわずかの例外を除いて、ヒトに生理学的に最も近いものとしてこの動物を確立する長い一覧の生物学的類似性を示す (Douglas R., 1972)。さらに、ブタにおけるインフル

10

【0252】

VIII.1.1. 処置 / 群 (表17)

10匹の成体巨大白ブタの群を、全量200 µlで鼻内に、三価全ホルマリン不活化インフルエンザウイルス (各株につき25 µg HA) を用いて0日目にプライミングした。プライミング株は、ワクチン株と相同な株 (25 µg HA全不活化H1N1 A/ニューカレドニア/20/99、H3N2 A/パナマ/2007/99及びB/山東/7/97) からなっていた。28日後、全量500 µlで筋肉内に、単回用量のワクチン候補をブタにワクチン接種した。ブタを、スプリット抗原のみ (三価スプリットプレーン) を含む製剤又は一定用量範囲のAS03 (全量、1/2若しくは1/5) のアジュバントを添加されたスプリット抗原を含む製剤で免疫した。免疫に用いた株は、H1

20

【0253】

群 (10匹のブタ / 群) :

表17

群	抗原 / 製剤	他の処置
1	三価スプリット / プレーン (アジュバント非添加)	異種プライミング D0
2	三価スプリット / AS03	異種プライミング D0
3	三価スプリット / AS03 1/2	異種プライミング D0
4	三価スプリット / AS03 1/5	異種プライミング D0

30

【0254】

VIII.1.2. ワクチン製剤の調製

三価スプリット / プレーン

Tween 80、Triton X100及びコハク酸ビタミンE (VES) のプレミックスを、750 µg/mlのTween 80、110 µg/mlのTriton X100及び100 µg/mlのVESのワクチン中の最終濃度を達成するために調製する。プレミックス中で用いられる量は、株中でのそれらの含量を考慮に入れる。

40

【0255】

1回の500 µl用量の製剤を、以下の順序に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー (実施例IVに教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4) + プレミックス、室温で5分間磁気攪拌、+ 15 µg HA H1N1株、室温で10分間磁気攪拌、+ 15 µg HA H3N2株、室温で10分間磁気攪拌、+ 17.5 µg HA B株、室温で15分間磁気攪拌。この製剤をその調製の終了後1時間以内に注入する。

【0256】

三価スプリット / AS03

Tween 80、Triton X100及びコハク酸ビタミンE (VES) のプレミックスを、750 µg/mlのTween 80、110 µg/mlのTriton X100及び100 µg/mlのVESのワクチン中の最終濃度を達成す

50

るために調製する。プレミックス中で用いられる量は、株中でのそれらの含量を考慮に入れる。

【0257】

1回の500 μ l用量の製剤を、以下の順序に従って即時に調製する：注射用水 + 塩水バッファー（実施例IVに教示されたように調製された10倍濃縮されたPBS pH 7.4）+ プレミックス、室温で5分間磁気攪拌、+ 15 μ g HA H1N1株、室温で10分間磁気攪拌、+ 15 μ g HA H3N2株、室温で10分間磁気攪拌、+ 17.5 μ g HA B株、室温で15分間磁気攪拌、+ 全用量AS03については250 μ lのSB62エマルジョン若しくは1/2用量のAS03については125 μ lのSB62エマルジョン若しくは1/5用量のAS03については50 μ lのSB62エマルジョン、室温で15分間磁気攪拌。この製剤をその調製の終了後1時間以内に注入する。

10

【0258】

VIII.1.3. 読み出し（表18）

ワクチン接種に対する液性免疫応答を、鼻内プライミングの前（0日目）、免疫の前（28日目）及び免疫の14日後に測定した（10匹のブタ/群）。血清サンプルを、血球凝集抑制（HI）試験により試験した。

【0259】

表18

読み出し	時点	サンプル種類	分析方法
液性応答	D0、D28、D42	血清	IHA

20

【0260】

VIII.2. 結果及び結論

VIII.2.1. 液性免疫

結果を図12に提供する。アジュバントの希釈率に関わらず、AS03アジュバントを添加された三価スプリット製剤は、相同プライミングのこのモデルにおいて、プレーン三価製剤よりも、全ての株に対してより強力なHI応答を誘導したが、3種全部の株について、統計学的有意差は常に達成されるわけではなかった。アジュバント用量効果は、株間でわずかな差異と共に観察された。B/山東などの免疫原性の低い株については、全用量のAS03アジュバントを添加された三価スプリットワクチンのみが、プレーンワクチンと有意差があった。全用量のAS03のアジュバントを添加された三価スプリットワクチンと対照的に、少量のAS03は、プレーンワクチンについて認められたものと比較して上記の3種の全部の株についてHI力価を増加させることができなかった。

30

【0261】

実施例 IX: 種々の希釈のAS03をアジュバント添加したdPly-PhtD-PD抗原の免疫原性

IX.1 実験Lims 20080257

dPly（無毒化ニューモリシン）及びPhtD（ポリヒスチジントライアド（triad）プロテインD）は、肺炎連鎖球菌由来のタンパク質であり、PDはインフルエンザ菌由来のプロテインDである。C57blマウスに、アジュバントAS03A（250 μ gのSB62）に添加されたdPly-PhtD-PDの2種の凍結乾燥臨床ロット（DSPEA005A及び006A）のヒト用量の1/10を3回（0日目、14日目及び28日目）筋肉内に免疫した（群1及び2）。AS03A中のdPly-PhtD-PDの液体前臨床ロットを参照ワクチンとして使用した（群3）。AS03B（125 μ gのSB62）及びAS03C（62.5 μ gのSB62）で再構成した臨床ロットDSPEA005もまた評価した（群4及び5）。最後に、生理食塩水で再構成した2種の凍結乾燥臨床ロットを比較用として注入し、dPly、PhtD及びPD抗原に対して誘導される免疫応答に及ぼすアジュバントの影響を測定した（群6及び7）。

40

【0262】

42日目にマウスを採血し、各抗原に対して生起された抗体応答をELISAにより測定した。データをGMC（ μ g/ml）として図13に示す。

【0263】

50

2種のdPly-PhtD-PD臨床ロットの一貫性が確認された（DSPEA005A及び006A）。凍結乾燥の影響は示されなかった（群1及び2 対 群3）。アジュバントを含まない製剤（群6及び7）と比較して、AS03製剤により全ての抗原に対して有意に高い抗体力価が誘導された（群1～5）。AS03C製剤（群5）中のPDを除いて、種々の濃度のアジュバントを含む製剤により各抗原に対して誘導された抗体力価には有意差は観察されなかった（群1、4及び5）。

【0264】

IX.2 実験Lims 20080334-20080340

C57blマウスに、生理食塩水で再構成した、又はアジュバントAS03A（250 μgのSB62）、AS03B（125 μgのSB62）及びAS03C（62.5 μgのSB62）に添加した、種々の濃度（15-15-15 μg；30-30-30 μg及び60-60-60 μg）のdPly-PhtD-PD凍結乾燥臨床ロット（DSPEA006A）のヒト用量の1/10を3回（0日目、14日目及び28日目）筋肉内に免疫した。

10

【0265】

42日目にマウスを採血し、各抗原に対して生起された抗体応答をELISAにより測定した。データをGMC（μg/ml）として図14に示す。

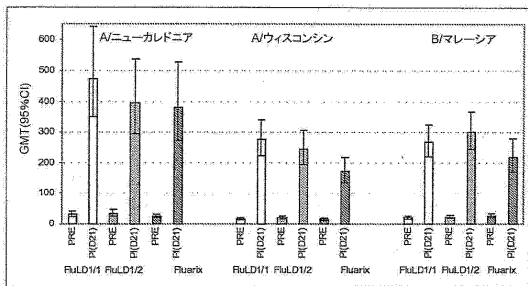
【0266】

生理食塩水のみを含む製剤（群10～12）と比較して、AS03を含む製剤（群1～9）では全ての抗原に対する抗体力価の有意な増加が示された。各抗原に対して生起される免疫応答に対して、抗原用量による明りょうな影響は観察されなかった。dPly及びPhtDに対して生起される抗体応答に対して、アジュバント希釈による有意な影響は観察されなかった。PDについては、抗原濃度3及び6 μgにおいてAS03AとAS03Cとの間に有意差が観察された。

20

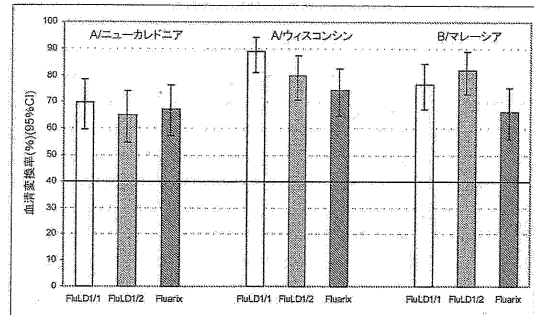
【図1】

様々な時点での抗HA抗体に関する幾何学的平均力価(GMT)
(免疫原性に関するATPコホート)



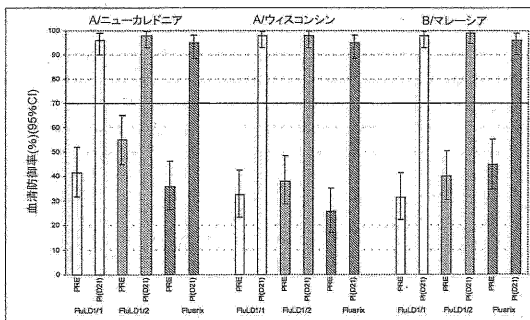
【図3】

21日目のHI抗体力価に関するSCR(95%信頼区間)
(免疫原性に関するATPコホート)



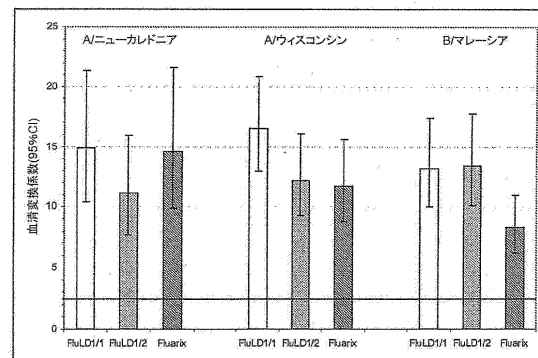
【図2】

0日目および21日目のHI抗体力価に関するSPR(95%信頼区間)
(免疫原性に関するATPコホート)



【図4】

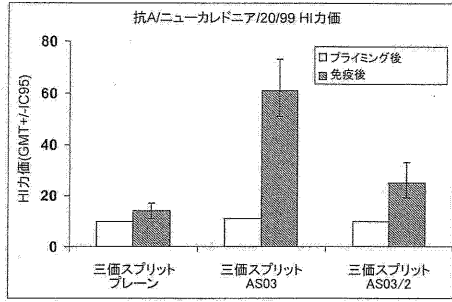
21日目の HI抗体力価に関するSCF(95%信頼区間)
(免疫原性に関するATPコホート)



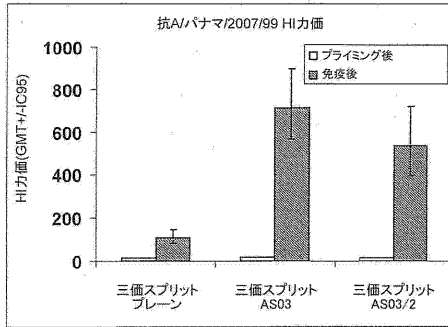
【 図 5 - 1 】

ヘテロサブタイプ株(用量範囲AS03)でプライミングされたBALB/cマウスにおける血球凝集抑制試験 (GMT+IC95)

5A-抗A/ニューカレドニア/20/99 HI力価

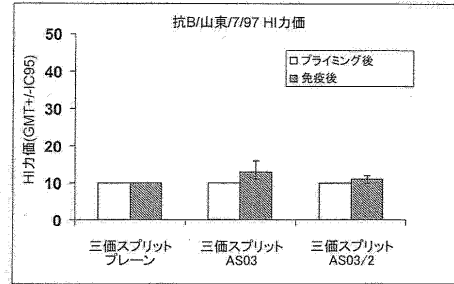


5B-抗A/パナマ/2007/99 HI力価



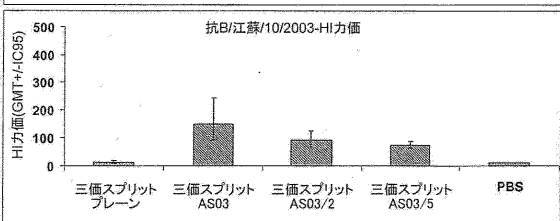
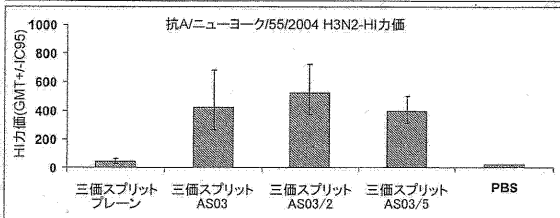
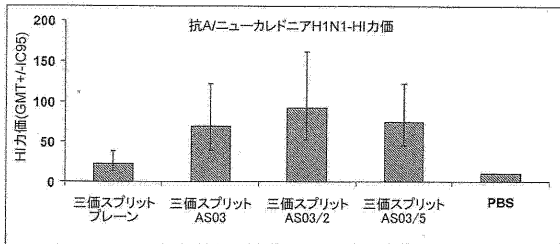
【 図 5 - 2 】

5C-抗B/山東/7/97 HI力価



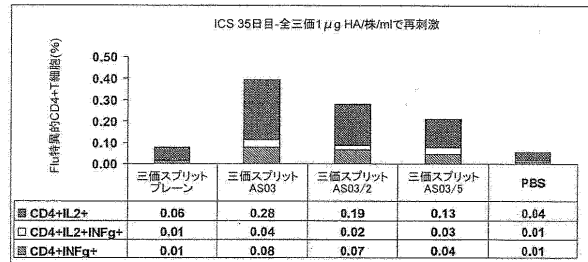
【 図 6 】

ヘテロサブタイプ株(用量範囲AS03)でプライミングされたC57Bl/6マウスにおける血球凝集抑制試験 (GMT+IC95)



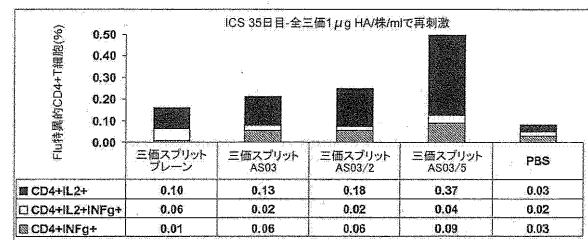
【 図 7 】

ヘテロサブタイプ株(用量範囲AS03)でプライミングされたC57Bl/6マウスに由来するPBMCにおける細胞性免疫応答(CD4+T細胞)



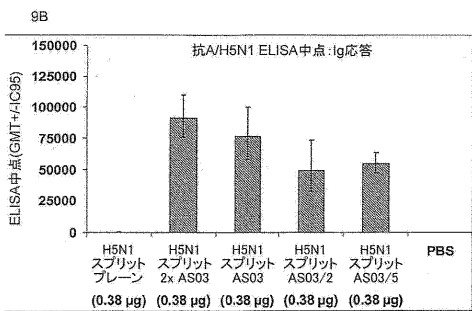
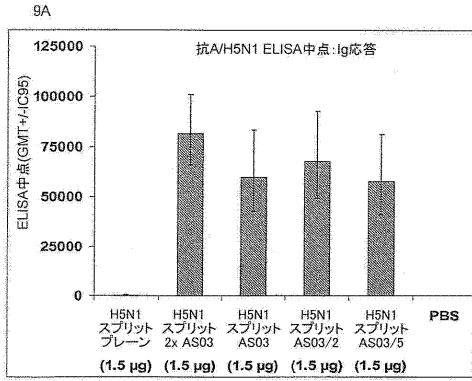
【 図 8 】

ヘテロサブタイプ株でプライミングされ、用量範囲AS03でアジュバントを添加した低用量の抗原(0.5 μg)で免疫されたC57Bl/6マウスに由来するPBMCにおける細胞性免疫応答(CD4+T細胞)

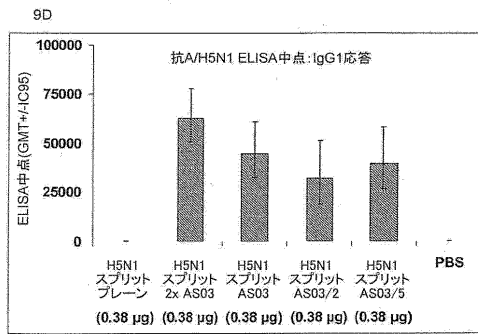
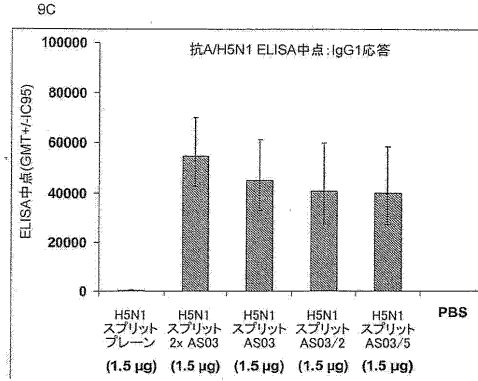


【 図 9 - 1 】

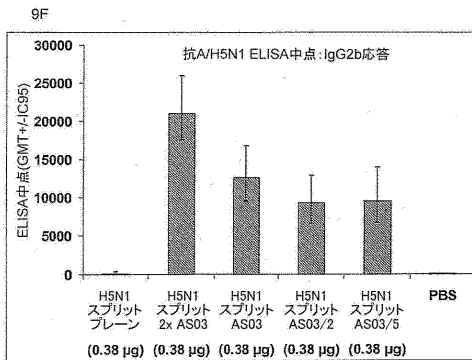
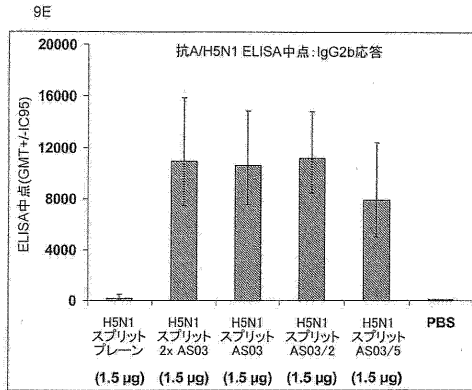
2つの異なる抗原用量:1.5μg(A、CおよびE)または0.38μg(B、DおよびF)に関する免疫後14日目のH5N1特異的血清Ig ELISA力価(AおよびB)ならびに抗H5N1 IgG1(CおよびD)およびIgG2b (EおよびF)アイソタイプ応答(GMT+/-IC95)



【 図 9 - 2 】

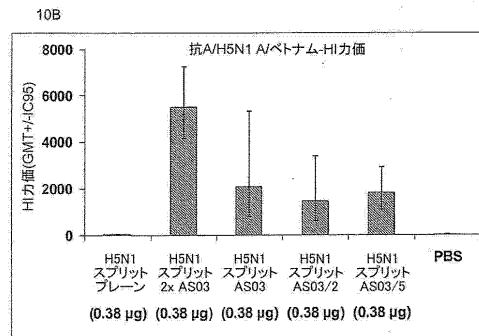
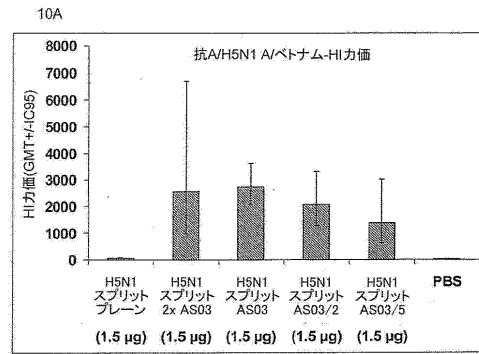


【 図 9 - 3 】



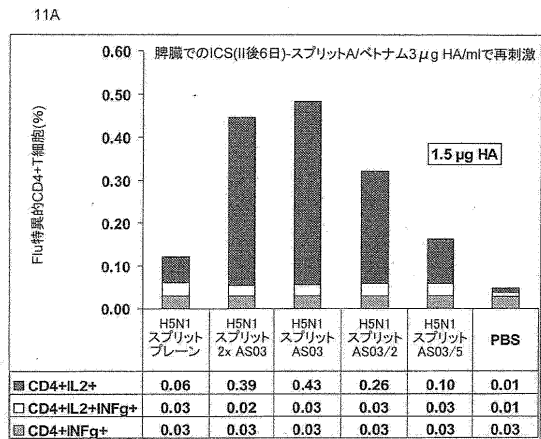
【 図 10 】

2つの異なる抗原用量:1.5μg(A)または0.38μg(B)に関する免疫後21日目の(GMT+/-IC95)の血球凝集抑制試験(GMT+/-IC95)

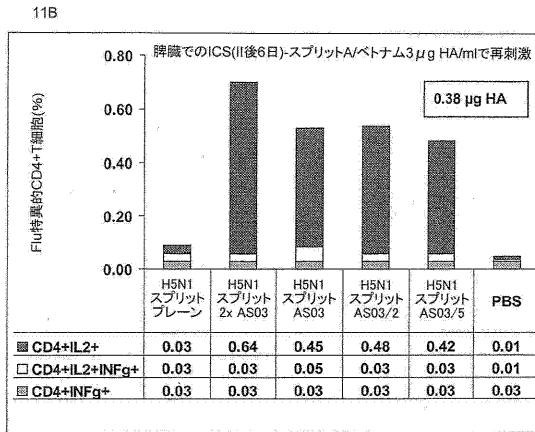


【 図 1 1 - 1 】

用量範囲AS03でアジュバントを添加した異なる用量のH5N1ワクチン(1.5または0.38 μg)で免疫されたナイーブなC57BL/6マウスにおける細胞性免疫応答(CD4+T細胞):
(A)1.5 μg Agまたは(B)0.38 μg Ag

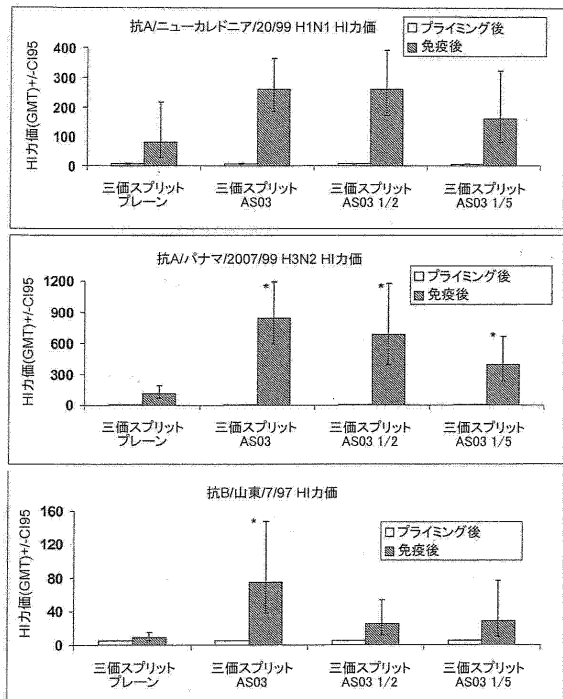


【 図 1 1 - 2 】



【 図 1 2 】

相同株(用量範囲AS03)でプライミングされたブタにおける血球凝集抑制試験(GMT+/IC95)

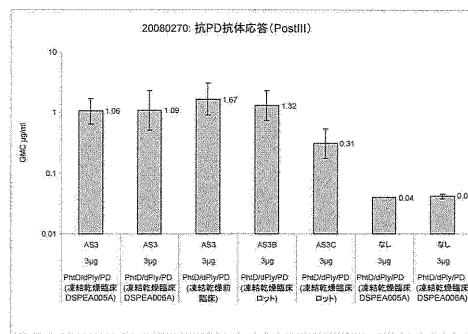


* プレーンと比較して統計学的有意差を有する群

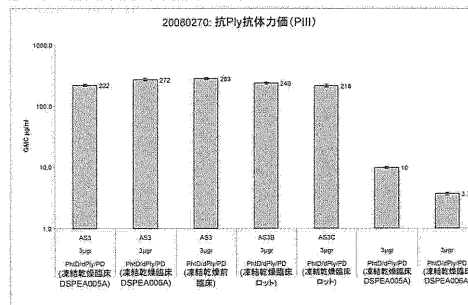
【 図 1 3 - 1 】

種々のAS03希釈液における肺炎連鎖球菌タンパク質に対する免疫応答を示すELISA結果

A インフルエンザ菌由来のタンパク質に対する免疫応答

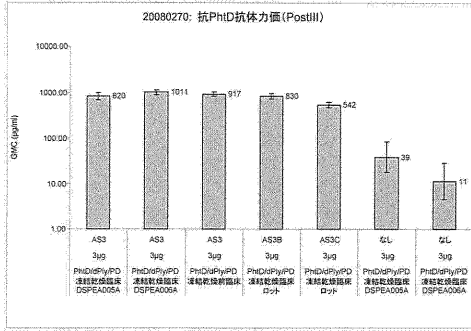


B ニューモシシに対する免疫応答



【 図 1 3 - 2 】

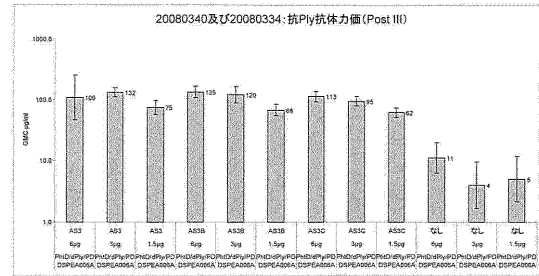
C プロテインDに対する免疫応答



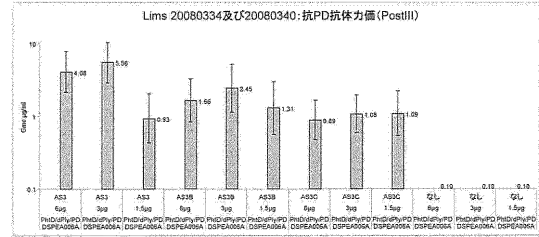
【 図 1 4 - 1 】

種々のAS03希釈液における肺炎連鎖球菌タンパク質に対する免疫応答を示すELISA結果

A ニューモリシンに対する免疫応答

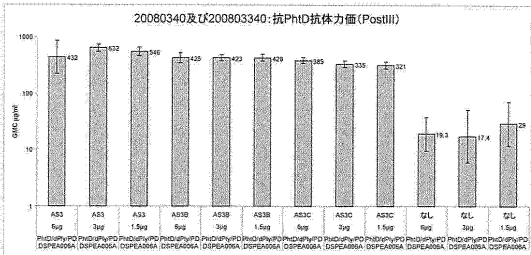


B インフルエンザ菌由来のプロテインDに対する免疫応答



【 図 1 4 - 2 】

C PhtDに対する免疫応答



【手続補正書】

【提出日】平成27年3月4日(2015.3.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヒスチジントライアドファミリー (PhTX) のメンバーである非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

【請求項2】

ポリヒスチジントライアドファミリー (PhTX) のメンバーである非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンからなるアジュバント組成物とを含む免疫原性組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

【請求項3】

ポリヒスチジントライアドファミリー (PhTX) のメンバーである非コンジュゲート肺炎連鎖球菌タンパク質と、水中油型エマルジョンを含むアジュバント組成物とを含むワクチン組成物であって、該水中油型エマルジョンがヒト用量あたり0.5~10 mgの代謝可能油、0.5~11 mgのトコール及び0.1~4 mgの乳化剤を含む、前記ワクチン組成物。

【請求項4】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、1~10、2~10、3~9、4~8、5~7、又は5~6 mg (例えば、2~3、5~6、又は9~10 mg) の代謝可能油を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、0.5~11、1~11、2~10、3~9、4~8、5~7、5~6 mg (例えば、10~11、5~6、2.5~3.5又は1~3 mg) のトコールを含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

水中油型エマルジョンがヒト用量あたり、0.1~5、0.2~5、0.3~4、0.4~3又は2~3 mg (例えば、0.4~1.2、2~3又は4~5 mg) の乳化剤を含む、請求項1~5のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項7】

代謝可能油がスクアレンである、請求項1~6のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項8】

トコールが α -トコフェロールである、請求項1~7のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項9】

乳化剤がポリオキシエチレンソルビタンモノオレートである、請求項1~8のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項10】

ワクチン組成物の容量が0.4~1.5 mlである、請求項1~9のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項11】

前記用量の容量が0.5 mlである、請求項10に記載の免疫原性組成物。

【請求項12】

前記用量の容量が0.7 mlである、請求項 1 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 3】

前記用量の容量が1.0 mlである、請求項 1 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 4】

非コンジュゲート肺炎球菌PhtDを含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 5】

2以上の非コンジュゲートタンパク質を含む、請求項 1 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 6】

非コンジュゲート肺炎球菌PhtD及び非コンジュゲート肺炎球菌ニューモリシンを含む、請求項 1 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 7】

肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患の予防的治療又は治療における使用のための請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 8】

肺炎球菌感染症又は肺炎球菌性疾患の予防的治療又は治療において使用するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物の使用。

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 47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K 47/44	(2006.01)	A 6 1 K	47/44	

(72)発明者 バルー ジェイアール, ウィリアム リブリー
 ベルギー国 ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミス
 クライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ハノン, エマニュエル ジュール
 ベルギー国 ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミス
 クライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

Fターム(参考) 4C076 AA17 BB11 CC15 CC31 DD34 DD59 EE23 FF12 FF16 FF43
 4C085 AA03 AA38 BA14 CC07 CC21 CC24 EE03 EE06 FF12 GG01

【外国語明細書】

2015129148000001.pdf