

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3901731号

(P3901731)

(45) 発行日 平成19年4月4日(2007.4.4)

(24) 登録日 平成19年1月12日(2007.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	

請求項の数 18 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-532122	(73) 特許権者	スミスクライン・ピーチャム・バイオロジカルス (ソシエテ・アノニム)
(86) (22) 出願日	平成8年4月1日(1996.4.1)		ベルギー国ペー-1330リクセンザルト、リュ・デュ・ランスティテュート89番
(65) 公表番号	特表平11-504020	(74) 代理人	弁理士 青山 稔
(43) 公表日	平成11年4月6日(1999.4.6)	(74) 代理人	弁理士 田中 光雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP1996/001464	(72) 発明者	ガルソン, ナタリー・マリー・ジョゼフ・クロード
(87) 国際公開番号	W01996/033739		ベルギー、ペー-1330リクセンザルト、リュ・デュ・ランスティテュート89番
(87) 国際公開日	平成8年10月31日(1996.10.31)		スミスクライン・ピーチャム・バイオロジカルス・ソシエテ・アノニム
審査請求日	平成15年2月28日(2003.2.28)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	9508326.7		
(32) 優先日	平成7年4月25日(1995.4.25)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	9513107.4		
(32) 優先日	平成7年6月28日(1995.6.28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 サポニンおよびステロールを含有するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的に活性なサポニンとしての実質的に純粋な QS 2 1 およびステロールを含むワクチン組成物であって、QS 2 1 : ステロールの比率が 1 : 1 ~ 1 : 1 0 0 (w / w) であることを特徴とするワクチン組成物。

【請求項 2】

QS 2 1 : ステロールの比率が 1 : 1 ~ 1 : 5 (w / w) の範囲である請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 3】

QS 2 1 : ステロールの比率が 1 : 2 (w / w) である請求項 1 記載のワクチン組成物。 10

【請求項 4】

ステロールがコレステロールである請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

さらに 3 デ - o - アシル化モノホスホリル脂質 A (3 D - M P L) を含む請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

さらに担体を含む請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

担体が水中油型エマルジョン、ミョウバン、マイクロスフェアおよび被包化抗原粒子を含む群から選択される請求項 6 記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

ワクチン組成物がリポソームビヒクルを含有する、請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

QS 2 1 が少なくとも純度 9 5 % である請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項記載のワクチン組成物。

【請求項 1 0】

QS 2 1 が少なくとも純度 9 8 % である請求項 9 記載のワクチン組成物。

【請求項 1 1】

さらに、リポソームの膜内に含有された 3 D - M P L を含む請求項 8 記載のワクチン組成物。

10

【請求項 1 2】

さらに、ヒト免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、I 型単純ヘルペスウイルス、II 型単純ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスもしくは E 型肝炎ウイルス、RS ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、インフルエンザウイルス、Hib、髄膜炎ウイルス、サルモネラ属 (Salmonella)、ナイセリア属 (Neisseria)、ボレリア属 (Borrelia)、クラミジア属 (Chlamydia)、ボルデテラ属 (Bordetella)、プラスモディウム属 (Plasmodium) またはトキソプラズマ属 (Toxoplasma) のいずれかから得られる抗原または抗原組成物を含む請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 1 3】

さらに、腫瘍に由来する抗原を含む請求項 1 記載のワクチン組成物。

20

【請求項 1 4】

医薬用の請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載のワクチン組成物。

【請求項 1 5】

塩基媒介加水分解に対して免疫学的に活性なサポニンとしての実質的に純粋な QS 2 1 を安定化させる方法であって、1 : 1 ~ 1 : 1 0 0 の重量対重量比で該実質的に純粋な QS 2 1 をステロールと会合させることを含む方法。

【請求項 1 6】

ステロールがコレステロールである請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 記載のワクチン組成物の製造方法であって、

- a) ステロールを含む脂質懸濁液を調製する工程；
 - b) 該脂質懸濁液を、リポソームのサイズが 1 0 0 n m に減少するまで、顕微溶液化する工程；
 - c) 免疫学的に活性なサポニンとしての QS 2 1 を添加する工程
- を含む製造方法。

30

【請求項 1 8】

免疫学的に活性なサポニンとしての QS 2 1 およびステロールとしてのコレステロールと抗原または抗原組成物とを混合することを含む、請求項 1 記載のワクチン組成物の製造方法。

40

【発明の詳細な説明】

本発明は、新規ワクチン製剤、その調製方法および医薬におけるそれらの使用に関する。特に、本発明は、抗原、QS 2 1 などのキラジャ・サボナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮から得られた免疫学的に活性なフラクション、およびステロールを含有するワクチンに関する。

南米の樹木であるキラジャ・サボナリア・モリナの樹皮から得られたアジュバント活性を有する免疫学的に活性なサポニンフラクションは、当該技術分野で知られている。例えばキラジャ・サボナリア・モリナの木からの H p 1 c 精製フラクションである QA 2 1 としても知られている QS 2 1 およびその製造方法は、US 特許第 5,057,540 号に (QA 2 1 として) 開示されている。キラジャサポニンは、Scottら, Int. Archs. Allergy Appl. Imm

50

un., 1985, 77, 409によってもアジュバントとして開示された。しかしながら、アジュバントとしてのQS21の使用は、ある欠点と関連している。例えば、QS21が遊離分子として哺乳動物に注射されると、該注射部位で、壊死、すなわち、限局性組織死が生じることが観察された。

今、驚くべきことに、注射部位での壊死は、QS21およびステロールの混合物を含有する製剤の使用により回避することができるが見いだされた。好ましいステロールとしては、 α -シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロールおよびコレステロールが挙げられる。これらのステロールは、当該技術分野でよく知られており、例えば、コレステロールは、動物脂肪中に見られる天然ステロールとしてMerck Index, 第11版, 第341頁に開示されている。

したがって、第1の態様において、本発明は、抗原、免疫学的に活性なサポニンフラクションおよびステロールを含有してなるワクチン組成物を提供するものである。好ましくは、本発明の組成物は、免疫学的に活性なサポニンフラクションを実質的に純粋な形態で含有する。好ましくは、本発明の組成物は、実質的に純粋な形態のQS21を含有する、すなわち、該QS21は、少なくとも純度90%、好ましくは少なくとも純度95%、最も好ましくは少なくとも純度98%である。本発明の組成物において有用な他の免疫学的に活性なサポニンフラクションとしては、QA17/QS17が挙げられる。Q21およびコレステロールを含有してなる本発明の組成物は、コレステロールを含まない組成物と比較すると、低下した反応原性(reactogenicity)を示すが、アジュバント効果は、維持されている。さらに、QS21は、pHが約7以上である塩基性条件下で分解することが知られている。本発明の組成物のさらなる長所は、塩基媒介加水分解に対するQS21の安定性がコレステロールを含有する製剤において増強されるということである。

本発明の好ましい組成物は、リポソーム構造を形成するものである。ステロール/免疫学的に活性なサポニンフラクションがISCOM構造を形成する組成物もまた本発明の態様を形成する。

Q21:ステロールの比は、典型的には、1:100~1:1(重量対重量)のオーダーであろう。好ましくは、過剰なステロールが存在し、Q21:ステロールの比は、少なくとも1:2(w/w)である。典型的には、ヒト投与について、QS21およびステロールは、投与当たり、約1 μ g~約100 μ g、好ましくは、約10 μ g~約50 μ gの範囲でワクチン中に存在するであろう。

リポソームは、好ましくは室温で非晶質である中性脂質、例えば、ホスファチジルコリン、例えば卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリンまたはジラウリルホスファチジルコリンを含有するのが好ましい。リポソームは、飽和脂質からなるリポソームについてリポソーム-QS21構造の安定性を増加させる荷電脂質(charged lipid)を含有してもよい。これらの場合、荷電脂質の量は、好ましくは1-20%w/w、最も好ましくは5-10%である。リン脂質に対するステロールの比率は、1-50%(モル/モル)、最も好ましくは20-25%である。

好ましくは、本発明の組成物は、MPL(3-デアシル化モノホスホリル脂質A、3D-MPLとしても知られている)を含有する。3D-MPLは、4、5または6個のアシル化鎖を有する3つのタイプのデ-O-アシル化モノホスホリル脂質Aの混合物としてGB 220 211(リビ(Ribi))により知られており、モンタナ州のリビ・イムノケム(Ribi Immunochem)により製造されている。好ましい形態は、国際特許出願92/116556に開示されている。

本発明の好適な組成物は、まずMPLなしでリポソームを調製し、次いで、MPLを好ましくは100nmの粒子として添加したものである。したがって、MPLは、小胞膜内には含有されていない(MPLアウトとして知られている)。MPLが小胞膜内に含有されている(MPLインとして知られている)組成物もまた本発明の態様を形成する。抗原は、小胞膜内に含有され得るか、または、小胞膜の外部に含有され得る。好ましくは、可溶性抗原は外部にあり、疎水性または脂質化抗原は膜の内部または外部のいずれかに含有される。

10

20

30

40

50

しばしば、本発明のワクチンは、特定の担体を必要としないであろうし、水性または他の医薬的に許容されるバッファー中で処方されるであろう。いくつかの場合、本発明のワクチンがさらにミョウバンを含有するか、または水中油型エマルジョン、または、例えばリポソーム、マイクロスフェアもしくは被包化抗原粒子などの他の適切なビヒクル中で提供されるであろうという点で優れている。

好ましくは、ワクチン製剤は、ヒトまたは動物の病原体に対する免疫応答を導き出すことができる抗原または抗原組成物を含有するであろう。当該技術分野で知られている抗原または抗原組成物は、本発明の組成物において用いることができる、例えば、以下ものから得られた多糖類抗原、抗原または抗原組成物：H I V - 1（例えば、gp 1 2 0またはgp 1 6 0）、ネコ免疫不全ウイルス、ヒトもしくは動物ヘルペスウイルス（例えば、gDもしくはその誘導体またはH S V 1もしくはH S V 2からのI C P 2 7などの即時型初期タンパク質（Immediate Early protein））、サイトメガロウイルス（特にヒト）（gBまたはその誘導体）、水痘帯状疱疹ウイルス（例えばgp I、IIまたはIII）、または、B型肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎表面抗原またはその誘導体）、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスのような肝炎ウイルス、または例えばR Sウイルス（Respiratory Syncytial virus）（例えば、US特許第5,149,650号に開示されているH S R V FおよびGタンパク質もしくはその免疫原性断片、またはUS特許第5,194,595号に開示されているF G糖タンパク質などのH S R Vタンパク質FおよびGからの免疫原性断片を含有するキメラポリペプチド）などの他のウイルス性病原体；以下ものから得られた抗原：髄膜炎A、BおよびCなどの髄膜炎菌株、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Streptococcus Pneumonia）、ヒト乳頭腫ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘモフィルスインフルエンザB（Hib）、エプスタイン - バーウイルス（EBV）、またはサルモネラ属（Salmonella）、ナイセリア属（Neisseria）、ボレリア属（Borrelia）（例えば、O s p AまたはO s p Bまたはその誘導体）またはクラミジア属（Chlamydia）、またはボルデテラ属（Bordetella）（例えばP . 6 9、P TおよびF H A）などの細菌性病原体、またはプラスモディウム属（Plasmodium）もしくはトキソプラズマ属（Toxoplasma）などの寄生物。

H S V糖タンパク質D（gD）またはその誘導体は、好ましいワクチン抗原である。それは、ウイルス膜上にあり、感染細胞の細胞質中にも見られる（Eisenberg R. J. ら；J of Virol 1980 35 428-435）。それは、シグナルペプチドを含む393アミノ酸からなり、約60kDの分子量を有する。全てのH S Vエンベローブ糖タンパク質のうち、これは、おそらく最もよく特徴付けられたものである（Cohenら、J. Virology 60 157-166）。それは、イン・ピボで、細胞膜へのウイルス付着における中心的な役割を果たすことが知られている。さらにまた、糖タンパク質Dは、イン・ピボで中和抗体を導き出し、致死攻撃から動物を保護することができることを示した。gD分子のトランケート形態は、C末端アンカー領域が欠けており、細胞培養上清中に輸出される可溶性タンパク質として哺乳動物中で生成され得る。かかる可溶性形のgDが好ましい。gDのトランケート形態の生成は、EP 0 139 417に開示されている。好ましくは、gDは、H S V - 2から誘導される。本発明の具体例は、アミノ酸1 - 306個の天然糖タンパク質ならびに膜アンカー領域が欠けているトランケートタンパク質のC末端にさらなるアスパラギンおよびグルタミンを含有してなる308個のアミノ酸からなるトランケートH S V - 2糖タンパク質Dである。該タンパク質のこの形態としては、成熟可溶性283アミノ酸タンパク質を宿主細胞から分泌させるように切断されるシグナルペプチドが挙げられる。

本発明のもう1つの態様では、B型肝炎表面抗原は、好ましいワクチン抗原である。

本明細書で用いる場合、「B型肝炎表面抗原」または「H B s A g」なる表現としては、H B V表面抗原の抗原性を示すH B s A g抗原またはその断片が挙げられる。H B s A g抗原の226アミノ酸配列に加えて（Tiollaisら、Nature, 317, 489（1985）およびそれらにおける引用文献を参照）、本明細書に記載のH B s A gは、所望により、前記文献およびEP-A-0 278 940に開示されているプレ - S配列の全部または一部を含有してよい。特に、H B s A gは、アド血清型（ad serotype）のB型肝炎ウイルス上のオープンリーデ

10

20

30

40

50

イングフレームに関するHBsAgのL-タンパク質の残基12-52、次いで、残基133-145、次いで、残基175-400からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有してよい(このポリペプチドは、L*と称される; EP 0 414 374を参照)。本発明の範囲内のHBsAgとしては、EP 0 198 474(エンドトロニクス(Endotronics))に開示されているプレ-A1-プレS2-SポリペプチドまたはEP 0 304 578(マコーミック(Mc Cormick)およびジョーンズ(Jones))に開示されているもののような密接な類似体も挙げられる。本明細書に記載のHBsAgは、突然変異体、たとえばW0 91/147 03または欧州特許出願0 511 855A1に開示されている「エスケープ突然変異体」、特に、145位でグリシンからアルギニンにアミノ酸置換されたHBsAgを引用することもできる。

10

通常、HBsAgは、粒子形態であろう。該粒子は、例えば、Sタンパク質のみからなっているか、または、複合粒子、例えば(L*, S)(L*は、前記定義と同じであり、Sは、HBsAgのSタンパク質を示す)であってもよい。該粒子は、酵母において発現される形態であるのが好都合である。

B型肝炎表面抗原Sタンパク質の調製は、よく開示されている。例えば、Harfordら(1983) Develop. Biol. Standard 53, 第125頁、Greggら(1987) Biotechnology, 5, 第479頁、EP 0 226 846、EP 0 299 108およびそれらにおける引用文献を参照。

本発明の範囲内の製剤は、抗腫瘍抗原を含有してもよく、免疫治療的に処置された癌に有用でもある。

ワクチン製剤は、一般的に、New Trends and Developments in Vaccines, Vollerら編, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978に開示されている。リポソーム内への被包化は、例えば、FullertonによるU.S.特許4,235,877に開示されている。タンパク質の巨大分子へのコンジュゲーションは、例えば、LikhitelによるU.S.特許4,372,945およびArmorらによるU.S.特許4,474,757に開示されている。

20

各ワクチン投与量中のタンパク質の量は、典型的なワクチン接種者において有意な副作用を伴わない免疫防御応答を含む量として選択される。かかる量は、特定の免疫原を用いることおよびその提供方法に依存して変化するであろう。一般的に、各投与量は、タンパク質1-1000mcg、好ましくは、2-1000mcg、最も好ましくは、4-40mcgからなるであろう。特定のワクチンについての至適量は、患者における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究によって確かめることができる。初回予防接種の後、患者は、適当に間隔をおいて1回または数回のブースター免疫感作を受けてよい。

30

本発明の処方は、予防目的および治療目的の両方のために用いてもよい。

したがって、さらなる態様では、本発明は、ヒト患者の治療のための本発明のワクチンの使用を提供するものである。本発明は、本発明のワクチンの有効量を患者に投与することを特徴とする治療方法を提供するものである。特に、本発明は、本発明のワクチンの有効量を患者に投与することを特徴とする、ウイルス感染、細菌感染、寄生生物感染または癌の治療方法を提供するものである。

以下の実施例およびデータにより、本発明を説明する。

実施例

1.1 リポソームの調製方法:

40

脂質(卵黄由来または合成したホスファチジルコリンなど)およびコレステロールの有機溶媒中混合物を真空下(または、別法としては、不活性ガス流下)で乾燥させる。次いで、水溶液(リン酸緩衝生理食塩水など)を添加し、全ての脂質が懸濁液になるまで、容器を攪拌する。次いで、この懸濁液を、リポソームサイズが100nmに減少するまで微小流動化し、次いで、0.2μmフィルターを介して濾過滅菌する。エキストルージョン(extrusion)または音波処理をこの工程に代えて用いることができる。典型的には、コレステロール:ホスファチジルコリン比は1:4(w/w)であり、水溶液を添加して、5~50mg/mlの最終コレステロール濃度を得る。有機溶液中の該脂質に有機溶液中のMPLを添加すると、最終リポソームは、膜中にMPLを含有する(MPLインと称される)。該リポソームは、所定のサイズ100nmを有しており、SUV(小さな単ラメラ小胞)と

50

称される。この溶液が繰り返し冷凍および解凍されると、該小胞は、縮合して、500 nm ~ 15 μ mの範囲のサイズの大きな多重ラメラ構造体 (MLV) を形成する。リポソーム自体は、期間じゅう安定であり、融合原性 (fusogenic) 能を持っていない。

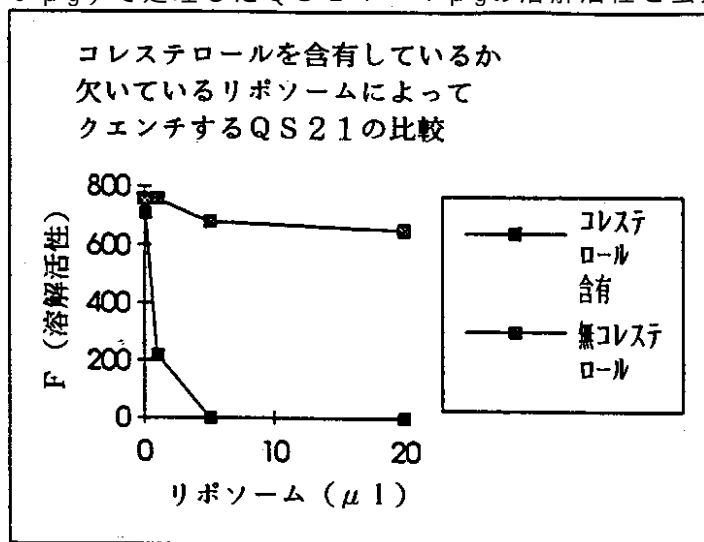
1.2 処方工程：

該リポソームに水溶液中のQS21を添加する。次いで、この混合物を、所望により100 nm粒子の形態でMPLを含有していてもよい抗原溶液に添加する。

1.3 QS21の溶解活性は、コレステロールを含有するリポソームによって阻害される。

赤血球にQS21を添加すると、赤血球は溶解してヘモグロビンを放出する。この溶解活性は、膜中にコレステロールを含有するリポソームおよび捕獲した蛍光性色素カルボキシフルオレセインを用いて測定することもできる - リポソームが溶解されると、該色素が放出され、蛍光分光学によってモニターすることができる。蛍光リポソームが膜中にコレステロールを含有しない場合、リポソームの溶解は、観察されない。QS21が、赤血球に添加される前にコレステロールを含有するリポソームと一緒にインキュベートされると、赤血球の溶解は、QS21に対するコレステロールの比率に依存して減少する。1:1の比率を用いると、溶解活性は検出されない。リポソームがコレステロールを含有しない場合、溶解の阻害は、QS21よりも1000倍過剰のリン脂質を必要とする。

溶解活性を測定するために蛍光リポソームを用いても同じことが当てはまる。下記グラフにおいて、コレステロールを欠いているリポソーム (ml当たり卵黄レシチン1 mg) またはコレステロールを含有しているリポソーム (ml当たりレシチン1 mg、コレステロール500 μ g) で処理したQS21 4 μ gの溶解活性を蛍光により測定した。



データは、QS21が膜中のコレステロールと特定の方法で結合しており、かくして、(細胞または蛍光リポソームの)溶解を生じることを示す。

QS21がまずリポソーム中のコレステロールと結合すると、もはや、細胞または他のリポソームに対して溶解しなくなる。これは、コレステロール: QS21の最小比0:1 (w/w)を必要とする。

コレステロールは、水溶液に不溶性であり、安定な懸濁液を形成しない。リン脂質の存在下、コレステロールは、リポソームと称される小胞の安定な懸濁液を形成することができるリン脂質二重層内に存する。リン脂質を添加する必要性を回避するために、可溶性誘導体を試みた。ポリオキサエタニルコレステロールセバシン酸は、60 mg/mlで、QS21よりも2000倍過剰 (w/w)でさえ水に溶けるが、しかしながら、QS21の溶解活性の低下は検出されなかった。

1.4 コレステロールを含有するリポソームによるQS21の増加した安定性

QS21は、pH7以上で加水分解に非常に高感度である。この加水分解は、逆相HPLCでQS21に対応するピークの減少を測定することによってモニターすることができる

10

20

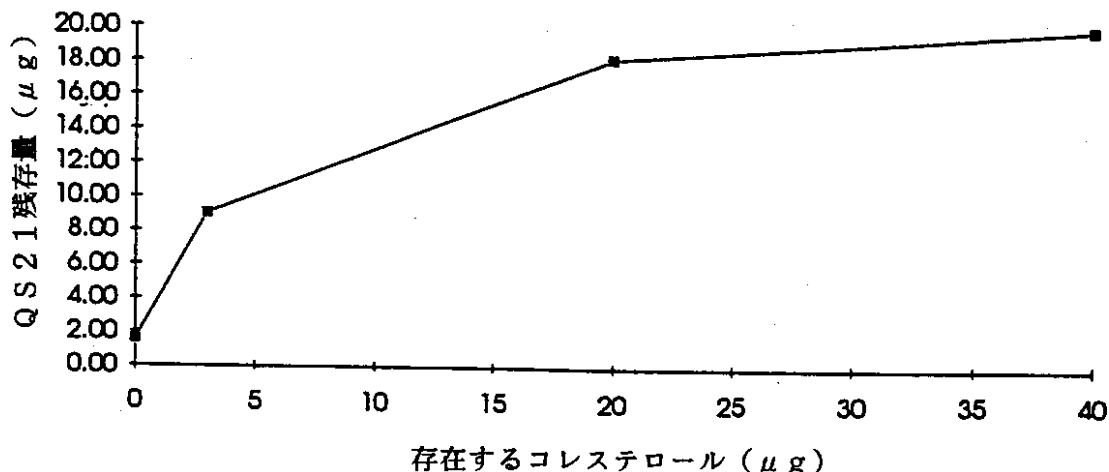
30

40

50

。例えば、下記グラフは、pH 9で、37 の温度で、QS21の90%が16時間以内に加水分解される。コレステロールを含有するリポソームが2：1（コレステロール：QS21（w/w））の割合でQS21に添加されると、QS21の加水分解は、同一条件下で検出されない。比率が1：1である場合、QS21の10%が分解する。

37℃で16時間、pH9でコレステロールを含有するSUVの存在下、
QS21 20 μgのインキュベーション



QS21がコレステロールを含有するリポソームと結合すると、塩基媒介加水分解に対してあまり感度が良くないようになると推断される。加水分解産物は、非経口投与されるとアジュバント活性を有しないと開示されており、かくして、QS21を含有するワクチンは、酸性pHで処方され、4 に維持してアジュバント組成物を維持しなければならない。リポソームの使用は、この要求に打ち勝つ。

1.5 反応原性研究：

増加する量のリポソーム（コレステロールのμgによって表される）に添加したQS21（またはジギトニン）5 μgをマウスの脛側筋に注射する。溶解活性は、試料と同一の溶血を達成するのに必要なQS21の量を意味する、等価のQS21のμgとして表す。注射部位での筋肉における赤み、壊死および毒性を、マウスを殺した後に視覚的に評価した。

処方	溶解活性 (μg)	赤み	壊死	毒性
QS21+PBS	5	+++	±	+++
QS21+コレステロール1 μg (SUV)	4	+++	+	++++
QS21+コレステロール5 μg (SUV)	0	-	-	±
QS21+コレステロール25 μg (SUV)	0	±	-	+
SUVのみ	0	-	-	-
ジギトニン	5	-	-	±
PBS	0	-	-	-

データは、溶解活性がコレステロールを含有するリポソームの添加によって完全に破壊されると、QS21による毒性もまた完全に破壊されることを示す。

1.6 ウサギにおける筋肉内反応原性

U.I./Lにおける値

実験	処方	0日目	溶血	1日目	溶血	3日目	溶血
ウサギNo. 1	QS21 50 μ g	1078	±	8650		1523	
ウサギNo. 2		1116		4648		1435	
ウサギNo. 3		660		4819		684	
ウサギNo. 4		592		5662		684	
ウサギNo. 5		3400		7528		1736	
平均		1369		6261		1212	
SD		1160		1757		495	

10

実験	処方	0日目	溶血	1日目	溶血	3日目	溶血
ウサギNo. 6	QS21 50 μ g	596		1670		460	
ウサギNo. 7	SUV中	540		602		594	
ウサギNo. 8	コレステロール	611		1873		803	
ウサギNo. 9	50 μ g	521		507		616	
ウサギNo. 10	(1:1)	1092	±	787		555	
平均		672		1088		606	
SD		238		636		125	

20

実験	処方	0日目	溶血	1日目	溶血	3日目	溶血
ウサギNo. 11	QS21 50 μ g	332		344		387	
ウサギNo. 12	SUV中	831		662		694	
ウサギNo. 13	コレステロール	464		356		519	
ウサギNo. 14	150 μ g	528		720		614	
ウサギNo. 15	(1:3)	1027		568		849	
平均		637		530		613	
SD		285		173		175	

30

40

実験	処方	0日目	溶血	1日目	溶血	3日目	溶血
ウサギNo. 16	QS21 50 μ g	540		769		745	
ウサギNo. 17	SUV中	498		404		471	
ウサギNo. 18	コレステロール	442		717		(4535)	
ウサギNo. 19	250 μ g	822		801		925	
ウサギNo. 20	(1:5)	3182	±	2410		960	
平均		1097		1020		775	(1527)
SD		1175		793		224	(1692)

10

実験	処方	0日目	溶血	1日目	溶血	3日目	溶血
ウサギNo. 21		321		290		378	
ウサギNo. 22		660		535		755	
ウサギNo. 23	PBS	650		603		473	
ウサギNo. 24		1395		(3545)		(5749)	
ウサギNo. 25		429	±	323		263	
平均		691		438	(1059)	467	(1523)
SD		419		155	(1396)	210	(2369)

20

30

データは、処方へのコレステロール含有リポソームの添加が、QS21によって生じるCPK（クレアチンホスホキナーゼ）の上昇を有意に低下させることを示す。CPK増加は筋肉損傷の尺度なので、これは、減少した筋肉損傷を示し、組織病理学によって確認される。

1.7 リポソーム-QS21複合体のミョウバンへの結合

QS21を、過剰のコレステロールおよび放射性コレステロールを含有する中性リポソームと一緒にインキュベートし、次いで、PBS中のミョウバン（Al(OH)₃）と一緒にインキュベートした。単独では、中性リポソームもQS21もPBS中のミョウバンに結合せず、負に荷電したリポソームは、結合する。しかしながら、一緒にすると、QS21および中性リポソームは、ミョウバンに結合する。上清は、QS21（オルシノール試験によってアッセイする）も放射性コレステロールも含有しなかった。

40

これは、QS21がリポソームに結合し、リポソーム-QS21混合物をミョウバンに結合させることを示す。これは、QS21によりリポソームに負荷された負の電荷により生じるか、またはリポソーム上の疎水性領域の暴露に対して生じる。結果は、QS21が膜からコレステロールを抽出しないことをも意味する。

これは、本発明の組成物がミョウバンをベースとするワクチンにおいて用いることができることを示す。

1.8 抗体およびCMI誘発についてのリポソームQS21/MPLおよび遊離QS21+MPLの比較

SUVは、エキストゥルージョンにより調製した（EYPC：コレステロール：MPL

50

20 : 5 : 1)。

MPLアウトについて、リポソームは、MPLなしで調製し、MPLは、100nmの粒子として添加した。

QS21は、抗原の前に添加した。コレステロール：QS21 = 5 : 1 (w/W)。

MLVは、抗原添加前に、冷凍 - 解凍SUV3xによって調製した。

捕獲された抗原を有するように、抗原は、冷凍 - 解凍の前にSUVに添加し、QS21は、冷凍 - 解凍後に添加した。抗原被包化 = 5%イン、95%アウト。マウス (gDについてはbalb/c、RTSについてはB10BR) のフットパッドに2回注射した。

gDは、単純疱疹ウイルス由来の糖タンパク質Dである。RTSは、プラスモジウム・ファルシバルム・スポロゾイト (Plasmodium falciparum sporozoite) 由来のエピトープを含有するように遺伝学的に修飾されたB型肝炎表面抗原 (HBsAg) である。

抗原 = RTS 10 μ g		抗HBsAg力価 15日後にブースター		
処方		IgG1	IgG2a	IgG2b
SUV/QS+MPL(アウト)	+Ag	1175	10114	71753
MLV/QS+MPL(アウト)	+Ag	2247	11170	41755
MLV/QS/MPL(イン)	+Ag	969	7073	18827
MLV/QS/MPL(イン)/Ag(イン)+Ag		1812	2853	9393
QS+MPL	+Ag	372	9294	44457
	Ag	<100	<100	<100
SUV/QS+MPL(アウト)		<100	<100	<100
MLV/QS/MPL(イン)		<100	<100	<100

抗原 = gD 20 μ g		抗gD	CMI	
処方		IgG	IFN- γ 96時間 (pg/ml)	IL2 48時間 (pg/ml)
SUV/QS+MPL(アウト)	+Ag	2347	1572	960
SUV/QS/MPL(イン)	+Ag	2036	1113	15
MLV/QS+MPL(アウト)	+Ag	1578	863	15
MLV/QS/MPL(イン)	+Ag	676	373	15
MLV/QS/MPL(イン)/Ag(イン)+Ag		1064	715	15
QS+MPL	+Ag	1177	764	15
	Ag	<100	567	44
SUV/QS+MPL(アウト)		<100	181	15
MLV/QS/MPL(イン)		<100	814	105

10

20

30

40

50

データは、SUV/QS + MPL (アウト) が少なくとも QS 2 1 + MPL と同様に良好な高い抗体力価を誘発し、細胞媒介免疫性のマーカー IL 2 を誘発するが、QS 2 1 抗原性をクエンチすることを示す。

抗原として HSV gD を用いて balb/c マウスにおける QS 2 1 およびコレステロール (SUV) の存在下での QS 2 1 を比較する第 2 の実験からのさらなる結果を以下に示す：

処方	抗原	IgG 7日後Ⅱ (GMT)	IgG 14日後Ⅱ (GMT)	血清型 7 日後Ⅱ					
				IgG1		IgG2a		IgG2b	
				μg/ml	%	μg/ml	%	μg/ml	%
SUV/QS21+MPLアウト	gD(5μg)	20290	16343	331	26	716	56	222	17
SUV/QS21/MPLイン	gD(5μg)	12566	10731	418	44	412	44	111	12
QS21+MPL	gD(5μg)	10504	10168	200	34	285	48	107	18
SUV/QS21+MPLアウト	無	0	0	0	0	0	0	0	0
QS21	gD(5μg)	3468	4132	156	66	67	28	14	6
SUV/QS21	gD(5μg)	11253	11589	484	57	304	36	65	8

1.9 gp120 + リポソーム MPL / QS 2 1 と遊離 MPL / QS 2 1 との比較

リポソーム = 膜中に MPL を含有する SUV

コレステロール : QS 2 1 = 6 : 1

1 回の免疫感作の 2 週間後に応答を試験した。

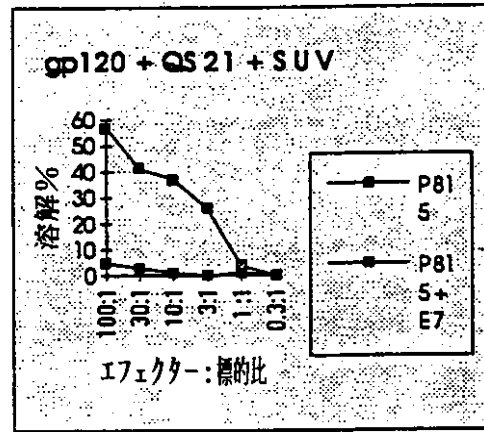
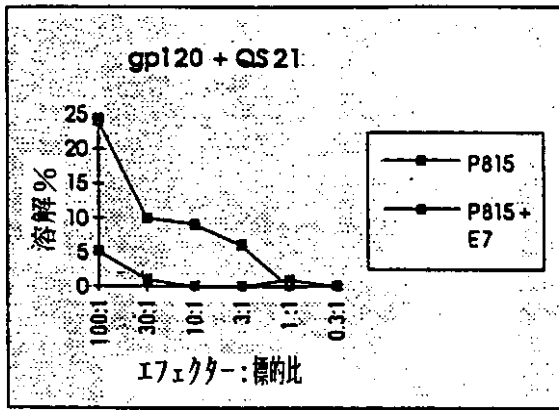
処方	proliftn	IFN-g ng/ml	IL2 pg/ml	IL5 pg/ml
SUV/MPL/QS21+Ag	12606	16.6	59	476
MPL+QS21+Ag	16726	15.8	60	404

2 回目の免疫感作後：

処方	proliftn	IFN-g ng/ml	IL2 pg/ml	IL5 pg/ml
SUV/MPL/QS21+Ag	12606	135	0	250
MPL+QS21+Ag	16726	60	0	500

データは、コレステロール含有リポソームおよび MPL と結合した QS 2 1 が MPL + QS 2 1 と同等の Th1 / Th0 応答を誘発することを示す。

第 2 の実験では、balb/c マウスをフットパッド内で、QS 2 1 または QS 2 1 + コレステロール含有 SUV の存在下、gp120 で免疫感作した。脾臓細胞における細胞毒性 T - リンパ球活性を測定した。



10

これは、QS21単独がCTL活性を誘発すること、およびコレステロールを含有するリポソームの存在下でのQS21がQS21単独と少なくとも同様に良好またはQS21単独よりも良好なCTL活性を有することを示す。

2. ワクチン

2.1 HBsAg L*, S粒子の処方

HBsAg L*, S粒子は、以下のとおり処方する：

HBsAg L*, S粒子 10 μg / 投与を、攪拌下、室温で1時間インキュベートする。注射用水およびPBS溶液を用いて容量を調節し、QS21の水溶液 (10 μg / 容量)

20

を用いて最終容量 70 μl / 容量に完成する。pHを 7 ± 0.5 に維持する。

HBsAg L*, S 1 μgおよび 50 μgを用い、HBsAg S抗原を用いて同様の処方を調製してもよい。

ウッドチャックモデル

これらのは、モデルとしてウッドチャック (Woodchuck) HBV抗原を用いて、ウッドチャック代用治療モデルにおいて試験してよい。

DQ QS21 (すなわち、QS21 / コレステロールまたはクエンチしたQS21) は、動物が慢性的にウイルスに感染しているウッドチャック治療モデルにおいて試験してよい。特定のウッドチャック肝炎ウイルスワクチンをそのままのQS21またはMPLを含有するかしないDQと混合し、6カ月間、毎月1回動物に投与してよい。ワクチンの効果

30

2.2 モルモットモデル (HSV)

2.2.1 予防モデル

12匹の雌性ハートリイ種モルモットのグループに0日目および28日目に以下の処方で筋肉内注射した：

第1の実験：

- gD 5 μg + QS21 50 μg + コレステロール 50 μg 含有 SUV
- gD 5 μg + QS21 100 μg + コレステロール 100 μg 含有 SUV
- gD 5 μg + QS21 50 μg + コレステロール 250 μg 含有 SUV
- gD 5 μg + QS21 50 μg

40

第2の実験：

gD 5 μg + MPL 12.5 μg + QS21 12.5 μg + コレステロール 62.5 μg 含有 SUV、または未処置のまま。

第2の免疫感作の後、14日目および28日目に動物から採血し、血清を、gD特異的ELISA抗体力価について試験した。

次いで、動物をHSV-2 MS株 10⁵ pfuで膣内抗原投与した。それらは、原発性疱疹性病変の評価のために4~12日間毎日評価した。評価は、以下のとおり行った：

膣病変：

- 出血 = 0.5
- 出血なしで1日または2日間の赤み = 0.5

50

- 1日間赤みおよび出血 = 1
- 少なくとも3日後に出血なしで赤み = 1

外部の疱疹性小胞：

- < 4個の小さな小胞 = 2
- ≥ 4個の小さな小胞または1個の大きな小胞 4 ≥ 4個の大きな病変 8融合する大きな病変 = 16
- 全外部生殖器領域における融合する大きな病変 = 32。

結果は、下記表に示す：

予防モデル

実験1 (cholは、コレステロールを含有するSUVを表す)

n	処方	一次疾患						
		病変なし動物 %	膣病変発生率 %	外部病変発生率 %	PIインデックス**	対対照減少	病変重篤度* メジアン	n
12	gD/QS21 50μg	50	33	17	73	93%	1.50	6
11	gD/QS21 50μg-chol 1/5	64	18	18	67	93%	2.50	4
12	gD/QS21 50μg-chol 1/1	100	0	0	0	100%	-	-
12	gD/QS21 50μg-chol 1/1	50	33	17	54	95%	0.75	6
12	未処置	25	0	75	996	-	55.00	9

実験2

n	処方	抗体力価(GMT)			一次疾患						
		E L I S A N E U T R A			病変なし動物 %	膣病変発生率 %	外部病変発生率 %	PIインデックス**	対対照減少	病変重篤度* メジアン	n
		14日後I	28日後I	28日後II							
12	gD/QS21/SUV/MPL	47006	31574	449	58.33	33.33	8.33	37.50	94%	1.00	5
12	未処置	<400	<400	<50	16.67	8.33	75.00	587.50	-	11.50	10

*感染後4～12日間の病変スコアの総数(病変なしの動物は、考慮しない)。病変スコア：病変なし(0)、膣病変(0.5または1)、外皮小胞(2、4、8または16)。

**一次感染インデックス = SUM(最大スコアi) x (発生率%) ; i = 0、0.5、1、2、4、8または16。

表及びグラフは、予防モデルにおいて、gD / M P L / Q S 2 1 / S U Vによる免疫感作により一次疾患に対する非常に高いレベルの防御が誘発されたことを示す。外部病変の発生率および病変重篤度は、共に、gD / M P L / Q S 2 1 / S U Vで免疫感作された動物のグループにおいて非常に低下した。

2.2.2 治療モデル

治療モデルにおいて、雌性ハートリイ種モルモットをまずH S V - 2 M S株10⁵pfuで

10

20

30

40

50

抗原投与した。次いで、疱疹性病変を有する動物を任意に16匹からなるグループに分配した。

21日目および42日目に、それらを以下の処方の一つで免疫感作した：

- gD + MPL 50 µg + QS 21 50 µg + コレステロール 250 µg 含有 SUV
- gD + Al(OH)₃ + MPL 50 µg + QS 21 50 µg + コレステロール 250 µg 含有 SUV、または未処置のまま。

再発性疾患の評価のために、22～75日間毎日それらをモニターした。評価は、予防モデルについて記載したと同様であった。結果は、下記表およびグラフに示す。

治療モデル

n	処方	重篤度*		持続期間**		症状発現数***	
		メジアン	対対照減少%	メジアン	対対照減少%	メジアン	対対照減少%
16	gD+MPL+QS21+SUV	9.00	43%	7.00	18%	3.00	14%
15	gD+Al(OH) ₃ +MPL+QS21+SUV	8.50	46%	7.00	18%	3.00	14%
16	未処置	15.75	-	8.50	-	3.50	-

10

*感染後22～75日間の病変スコアの総数

**感染後22～75日間に動物が再発性病変を経験した合計日数

***感染後22～75日間の再発症状発現数。1つの症状発現が先に起こり、次いで、1日後に病変なしで続き、少なくとも2日後に紅斑（スコア=0.5）により特徴付けられるか、または、1日後に外部小胞（スコア>=2）により特徴付けられ、免疫治療的処置を21日目および42日目に行った。

20

結果は、良好なレベルの防御が、HSV-2感染の治療モデルにおいても誘発されたことを示す。ミョウバンを有するかまたは有しないgD/MPL/QS21/SUVによる免疫感作は、再発性疾患のメジアン重篤度に対して顕著な効果を有した。症状発現数および期間もわずかに減少した（表を参照）。

30

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 35/00
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/12

(72)発明者 フリード, マーティン
ベルギー、ペー - 1 3 3 0 リクセンザルト、リュ・デュ・ランステイテュート 8 9 番 スミスクラ
イン・ピーチャム・バイオリジカルス・ソシエテ・アノニム

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 特表平 0 5 - 5 0 0 0 5 6 (J P , A)
国際公開第 9 2 / 0 0 6 7 1 0 (W O , A 1)
特表平 0 4 - 5 0 1 7 1 4 (J P , A)
米国特許第 0 5 0 5 7 5 4 0 (U S , A)
国際公開第 9 4 / 0 2 1 2 9 2 (W O , A 1)
国際公開第 9 4 / 0 1 9 0 1 3 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

A61K 39/39
A61K 39/00
A61K 39/02
A61K 39/12
A61P 31/04
A61P 31/12
A61P 35/00
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)