

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-538290

(P2004-538290A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 C O 7 6
A 6 1 K 39/002	A 6 1 K 39/002	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 K 39/10	A 6 1 K 39/10	
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-515260 (P2003-515260)	(71) 出願人	504031665
(86) (22) 出願日	平成14年7月26日 (2002.7.26)		オタゴ イノベーション リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月26日 (2004.1.26)		ニュージーランド国, ダニーディン, モレイ
(86) 国際出願番号	PCT/NZ2002/000132		プレイス 481, オタゴ ハウス
(87) 国際公開番号	W02003/009868		レベル 6, チャータード アカウタン
(87) 国際公開日	平成15年2月6日 (2003.2.6)		ツ, シー/ーティー ディー スコット
(31) 優先権主張番号	513169		アンド カンパニー
(32) 優先日	平成13年7月26日 (2001.7.26)	(71) 出願人	504031654
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)		アニマル ヘルス ボード, インコーポレ
			イテッド
			ニュージーランド国, ウェリントン, ジョ
			ンソン ストリート 12, アグリカルチ
			ュラル ハウス, レベル 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原性組成物

## (57) 【要約】

本発明は抗原性組成物およびこれを使用して動物を免疫化するための方法に関する。抗原性組成物は、最も普通には固形である脂質配合物と、少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる。好適な抗原性成分は生きた微生物である。好適な実施態様において、組成物は経口投与用に配合されている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

脂質配合物と、生きた微生物を含む少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物。

## 【請求項 2】

脂質配合物が固形である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

脂質配合物が 10 以上の温度で固形である、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

10 以上の温度で固形である脂質配合物と、少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物。 10

## 【請求項 5】

抗原性成分がタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド成分を有する因子あるいはこれらの混合物である、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

抗原性成分が生きた微生物を含む、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

生きた微生物が菌類、原生動物、細菌類およびウイルス類からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項または請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

ウイルスが HIV または SIV である、請求項 7 に記載の組成物。 20

## 【請求項 9】

細菌がブルセラ属 (*Brucella*)、炭疽菌 (*Anthrax*) およびマイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属より選択される、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

細菌がマイコバクテリウムである、請求項 9 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

マイコバクテリウムが、マイコバクテリウム・ツベロクロシス複合体 (マイコバクテリウム・ツベロクロシス (*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*)、マイコバクテリウム・アフリカナム (*M. africanum*) およびマイコバクテリウム・ミクロティ (*M. microtii*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・アビウム - イントラセルラール複合体 (マイコバクテリウム・イントラセルラール (*M. intracellulare*) およびマイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・パラツベロクロシス (*M. paratuberculosis*)、マイコバクテリウム・ワッカ (*M. vaccae*)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*M. smegmatis*)、マイコバクテリウム・チェロナ (*M. chelonae*)、マイコバクテリウム・フォーチュイタム (*M. fortuitum*)、マイコバクテリウム・カンサイ (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・レプラ (*M. leprae*)、マイコバクテリウム・マリナム (*M. marinum*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*M. ulcerans*)、マイコバクテリウム・シミア (*M. simiae*)、マイコバクテリウム・ハエモフィラム (*M. haemophilum*)、マイコバクテリウム・マルモエンス (*M. malmoense*)、マイコバクテリウム・シモイデイ (*M. shimoidei*)、マイコバクテリウム・ガストリ (*M. gastri*)、マイコバクテリウム・テラ (*M. terrae*) 複合体、およびマイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム (*M. nonchromogenicum*)、ならびにこれらの菌株の機能的に等価な変異株、天然または遺伝子工学による純株、突然変異株および組換え体、およびこれらの抗原性成分より選択される、請求項 10 に記載の組成物。 30 40

## 【請求項 12】

マイコバクテリウムがマイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*) である、請求項 11 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

マイコバクテリウム・ボービスがカルメット・گران杆菌 (*Bacille Calmette Guerin*) ( 50

B C G ) である、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

少なくとも 2 種の抗原性成分を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

一方の抗原性成分が生きた微生物であり、一方の抗原性成分がタンパク質またはペプチドである、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

生きた微生物がマイコバクテリウムである、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

マイコバクテリウムがマイコバクテリウム・ボービス (M. bovis) である、請求項 1 6 に記載の組成物。 10

【請求項 1 8】

マイコバクテリウム・ボービスが B C G である、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

タンパク質が免疫避妊性タンパク質である、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 0】

タンパク質またはペプチドが低い免疫原性である、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

脂質配合物が約 1 0 ~ 3 0 の温度で固形である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 2 2】

脂質配合物が約 2 0 ~ 3 0 の温度で固形である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

脂質配合物が約 3 0 ~ 3 7 の間で固体から液体への転移を受ける、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

脂質配合物が 4 0 ~ 1 0 0 %、好ましくは 6 0 ~ 1 0 0 %、好ましくは 8 0 % ~ 1 0 0 %、そして一層好ましくは 9 0 ~ 1 0 0 % の C<sub>16</sub> および / または C<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 2 5】

脂質配合物が 1 0 % ~ 4 0 %、好ましくは 2 0 % ~ 3 5 %、そしてより好ましくは 2 5 % ~ 3 2 % の C<sub>16</sub> 脂肪酸 ; および 4 0 % ~ 9 0 %、好ましくは 5 0 % ~ 8 0 %、そしてより好ましくは 6 0 % ~ 7 0 % の C<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6】

脂質配合物が 3 5 % 未満、好ましくは 2 5 % 未満、そしてより好ましくは 1 0 % 未満の C<sub>14</sub> 又はより短鎖の脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 7】

脂質配合物が 5 % 未満の C<sub>14</sub> 又はより短鎖の脂肪酸、2 5 % ~ 3 2 % の C<sub>16</sub> 脂肪酸、および 6 0 % ~ 7 0 % の C<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 2 8】

脂質配合物が :

2 0 % ~ 6 0 % の飽和脂肪酸 ;

2 5 % ~ 6 0 % の一不飽和脂肪酸 ; および

0 . 5 % ~ 1 5 % の多不飽和脂肪酸

を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9】

脂質配合物が：

30%～55%の飽和脂肪酸；  
30%～60%の一不飽和脂肪酸；および  
3%～11%の多不飽和脂肪酸  
を含む、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

脂質配合物が：

40%～50%の飽和脂肪酸；  
40%～55%の一不飽和脂肪酸；および  
5%～9%の多不飽和脂肪酸  
を含む、請求項29に記載の組成物。

10

【請求項31】

脂質配合物が次の配合：3%ミリスチン酸；26%パルミチン酸；15%ステアリン酸；  
40%オレイン酸；および6%リノール酸を有する、請求項1～23のいずれか一項に記載  
の組成物。

【請求項32】

水性成分を実質的に含まない、請求項1～31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

非経口投与用に配合されている、請求項1～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

皮下投与用に配合されている、請求項1～32のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項35】

経口投与用に配合されている、請求項1～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項36】

ワクチンである、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項37】

ワクチンアジュバントである、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項38】

動物を免疫化するための方法であって、前記動物に対して請求項1～37のいずれか一項  
に記載の組成物を投与することを含んでなる方法。

30

【請求項39】

動物の粘膜免疫反応を刺激するための方法であって、前記動物に対して請求項1～37の  
いずれか一項に記載の組成物を投与することを含んでなる方法。

【請求項40】

投与が経口投与である、請求項38または請求項39に記載の方法。

【請求項41】

投与が皮下投与である、請求項38または請求項39に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗原性組成物、特に生細菌ワクチン、を配合するための脂質の使用に関し、また  
該組成物を使用して動物を免疫化するための方法にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

結核(TB)を引き起こす病原など、大抵のヒトおよび動物の病原は粘膜表面を通じて感  
染を開始する。従って、このような病原に対する保護性免疫が強い粘膜免疫反応を誘導す  
ることを必要とする場合がある。しかしながら、粘膜免疫反応は非経口的な免疫化を受け  
て一般に弱い。粘膜部位を保護するためにワクチン、特にTBワクチンに対する明らかな  
必要性にもかかわらず、今日使用されているワクチンは皮内または皮下注射により行われ  
る。それ故に、より効果的な組成物および/または代替的ルートによるワクチン送達シス

50

テムの開発が望ましい。特にワクチンの経口投与は、投与の容易性および粘膜免疫反応のターゲットイングなど多数の利点を有する。これにもかかわらず、動物およびヒトの経口ワクチン接種により粘膜免疫および/または全身免疫を行うことは今日まで概ね効果をあげていない。このようなワクチンの効力は、ワクチンが消化管を通過する際にワクチンの分解により阻害されてきた。特に、大抵の抗原性成分は、消化管における胃酸およびタンパク質分解酵素により容易に分解するペプチド結合を有している。

【0003】

多数のワクチンが微生物の凍結乾燥調製物の使用に依存している。例えば、ヒトTBに対する現在のワクチンは、カルメット・ゲラン桿菌(Bacille Calmette Guerin) (BCG) と呼ばれる生(live)の弱毒化細菌の凍結乾燥調製物に基づく。しかしながら、凍結乾燥方法はBCG生存度の30~50%の損失を生じ、残存する生菌の回復を害する(7)。使用前の高い微生物生存度を保持する組成物は、このようなワクチンの有効性に大きく寄与するものとなる。

10

【0004】

免疫反応を改善するために、抗原は、免疫原性を刺激する多数のアジュバント(免疫助成剤)と混合されてきた。これらのアジュバントは主にミョウバンそして水中油エマルジョンである。後者の群はフロイントの鉱物油アジュバントに代表される。しかしながら、ヒトおよび家畜ワクチンにおいてフロイント完全アジュバント(FCA)を使用することは、報告されている毒性反応のために禁忌されている。これらの理由のために、フロイントのアジュバントも経口投与のために不适当となる場合がある。

20

【0005】

他の水中油エマルジョンでは、高い含油量のために界面活性剤を必要としている。界面活性剤の洗剤特性によって該エマルジョンは非経口投与および経口投与のために不适当となる。更に、承認されている界面活性剤についても毒性反応が報告されている。エマルジョンを使用する場合の更なる欠点は、不混和性の一つの液が他の液に分散される不均一系であるということである。これは不安定であって、経時的に水性相の分離を生じる。このことが安定な懸濁液中でワクチンを維持することを困難にしている。更に、油中水エマルジョンの水性相に捕らえられた抗原は、胃での分解から保護されることが困難である。

【0006】

リポソームおよび脂質ベシクルも、ワクチンと共に、特に容易に被包され得る小さな抗原性成分と共に使用するために検討されてきた。一般に、リポソームおよびベシクルは大きな抗原、例えば生きた微生物、の被包(encapsulation)にとって有用でない。更に、リポソームおよびベシクルはその生産に費用と時間がかかるので、その調製における抽出手順はワクチン調製物の化学構造または生存度に変化を生じさせ、従ってその免疫原性に変化を生じさせる場合がある。例えば、熱および溶媒は、タンパク質などの抗原性成分の生物学的完全性を変化させ得る。

30

【0007】

したがって、本発明の目的は、これらの要望に応えるか又は少なくとも有用な選択肢を公衆に供する、抗原性組成物および/または送達システムを提供することを目的とする。

【発明の開示】

40

【0008】

従って、一つの態様において本発明は、脂質配合物と、生きた微生物を含む少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

【0009】

好ましくは、脂質配合物は固形である。

【0010】

別の態様において本発明は、10以上の温度で固形である脂質配合物と、少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

【0011】

本発明に係る組成物に使用するために好適な脂質配合物は、長鎖脂肪酸を含む。

50

## 【0012】

脂肪酸組成の点から、好適な脂質配合物は40～100%、好ましくは60～100%、より好ましくは80%～100%、そして一層好ましくは90～100%のC<sub>16</sub> および/またはC<sub>18</sub> 脂肪酸を含む。

## 【0013】

更に好適な組成は、35%未満、好ましくは25%未満、そしてより好ましくは10%未満のC<sub>14</sub> 又はより短鎖の脂肪酸を含む。

## 【0014】

一つの実施態様において、脂質配合物は以下を含む：

20%～60%の飽和脂肪酸；

25%～60%の一不飽和脂肪酸；および

0.5～15%の多不飽和脂肪酸。

## 【0015】

特に好適な組成では、脂質配合物は以下を含む：

35%～50%の飽和脂肪酸；

40%～55%の一不飽和脂肪酸；および

5～9%の多不飽和脂肪酸。

## 【0016】

本発明に使用するために現在のところ好適な脂質配合物は、以下の配合を有する：3%ミリスチン酸、26%パルミチン酸、15%ステアリン酸、40%オレイン酸、および6%リノール酸。

## 【0017】

抗原性成分はタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド成分を有する因子であってよい。

## 【0018】

一つの実施態様において、抗原性成分は生きた微生物を含む。

## 【0019】

好ましくは、本発明に係る組成物における生きた微生物は細菌、特に非病原性微生物であり、より好ましくはマイコバクテリウム(Mycobacterium)属に属する細菌である。本発明に使用するために特に好適なマイコバクテリウムは、マイコバクテリウム・ボビス(Mycobacterium bovis) BCGである。

## 【0020】

一つの実施態様において、組成物は少なくとも2種の抗原性成分を含む。第1の抗原性成分は生きた微生物であることが好ましく、第2の抗原性成分は病原菌に由来するか又は弱免疫原性のタンパク質もしくはペプチドであることが好ましい。

## 【0021】

別の態様において本発明は、本発明に係る抗原性組成物を調製するための方法であって、該抗原性成分を脂質配合物と混合することを含んでなる方法を提供する。

## 【0022】

更に別の態様において本発明は、動物を免疫化するための方法であって、前記動物に対して本発明に係る抗原性組成物を投与することを含んでなる方法を提供する。

## 【0023】

別の態様において本発明は、動物の粘膜免疫反応を刺激する方法であって、前記動物に対して本発明に係る抗原性組成物を投与することを含んでなる方法を提供する。

## 【0024】

これらの方法における組成物の投与は、好ましくは経口ルートにより行われる。

## 【0025】

本発明は、本発明に係る抗原性組成物の調製における脂質配合物の使用にも関する。ここで本発明の態様を添付図面に関連して説明する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

## 【0026】

従って、第1の態様において本発明は、脂質配合物と、生きた微生物を含む少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

## 【0027】

脂質は固形であることが好ましい。脂質は10以上の温度で固形であることが好適である。

## 【0028】

別の態様において本発明は、10以上の温度で固形である脂質配合物と、少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

## 【0029】

上記配合物に用いられる脂質は、動物またはヒトの消費のために適していることが好ましく、広範囲の天然（植物または動物由来）または合成の脂質生成物、例えば油、脂肪およびワックスより選択してよい。

## 【0030】

最も普通には、該脂質材料は約30よりも高い温度で液状となる。すなわち、脂質は該脂質が最も普通には経口ルートにより投与される動物の生理学的温度における融点を達成するように選択されるべきである。脂質は大気圧で10~30において固形となり、好ましくは大気圧で20~30においても固形であることが望ましい。しかしながら、脂質の融点は限定的でなく、ある範囲の融点をもった油、脂肪およびワックスを含んでよい。

## 【0031】

ここで使用するために好適な脂質は、約30と約37の生理学的温度との間で固相から液相への転移を受ける。脂質相の挙動の概説が当該技術分野で利用可能であり、例えば(10)を参照。従って、当業者は当該技術分野における情報および簡単な実験に基づいて、所望の特性および融点を有する脂質を選択することができる。

## 【0032】

適した脂質配合物は、カルボン酸グリセリルエステル、脂肪族鎖と-COOH末端からなる化合物、飽和および不飽和脂肪酸、およびこれらの混合物を含む、トリグリセリド類である。

## 【0033】

現在のところ好適な脂質は、主にC<sub>8</sub>~C<sub>20</sub>アシル基、例えばミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、パリン酸(parinic acid)、ラウリン酸、リノレン酸、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸、またはこれらの混合物、を含むトリグリセリド類である。

## 【0034】

本発明に有用な脂質配合物として、長鎖脂肪酸、例えばC<sub>16</sub>~C<sub>18</sub>が好適であることも実証された。長鎖脂肪酸は、マウスおよびフクロネズミに投与されるワクチン中の微生物、例えばBCG、を保護するのに効果的であることが見出された。このような点からみて、本発明に使用するために好適な脂質配合物は、40~100%、好ましくは60~100%、好ましくは80%~100%、そして一層好ましくは90~100%のC<sub>16</sub>および/またはC<sub>18</sub>脂肪酸を含む。

## 【0035】

一般には、C<sub>16</sub>脂肪酸は、全脂肪酸含有量の10%~40%、より好ましくは20%~35%、そして一層好ましくは25%~32%であり、そしてC<sub>18</sub>脂肪酸は、全脂肪酸含有量の40%~90%、好ましくは50%~80%、そして一層好ましくは60%~70% C<sub>18</sub>である。

## 【0036】

また、好適な脂質配合物は、35%未満、好ましくは25%未満、そしてより好ましくは10%未満のC<sub>14</sub>又はより短鎖の脂肪酸を含む。

## 【0037】

10

20

30

40

50

鎖長の点で、好適な脂質配合物は、5%未満のC<sub>14</sub>又はより短鎖の脂肪酸、25%~32%のC<sub>16</sub>脂肪酸、および60%~70%のC<sub>18</sub>脂肪酸鎖を含む。

【0038】

脂肪酸含有量の点で、本発明に使用するための脂質配合物は、20%~60%、好ましくは30%~55%、そして一層好ましくは40%~50%の量の飽和脂肪酸；25%~60%、好ましくは30%~60%、そして一層好ましくは40%~55%の量の一不飽和脂肪酸；および0.5%~15%、好ましくは3%~11%、そして一層好ましくは5%~9%の量の多不飽和脂肪酸を含んでよい。

【0039】

本発明に使用するための特に好適な脂質配合物は、40%~50%の飽和脂肪酸、40%~50%の一不飽和脂肪酸、および5%~9%の多不飽和脂肪酸を含んでなる。

【0040】

本発明に使用するために現在のところ好適な脂質配合物は、HPLC分析によって決定される、次の配合：3%ミリスチン酸、26%パルミチン酸、15%ステアリン酸、40%オレイン酸、および6%リノール酸を有する。

【0041】

また、現在のところ好適な脂質配合物としては、動物由来の分別された脂質複合物、1種以上の水素添加植物油、特にオリーブ油またはココナッツ油、市販の座薬基剤、および他の脂質配合物、またはこれらの混合物が挙げられる。

【0042】

上記脂質配合物は、抗原性組成物の調製に、及び該組成物内の抗原を分解から保護するのに有用である。脂質配合物は、生きた微生物、特に細菌、の生存度を維持するのに特に有用である。脂質配合物は微生物を生きているが休眠状態に維持するように作用する。このことは経口投与用に配合される生きた微生物を含んでなるワクチンにとって特に重要である。また、脂質は抗原を均一な分散体中に維持する。すなわち本発明に係る組成物において、抗原性成分、および特に、生きた微生物は、固形またはペースト様の脂質マトリックスの全体に均一に分配されている。また、脂質は経口投与時に胃腸分泌物による破壊から抗原を保護する。他のルート、例えば皮下、による投与時にマクロファージの攻撃からの保護も起こり得る。このことは抗原および特に生きた微生物が胃腸粘膜を通じて取り込まれること、及び次に微生物が宿主内で複製されることを可能とする。生きた微生物の宿主内での複製は、病原性細菌で抗原投与(challenge)を受けた疾患の重症度の低減により決定される、保護性免疫反応を刺激する。

【0043】

広範囲の送達ルート用の配合物はまた、添加剤、例えば限定されることなく、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤、界面活性剤、沈殿防止剤、保存剤、着色剤、塩類、酸化防止剤、例えばグルタミン酸ナトリウム(MSG)、ビタミン類、例えばビタミンE、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、アルブミン・デキストロース・カタラーゼ(ADC)、保護コーティング、誘引剤および着臭剤、ならびに脂質中に含まれる微生物の生存補助剤等を含んでもよい。

【0044】

保護コーティングまたは腸溶性コーティングは、例えばゲル、パラフィン、およびゲラチンを含む可塑性から選択してよい。これらのコーティングは更に、経口投与ルートが選択される場合に胃酸および酵素に対して曝露されるのを防止することを助ける。

【0045】

上記配合物は、経口投与用に使用される場合に、例えば嗜好性を改善する添加剤、例えば香味料(アニス油、チョコレートおよびペパーミントを含む)および甘味料(グルコース、フルクトース、または他の何れかの糖もしくは人工甘味料)を含んでもよい。

【0046】

抗原性成分は、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド成分を有する因子、あるいはこれらの混合物であってよい。抗原性成分は、動物におけ



る免疫反応を生じさせるために使用され得る物質に由来してよい。

【0047】

最も普通には、抗原は、治療される動物種に病原性である微生物上に存在する少なくとも1種のエピトープを有し得る。当該技術分野で公知である等の他の抗原性構造物も使用し得る。例えば、多糖、糖脂質、および担体に結合されたハプテンが挙げられる。

【0048】

好ましくは、抗原性成分は生きた微生物である。

【0049】

本発明の組成物における生きた微生物は、菌類、原生動物、細菌類およびウイルス類からなる群より選択し得る。例えば、HIV、SIV、ブルセラ属 (*Brucella*) および炭疽菌 (*Anthrax*) が挙げられる。好ましくは、微生物は細菌である。経口または皮下の送達用に配合される組成物に使用するのが好適なのは、非病原性細菌から現在選択される微生物である。好適な細菌は、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、例えばマイコバクテリウム・ツベロクロシス複合体 (マイコバクテリウム・ツベロクロシス (*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*)、マイコバクテリウム・アフリカナム (*M. africanum*) およびマイコバクテリウム・ミクロティ (*M. microtii*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・アビウム - イントラセルラール複合体 (マイコバクテリウム・イントラセルラール (*M. intracellulare*) およびマイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・パラツベロクロシス (*M. paratuberculosis*)、マイコバクテリウム・ワッカ (*M. vaccae*)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*M. smegmatis*)、マイコバクテリウム・チェロナ (*M. chelonae*)、マイコバクテリウム・フォーチュイタム (*M. fortuitum*)、マイコバクテリウム・カンサイ (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・レプラ (*M. leprae*)、マイコバクテリウム・マリナム (*M. marinum*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*M. ulcerans*)、マイコバクテリウム・シミア (*M. simiae*)、マイコバクテリウム・ハエモフィラム (*M. haemophilum*)、マイコバクテリウム・マルモエンス (*M. malmoense*)、マイコバクテリウム・シモイデイ (*M. shimoidei*)、マイコバクテリウム・ガストリ (*M. gastri*)、マイコバクテリウム・テラ (*M. terrae*) 複合体、およびマイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム (*M. nonchromogenicum*) より選択される非病原性菌株である。特に好適な実施態様において、該物質はカルメット・ゲラン杆菌 (*Bacille Calmette Guerin: BCG*)、マイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*) の弱毒化菌株、例えば以下の菌株：83/6235、パスツール (*Pasteur*) 1173P2、グラクソ (*Glaxo*) 1077、ジャパニーズ (*Japanese*) 172、プラハ (*Prague*)、ロシアン (*Russian*)、ブラジリアン (*Brazilian*)、デーニッシュ (*Danish*) 1331、コペンハーゲン (*Copenhagen*)、コンノート (*Connaught*)、ならびにマイコバクテリウム・ボービスの機能的に等価な変異株および他の弱毒化菌株、これらの菌株の純株 (*clones*)、突然変異株 (*mutants*) および天然の組換え体または広範囲の遺伝子工学技術のいずれかにより生産された組換え体を含め組換え体 (*recombinants*)、およびこれらの抗原性成分である。

【0050】

以下の説明から、抗原性成分がタンパク質もしくはペプチドの複合体等であってよいことが理解されるであろう。

【0051】

一つの実施態様において、本発明の組成物は、上記で特定される抗原性成分のいずれかより選択される少なくとも2種の抗原性成分を含み、サブユニット抗原の複数からなる組合せを含んでよい。3種以上の抗原性成分が適している。

【0052】

本発明の組成物における抗原性成分の濃度は、動物に対する投与による免疫反応、特に小腸の消化管関連リンパ組織における免疫反応、を刺激するのに有効な量で存在する限り、当業界で公知のプロトコルに従って変更してよい。マイコバクテリアの場合には、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$  コロニー形成単位 (CFU) / ml の範囲が適当である。その濃度は  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  CFU / ml であることが好ましい。タンパク質およびペプチド

10

20

30

40

50

型抗原の場合には、 $10 \sim 1000 \mu\text{g} / \text{配合物 g}$ の範囲が適当である。ウイルス型抗原の場合には、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  プラーク形成単位 (PFU) / ml が適当である。免疫反応は、体液性であっても、又は粘膜免疫反応など細胞媒介性であってもよい。

【0053】

従って、別の態様において本発明は、動物に対して本発明に係る抗原性組成物を投与することによる、動物の粘膜免疫反応を刺激する方法に関する。

【0054】

本発明の組成物は、当業界で公知の方法を用いて調製し得る。好適には、該脂質配合物が必要に応じ加熱されて液化し、そして上述のような抗原性成分および他の成分（使用される場合）が添加される。抗原性組成物の分散は、混合、振盪または抗原性成分の生存度に悪影響を与えない他の方法により達成し得る。

10

【0055】

本発明に使用するために更に好適な組成物は、水などの水性成分を実質的に含まないものでもある。ここで用いられる「実質的に含まない」という用語は、組成物に含まれる水性成分が10%未満、そして好ましくは水性成分が5%未満であることを意味する。上で示したように、成分、特に水性溶媒が存在することは、特に消化管における脂質配合物の保護効果を低減する。

【0056】

1つの実施態様において、抗原性組成物はワクチンである。

20

【0057】

代替的な実施態様において、抗原性組成物は、ワクチンの効力を増大させるために、ワクチンを用いた投与に有用なアジュバントである。マイコバクテリウム含有抗原性組成物およびBCG含有抗原性組成物が、アジュバントして使用するために特に好適である。

【0058】

本発明に係る抗原性組成物はまた、抗原性成分について上記で示したタイプ、特に弱免疫原性の第2の又は更なる抗原性分子に対する反応を生じさせるために有用となり得る。このことは、本発明の抗原性組成物の抗原性成分に抗原性分子を結合させることにより、該組成物中の第2の又は更なる抗原性分子を同時送達することによって達成し得る。結合は当業界で標準的な方法(9)を使用して行い得る。特に、関心ある抗原を生体内(in vivo)での抗体産生を妨げないリンカー基により抗原性担体またはアジュバントに結合させ得る。抗原性担体またはアジュバントは、上記で特定される微生物を含む抗原性成分のいずれであってもよいが、好ましくはマイコバクテリウム属であり、より好ましくはBCGである。適したリンカー基としては、マンノースレセプター結合性タンパク質、例えばオブアルブミン、およびFcレセプターに結合するものが挙げられる。第2の又は更なる抗原性分子は、好ましくはタンパク質またはペプチドである。特に好適なタンパク質は免疫避妊性(immunocontraceptive)タンパク質である。脂質はまた送達マトリックスとして作用する。このワクチン送達システムの例を図12に示す。上記組成物が投与されると、結合された分子または同時送達された分子に対する増大した免疫反応が生じる。

30

【0059】

別の態様において本発明は、動物を免疫化するための方法であって、前記動物に対して本発明に係る抗原性組成物を投与することを含んでなる方法も提供する。

40

【0060】

ここで用いられる「動物」という用語は、温血動物、特に哺乳動物をいう。ヒト、イヌ、ネコ、鳥類、ウシ、ヒツジ、シカ、ヤギ、ラット、マウス、ウサギ、フクロネズミ、アナグマ、モルモット、フェレット、ブタおよびバウファローが、この用語の意味の範囲内の動物の例である。単胃動物および反芻動物が特に、この用語の範囲内と考えられる。

【0061】

本発明に係る組成物は、非経口(皮下、皮内、筋肉内)、粘膜、エアゾールおよび経口投与を含むがこれらに限定されない多様なルートにより投与し得る。1つの実施態様におい

50

て、経口投与が好適である。本発明の組成物は、ペレット剤、錠剤、カプセル剤、舐剤、または他の適した配合物の形態で経口投与し得る。経口投与は、針と注射器の使用を避けることができる点で広く消費者に受け入れられるとともに、野生生物をワクチン接種するための経済的で実用的な方法である。そのため、1つの実施態様において、本出願人は経口投与用に配合された新規な生ワクチンを提供している。

#### 【0062】

代替的な実施態様において、本発明の組成物は、注射による非経口投与用に配合し得る。この投与形態には、体組織との適合性がある注射用皮下デポー配合物も含まれ得る。該デポー剤からの経時放出吸収(time release absorption)は、脂質配合物を単独で又は追加的な生分解性ポリマーと共に使用して達成し得る。該デポー剤は、感染プロセスと非常に近似するプロセスで抗原性成分の遅延放出を可能とし、当該組成物が投与される動物における免疫反応の増大を促進する。これらの投与形態では脂質保護効果も生じる。

10

#### 【0063】

本発明の組成物は、特に非経口投与のための、単一用量として投与することができ、又は経時的に反復用量で投与することができる。例えば、時間間隔において初回量およびブースター量で投与できる。投与量は、免疫性成分の放出速度とともにその抗原性により決定される。動物の体重、年齢、性別、併用処理(該当する場合)、および処理される抗原の性質など通常の事項を考慮に入れてよい。一般に、経口によるワクチン接種の場合の用量範囲は上述したように、用量当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  CFU/kgである。タンパク質およびペプチド型抗原の場合には、用量範囲は $1 \sim 10,000 \mu\text{g}$ 、好ましくは $10 \sim 1000 \mu\text{g}$ である。ウイルス型抗原の場合には、用量範囲は $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  PFU/mlである。どの送達方法を使用しても、生きた微生物をワクチン配合物で使用する場合には、それらの微生物が宿主内で増殖して免疫反応を促進することが期待される。

20

#### 【0064】

本発明の組成物は、集団ワクチン接種計画のための複数用量製剤として又は単一用量製剤として調製することもできる。

#### 【0065】

使用のために必要とされるまで、本発明の組成物は、室温において一定期間保存してよく、又は好ましくは約4°Cにおいて通常の冷蔵条件の下で保存してよい。4°Cにおいて、脂質配合物は休眠しているが生存可能な状態にある微生物を劣化することなく保存および維持することを容易にする。非経口送達の場合に、組成物は次に30~40°Cに温められて投与前に液化する。経口投与の場合に、組成物は固形またはペーストである。

30

#### 【0066】

上述した説明は例示のためだけに示されるものであって、当業者に公知である材料および方法の両方における変形が考えられる。

#### 【0067】

本発明を例示する非限定的な例を以下に示す。

#### 【実施例】

#### 【0068】

#### 材料および方法

細菌。

マイコバクテリウム・ボービス(M. bovis) BCG パスツール(Pasteur) 1173P2 (Pasteur institute, Paris)をワクチン菌株として用いた。マクロファージ感染研究とフクロネズミ抗原投与(challenge)のための用いたM. bovis菌株は、M. bovis 83/6235 (AgResearch, Wallaceville, New Zealand)であり、これは元々ブラッシュテイルフクロネズミの結核病巣から単離され、そして従前のマクロファージおよびフクロネズミ接種研究で使用されたものである(1, 4)。BCG配合およびマクロファージ感染のために、アルブミン・デキストロース・カタラーゼ(ADC; BBL, Becton Dickinson, Maryland, USA)で補充したMiddlebrook 7H9 培地(Difco, Detroit, Mich.)を含む175mlフラスコ(

40

50

Falcon) 内で菌を中間対数増殖期まで増殖させた。桿菌を遠心分離により集菌し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で2回洗浄した後に  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存した。フクロネズミ抗原投与のために、 $0.006\% \text{ v/v}$  アルカリ化オレイン酸、 $0.5\% \text{ w/v}$  アルブミン・フラクション V および  $0.25\% \text{ w/v}$  グルコースで補充したデュボス液体培地 (Difco Laboratories, Detroit, USA) を含むツウィーン・アルブミン液体培地 (TAB) 中で *M. bovis* を中間対数増殖期まで増殖させ、細菌数を懸濁度により評価した。フクロネズミに接種するための希釈を TAB 中に行った。BCG または *M. bovis* のコロニー形成単位 (CFU) の数を従前に記載されているようにして決定した (5)。

#### 【0069】

配合物組成。

BCG と共に配合するための均一懸濁液中に BCG を維持する能力および融点に基づいて、3種の脂質製品を選んだ。 $37^{\circ}\text{C}$  で液状であるが  $30^{\circ}\text{C}$  よりも低い温度で固形となる脂質を BCG 生存度研究において試験するために選んだ。生存度試験の後に、マウスおよびフクロネズミにおいて経口ワクチン試験を行うために、以下の3種の配合物を選んだ：  
配合物 C - 動物由来の分別された脂質複合物； 配合物 K - 精製された水素添加ココナッツ油のトリグリセリドからなる； 配合物 N - ノバルタ (Novarta) B、市販の座薬基剤。これら3種の配合物をガスクロマトグラフィにより分析して、脂肪酸群の比率を決定した。

#### 【0070】

BCG の配合。

ペレット化した BCG を、 $37^{\circ}\text{C}$  まで温められた配合媒体中に再懸濁した。フクロネズミのワクチン接種のために、BCG を  $1 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$  の濃度に再懸濁した。フクロネズミに対する誘引性および嗜好性を増大させるために、配合物  $\text{ml}$  当たり  $10 \text{ mg}$  のグルコースおよび  $10 \mu\text{l}$  のアニス油 (Pharmacare, Auckland NZ) を添加した。マウスの経口ワクチン接種のために、配合物  $\text{ml}$  当たり  $10 \text{ mg}$  のグルコース、 $1 \text{ mg}$  のグルタミン酸ナトリウム塩 (Sigma) および  $10\% \text{ v/v}$  ADC を添加した。これらの添加剤が配合脂質に分散され、BCG の生存度に影響を与えないことが前もって示された。BCG 配合物を  $15 \text{ ml}$  チューブ (Falcon) に移し、 $4^{\circ}\text{C}$  で穏やかに混合しながら固化させた。チューブから配合物を取り出して、生存度試験およびワクチン接種研究のために必要とされる  $1 \text{ g}$  ペレットに無菌状態で切断した。ペレットを、7H11寒天プレートで培養して以下に述べるように CFU をカウントすることにより、BCG の分散について試験した。

#### 【0071】

BCG 生存度。

$4^{\circ}\text{C}$  または室温 ( $10 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ) において保存した後の配合物中の CFU 数を、従前に記載されているように (4) 決定した。3種の BCG 配合物の  $100 \text{ mg}$  アリコートをもとに  $15$  分間温め、7H9液体培地中で直列的に  $10$  倍希釈を行うことによって、培養用のサンプルを集めた。オレイン酸・ADC (OADC; Becton Dickinson, Maryland) および  $0.5\%$  グリセロールで補充した Middlebrook 7H11寒天プレート (Difco) 上で  $100 \mu\text{l}$  の各エマルジョンを接種して、生存可能な微生物の数を決定した。エマルジョンはガラス・スプレッドを使用して分散させた。プレートをパラフィンで密封し、 $37^{\circ}\text{C}$  で  $5\% \text{ CO}_2$  中でインキュベートした。培養の  $2 \sim 3$  週後にコロニー数をカウントした。結果は  $\text{CFU/BCG 配合物 } \mu\text{g}$  として表わす。

#### 【0072】

マウスのワクチン接種。

特定の病原の無い雌 BALB/c マウス ( $6 \sim 8$  週齢) をオタゴ大学動物実験科学部門、ダニディン (University of Otago Department of Animal Laboratory Sciences, Dunedin) より入手した。オタゴ大学動物倫理委員会からの倫理承認 (承認番号: 51/2000) の下でマウス実験を行った。マウスを個々のかごに分けて入れ、経口ワクチン接種前  $12$  時間食餌を絶った。非配合の対照群は、クレイグ (Craig) の無保存料ストロベリー・ジャム (Heinz-Watties Ltd., Hastings, New Zealand) 中の *M. bovis* BCG からなる。従前の

10

20

30

40

50

研究により、24時間間隔におけるM. bovis BCGの生存度が、M. bovis BCGを該ジャム中で混合することによっても影響を受けないことが示されている(データは示さない)。非接種の対照群は脂質配合物のみからなる。用量反応および経時実験のために、マウスに24時間の間隔で2種の別個の用量でワクチンを与えた。エアゾール抗原投与実験のために、マウスに単一経口用量( $5 \times 10^7$  CFU)を与えるか、又は $1 \times 10^6$  CFUで皮下的にワクチン接種した。ペレットおよびジャムの消費時に種々の間隔でマウスを観察して、全用量が食べられていることを確認した。ワクチン接種後の種々の間隔で、5%CO<sub>2</sub>吸入によりマウスを殺し、その脾臓を無菌状態で取り出した。

#### 【0073】

脾臓細胞の増殖アッセイ。

セルストレナー(70µmメッシュ; Beckton Dickinson)を通じて細胞を濾過することにより、脾臓細胞懸濁液を調製した。赤血球を0.83%NH<sub>4</sub>Cl(pH7.2)中で溶解させた。細胞をPBS中で2回洗浄し、10%致死性仔ウシ血清(FCS)、100U/mlの20mM HEPES、ペニシリン、100µg/mlのストレプトマイシン、 $5.5 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノールを含有するダルベッコ-修飾イーグル培地(DMEM)(DMEM-10%FCS; 全てGibco-BRL, USAから)中で $1 \times 10^6$ /mlに再懸濁した。細胞をRPMI+10%致死性仔ウシ血清(Gibco)中で $10^7$ /mlの濃度に再懸濁した。脾臓細胞( $5 \times 10^5$ /ウェル)をプレートから出して96ウェルプレート(Nunc.)の3つのウェルに入れた。細胞を、M. bovis培養物から由来する精製タンパク質(ウシPPD; CSL, Melbourne, Australia)、60µg/ml最終濃度、または培地のみで培養した。細胞を4日後に収穫し、1µCiの[<sup>3</sup>H]チミジン(Amersham, Buckinghamshire, England)による18時間パルス後、取り込まれたチミジンを従前に記載されているように(5)測定した。ウシPPDでインキュベートした3つの培養物についての平均カウント数/分(cpm)を、培地のみで培養した脾臓細胞についての平均cpmで割り算することによって、刺激指数(SI)を得た。

#### 【0074】

脾臓細胞によるサイトカイン産生についての生体外(in vitro)アッセイ。

脾臓細胞増殖アッセイのために、脾臓細胞懸濁液を上述したように調製した。1mlの細胞懸濁液を24ウェルプレート(Costar)に分散させ、そのウェルに100µlのPBSまたはPPD(60µg/ml最終濃度)を添加した。培養物を37°Cにおいて5%CO<sub>2</sub>中で72時間インキュベートし、その後200µlの培養上清を集め、-70°Cで凍結して、サイトカイン分析に用いた。市販キット(R&D Systems, Duoset, City, Country)を使用し、製造業者の指示に従って、インターロイキン-2(IL-2)捕捉ELISAおよびインターフェロン-ガンマ(IFN-γ)捕捉ELISAを行った。培養上清中のサイトカインレベルを標準曲線からの外挿によって定量した。2種のELISAの最小感度(minimum sensitivities)は、IFN-γについて50pg/mlおよびIL-2について35pg/mlと定量された。

#### 【0075】

M. bovis阻害アッセイ。

腹膜由来マクロファージを、自己リンパ球を用いないで又は自己リンパ球を用いて共培養の後に、M. bovisの細胞内増殖の阻害について試験した。従前に記載されているプロトコルの修正方法に従って実験を行った。腹膜滲出細胞(PEC)を雌BALB/cマウスからの洗浄によって得た。細胞を1%BSAおよび20U/mlヘパリンで補充されたPBS中で集め、1回洗浄し、10%致死性仔ウシ血清および100U/mlペニシリンを含有するDMEM(補充DMEM)中で $2 \times 10^6$ /mlに再懸濁した。100µlの細胞懸濁液を96ウェル平坦プレート(Nunc)中に分散させた。37°Cにおいて5%CO<sub>2</sub>中で2時間インキュベートした後に、非付着性細胞を取り出し、洗浄して、補充DMEM中に $5 \times 10^6$ /mlの濃度で再懸濁した。非不着性細胞は、25mlフラスコ(facon)中でのインキュベーションにより残留する付着性集団が選択的に除去されたものである。非付着性PEC(NPEC)はメイグリユンワルド/ギムザ(May-Grunwald/Giemsa)染色に

10

20

30

40

50

より90%より多くのリンパ球を含むことが決定された。温かい補充DMEMを、 $5 \times 10^4$  細胞/ウェルを含むと推定される付着性単層に添加した。この集団は非特異的エステラーゼ染色キット(カタログ番号181-B; Sigma, St. Louis, MO, USA)により98%陽性であることが分かり、以下マクロファージと称する。従前に記載されているように(2)マクロファージ当たり2桿菌(Bacilli)のMOIでマクロファージにM. bovisを感染させた。穏やかな洗浄により、貪食されなかった(non-phagocytosed)細菌を除去した。(  $5 \times 10^6$  細胞を含有する)  $100 \mu\text{l}$  の自己NEPCを、感染マクロファージを含有する各ウェルに加え、培養物を更に37において5%CO<sub>2</sub> 中でインキュベートした。得られた10:1のNEPC/マクロファージ比は、末梢血液単核細胞において見られる比のものと近似するように選択された。対照ウェルはM. bovis感染マクロファージのみからなるか、又は未感染NEPCおよびマクロファージからなる。72時間後、細胞を1.0  $\mu\text{Ci}$  の [<sup>3</sup>H]ウラシルにより18時間パルスした。細胞を0.1%サポニンにより溶解させ、80~90で20分間加熱殺菌した後に、自動セルハーベスター(Cambridge Technology, USA)を用いて、ガラス繊維フィルター上で収穫した(Whatman Inc, Finland)。液体シンチレーションカウンター(Wallac, Country)を用いて [<sup>3</sup>H]ウラシルの取込み量を測定した。

10

## 【0076】

M. bovisによるマウスのエアゾール抗原投与。

ワクチン群当たり6匹のマウスをワクチン接種後8週で病原性M. bovisを含むエアゾールで抗原投与(challenge)した。Grover et al., 1967により記載されている方法の修正方法を使用してM. bovisの単細胞懸濁液を調製し、-70で保存した。これらの懸濁液を調製するために、該細菌細胞をソニケータにより30秒間分散させ、8  $\mu\text{m}$ 膜フィルターを通じて濾過した。歯槽空間に入るために適当なサイズの飛沫核を生じさせるエアゾールチャンバーを使用して、マウスに呼吸経路を介して感染させた。生存可能なM. bovisの濃度をネブライザ(nebuliser)内で経験的に調整して、マウス肺当たり5~20の生存可能な微生物の吸入と保持を行った(B. Buddle and G. de Lisle, 未公表データ)。類似の手順によりモルモットの肺の再現性のある均一な感染を生じることが示された。バイオハザード設備内での厳格な単離条件の下でエアゾール感染および次の感染マウスの維持と操作を行った。

20

## 【0077】

M. bovisの単離。

エアゾール抗原投与後37~40日でマウスを安楽死させた。各マウスからの肺と脾臓をマイコバクテリウム単離のために個別に処理した。該微生物をTen-Broeckグラインダー中でホモジェナイズし、サンプルを3500gで20分間遠心分離した。沈降物を1mlの蒸留水中で再懸濁した。TAB中で適当な希釈を行い、0.1ml量の希釈された又は希釈されないサンプルを修正マイコバクテリア7H11寒天プレートに接種した(1)。各希釈物について2つの複製物を調製した。従前に記載されているように(1)培養条件および単離物同定方法を実行した。

30

## 【0078】

データ解析

ワクチン群について平均サイトカインレベル差および $\log_{10}$ 変換された脾臓細胞増殖反応の統計的解析を学生t検定により求めた。肺および脾臓からの細菌数を $\log_{10}$ 変換し、分散解析により解析した。統計的目的のために、組織から培養される細菌が存在しない場合には、最低検出可能数の半分(%CFU/臓器)を使用した。

40

## 【0079】

フクロネズミのワクチン接種および抗原投与。

従前に記載されているように(4)フクロネズミを捕獲し収容した。フクロネズミの2つの群(5匹/群)にBCGを供給した。配合されたBCGの1gペレット( $1 \times 10^8$  CFU)を1つの群の各フクロネズミに与えた。第2の群には配合手順の対照のためにジャム中のBCG( $1 \times 10^8$  CFU)を与えた。該ジャムはBCG生存度を阻害することが

50

従前から示されている（データは示さない）。第3の群（6匹/群）には配合媒体のみを含有するペレットを与え、非ワクチン接種対照とした。ペレットの消費時にフクロネズミを観察して、全ペレットが食べられていることを確認した。次の日にワクチン接種を繰り返した（全BCG用量 $2 \times 10^8$  CFU/フクロネズミ）。ワクチン接種後41日で、フクロネズミの全てをエアゾール経路により抗原投与した。

#### 【0080】

第2の実験において、4種の経口用脂質BCG配合物を皮下ワクチン接種と比較した。ワクチン接種後8週で、ワクチン群当たり6匹のフクロネズミを、病原性M. bovisを含むエアゾールで抗原投与した。脂質C、K、NおよびF（Kの修正点は10%致死性仔ウシ血清を含有する）。

10

#### 【0081】

M. bovisによるフクロネズミのエアゾール抗原投与。

フクロネズミに、元々はTaumaranui, New Zealandからのフクロネズミのリンパ節より単離された(5) M. bovis 83/6235を用いて抗原投与した。Grover et al., 1967により記載されている方法の修正方法を使用して該単離物の単一細胞懸濁液を調製し、-70で保存した。これらの懸濁液を調製するために、該細菌細胞を超音波処理により30秒間分散させ、8 $\mu$ 膜フィルターを通じて濾過した。歯槽空間に入るために適当なサイズの飛沫核を生じさせるエアゾールチャンバーを使用して、ケタミンHCl（30ml/kg; Parnell Laboratories, Auckland, New Zealand）の筋肉内注射により麻酔されたフクロネズミに、呼吸経路により感染させた。生存可能なM. bovisの濃度をネブライザ（nebuliser）内で経験的に調整して、フクロネズミ当たり10~20の生存可能な微生物の吸入と保持を行った（B. Buddle and G. de Lisle, 未公表データ）。この抗原投与用量（challenge dose）は、感染後4週で非ワクチン接種フクロネズミの肺に肉眼で観察される主いぼの数から従前に推定されたものである。類似の手順によりモルモットの肺の再現性のある均一な感染を生じることが示されている（Wiegshauss et al., 1970; Smith et al., 1970）。バイオハザード設備内での厳格な単離条件の下でエアゾール感染および次の感染フクロネズミの維持と操作を行った。

20

#### 【0082】

フクロネズミの検死。

抗原投与後56~57日で全てのフクロネズミを殺し、広範な全体的な死後検査の対象とした。肺を周囲組織から単離し、秤量した。

30

#### 【0083】

フクロネズミ組織からのM. bovisの単離。

各動物より、肉眼による病巣から重さ約1gの肺および脾臓のサンプルを取り出し、又は病巣が無い場合には、該臓器の予め定めた部分からサンプルを取り出して、マイコバクテリア単離のために個別に処理した。サンプルを秤量し、Ten-Broeckグラインダー中でホモジェナイズし、0.75%塩化セチルピリジウム中で1時間除染した。サンプルを3500gで20分間遠心分離し、沈降物を1mlの蒸留水中で再懸濁した。TAB中で適当な希釈を行い、0.1ml量の希釈された又は希釈されないサンプルを修正マイコバクテリア7H11寒天プレートに接種した。各希釈物について2つの複製物を調製した。従前に記載されているように（1）培養条件および単離物同定方法を実行した。

40

#### 【0084】

フクロネズミ末梢血液リンパ球増殖アッセイ。

PPD-BおよびPPD-A（CSL Limited, Parkville, Australia）に対する増殖反応（proliferative responses）を、赤血球除去した全血を用いて測定した。コンカナバリンA（Con A）に対する反応も試験した。簡潔に述べると、1mlのヘパリン添加血液を50ml 0.17M Tris-0.16M NH<sub>4</sub>Cl、pH 7.2と37で10分間混合し、20のPBS中で2回洗浄し、2mMグルタミンおよび2%正常フクロネズミ血清で補充したDMEM組織培養培地中で合計3mlとした。その細胞（200 $\mu$ l）を、50 $\mu$ lのPBS中PPD-B、PPD-AもしくはコンカナバリンAを含有するか又はP

50

B Sのみを含有する平底96ウェルプレートに入れた。プレートをエアインキュベータ内の5%CO<sub>2</sub>中に72時間置き、1μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-トリチウム標識チミジン(Amersham, UK)でパルスし、更に18時間後に収穫し、Micro Beta Trilux(Wallac, Finland)中で<sup>3</sup>Hカウントした。PPDで刺激された3つの培養物からのカウント数/分(cpm)を、培地およびPBSでの3つの培養物からのcpmで割り算することによって、刺激指数(SI)を得た。

【0085】

データの解析

マウスサイトカイン分泌の統計学的有意差を、スチューデントt検定を用いて決定した(GraphPad, San Diego, Calif.)。これらの研究は類似の結果をもって2回行われた。フクロネズミのリンパ球増殖反応のために、3.5よりも大きな刺激指数はバックグラウンドの平均(ワクチン接種前のPPD-Bについての平均SI)よりも大きな少なくとも3の標準偏差を表わすので、これを陽性反応として評価した。種々異なる処理群についてのフクロネズミの体重変化、肺重量、リンパ球芽球発生反応および細菌数を分散の一方方向解析により最初に比較した。次に、ダンカンの多重検定(Duncan's multiple range test)を用いて個々の群の平均を比較した。肺および脾臓からのリンパ球増殖反応および細菌数をlog<sub>10</sub>変換して解析を行った。統計的目的のために、組織から培養される細菌が存在しない場合には、最低検出可能数の半分(5CFU/臓器)を使用した。

10

【0086】

結果

20

A. 配合物脂質の脂肪酸組成。

経口用BCGを配合するのに使用するために選択された脂質を、ガスクロマトグラフィにより分析した。図1は、マウスおよびフクロネズミのワクチン接種試験に使用される3種の脂質の脂肪酸組成を示す。

【0087】

3種の脂質配合物中の脂肪酸の相対比率を図1に示す。HPLCによる脂質の化学分析により、3種の配合物が以下の脂肪酸の混合物からなることが示された。

【0088】

配合物C

89%全脂質(48.5%中性、40.5%極性 - 3%ミリスチン酸、26%パルミチン酸、15%ステアリン酸、40%オレイン酸および6%リノール酸を含んでなる)。

30

【0089】

配合物K

47%ラウリン酸、20%ミリスチン酸、12%パルミチン酸、12%ステアリン酸および3%オレイン酸。

【0090】

配合物N

ノバルタ(Novarta)Bは、分別された植物油の水素添加エステル化混合物ならびに合成トリグリセリド混合物からなる市販の座薬基剤であり、44%ラウリン酸、20%ミリスチン酸、16%パルミチン酸、19%ステアリン酸を含んでなる。

40

【0091】

B. 配合後のBCG生存度

4での保存後の配合BCGの生存度を図2aに示す。16週の期間にわたって、配合物Cおよび配合物Kは高レベルのBCG生存度を維持し、配合物K(52%)に比べ、配合物Cは生存度(98%)を高く保持することを示した。対照的に、配合物NはBCG生存度の累進的損失を示し、16週で97%より多くの生存可能な微生物の損失を生じた。これらの結果は、配合物Nに比べ、配合物Cおよび配合物Kが4でのBCG生存度の維持に適していることを示唆する。

【0092】

室温(10~25)での保存後の配合BCGの生存度を図2bに示す。配合物Cおよび

50



配合物 K は高レベルの B C G 生存度を維持し、生存度 (平均  $\log_{10} \text{CFU} / \mu\text{g} = 10$ ) が 22 日である配合物 K に比べ、配合物 C は 40 日の長期にわたる生存度 (平均  $\log_{10} \text{CFU} / \mu\text{g} = 10$ ) の保持を示した。対照的に、配合物 N は 12 日で B C G 生存度 (平均  $\log_{10} \text{CFU} / \mu\text{g} = 10$ ) の急速な損失を示した。これらの結果は、配合物 N に比べ配合物 C および配合物 K が室温での B C G 生存度の維持に適していることを示唆する。

#### 【0093】

C. 配合 B C G のマウスにおける免疫原性。

配合 M. bovis BCG の経口送達はマウスにおける免疫反応を誘導する。M. bovis BCG の経口送達を受けた全身免疫反応を測定する適当な方法を決定するために、 $10^7$  CFU の液状配合 BCG またはジャム中の M. bovis BCG (非配合 M. bovis BCG) の経口送達後 8 週でのウシ P P D 誘導脾細胞増殖 (L T A) 反応、脾臓 I L - 2 反応および I F N - 反応を比較した。表 1 は、L T A アッセイおよび I F N - アッセイが配合および非配合の経口 M. bovis BCG グループ間で有意な差を示したのに対し、I L - 2 アッセイについては差が有意でないことを示した。結核に対する保護における I F N - の重要性のため、全身免疫反応をモニターするための更なる実験に I F N - アッセイを用いた。

#### 【0094】

経口送達後の M. bovis BCG の用量の効果を決定するために、ワクチン接種後 8 週での配合または非配合 M. bovis BCG の用量を種々変化させてワクチン接種したマウス中のウシ P P D に対する脾臓 I F N - 反応を比較した。図 2 は、 $10^6$  CFU の M. bovis BCG による経口免疫化を受けた配合群において低レベルの I F N - ( $< 200 \text{pg/ml}$ ) が検出されたが、ワクチン群間では有意な差が無かったことを示した。用量を  $10^7$  CFU に増大させたときに、非配合群における I F N - 反応は低いままであったのに対し、配合 M. bovis BCG に対する反応は有意に増大した。同様の差が  $10^8$  CFU の M. bovis BCG の場合にも見られた。ワクチン用量を  $10^9$  CFU の B C G に増大させたときに、非配合群において I F N - レベルの増大が見られたのに対し、配合群は高いままであった。 $10^7 \sim 10^9$  CFU の範囲の M. bovis BCG の用量では、配合 M. bovis BCG 群における I F N - 反応は非配合 M. bovis BCG のものよりも有意に高かった。非配合 M. bovis BCG 群において高い用量で見られる I F N - 反応の増大は、配合 M. bovis BCG に比べ、かなり高い用量の M. bovis BCG が免疫反応の誘導に必要とされることを示す。経口 M. bovis BCG に対する免疫反応の経時変化を決定するために、M. bovis BCG による経口または皮下のワクチン接種後 2 週間の間隔で、脾臓 I F N - 反応を比較した。図 3 は、皮下ワクチン接種後の I F N - 反応が 4 週をピークとして 6 週および 8 週で徐々に減少することを示す。これに比べて、配合 M. bovis BCG による経口ワクチン接種後の I F N - 反応は 6 週で最初に増大し、ワクチン接種後 8 週で高いままであった。非配合 M. bovis BCG または配合剤のみに対する I F N - 反応は 2 ~ 8 週で低いままであった。これらの結果は、M. bovis BCG が配合された経口ワクチン接種を受けた免疫反応が、皮下ワクチン接種と比べて遅延するが少なくとも 8 週まで持続するように見えることを示す。

#### 【0095】

配合 M. bovis で経口ワクチン接種されたマウスからの腹膜由来リンパ球が自己マクロファージ内での M. bovis の増殖を阻害する。

リンパ球媒介エフェクター機構が M. bovis の細胞内増殖を阻害し得るかどうかを決定するために、経口 M. bovis BCG 配合物でワクチン接種されたマウスからの M. bovis 感染マクロファージに対する N P E C の添加を行った。マクロファージ内での M. bovis の増殖は [ $^3\text{H}$ ] ウラシル取込みにより決定した。単独マクロファージ内での、又は経口ワクチン接種されたマウスからの N P E C と共に同時培養したときの、M. bovis の増殖を図 4 に示す。配合または非配合 M. bovis BCG で経口ワクチン接種されたマウスあるいは配合剤のみが与えられたマウスから調製されたマクロファージは、M. bovis の増殖を抑制する能力に有意な差を示さなかった。配合 M. bovis BCG でワクチン接種されたマウスからの N P E C が自己 M. bovis 感染マクロファージと共に同時培養された場合は、非配合 M. bovis BCG また

10

20

30

40

50

は配合剤のみでワクチン接種されたマウスからのNPECの同時培養に比べて、 $[^3\text{H}]$ ウラシルカウント数が有意に減少した ( $P < 0.05$ )。これらの結果は、配合M. bovis BCGで経口ワクチン接種されたマウスからのリンパ球がマクロファージを活性化してM. bovisの細胞内増殖を阻害するようにすることを実証する。生体外 (in vitro) でのM. bovisの細胞内増殖の抑制は、宿主内でのM. bovisの蔓延の減少につながる生体内 (in vivo) での増殖阻害を反映し得る。

#### 【0096】

配合M. bovis BCGによる経口ワクチン接種は病原性M. bovisによるエアゾール抗原投与に対して保護する。

配合された経口用M. bovis BCGの保護効果を決定するために、マウスに  $5 \times 10^7$  CFUの配合M. bovis BCGをワクチン接種するか、又は  $1 \times 10^6$  CFUのM. bovis BCGを皮下ワクチン接種した。非ワクチン接種マウスを対照とした。マウスをワクチン接種後8週でエアゾール経路により病原性M. bovisで抗原投与し、抗原投与後37~40日で安楽死させた。表2は、皮下M. bovisワクチン接種が肺細菌数を約  $2.34 \log$  減少させ、また脾臓細菌数を  $1.90 \log$  減少させることを示す。これに比べて、配合された経口M. bovis BCGは肺細菌数を約  $1.01 \log$  減少させ、また脾臓細菌数を  $1.48 \log$  減少させた。表2の結果は、経口配合M. bovis BCGおよび皮下M. bovis BCGが病原性M. bovisによるエアゾール抗原投与に対する著しい保護を誘導するが、肺における皮下M. bovis BCGの保護効果は経口配合M. bovis BCG群の場合よりも大きいことを示した。

#### 【0097】

D. フクロネズミにおける免疫反応および病理学

リンパ球芽球発生反応。

ウシPPDに対する全血リンパ球芽球発生反応に及ぼす配合BCGによる経口ワクチン接種の効果を図5および表3に示す。ワクチン接種後6週で、配合BCG群についてのPPD-Bに対する平均刺激指数(SI)は、非配合BCG群の場合および非ワクチン接種対照群の場合よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。M. bovisで抗原投与後4週で、全ての群が20よりも大きなPPD-Bに対する平均SIを示した。これらの結果は、配合BCGの経口送達、非配合BCGに比べフクロネズミにおいて強い免疫反応を誘導することを示す。

#### 【0098】

更なる実験により、皮下ワクチン接種による4種の経口脂質BCG配合物に対する免疫反応を比較した (図11)。皮下的にワクチン接種されたフクロネズミは、ワクチン接種後4週をピークとし (平均SI  $42.5$ ) 8週で  $SI = 30$  まで徐々に低下する強いLTA反応を示した。対照的に、脂質N配合経口BCGは8週のワクチン期間の間LTA反応を誘導しなかった。脂質C、脂質Kおよび脂質Fに配合された経口BCGは、ワクチン接種後4週で弱いが ( $SI = 1 \sim 7$ ) ワクチン接種後8週まで累進的に増大し持続する ( $SI = 15 \sim 22$ ) LTA反応を誘導した。これらの結果は、経口ワクチン接種に対する全身免疫反応が皮下ワクチン接種の場合に比べて遅延するが、長く持続し得ることを示す。配合物Nは、非ワクチン接種フクロネズミの場合に見られるよりも高いLTA反応を誘導せず、またM. bovisによるエアゾール抗原投与に対する保護も行わなかった (表4参照)。経口BCGを配合するために用いられる脂質の種類が結核に対する保護にとって重要であることを示した。

#### 【0099】

臨床知見。

異なる群の間での抗原投与と検死の間の平均体重の変化を図6に示す。配合BCGでワクチン接種されたフクロネズミの平均体重は、抗原投与と検死の間で  $0.02 \text{ kg}$  増加した。対照的に、非配合BCG群および非ワクチン接種群については、平均体重がこの間にそれぞれ  $0.35 \text{ kg}$  および  $0.23 \text{ kg}$  減少した。しかしながら、これらの差は統計学的に有意でなかった。

#### 【0100】

10

20

30

40

50

4種の経口脂質BCG配合物と皮下ワクチン接種とを比較する更なる実験(表4)において、抗原投与と検死の間での平均体重変化が、非ワクチン接種群(0.147kg)に比べ、皮下ワクチン接種群(平均体重損失0.012kg)および経口脂質BCG群の1つ(F群)(0.035kg)については有意に減少した。比較して、残りの経口BCG群についての平均体重損失は、0.060kg(脂質C)、0.067kg(脂質K)および0.122kg(脂質K)であった。ワクチン接種に対する免疫反応を示さなかったフクロネズミ(すなわち非ワクチン接種群および脂質N群)は、反応したフクロネズミに比べて大きな体重損失を示した。

#### 【0101】

病理学。

抗原投与した動物の全ての肺において肉眼による病巣を観察した。結核性肺炎の程度は肺重量から推定することができる(図7)。高い肺重量は広範な結核性肺炎に関連する(3)(4)。肺重量差を体重変動で標準化するために、各動物の平均肺重量を体重と比較し、比で表わした。配合BCGでワクチン接種された動物の平均肺重量と体重の比は1.62であった。比較して、非配合BCG群および非ワクチン接種対照群の平均肺重量と体重の比はそれぞれ2.86および3.0であった。配合BCGでワクチン接種したフクロネズミの平均肺重量と体重の比は、非配合BCG群および非ワクチン接種対照群とは有意な差がある( $P < 0.05$ )。一般には、肺の病巣は、その病巣の中央に黄色の壊死領域をもった葉様硬化または小硬化領域である。最も広範な肺病巣をもった動物では肥大した気管支リンパ節が観察される。

#### 【0102】

4種の経口脂質BCG配合物と皮下ワクチン接種とを比較した第2の実験(表4)において、ワクチン群の間で平均肺重量と体重の比に有意差は無かった。しかしながら、ワクチン接種に対する免疫反応を示さなかったフクロネズミ(すなわち非ワクチン接種群および脂質N群)は、反応したフクロネズミに比べて高い肺重量を示した。

#### 【0103】

細菌学。

マイコバクテリウム・ボービス(*Mycobacterium bovis*)をM. bovisで抗原投与したフクロネズミの肺および脾臓から単離した。異なる群について肺および脾臓から単離された平均M. bovis数を図8および図9に示す。非配合群および配合BCG群についての平均肺細菌数は、非ワクチン接種対照群のものよりも有意に低かった( $P < 0.05$ )。配合BCG群についての平均脾臓細菌数は、非配合BCG群よりも約10倍少なく、また非ワクチン接種群よりも約40倍少なかった。配合BCG群についての平均脾臓細菌数は、非配合BCG群および非ワクチン接種対照群のものよりも有意に低かった( $P < 0.05$ )。

#### 【0104】

4種の経口脂質BCG配合物と皮下ワクチン接種とを比較した第2の実験(表4)において、経口ワクチン接種群のうちの3群および皮下ワクチン接種群について脾臓細菌数は非ワクチン接種群と比べて有意に低かった( $P < 0.05$ )。残りの経口脂質BCG群(脂質N)は脾臓細菌数の有意な低下を示さなかった。肺細菌数を比較した場合には、これらの群の間で有意差が見られなかった。一般に、ワクチン接種に対する免疫反応を示さなかったフクロネズミ(すなわち非ワクチン接種群および脂質N群)は反応したフクロネズミに比べて高い平均脾臓および肺細菌数を示した。

#### 【0105】

#### 【表1】

10

20

30

40

表 1. 異なる脂質配合物による経口ワクチン接種後 8 週におけるウシ PPD-刺激脾臓  
細胞反応\*

免疫化	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	LTA (SI)
配合剤のみ	110.62 (+/-14.06)	51.44 (+/-14.38)	1.67 (+/-0.49)
非配合 BCG	153.51 (+/-25.22)	65.10 (+/-20.05)	1.83 (+/-0.51)
配合物 C BCG	430.43* (+/-66.44)	2160.95* (+/-273.40)	16.26* (+/-1.20)
配合物 K BCG	230.23 (+/-54.13)	1268.30* (+/-76.80)	7.26* (+/-0.83)
配合物 N BCG	130.23 (+/-54.70)	75.50 (+/-16.80)	2.76 (+/-0.33)

\* は非ワクチン接種（配合剤のみ）対照群の平均から有意な差がある平均を表わす。

P値<0.05（スチューデント t 検定）

【 0 1 0 6 】

【 表 2 】

10

20

30

表2. マイコバクテリウム・ボービスによるエアゾール抗原投与に対するマウスの保護に及ぼすワクチン接種の効果

ワクチン群	肺細菌 数 <sup>†</sup>	Log <sub>10</sub> 抵抗 <sup>#</sup>	脾臓細菌 数	Log <sub>10</sub> 抵抗 <sup>#</sup>
非ワクチン接種	5.837 <sup>a</sup> (+/-0.362)	NA	4.565 <sup>a</sup> (+/-0.189)	NA
配合経口BCG	4.774 <sup>b</sup> (+/-0.270)	1.06	3.084 <sup>b</sup> (+/-0.176)	1.48
皮下BCG	3.498 <sup>c</sup> (+/-0.237)	2.34	2.660 <sup>c</sup> (+/-0.181)	1.90

<sup>†</sup> 値は抗原投与後37~40日の群当たり6匹の肺および脾臓からのM. bovisについてのCFU±標準誤差のlog<sub>10</sub>数である。

<sup>#</sup> データは非ワクチン接種動物の臓器における桿菌のlog<sub>10</sub>平均数からワクチン接種動物の臓器における桿菌のlog<sub>10</sub>平均数を引くことによって計算されるlog<sub>10</sub>抵抗のレベルとして表わされる。NAは適用できず。

同じ上付き文字を付した欄の数字は有意な差がない(P>0.05)。

10

20

30

【0107】

【表3】

表3. 経口ワクチン接種後のリンパ球増殖アッセイにおいてウシPPDに反応する

フクロネズミの数

ワクチン接種後の週

BCG配合物	群の大きさ	0	4	6
配合BCG	5	0*	2	5
非配合BCG	5	0	0	1
対照 (BCG無し)	6	0	0	0

\* 刺激因子 &gt; 3.5 をもった動物の数

10

20

【 0 1 0 8 】

【 表 4 】

表4.M. bovisで抗原投与されたワクチン接種フクロネズミについての病理学的および細菌学的知見

ワクチン群	体重変化／抗原投与体重 <sup>a</sup>	肺重量／PM体重 <sup>b</sup>	肺細菌数 <sup>c</sup>	脾臓細菌数 <sup>c</sup>
脂質C	-0.060 (±0.033)	22.54 (±2.63)	5.634 (±0.385)	1.301* (±0.373)
脂質K	-0.067 (±0.030)	15.49 (±2.12)	5.481 (±0.428)	1.321* (±0.289)
脂質N	-0.122 (±0.037)	23.47 (±2.85)	6.038 (±0.273)	2.200 (±0.498)
脂質F	-0.035* (±0.031)	16.28 (±4.11)	5.342 (±0.290)	0.934* (±0.230)
sc BCG	-0.012* (±0.055)	20.07 (±3.86)	5.384 (±0.427)	1.270* (±0.309)
非ワクチン 接種	-0.147 (±0.048)	24.10 (±3.50)	6.048 (±0.166)	2.553 (±0.465)

体重変化／抗原投与体重：脂質F，BCG<非ワクチン接種（P<0.05）

脾臓細菌数：脂質C，脂質K，脂質F，BCG<非ワクチン接種；脂質F<脂質N（P<0.05）

<sup>a</sup> 死後と抗原投与の間の体重変化（kg）／抗原投与時の体重（kg）

<sup>b</sup> 肺重量（g）／死後体重（kg）

<sup>c</sup> 細菌数，CFU /  $10^6$  / 組織のg

\* 非ワクチン接種群に対して有意に差がある。

【産業上の利用可能性】

【0109】

産業上利用

抗原性組成物には、安定なマトリックス中に抗原を維持し、マトリックス中に抗原が均一に分散された脂質配合物が含まれる。この抗原性組成物は、一定用量の抗原の投与を促進し、高用量投与（dose dumping）および非効率な低用量投与を回避する。脂質配合物は、本

10

20

30

40

50

出願人により、その中に含まれる生きた微生物の生存度および保存を改善することも示されている。脂質配合物はまた、胃酸および酵素による分解から抗原および生きた微生物を保護する。脂質系配合物における微生物の生存度の損失は、凍結乾燥製品について報告されているものよりも著しく低い。配合物の疎水的性質のために、劣化することなく、湿性または湿気条件下での保存も達成することができる。

【0110】

ワクチン製剤における微生物、特に細菌、の生存度は、強くて長期間持続する保護性免疫を誘導するために重要であることが実証されている。このことは本発明の組成物を使用することによって達成し得る。本発明の組成物はまた、調製し易く、生産費用が廉価で、針と注射器の使用を避けることができる点で消費者の受け入れ易さと安全性の増大が認められる。

10

【0111】

本発明の組成物は、皮下を含め多様な経路で投与し得るが、特に経口送達に適している。本出願人は、組成物における脂質配合物が微生物の生存度およびその構成要素である抗原を胃での分解から保護することができ、生きた微生物が免疫系に対する処理、複製および提示のために胃腸粘膜により吸収されることを可能とすることを見出した。さらに、本出願人は、投与される用量が従前に経口投与について予期されていた(8)よりも少ない用量で効果的となり得ることを決定している。

【0112】

例えばフクロネズミ等のような野生動物のワクチン接種には、抗原が粘膜ルートにより送達される必要がある。経口食餌ワクチンはそれ故に実用的で費用対効果に優れた送達の実施方法となる。ヒトの経口ワクチン接種も費用対効果に優れたワクチン接種方法であり、使用者の支持を受け易い。

20

【0113】

例えば皮下等の他の経路で投与される場合に、脂質配合物は、攻撃、例えばマクロファージによる攻撃から保護をも与える。皮下投与または注射による投与の場合に、脂質デポー配合物は、持続した放出をも可能として、感染プロセスを模倣し、そして免疫反応の増大を促進する。

【0114】

本発明の組成物が、多数の高コストの注射用ワクチン製剤を上回る実質的な利点を与えることが理解されるであろう。

30

【0115】

本発明の組成物は、広範囲の感染性微生物、例えば胃腸および呼吸系の病原、特に結核に対する免疫反応を誘導するのに効果的である。

【0116】

本発明の組成物は、広範囲の抗原に対するワクチン送達システムとして、または抗原性分子の同時送達または共役送達、特にその用量または抗原性の理由が低い免疫原性である抗原性分子の同時送達または共役送達にも使用し得る。本発明の組成物はワクチンアジュバントとしても有用である。

【0117】

本説明が例示のみのために与えられ、本発明の範囲がこれに限定されないことが当業者に更に理解されるであろう。

40

【0118】

【表5】



## 文献リスト

1. **Aldwell, F. E., D. L. Keen, V. C. Stent, A. Thomson, G. F. Yates, G. W. de Lisle, and B. M. Buddle.** 1995. Route of BCG administration in possums affects protection against bovine tuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal.* 43:356-359.
2. **Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. M. Buddle.** 1996. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. *Immunol Cell Biol.* 74:45-51. 10
3. **Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. N. Buddle.** 1997. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN- $\gamma$  and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. *Immunology and Cell Biology.* 75:.
4. **Buddle, B. M., F. E. Aldwell, D. L. Keen, N. A. Parlane, G. Yates, and G. W. de Lisle.** 1997. Intraduodenal vaccination of brushtail possums with bacille Calmette-Guerin enhances immune responses and protection against *Mycobacterium bovis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1:377-83. 20
5. **Buddle, B. M., F. E. Aldwell, A. Pfeffer, and G. W. de Lisle.** 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): pathology, haematology and lymphocyte stimulation responses. *Vet Microbiol.* 38:241-54.
6. **Daugelat, S., C. H. Ladel, and S. H. Kaufmann.** 1995. Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun.* 63:2033-40.
7. **Gheorghiu, M., M. Lagranderie, and A. M. Balazuc.** 1996. Stabilisation of BCG vaccines. *New Approaches to Stabilisation of Vaccine Potency.* Dev.Biol.Stand.Basel, Karger. 87:251-261. 30
8. **Lagranderie, M., P. Chavarot, A. M. Balazuc, and G. Marchal.** 2000. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine.* 18:1186-95.
9. Masarova, J., Mislovicova, D., Gemeiner, P and Michalkova, E. 2001  
Stability enhancement of *Escherichia coli* penicillin G acylase by glycosylation with yeast mannan. *Biotechnol Appl Biochem* 34:127-33
10. Morrison, I. M. and Hawke, J. C 1979. Influence of elevated levels of linoleic acid on the thermal properties of bovine milk fat *Lipids* 14: 391-4. 40

【図面の簡単な説明】

【0119】

【図1】脂質配合物の脂肪酸組成を示す図である。脂質は標準的プロトコルに従ってガスクロマトグラフィにより分析された。各脂質の脂肪酸組成は全脂肪酸組成の比率として表 50

わされる。

【図2】4 (2a) または室温 (10 ~ 25 ) における脂質中での配合および保存の後のBCG生存度を示す図である。BCG配合物は37 に温められ7H9液体培地中で乳化される。生存可能な微生物の数は7H11寒天プレート上への各エマルジョンの直列的な10倍希釈液を接種することによって決定した。配合媒体のCFU / ul 数は培養の2 ~ 3週後に決定した。結果は2重実験を代表し、平均として表わされる。

【図3】種々異なる用量の配合M. bovis BCGによる経口ワクチン接種後のウシPPD誘導INF - 反応を示す図である。配合M. bovis BCG (丸)、非配合M. bovis BCG (三角) または配合剤のみ (菱形) による経口免疫化後8週で、マウスを殺した。脾臓細胞をウシPPDと共に72時間インキュベートした。次に上清を集め、サンドイッチELISAを用いて分析した。各処理群は6匹のマウスを含んだ。脾臓を個別に処理した。結果はpg/mlで表わされ、三重測定の前平均として示される。棒は標準誤差を示す。

【図4】BALB / cマウスにおけるM. bovis BCGワクチン接種に対する抗原誘導脾臓INF - 反応を示す図である。10<sup>6</sup> CFUの皮下M. bovis BCG (四角)、10<sup>7</sup> CFUの配合M. bovis BCGの経口送達 (丸)、非配合M. bovis BCG (三角) または配合剤のみ (菱形) によるワクチン接種後2週、4週、6週および8週でマウスを安楽死させた。脾臓細胞をウシPPDと共に72時間インキュベートした。次に上清を集め、サンドイッチELISAを用いて分析した。各処理群は5 ~ 6匹のマウスを含んだ。脾臓を個別に処理した。結果はpg/mlで表わされ、三重測定の前平均として示される。8週での結果は2つの別個の実験から得られたものである。P値 < 0.05 (スチューデントt検定)。棒は標準誤差を示す。

【図5】非不着性腹膜滲出細胞 (NPEC) と共に同時培養されたマクロファージによるM. bovisの増殖阻害。マクロファージ当たり2桿菌のMOIでマクロファージにM. bovisを感染させた。非不着性自己NPECをマクロファージ当たり10NPECの比で加えた。次に [<sup>3</sup>H] ウラシルの取込み量を感染後72時間でアッセイした。M. bovisを含有しない細胞培養物による平均 [<sup>3</sup>H] ウラシル取込み量は460cpmであった。同時培養マクロファージおよびNPECからの細胞内桿菌の増殖を三重測定の前平均として表わした。結果は2つの実験を代表する。\* は配合剤のみの対照群の前平均から有意な差がある平均を表わし；棒は標準誤差を示す。

【図6】PPD - Bに対する生体外 (in vitro) 腹膜血液リンパ球芽球発生反応に及ぼす配合BCGによるフクロネズミの経口ワクチン接種の効果を示す図である。配合BCG ---- ; 非配合BCG (黒) ---- (黒) ; 非ワクチン接種対照群 x ---- x ; 結果は平均刺激指数 (SI) として表わされる。\* は非ワクチン接種対照群の前平均から有意な差がある平均を表わす。棒はSEを示す。

【図7】M. bovisで抗原投与されたフクロネズミの体重に及ぼす配合BCGによる経口ワクチン接種の効果を示す図である。平均体重変化は抗原投与から検死までの期間にわたって測定された。抗原投与の直前のフクロネズミの平均体重は3.0 ± 0.07 (± SE) kgである。棒はSEを示す。

【図8】M. bovisで抗原投与されたフクロネズミの肺重量に及ぼす配合BCGによる経口ワクチン接種の効果を示す図である。平均肺重量は検死時に測定された。肺重量の差を体重の変動で標準化するために、各動物の肺重量を体重と比較し、比として表わした。\* は非ワクチン接種対照群の前平均から有意な差がある平均を表わし；棒はSEを示す。

【図9】M. bovisで抗原投与を受けた肺から単離されたマイコバクテリアの平均数に及ぼす配合BCGによるフクロネズミの経口ワクチン接種の効果を示す図である。結果はCFU (log<sub>10</sub>) / 組織のgの幾何平均数として表わされる。\* は非ワクチン接種対照群の前平均から有意な差がある平均を表わし；棒はSEを示す。

【図10】M. bovisで抗原投与を受けた脾臓から単離されたマイコバクテリアの平均数に及ぼす配合BCGによるフクロネズミの経口ワクチン接種の効果を示す図である。結果はCFU (log<sub>10</sub>) / 組織のgの幾何平均数として表わされる。\* は非ワクチン接種対照群の前平均から有意な差がある平均を表わし；棒はSEを示す。

10

20

30

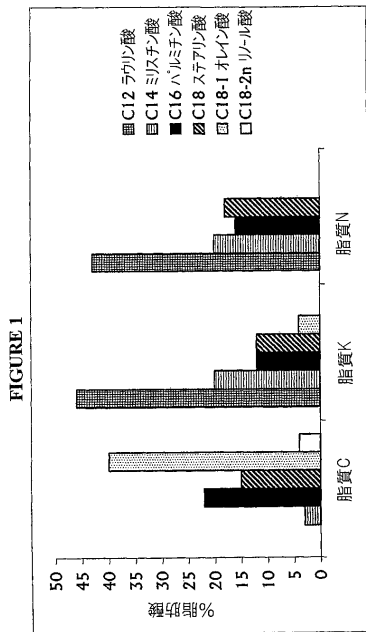
40

50

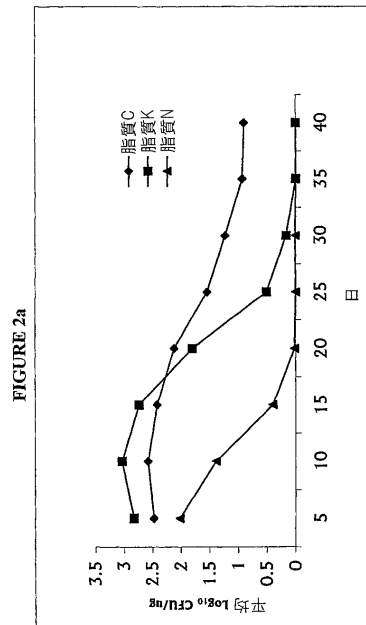
【図11】4種の経口脂質BCG配合物または皮下ワクチン接種に対する免疫反応の比較を示す図である。図はワクチン接種(0週)および抗原投与(8週)を受けたフクロネズミにおけるPPD-Bに対する生体外(in vitro)腹膜血液リンパ球芽球発生反応に及ぼす効果を示す。結果は平均刺激指数(SI)として表わされる。

【図12】本発明による包括的なワクチン送達システムの図である。

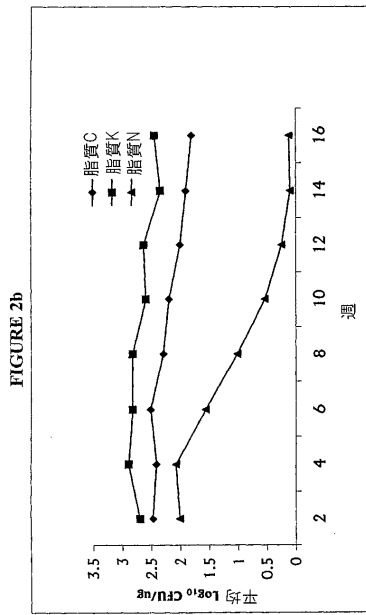
【図1】



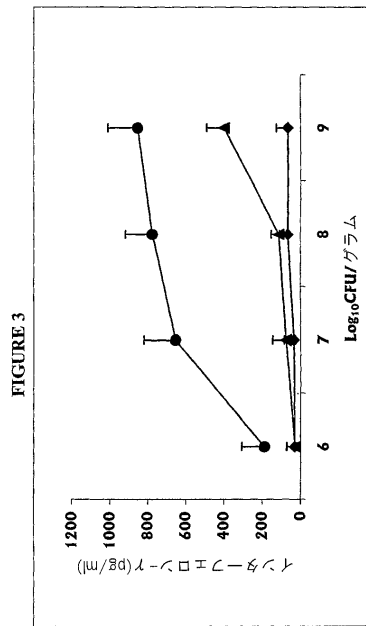
【図2a】



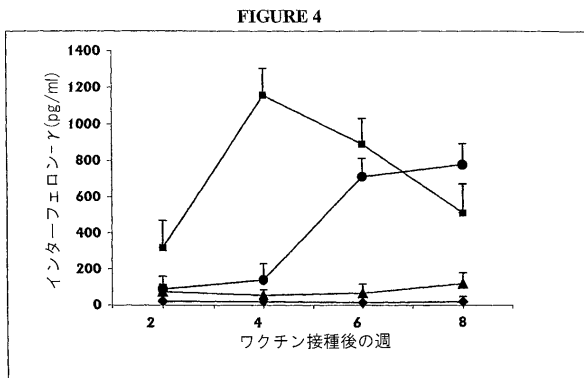
【 図 2 b 】



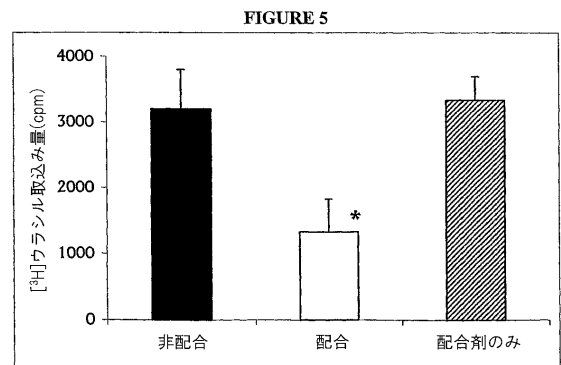
【 図 3 】



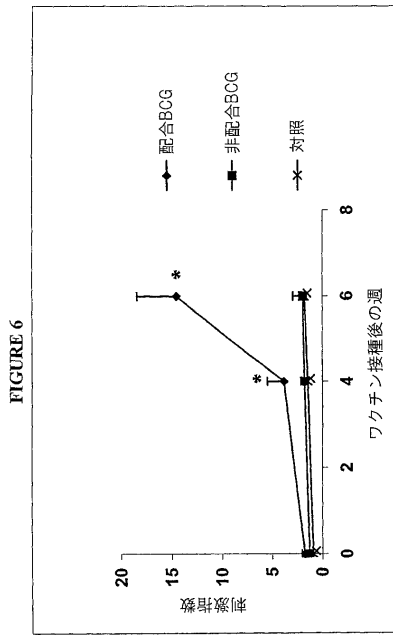
【 図 4 】



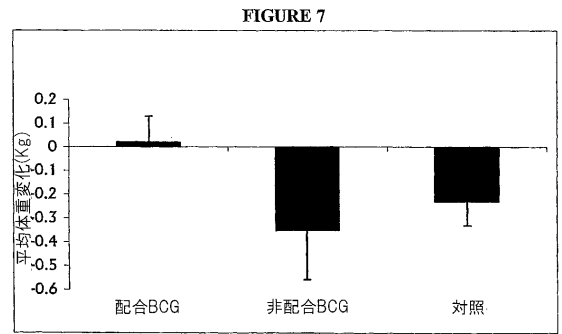
【 図 5 】



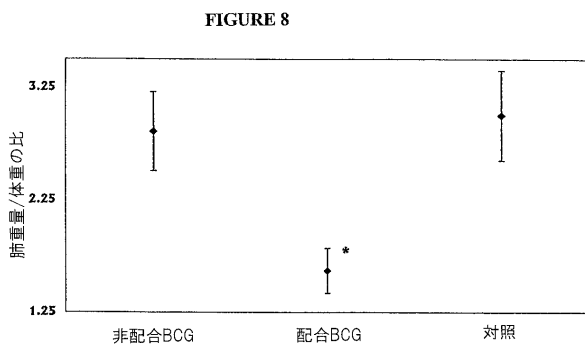
【 図 6 】



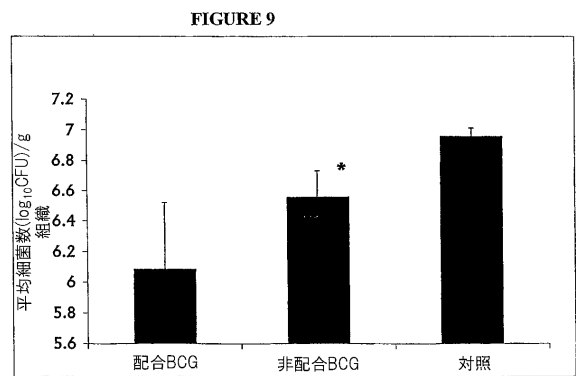
【 図 7 】



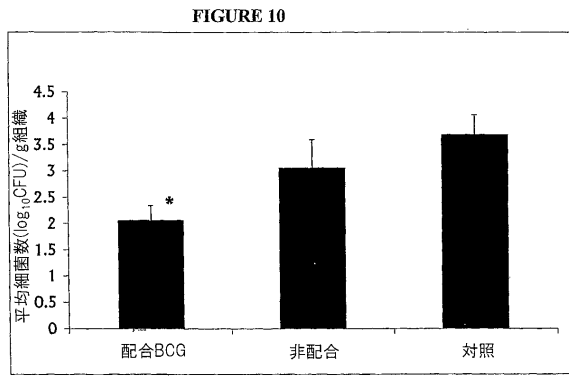
【 図 8 】



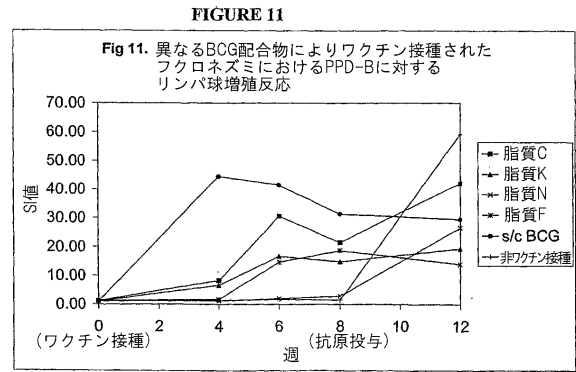
【 図 9 】



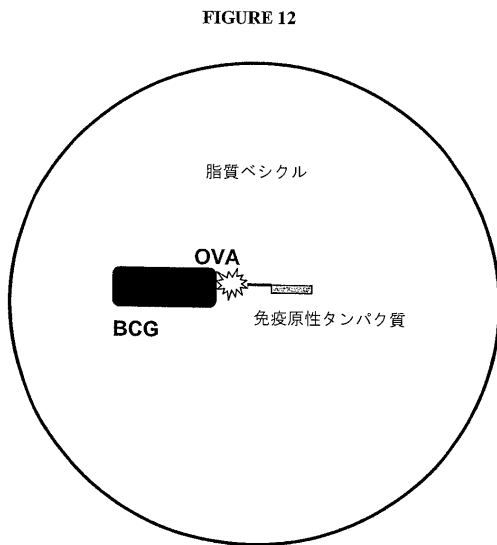
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 February 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/009868 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/04, 39/21, 39/002, 47/44, 47/14
- (74) Agents: GRIFFITHS, Teresa, V. et al.: A J Park, 6th Floor  
Huddart Parker Building, 1 Post Office Square, PO Box  
949, Wellington 6015 (NZ).
- (21) International Application Number: PCT/NZ02/00132
- (22) International Filing Date: 26 July 2002 (26.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 513169 26 July 2001 (26.07.2001) NZ
- (71) Applicants (for all designated States except US): UNIVERSITY OF OTAGO [NZ/NZ]; Leith Street, Dunedin (NZ). ANIMAL HEALTH BOARD, INC. [NZ/NZ]; Level 3, Agricultural House, Johnson Street, Wellington (NZ). AGRESEARCH LIMITED [NZ/NZ]; 5th Floor Tower Block, Ruakura Research Centre, East Street, Hamilton (NZ).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): ALDWELL, Frank, Ernest [NZ/NZ]; 80B London Street, Dunedin (NZ). BUD-  
DLE, Bryce, Malcolm [NZ/NZ]; 34 Sheridan Crescent, Upper Hunt (NZ). TUCKER, Ian, George [NZ/NZ]; 211 Portobello Road, Dunedin (NZ).
- Published:  
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/009868 A1

(54) Title: ANTIGENIC COMPOSITIONS

(57) Abstract: The invention relates to antigenic compositions and to methods for immunising animals using same. The antigenic compositions comprises a lipid formulation most usually in solid form, and at least one antigenic component. A preferred antigenic component is a living organism. In a preferred embodiment the composition is formulated for oral administration.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**ANTIGENIC COMPOSITIONS****TECHNICAL FIELD**

5 The present invention broadly relates to the use of lipids to formulate antigenic compositions, particularly live bacterial vaccines, and to methods for immunising animals using the compositions.

**BACKGROUND**

10 Most human and animal pathogens including those that cause tuberculosis (TB), initiate infection via the mucosal surfaces. Accordingly, protective immunity against such pathogens may require induction of strong mucosal immune responses. However, mucosal immune responses are generally weak following parenteral immunisation. Despite the obvious need  
15 for vaccines, particularly TB vaccines, to protect against mucosal sites, the vaccines in use today are given by intradermal or subcutaneous injection. The development of more effective compositions, and/or delivery systems for vaccines by alternate routes is therefore desirable. Oral administration of vaccines in particular has a number of advantages including ease of administration and targeting of the mucosal immune response. Despite this, oral vaccination  
20 of animals and man to provide mucosal and/or systemic immunity has to date been largely ineffective. Efficacy of such vaccines has been hampered by degradation of the vaccine as it passes through the gut. In particular, most antigenic compounds possess peptide bonds that are readily broken down by gastric and proteolytic enzymes in the gut.

25 A number of vaccines rely on the use of freeze-dried preparations of organisms. For example, the current vaccine for human TB is based on freeze-dried preparations of a live attenuated bacterium called Bacille Calmette Guerin (BCG). However, it has been shown that freeze-drying procedures result in 30 to 50% loss of viability of BCG and impaired recovery of remaining live bacteria (7). A composition which retains greater viability of organisms prior  
30 to use would contribute greatly to the effectiveness of such vaccines.

To improve immune responses, antigens have been mixed with a number of adjuvant substances to stimulate immunogenicity. These adjuvants are primarily alum and oil-in-water emulsions. The latter group is typified by the Freund's mineral oil adjuvants. However, the  
35 use of Freund's complete adjuvant (FCA) in human and veterinary vaccines is contraindicated



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

because of toxic reactions that have been reported. For these reasons, Freund's adjuvant may also be unsuitable for oral administration.

In other oil-in-water emulsions surfactants have been required because of the high oil content. Detergent properties of surfactants render them unsuitable for parenteral or oral administration. Further, toxic reactions even for approved surfactants have been reported. A further drawback with emulsions are that they are heterogeneous systems of one immiscible liquid dispersed in another. This is unstable and results in separation of the aqueous phase over time. This poses difficulties for maintaining vaccines in stable suspension. Moreover, antigens trapped in the aqueous phase of water-in-oil emulsions are unlikely to be protected from degradation in the stomach.

Liposomes and lipid vesicles have also been explored for use with vaccines, particularly with small antigenic components that may be readily encapsulated. Generally, liposomes and vesicles are not useful for encapsulation of large antigens such as live microorganisms. Moreover, liposomes and vesicles are costly and time consuming to produce, and the extraction procedures used in their preparation may result in alteration of the chemical structure or viability of vaccine preparations and hence their immunogenicity. For example, heat and solvents may alter the biological integrity of antigenic components such as proteins.

It is therefore an object of the present invention to provide an antigenic composition and/or delivery system which addresses these desiderata or which at least provides the public with a useful choice.

#### 25 SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, in a first aspect the present invention provides an antigenic composition comprising a lipid formulation and at least one antigenic component comprising live organisms.

30 Preferably, the lipid formulation is in solid form.

In a further aspect the present invention provides an antigenic composition comprising a lipid formulation in solid form at 10°C or above and at least one antigenic component.

35

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

Preferred lipid formulations for use in the compositions of the invention contain long chain fatty acids.

5 In terms of fatty acid composition, a preferred lipid formulation contains 40% to 100%, preferably 60% to 100%, more preferably 80% to 100%, and even more preferably 90% to 100% C<sub>16</sub> and/or C<sub>18</sub> fatty acids.

A further preferred composition has a lipid formulation which contains less than 35%, preferably less than 25%, and more preferably less than 10% C<sub>14</sub> fatty acids or shorter.

10

In one embodiment, the lipid formulation contains:

20% to 60% saturated fatty acids;

25% to 60% monounsaturated fatty acids; and

0.5 to 15% polyunsaturated fatty acids.

15

In a particularly preferred composition, the lipid formulation contains:

35% to 50% saturated fatty acids;

40% to 55% monounsaturated fatty acids; and

5% to 9% polyunsaturated fatty acids.

20

The current preferred lipid formulation for use in the invention has the formula: 3% myristic acid; 26% palmitic acid; 15% stearic acid; 40% oleic acid; and 6% linoleic acid.

25 The antigenic component may be a protein, glycoprotein, peptide or factor with a protein or peptide component.

In one embodiment, the antigenic component comprises live organisms.

30 Preferably, the live organisms in the compositions of the invention are bacteria, particularly non-pathogenic bacteria, and more preferably bacteria belonging to the genus *Mycobacterium*. A particularly preferred mycobacterium for use in the invention is *Mycobacterium bovis* BCG.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

In one embodiment, the composition comprises at least two antigenic components. The first is preferably a live organism and the second antigenic component is preferably derived from an infectious agent, or is a weakly immunogenic protein or peptide.

5 In a further aspect, the invention provides a method for preparing an antigenic composition of the invention, the method comprising mixing the antigenic component(s) with the lipid formulation.

10 In a still further aspect, the invention also provides a method for immunising an animal, the method comprising administering to said animal an antigenic composition of the invention.

In a further aspect, the invention provides a method for stimulating a mucosal immune response in an animal, the method comprising administering to said animal an antigenic composition of the invention.

15 Administration of the composition in these methods is preferably by the oral route

The invention also relates to the use of lipid formulations in the preparation of the antigenic compositions of the invention.

20

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

25 Aspects of the invention will now be described in relation to the accompanying drawings in which:

**Figure 1.** Fatty acid composition of lipid formulations. Lipids were analysed by gas chromatography according to standard protocols. The fatty acid composition of each lipid is expressed as a percentage of the total fatty acid composition.

30

**Figure 2.** BCG viability following formulation and storage in lipids at 4°C (2a) or room temperature (10-25°C) (2b). BCG formulations were warmed to 37°C and emulsified in 7H9 broth. Numbers of viable organisms were determined by inoculating serial 10 fold dilutions of each emulsion onto 7H11 agar plates. The number of CFU/ul of formulation media was

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

determined after 2-3 weeks of culture. Results are representative of duplicate experiments and are expressed as means.

**Figure 3.** Bovine PPD induced IFN- $\gamma$  responses following oral vaccination with varying doses of formulated *M. bovis* BCG. Mice were sacrificed at 8 weeks after oral immunization with formulated *M. bovis* BCG (circles), non-formulated *M. bovis* BCG (triangles) or formulation material only (diamonds). Splenocytes were incubated with bovine PPD for 72 h. Supernatants were then collected and analysed using a sandwich ELISA. Each treatment group contained 6 mice. Spleens were individually processed. Results are expressed in pg/ml and are presented as means of triplicate determinations. Bar indicates standard error.

**Figure 4.** Antigen-induced splenic IFN- $\gamma$  responses to *M. bovis* BCG vaccination in BALB/c mice. Mice were euthanased at 2, 4, 6 and 8 weeks after vaccination with  $10^6$  CFU subcutaneous *M. bovis* BCG (squares), oral delivery of  $10^7$  CFU of formulated *M. bovis* BCG (circles), non-formulated *M. bovis* BCG (triangles), or formulation material only (diamonds). Splenocytes were incubated with bovine PPD for 72 h. Supernatants were then collected and analysed using a sandwich ELISA. Each treatment group contained 5-6 mice. Spleens were individually processed. Results are expressed in pg/ml and are presented as means of triplicate determinations. Results at 8 weeks are from 2 separate experiments. *P* value < 0.05 (Student *t* test). Bar indicates standard error.

**Figure 5.** Growth inhibition of *M. bovis* by macrophages co-cultured with nonadherent peritoneal exudate cells (NPEC). Macrophages were infected with *M. bovis* at an MOI of 2 bacilli per macrophage. Non-adherent autologous NPEC were added at a ratio of 10 NPEC per macrophage. [ $^3$ H]uracil incorporation was then assessed at 72h post infection. The mean [ $^3$ H]uracil uptake by cell cultures which did not contain *M. bovis* was 460 cpm. Growth of intracellular bacilli from co-cultured macrophages and NPEC was expressed as means of triplicates. The results are representative of two experiments. \*Represents a mean which is significantly different from the mean of Formulation only control group; bar indicates standard error.

**Figure 6.** Effect of oral vaccination of possums with formulated BCG on *in vitro* peripheral blood lymphocyte blastogenic responses to PPD-B. Formulated BCG ◆---◆; non-formulated BCG, ■-----■; non-vaccinated control X---X; Results are expressed as mean

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

stimulation index (SI). \*Represents a mean which is significantly different from the mean of non-vaccinated control group. Bar indicates SE.

5 **Figure 7.** Effect of oral vaccination with formulated BCG on body weight of possums challenged with *M. bovis*. Mean body weight change was determined over the period from challenge to necropsy. The mean body weight of the possums immediately prior to challenge was  $3.0 \pm 0.07$  ( $\pm$  SE) kg. Bar indicates SE.

10 **Figure 8.** Effect of oral vaccination with formulated BCG on lung weight of possums challenged with *M. bovis*. Mean lung weight was determined at necropsy. In order to standardise differences in lung weight with variation in body weight, the lung weight of each animal was compared with the body weight and expressed as a ratio. \*Represents a mean which is significantly different from the mean of non-vaccinated control group; bar indicates SE.

15 **Figure 9.** Effect of oral vaccination of possums with formulated BCG on mean numbers of mycobacteria isolated from lungs following challenge with *M. bovis*. Results are expressed as the geometric mean number of CFU ( $\log_{10}$ )/g of tissue. \*Represents a mean which is significantly different from the mean of non-vaccinated control group; bar indicates SE.

20 **Figure 10.** Effect of oral vaccination of possums with formulated BCG on mean numbers of mycobacteria isolated from spleen following challenge with *M. bovis*. Results are expressed as the geometric mean number of CFU ( $\log_{10}$ )/g of tissue. \*Represents a mean which is significantly different from the mean of non-vaccinated control group; bar indicates SE.

25 **Figure 11.** Comparison of immune responses to four oral lipid BCG formulations or to subcutaneous vaccination. The figure shows the effect on *in vitro* peripheral blood lymphocyte blastogenic responses to PPD-B in possums following vaccination (week 0) and challenge (week 8). Results are expressed as mean stimulation index (SI).

30 **Figure 12.** is a diagram of a generic vaccine delivery system according to the invention.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**DETAILED DESCRIPTION**

5 Accordingly, in a first aspect, the invention provides an antigenic composition comprising a lipid formulation and at least one antigenic component comprising live organisms.

Preferably, the lipid is in solid form. Conveniently, the lipid is in solid form at 10°C or above.

10

In a further aspect the present invention provides an antigenic composition comprising a lipid formulation in solid form at 10°C or above, and at least one antigenic component.

15 The lipids employed in the formulations above are preferably suitable for animal or human consumption and may be selected from a broad range of natural (vegetable or animal derived), or synthetic lipid products including oils, fats and waxes.

Most usually, the lipid material will be liquid at temperatures above about 30°C. That is, the lipid should be selected to achieve melting point at physiological temperature in the animal to  
20 which it is administered, most usually by the oral route. Desirably, the lipid will be in the form of a solid at 10-30°C at atmospheric pressure, and preferably is still solid at from 20°C to 30°C at atmospheric pressure. However the melting temperature of lipid is not exclusive and may include oils, fats and waxes with a range of melting temperatures.

25 Preferred lipids for use herein will undergo transition from the solid phase to the liquid phase between about 30°C and physiological temperature of about 37°C. Summaries of lipid phase behaviour are available in the art, see for example (10). Accordingly, a skilled reader can select a lipid having the desired properties and melt point based on information in the art and simple experiment.

30

Suitable lipid formulations are triglycerides including glyceryl esters of carboxylic acids, compounds consisting of an aliphatic chain and a -COOH end, and saturated and non-saturated fatty acids and mixtures thereof.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

Currently preferred lipids are triglycerides containing primarily C<sub>8</sub> to C<sub>20</sub> acyl groups, for example myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, parinic, lauric, linolenic, arachidonic, and eicosapentaenoic acids, or mixtures thereof.

5

It has also been determined that for lipid formulations useful in the invention longer chain fatty acids, for example, C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>, are preferred. Long chain fatty acids have been found to be more effective in protecting organisms such as BCG in vaccines given to mice and possums. Viewed in this way, lipid formulations preferred for use in the invention contain: 40% to 100% , preferably 60% to 100%, preferably 80% to 100%, and more preferably 90% to 100% C<sub>16</sub> and/or C<sub>18</sub> fatty acids.

10

Generally, C<sub>16</sub> fatty acids represent from 10% to 40%, more preferably 20% to 35%, and even more preferably 25% to 32% of the total fatty acid content, and C<sub>18</sub> fatty acids represent from 40% to 90%, preferably from 50% to 80%, and more preferably from 60% to 70% C<sub>18</sub> of the total fatty acid content.

15

Preferred lipid formulations also contain less than 35% C<sub>14</sub> fatty acids or shorter, preferably less than 25%, and more preferably less than 10%.

20

In terms of chain length, the preferred lipid formulation contains less than 5% fatty acids with C<sub>14</sub> chains or shorter, 25% to 32% C<sub>16</sub> fatty acids, and from 60% to 70% C<sub>18</sub> fatty acid chains.

In terms of their fatty acid contents, lipid formulations for use in the invention may contain: saturated fatty acids in an amount from 20% to 60%, preferably 30% to 55%, and even more preferably 40% to 50%; monounsaturated fatty acids in an amount from 25% to 60%, preferably 30% to 60%, and more preferably 40% to 55%; and polyunsaturated fatty acids in an amount of from 0.5% to 15%, preferably 3% to 11%, and more preferably 5% to 9%.

25

A particularly preferred lipid formulation for use in the invention comprises 40% to 50% saturated fatty acids, 40% to 50% monounsaturated fatty acid, and 5% to 9% polyunsaturated fatty acid.

30

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

The currently preferred lipid formulation for use in the invention has the formula 3% myristic acid, 26% palmitic acid, 15% stearic acid, 40% oleic acid, and 6% linoleic acid as determined by HPLC analysis.

5 Currently preferred lipids formulations also include animal derived fractionated lipid complexes, one or more hydrogenated vegetable oils, especially olive oil or coconut oil, commercial suppository bases and other lipid formulations or mixtures thereof.

The lipid formulation is useful in the preparation of antigenic compositions, and in protecting  
10 antigens within the composition from degradation. The lipid formulation is especially useful in maintaining viability of live organisms, particularly bacteria. The lipid formulation acts to maintain the organisms in a live, but dormant state. This is particularly important for vaccines comprising live organisms formulated for oral administration. The lipids also  
15 maintain antigens in a uniform suspension. That is, in the compositions of the invention the antigenic components, and live organisms in particular, are uniformly distributed throughout a solid or paste like lipid matrix. The lipids also protect the antigens from destruction by gastrointestinal secretions when orally administered. Protection from macrophage attack is also likely when administered by other routes such as subcutaneously. This allows for uptake  
20 of the antigens and particularly live organisms through the gastrointestinal mucosa, and subsequent replication of organisms in the host. Replication of the live organisms within the host stimulates a protective immune response as determined by a reduction in severity of disease following challenge with virulent bacteria.

Formulations for a wide range of delivery routes may also include additives such as fillers,  
25 extenders, binders, wetting agents, emulsifiers, buffering agents, surfactants, suspension agents, preservatives, colourants, salts, antioxidants including mono sodium glutamate (MSG), vitamins such as vitamin E, butylated hydroxyanisole (BHA), albumin dextrose-catalase (ADC), protective coatings, attractants and odourants, and agents to aid survival of organisms contained in the lipid but are not limited thereto.

30 Protective coatings or enterocoatings may be selected, for example, from gels, paraffins, and plastics including gelatin. The coatings further aid in the prevention of exposure to gastric acids and enzymes when the oral administration route is selected.



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

When used for oral administration, the formulation may also include additives which, for example, improve palatability, such as flavouring agents (including anise oil, chocolate and peppermint), and sweeteners (including glucose, fructose, or any other sugar or artificial sweetener).

5

The antigenic component may be a protein, glycoprotein, peptide, or factor with a protein or peptide component or mixtures thereof. The component may be derived from an agent which may be used to generate an immune response in an animal.

10 Most usually, the antigen will bear at least one epitope which is present on an organism which is pathogenic in the animal species to be treated. Other antigenic structures such as are known in the art may also be used. For example, polysaccharides, glycolipids, and haptens conjugated to a carrier.

15 Preferably, the antigenic component is a living organism.

The living organism in the composition may be selected from the group consisting of: fungi, protozoans, bacteria and viruses. For example, HIV, SIV, Brucella and Anthrax. Preferably the organism is a bacterium. Organisms currently selected from non-pathogenic bacteria are preferred for use in compositions formulated for oral or subcutaneous delivery. A preferred bacterium is a non-pathogenic strain selected from the genus *Mycobacterium* including *M. tuberculosis* complex (comprising *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microtii*), *M. avium-intracellulare* complex (comprising *M. intracellulare* and *M. avium*), *M. paratuberculosis*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. shimoides*, *M. gastri*, *M. terrae* complex, and *M. nonchromogenicum*. In a particularly preferred embodiment the agent is *Bacille Calmette Guerin* (BCG), an attenuated strain of *M. bovis* including the following strains: 83/6235, Pasteur 1173P2, Glaxo 1077, Japanese 172, Prague, Russian, Brazilian, Danish 1331, Copenhagen, Connaught and including functionally equivalent variants and other attenuated strains of *M. bovis*, clones, mutants and recombinants of these strains either natural recombinants or those produced by any of a wide range of genetic engineering techniques, and antigenic components thereof.

20

25

30 It will be appreciated from the foregoing that the antigenic component may be a complex of proteins or peptides, or the like.

35

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

In one embodiment, the composition includes at least two antigenic components selected from any of those identified above, and may include multiple combinations of subunit antigens. Three or more antigenic components are feasible.

5

The concentration of the antigenic component(s) in the composition may vary according to known art protocols provided it is present in an amount which is effective to stimulate an immune response on administration to an animal. In particular, an immune response in the gut associated lymphoid tissue of the small intestine. In the case of mycobacteria a range of from  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)/ml is appropriate. Preferably, the concentration is from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^9$  CFU/ml. For protein and peptide type antigens a range of from 10-1000 $\mu$ g per gram of formulation is appropriate. For virus-type antigens a range of  $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^{10}$ , preferably  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  Plaque Forming Units (PFU)/ml is appropriate. The immune response may be humoral, or cell mediated including a mucosal immune response.

15

Accordingly, in a further aspect the invention relates to a method for stimulating a mucosal immune response in an animal by administering an antigenic composition of the invention to the animal.

20

The composition may be prepared using techniques known in the art. Conveniently, the lipid formulation is heated to liquefy if required, and the antigenic component(s) and other ingredients (when used) as described above are added. Dispersal of the antigenic composition may be achieved by mixing, shaking or other techniques that do not adversely affect the viability of the antigenic component.

25

Further preferred compositions for use in the invention are also essentially free of aqueous components including water. The term "essentially free" as used herein means that the composition contains less than 10% aqueous components, and preferably less than 5% aqueous components. As indicated above, the presence of components, particularly aqueous solvents, reduces the protective effect of the lipid formulation especially in the gut.

30

In one embodiment, the antigenic composition is a vaccine.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

In an alternate embodiment, the antigenic composition is an adjuvant useful for administration with a vaccine to increase efficacy of same. Mycobacterium-containing, and BCG-containing antigenic compositions in particular are preferred for use as adjuvants.

5 The antigenic composition of the invention can also be useful for generating a response to a second or further antigenic molecule of a type as indicated above for the antigenic component, particularly those that are weakly immunogenic. This may be achieved by co-delivery of the second or further antigenic molecule in an antigenic composition of the invention by conjugating the antigenic molecule to the antigenic component of the composition.

10 Conjugation may be achieved using standard art techniques (9). In particular, an antigen of interest may be conjugated to an antigenic carrier or adjuvant by a linker group which does not interfere with antibody production *in vivo*. The antigenic carrier or adjuvant may be any of the antigenic components including the organisms identified above but are preferably *Mycobacterium*, and more preferably BCG. Suitable linker groups include mannose receptor

15 binding proteins such as ovalbumin and those that bind to Fc receptors. The second or further antigenic molecule is preferably a protein or peptide. A particularly preferred protein is an immunocontraceptive protein. The lipid again acts as the delivery matrix. An example of this vaccine delivery system is given in Figure 12. When the composition is administered an enhanced immune response to the conjugated molecule or co-delivered molecule results.

20 In a further aspect the invention also provides a method for immunising an animal, the method comprising administering to said animal an antigenic composition of the invention.

The term "animal" as used herein refers to a warm-blooded animal, and particularly

25 mammals. Humans, dogs, cats, birds, cattle, sheep, deer, goats, rats, mice, rabbits, possums, badgers, guinea pigs, ferrets, pigs and buffalo are examples of animals within the scope of the meaning of the term. Monogastric and ruminant animals in particular are contemplated within this term.

30 The compositions of the invention may be administered by a variety of routes including parenteral (subcutaneous, intradermal, intramuscular), mucosal, aerosol and oral administration, but are not limited thereto. In one embodiment, oral administration is preferred. The compositions may be orally administered in the form of pellets, tablets, capsules, lozenges, or other suitable formulations. Oral administration enjoys wide consumer

35 acceptance where the use of needles and syringes can be avoided and is an economical and

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

practical method for vaccinating wildlife. In one embodiment the applicants have therefore provided a novel live vaccine formulated for oral administration.

In an alternate embodiment, the compositions may be formulated for parenteral administration by injection. This form of administration may also include injectable and subcutaneous depot formulations compatible with body tissues. Time release absorption from the depot may be achieved using the lipid formulation alone or with additional biodegradable polymers. The depot allows for sustained release of the antigenic component in a process which more closely approximates the infection process, facilitating the mounting of an immune response in the animal to which the composition is administered. A lipid protective effect also occurs with these forms of administration.

The composition can be administered as a single dose, particularly for parenteral administration, or in repeated doses over time. For example, an initial dose and booster doses at spaced intervals. The dosage for administration is determined by the release rate of the antigen component in combination with its antigenicity. Usual considerations such as weight, age, sex of the animal, concurrent treatments (if any), and nature of the antigen to be treated may also be taken into account. Generally the dose range for oral vaccination will be as given above, i.e.  $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^{10}$ , preferably  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^9$  CFU/kilogram per dose. For peptide and protein type antigens the dose range will be from 1-10,000 $\mu$ g, preferably 10-1000 $\mu$ g. For virus-type antigens the dose range will be from  $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^{10}$ , preferably  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  PFU/ml. Whichever method of delivery is used, when live organisms are used in the vaccine formulation they are expected to multiply within the host to facilitate the immune response.

The composition may also be formulated as a single dose preparation or as a multidose preparation for mass vaccination programmes.

Until required for use, the compositions of the invention may be stored for limited periods at room temperature, or preferably under normal refrigeration conditions at approximately 4°C. At 4°C the lipid formulation facilitates storage and maintenance of organisms in a dormant but viable state without deterioration. For parenteral delivery, the composition is then warmed to 30 to 40°C to liquefy prior to administration. For oral administration the composition is a solid or a paste.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

It will be appreciated that the above description is provided by way of example only and variations in both the materials and techniques used which are known to those persons skilled in the art are contemplated.

5

Non-limiting examples illustrating the invention will now be provided.

#### EXAMPLES

#### 10 MATERIALS AND METHODS

**Bacteria.** *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 (Pasteur Institute, Paris) was used as the vaccine strain. The *M. bovis* strain used for macrophage infection studies and for possum challenge was *M. bovis* 83/6235 (AgResearch, Wallaceville, New Zealand) which was originally  
15 isolated from a tuberculous lesion in a brushtail possum and has been used in previous macrophage and possum inoculation studies (1, 4). For BCG formulation and macrophage infection, bacteria were grown to mid log phase in 175 ml flasks (Falcon) containing Middlebrook 7H9 medium (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with albumin-dextrose-catalase (ADC; BBL, Becton Dickinson, Maryland, USA). Bacilli were harvested by  
20 centrifugation and washed twice in phosphate buffered saline (PBS) prior to storage at  $-70^{\circ}\text{C}$ . For possum challenge, *M. bovis* was grown to mid-log phase in tween albumin broth (TAB) containing Dubos broth base (Difco Laboratories, Detroit, USA) supplemented with 0.006% v/v alkalinized oleic acid, 0.5% w/v albumin fraction V and 0.25% w/v glucose and the numbers of bacteria were estimated by the degree of turbidity. Dilutions for inoculating the  
25 possums were made in TAB. The number of colony forming units (CFU) of BCG or *M. bovis* was determined as described previously (5).

**Formulation composition.** Three lipid products were selected on the basis of melting temperature and the ability to maintain BCG in uniform suspension for formulating with  
30 BCG. Lipids which were liquid at  $37^{\circ}\text{C}$  but became solid below  $30^{\circ}\text{C}$  were chosen for testing in BCG viability studies. Following viability testing, the following three formulations were selected for testing in oral vaccine trials in mice and possums:

Formulation C - an animal derived fractionated complex lipid; Formulation K - consisting of tryglycerides of purified hydrogenated coconut oil; Formulation N - Novarta B, a commercially

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

available suppository base. The three formulations were analysed by gas chromatography to determine the percentage of fatty acid groups.

**Formulation of BCG.** Pelleted BCG was resuspended in formulation medium which had been warmed to 37°C. BCG was resuspended at a concentration of  $1 \times 10^7$  CFU/ml for vaccination of mice or  $1 \times 10^8$  CFU/ml for vaccination of possums. To increase attractiveness and palatability for possums, 10 mg of glucose and 10 µl of anise oil (Pharmacare, Auckland NZ) were added per ml of formulation. For oral vaccination of mice, 10 mg of glucose, 1 mg of monosodium glutamate (Sigma), and 10% v/v ADC was added per ml of formulation. These additives were dispersed with the formulation lipids and were previously shown not to affect viability of BCG. BCG formulations were transferred to 15 ml tubes (falcon) and allowed to solidify with gentle mixing at 4°C. Formulations were removed from the tubes and aseptically cut into 1g pellets as required for viability testing and vaccination studies. Pellets were tested for dispersal of BCG by culturing on 7H11 agar plates and counting CFU as described below.

**BCG viability.** The number of CFU in the formulations following storage at 4°C or at room temperature (10-25°C) was determined as described previously (4). Samples for culture were collected by warming 100 mg aliquots of the three BCG formulations to 37°C for 15 min and performing serial 10-fold dilutions in 7H9 broth. Numbers of viable organisms were determined by inoculating 100 µl of each emulsion onto Middlebrook 7H11 agar plates (Difco) supplemented with oleic acid-ADC (OADC; Becton Dickinson) and 0.5 % glycerol. Emulsions were dispersed using a glass spreader. Plates were sealed with parafilm and incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The number of colonies was counted after 2-3 weeks of culture. Results are expressed as CFU/µg of BCG formulation.

**Vaccination of mice.** Specific pathogen free female BALB/c mice (6-8 weeks old) were obtained from the University of Otago Department of Animal Laboratory Sciences, Dunedin. Mouse experiments were conducted under ethics approval from the University of Otago Animal Ethics Committee (Approval No: 51/2000). Mice were separated into individual cages and taken off food for 12h prior to oral vaccination. Non-formulated controls consisted of *M. bovis* BCG in Craig's preservative-free strawberry jam (Heinz-Watties Ltd., Hastings, New Zealand). A previous study had shown that *M. bovis* BCG viability over a 24 h interval was not affected by mixing *M. bovis* BCG in the jam (data not shown). Non-vaccinated controls

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

consisted of lipid formulation alone. For dose response and time course experiments mice were given vaccine in two separate doses at 24 h intervals. For aerosol challenge experiments, mice were given a single oral dose ( $5 \times 10^7$  CFU) or vaccinated subcutaneously with  $1 \times 10^6$  CFU. The mice were observed at various intervals during consumption of pellets and jam to ensure the full dose was eaten. At various time-points post vaccination, the mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and their spleens were removed aseptically.

**Spleen cell proliferation assay.** Spleen cell suspensions were prepared by filtering cells through a cell strainer (70- $\mu$ m mesh; Beckton Dickinson). Erythrocytes were lysed in 0.83% NH<sub>4</sub>Cl (pH 7.2). Cells were washed twice in PBS and resuspended to  $1 \times 10^6$ /ml in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) containing 10% foetal calf serum (FCS), 20 mM HEPES penicillin at 100U/ml, streptomycin at 100 $\mu$ g/ml,  $5.5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol (DMEM-10%FCS; all from Gibco-BRL, USA). Cells were resuspended to a concentration of  $10^7$  per ml in RPMI plus 10% foetal calf serum (Gibco). Splenocytes ( $5 \times 10^5$  per well) were plated out in triplicate wells in 96-well plates (Nunc). Cells were cultured purified protein derivative from a culture of *M. bovis* (bovine PPD; CSL, Melbourne, Australia), 60 $\mu$ g/ml final concentration or with medium alone. Cells were harvested 4 days later, after an 18-h pulse with 1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham, Buckinghamshire, England), and the incorporated thymidine was measured as previously described (5). A stimulation index (SI) was obtained by dividing the mean counts per minute (cpm) for the triplicate cultures incubated with bovine PPD by the mean cpm for splenocytes cultured with medium only.

**In vitro assay for cytokine production by spleen cells.** Spleen cell suspensions were prepared as described above for the spleen cell proliferation assay. One ml of cell suspension was dispensed into 24 well plates (Costar) and 100  $\mu$ l of either PBS or bovine PPD (60 $\mu$ g/ml final concentration) was added to the wells. Cultures were incubated for 72 h in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C after which time 200  $\mu$ l of culture supernatant was collected and frozen at 70°C for cytokine analysis. Interleukin-2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) capture ELISAs were performed according to the manufacturers instructions using a commercial kit (R&D Systems, Duoset, City, Country) Cytokine levels in culture supernatants were quantified by extrapolation from standard curves. The minimum sensitivities of the two ELISAs were determined to be 50 pg/ml for IFN- $\gamma$  and 35 pg/ml for IL-2.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

***M. bovis* inhibition assay.** Peritoneal-derived macrophages were tested for inhibition of intracellular growth of *M. bovis* following co-culture with or without autologous lymphocytes. Experiments were performed according to a modification of previously described protocols. Peritoneal exudate cells (PEC) were obtained by lavage from female BALB/c mice. Cells were collected in PBS supplemented with 1% BSA and 20 U/ml of heparin, washed once and resuspended in DMEM medium containing 10% foetal calf serum and 100U/ml penicillin (supplemented DMEM) at  $2 \times 10^6$  /ml. 100  $\mu$ l of cell suspension was dispensed into a 96 flat well plate (Nunc). After incubation for 2 h in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C the nonadherent cells were removed, washed and resuspended at a density  $5 \times 10^6$ /ml in supplemented DMEM. Nonadherent cells were selectively depleted of the remaining adherent population by incubation in 25 ml flasks (falcon). Nonadherent PEC (NPEC) were determined to comprise >90% lymphocytes following May-Grunwald/Giemsa staining. Warm supplemented DMEM was added to the adherent monolayer which was estimated to contain  $5 \times 10^4$  cells/well. This population was found to be 98% positive with a non-specific esterase staining kit (catalogue no. 181-B; Sigma, St. Louis, Mo, USA) and is henceforth referred to as macrophages. Macrophages were infected with *M. bovis* at an MOI of 2 bacilli per macrophage as described previously (2). Non phagocytosed bacteria were removed by gentle washing. One hundred  $\mu$ l (containing  $5 \times 10^5$  cells) of autologous NPEC was added to each well containing infected macrophages and cultures were further incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The resulting 10:1 NPEC-to-macrophage ratio was selected to approximate that of the ratio found in peripheral blood mononuclear cells. Control wells consisted of *M. bovis*-infected macrophages alone or uninfected NPEC and macrophages. After 72 h, cells were pulsed with 1.0  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]uracil for 18 h. The cells were lysed with 0.1% saponin and the bacteria heat killed at 80-90°C for 20 minutes prior to harvesting onto glass fibre filters (Whatman Inc, Finland) using an automated cell harvester (Cambridge Technology, USA). The amount of [<sup>3</sup>H]uracil incorporated was determined using a liquid  $\beta$ -scintillation counter (Wallac, Country).

**Aerosol challenge of mice with *M. bovis*.** Six mice per vaccine group were challenged by aerosol with virulent *M. bovis* 8 weeks after vaccination. A single cell suspension of *M. bovis* 83/6235 was prepared using a modification of a method described by Grover et al., 1967 and stored at -70 C. For preparing these suspensions, the bacterial cells were dispersed by sonication for 30 seconds and filtered through an 8  $\mu$ m membrane filter. Mice were infected via the respiratory route using an aerosol chamber which produces droplet nuclei of the size



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

appropriate for entry into alveolar spaces. The concentration of viable *M. bovis* in the nebuliser fluid was empirically adjusted to result in the inhalation and retention of 5-20 viable organisms per mouse lungs (B. Buddle and G. de Lisle, unpublished data). A similar procedure has been shown to result in reproducible, uniform infection of the lungs of guinea pigs. The aerosol infection and subsequent maintenance and manipulation of infected mice were performed under strict isolation conditions in a biohazard facility.

**Isolation of *M. bovis*.** Mice were euthanased between 37 and 40 days after aerosol challenge. The lungs and spleen from each mouse were processed individually for mycobacterial isolation. The organs were homogenized in a Ten-Broeck grinder and samples centrifuged at 3500 g for 20 min. The deposits were resuspended in 1 ml of distilled water. Appropriate dilutions were made in TAB and a 0.1 ml volume of a diluted or undiluted sample was inoculated onto a modified mycobacteria 7H11 agar (1). Two replicates were prepared for each dilution. Culture conditions and methods for identification of isolates were carried out as previously described (1)

#### Analysis of data

Statistical analyses of differences in the mean cytokine levels and  $\log_{10}$  transformed spleen cell proliferation responses for the vaccine groups were determined using the Student t test. The bacterial counts from the lung and spleen were  $\log_{10}$  transformed and analysed using analysis of variance. For statistical purposes, when no bacteria were cultured from tissues, half the lowest detectable count (% CFU/organ) was used.

**Vaccination and challenge of possums.** Possums were trapped and housed as previously described (4). BCG was fed to two groups of possums (5 animals/group). A 1 g pellet of formulated BCG ( $1 \times 10^8$  CFU) was given to each possum in one group. A second group was given BCG ( $1 \times 10^8$  CFU) in jam to control for the formulation procedure. The jam had previously been shown not to inhibit BCG viability (data not shown). A third group (6 animals/group) was given pellets containing formulation medium only and served as non-vaccinated controls. Possums were observed during consumption of pellets to ensure the full pellet was eaten. The following day the vaccinations were repeated (total BCG dose  $2 \times 10^8$  CFU/possum). All of the possums were challenged by the aerosol route 41 days after vaccination.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

In a second experiment, four oral lipid BCG formulations were compared with subcutaneous vaccination. Six possums per vaccine group were challenged by aerosol with virulent *M. bovis* 8 weeks after vaccination. Lipid C,K,N and F (a modification of K containing 10% foetal calf serum)

5

**Aerosol challenge of possums with *M. bovis*.** The possums were challenged with *M. bovis* 83/6235, which was originally isolated from a lymph node of a possum from Taumaranui, New Zealand (5). Single cell suspensions of the isolate were prepared using a modification of a method described by Grover et al., 1967 and stored at -70°C. For preparing these suspensions, the bacterial cells were dispersed by sonication for 30 seconds and filtered through an 8 µm membrane filter. Possums anaesthetised with an intramuscular injection of ketamine HCl (30 mg/kg; Parnell Laboratories, Auckland, New Zealand) were infected via the respiratory route by using an aerosol chamber which produces droplet nuclei of the size appropriate for entry into alveolar spaces. The concentration of viable *M. bovis* in the nebuliser fluid was empirically adjusted to result in the inhalation and retention of 10-20 viable organisms per possum (Buddle and de Lisle, unpublished). This challenge dose had previously been estimated from the number of primary tubercles observed grossly in the lungs of non-vaccinated possums at 4 weeks post-infection. A similar procedure has been shown to result in reproducible, uniform infection of the lungs of guinea pigs (Wiegshauss et al., 1970; Smith et al., 1970). The aerosol infection and subsequent maintenance and manipulation of infected possums were performed under strict isolation conditions in a biohazard facility.

**Necropsy of possums.** All possums were killed between 56 and 57 days after challenge and subjected to extensive gross post-mortem examination. The lungs were separated from surrounding tissues and weighed.

**Isolation of *M. bovis* from possum tissues.** From each animal, a sample of lung and spleen each weighing approximately 1 g, was taken from a macroscopic lesion, or, if no lesion was present, a sample was taken from a pre-determined part of the organ and processed individually for mycobacterial isolation. Samples were weighed, homogenized in a Ten-Broeck grinder and decontaminated in 0.75% cetyl-pyridinium chloride for 1 h. Samples were centrifuged at 3500 g for 20 min and deposits resuspended in 1 ml of distilled water. Appropriate dilutions were made in TAB and a 0.1 ml volume of a diluted or undiluted sample was inoculated onto a modified mycobacteria 7H11 agar plate. Two replicates were

30

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

prepared for each dilution. Culture conditions and methods for identification of isolates were carried out as previously described (1).

**Possom peripheral blood lymphocyte proliferation assay.** Proliferative responses to PPD-B and PPD-A (CSL Limited, Parkville, Australia) were measured using whole blood depleted of red blood cells. Responses to Con A were also tested. Briefly, 1 ml of heparinised blood was mixed with 50 ml 0.17 M Tris- 0.16 M NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.2 at 37°C for 10 min, washed twice in PBS at 20°C and made up to 3 ml in DMEM tissue culture medium supplemented with 2mM glutamine and 2% normal possum serum. The cells (200 µl) were plated into flat bottom 96 well plates containing 50 µl PPD-B, PPD-A or Con A in PBS or PBS alone to give final concentrations of 60 µg/ml PPD or 5 µg/ml Con A. Plates were placed in a 5% CO<sub>2</sub> in air incubator for 72 hr, pulsed with 1µ Ci/well <sup>3</sup>H-tritiated thymidine (Amersham, UK), harvested after a further 18 h and <sup>3</sup>H counted in a Micro Beta Trilux (Wallac, Finland). The stimulation index (SI) was calculated by dividing counts per minute (cpm) from triplicate cultures stimulated with PPD by cpm from triplicate cultures with medium and PBS.

#### Analysis of data

Statistically significant differences of mouse cytokine secretion were determined using the Student t test (GraphPad, San Diego, Calif.). These studies were performed twice with similar results. For possum lymphocyte proliferation responses, stimulation indices of >3.5 were scored as a positive response as this represents a response at least three standard deviations above the mean of the background (mean SI for PPD-B prior to vaccination). The possum body weight changes, lung weights, lymphocyte blastogenic responses and bacterial counts for the different treatment groups were initially compared by one-way analysis of variance. Duncan's multiple range test was then used to compare the means for individual groups. Lymphocyte proliferation responses and bacterial counts from the lung and spleen were log<sub>10</sub> transformed prior to analysis. For statistical purposes, when no bacteria were cultured from tissues, half the lowest detectable count (5 CFU/g tissue) was used.

30

## RESULTS

**A. Fatty acid composition of formulation lipids.** Lipids selected for use in formulating oral BCG were analysed by gas chromatography. Fig 1 shows the fatty acid composition of the 3 lipids used in mice and possum vaccination trials.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

The relative percentage of fatty acids in the three lipid formulations are shown in Fig 1. Chemical analysis of lipids by HPLC showed that the 3 formulations comprised the following mixtures of fatty acids:

5

Formulation C.

89% total lipid (48.5% neutral, 40.5% polar -comprising 3% myristic acid, 26% palmitic acid, 15% stearic acid, 40% oleic acid and 6% linoleic acid),

10 

Formulation K

47% lauric acid, 20% myristic acid, 12% palmitic acid, 12% stearic acid and 3% oleic acid.

Formulation N. Novarta B, a commercially available suppository base consisting of a mixture of esterified, hydrogenated, fractionated vegetable oils with synthetic triglyceride mixtures.

15 

comprising: 44% lauric acid, 20% myristic acid, 16% palmitic acid, 19% stearic acid.

**B. BCG viability following formulation.**

The viability of formulated BCG following storage at 4°C is shown in Fig 2a. Over a period of 16 weeks, formulations C and K maintained high levels of BCG viability with formulation C showing higher retention of viability (98%) compared to formulation K (52%). In contrast, formulation N showed a progressive loss of BCG viability resulting in greater than 97% loss of viable organisms by 16 weeks. These results suggest that formulations C and K are more suited to maintaining BCG viability at 4°C compared to formulation N.

20 

The viability of formulated BCG following storage at room temperature (10-25°C) is shown in Fig 2b. Formulations C and K maintained high levels of BCG viability with formulation C showing prolonged retention of viability (mean log<sub>10</sub> CFU/ug =10) at 40 days compared to formulation K (mean log<sub>10</sub> CFU/ug =10) at 22 days. In contrast, formulation N showed a rapid loss of BCG viability (mean log<sub>10</sub> CFU/ug =10) at 12 days. These results suggest that

30 

formulations C and K are more suited to maintaining BCG viability at room temperature compared to formulation N.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**C. Immunogenicity of formulated BCG in mice.**

**Oral delivery of formulated *M. bovis* BCG induces immune responses in mice.** To determine a suitable method of measuring systemic immune responses following oral delivery of *M. bovis* BCG, we compared bovine PPD-induced splenocyte proliferation (LTA), and splenic IL-2 and IFN- $\gamma$  responses at 8 weeks following oral delivery of  $10^7$  CFU of lipid-formulated *M. bovis* BCG or *M. bovis* BCG in jam (non-formulated *M. bovis* BCG). Table 1 shows that while both the LTA and IFN- $\gamma$  assays showed significant differences between the formulated and non-formulated oral *M. bovis* BCG groups, the differences for the IL-2 assay were not significant. The IFN- $\gamma$  assay was used in further experiments to monitor systemic immune responses due to importance of IFN- $\gamma$  in protection against tuberculosis.

To determine the effect of dose of *M. bovis* BCG following oral delivery, we compared splenic IFN- $\gamma$  responses to bovine PPD in mice vaccinated with varying doses of formulated or non-formulated *M. bovis* BCG at 8 weeks post vaccination. Fig 2 shows that a low level of IFN- $\gamma$  (<200pg/ml) was detected in the formulated group following oral immunization with  $10^6$  CFU of *M. bovis* BCG, but there were no significant differences between the vaccine groups. When the dose was increased to  $10^7$  CFU, IFN- $\gamma$  responses in the non-formulated group remained low whereas responses to formulated *M. bovis* BCG increased significantly ( $P < 0.05$ ). Similar differences were seen with  $10^8$  CFU of *M. bovis* BCG. When the vaccine dose was increased to  $10^9$  CFU of BCG, an increase in the levels of IFN- $\gamma$  was seen in the non-formulated group while the formulated group remained high. At doses of *M. bovis* BCG ranging from  $10^7$ - $10^9$  CFU, IFN- $\gamma$  responses in the formulated *M. bovis* BCG group were significantly greater than those of non-formulated *M. bovis* BCG. The increase in IFN- $\gamma$  responses seen at the high dose in the non-formulated group shows that considerably higher doses of oral *M. bovis* BCG are required for induction of immune responses compared to formulated *M. bovis* BCG. To determine the time course of immune responses to oral *M. bovis* BCG, we compared splenic IFN- $\gamma$  responses at 2 weekly intervals following oral or subcutaneous vaccination with *M. bovis* BCG. Fig. 3 shows that IFN- $\gamma$  responses following subcutaneous vaccination peaked at 4 weeks and gradually declined at weeks 6 and 8. By comparison, IFN- $\gamma$  responses following oral vaccination with formulated *M. bovis* BCG first increased at 6 weeks and remained high at 8 weeks post vaccination. IFN- $\gamma$  responses to non-formulated *M. bovis* BCG or formulation material alone remained low between 2 and 8

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

weeks. These results show that immune responses following oral vaccination with formulated *M. bovis* BCG are delayed compared to subcutaneous vaccination but appear to persist at least to 8 weeks.

5 **Peritoneal-derived lymphocytes from mice orally vaccinated with formulated *M. bovis* inhibit growth of *M. bovis* in autologous macrophages.** The addition of NPEC to *M. bovis*-infected macrophages from mice vaccinated with oral *M. bovis* BCG formulations was performed in order to determine whether lymphocyte-mediated effector mechanisms could inhibit intracellular growth of *M. bovis*. Growth of *M. bovis* in macrophages was determined  
10 by [<sup>3</sup>H]juracil uptake. The growth of *M. bovis* within macrophages alone or when co-cultured with NPEC from orally vaccinated mice is illustrated in Fig. 4. Macrophages prepared from mice orally vaccinated with formulated or non-formulated *M. bovis* BCG or mice given formulation material alone showed no differences in their ability to control *M. bovis* growth. When NPEC from mice vaccinated with formulated *M. bovis* BCG were co-cultured with  
15 autologous *M. bovis*-infected macrophages, the [<sup>3</sup>H]juracil counts were significantly reduced compared to co-culture of NPEC from mice vaccinated with non-formulated *M. bovis* BCG or formulation material alone ( $P < 0.05$ ). These results demonstrate that lymphocytes from mice orally vaccinated with formulated *M. bovis* BCG activate macrophages to inhibit intracellular growth of *M. bovis*. Control of intracellular growth of *M. bovis* in vitro may reflect growth  
20 inhibition in vivo leading to reduced dissemination of *M. bovis* in the host.

**Oral vaccination with formulated *M. bovis* BCG protects against aerosol challenge with virulent *M. bovis*.** In order to determine the protective efficacy of formulated oral *M. bovis* BCG, mice were orally vaccinated with  $5 \times 10^7$  CFU formulated *M. bovis* BCG or  
25 subcutaneously vaccinated with  $1 \times 10^6$  CFU *M. bovis* BCG. Non-vaccinated mice served as controls. Mice were challenged with virulent *M. bovis* by the aerosol route 8 weeks after vaccination and euthanased 37-40 days after challenge. Table 2 shows that subcutaneous *M. bovis* BCG vaccination reduced the bacterial lung count by approximately 2.34 logs and the bacterial spleen count by 1.90 logs. By comparison, formulated oral *M. bovis* BCG reduced  
30 the bacterial lung count by approximately 1.0 log and the bacterial spleen count by 1.48 logs. The results in Table 2 showed that oral formulated *M. bovis* BCG and subcutaneous *M. bovis* BCG induced significant protection against aerosol challenge with virulent *M. bovis*, although the protective efficacy of subcutaneous *M. bovis* BCG in the lung was greater than that for oral formulated *M. bovis* BCG group.

35

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**D. Immune responses and pathology in possums.**

**Lymphocyte blastogenic responses.** The effect of oral vaccination with formulated BCG on the whole blood lymphocyte blastogenic responses to bovine PPD is shown in Fig.5 and Table 3. At 6 weeks after vaccination, the mean stimulation indices (SIs) to PPD-B for the formulated BCG group were significantly higher than for non-formulated BCG and non-vaccinated control groups ( $P < 0.05$ ). At 4 weeks following challenge with *M. bovis* all groups showed a mean SI for PPD-B of  $>20$ . These results show that oral delivery of formulated BCG elicits strong immune responses to PPD-B in possums compared to non-formulated BCG.

A further experiment compared immune responses to four oral lipid BCG formulations with subcutaneous vaccination (Fig 11). Subcutaneously vaccinated possums showed strong LTA responses which peaked at 4 weeks post vaccination (Mean SI 42.5) and gradually dropped to SI = 30 by 8 weeks. In contrast, Lipid N formulated oral BCG failed to elicit an LTA response during the 8 week vaccination period. Oral BCG formulated in lipids C, K and F induced LTA responses which were weak (SI=1-7) at 4 weeks post-vaccination but increased progressively and were sustained through to 8 weeks post-vaccination (SI=15-22). These results show that systemic immune response to oral vaccination is delayed compared with subcutaneous vaccination but that they may persist longer. Formulation N did not induce LTA responses above those seen with the non-vaccinated possums nor did it protect against aerosol challenge with *M. bovis* (see table 4) indicating that the type of lipid used to formulate oral BCG is important for protection against tuberculosis.

**Clinical findings.** The mean body weight changes between challenge and necropsy for the different groups are shown in Figure 6. The mean body weight of possums vaccinated with formulated BCG increased by 0.02 kg between the time of challenge and necropsy. In contrast, the mean body weights for the non-formulated BCG and non-vaccinated control groups decreased by 0.35 kg and 0.23 kg respectively during this period. However these differences were not statistically significant.

In a further experiment (table 4), which compared four oral lipid BCG formulations with subcutaneous vaccination, the mean body weight changes between challenge and necropsy were significantly reduced for the subcutaneous vaccination group (mean weight loss 0.012

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

kg) and one of the oral lipid BCG groups (group F) (0.035 kg) compared to the non-vaccinated group (0.147 kg). By comparison, the mean weight loss for the remaining oral BCG groups were 0,060 kg (lipid C), 0,067 kg (lipid K) and 0,122 kg (lipid N). Possums which did not show an immune response to vaccination (ie non-vaccinated and lipid N groups) showed greater body weight loss compared with those that responded.

**Pathology.** Macroscopic lesions were observed in the lungs of all of the challenged animals. The extent of tuberculous pneumonia can be estimated from the lung weights (Fig. 7). High lung weight is associated with extensive tuberculous pneumonia (3) (4). In order to standardise differences in lung weight with variation in body weight, the lung weight of each animal was compared with the body weight and expressed as a ratio. The ratio of mean lung weight to body weight of the animals vaccinated with formulated BCG was 1.62. By comparison the ratio of mean lung weight to body weight of the non-formulated BCG and non-vaccinated control groups were 2.86 and 3.0 respectively. The lung weight to body weight ratio of the possums vaccinated with formulated BCG was significantly different from the non-formulated BCG and non-vaccinated control groups ( $P<0.05$ ). Typically, the lung lesions were small consolidated areas or lobar consolidation with a yellow necrotic area in the centre of the lesion. Swollen bronchial lymph nodes were observed in animals with the most extensive lung lesions.

In the second experiment (Table 4) which compared four oral lipid BCG formulations with subcutaneous vaccination, there were no significant differences in the ratio of mean lung weight to body weight between the vaccination groups. However possums which did not show an immune response to vaccination (ie non-vaccinated and lipid N groups) had higher mean lung weights compared with those that responded.

#### **Bacteriology**

*Mycobacterium bovis* was isolated from the lung and spleens of the *M. bovis* challenged possums. The mean numbers of *M. bovis* isolated from the lungs and spleen for the different groups are shown in Figs 8 and 9. The mean lung bacterial counts for the non-formulated and formulated BCG groups were significantly lower than those for the non-vaccinated control group ( $P<0.05$ ). The mean spleen bacterial counts for the formulated BCG group were approximately 10-fold less than the non-formulated BCG group and approximately 40-fold less than the non-vaccinated control group. The mean spleen bacterial counts for the



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

formulated BCG group were significantly lower than those for non-formulated BCG and the non-vaccinated control groups ( $P < 0.05$ ).

In the second experiment which compared four oral lipid BCG formulations with subcutaneous vaccination (table 4), spleen bacterial counts for three of the orally vaccinated groups and the subcutaneously vaccinated group were significantly lower compared to the non-vaccinated group ( $P < 0.05$ ). The remaining oral lipid BCG group (lipid N) did not show significantly reduce bacterial spleen counts. No significant differences were seen between the groups when bacterial lung counts were compared. In general, possums which did not show an immune response to vaccination (ie non-vaccinated and lipid N groups) had higher mean bacterial spleen and lung counts compared with possums that had responded to vaccination.

**TABLE 1. Bovine PPD-stimulated spleen cell responses in mice 8 weeks after oral vaccination with different lipid formulations<sup>a</sup>**

Immunization	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	LTA (SI)
Formulation only	110.62 (+/-14.06)	51.44 (+/-14.38)	1.67 (+/-0.49)
Non formulated BCG	153.51 (+/-25.22)	65.10 (+/-20.05)	1.83 (+/-0.51)
Formulation C BCG	430.43* (+/-66.44)	2160.95* (+/-273.40)	16.26* (+/-1.20)
Formulation K BCG	230.23 (+/-54.13)	1268.30* (+/-76.80)	7.26* (+/-0.83)
Formulation N BCG	130.23 (+/-54.70)	75.50 (+/-16.80)	2.76 (+/-0.33)

15

<sup>a</sup>Represents a mean which is significantly different from the mean of non-vaccinated (Formulation only) control group. P value < 0.05 (Student *t* test)

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**TABLE 2. Effect of vaccination on protection of mice against aerosol challenge with *Mycobacterium bovis***

Vaccine Group	Lung bacterial count <sup>†</sup>	Log <sub>10</sub> resistance <sup>#</sup>	Spleen bacterial count	Log <sub>10</sub> resistance <sup>#</sup>
Non-vaccinated	5.837 <sup>a</sup> (±0.362)	NA	4.565 <sup>a</sup> (±0.189)	NA
Formulated Oral BCG	4.774 <sup>b</sup> (±0.270)	1.06	3.084 <sup>b</sup> (±0.176)	1.48
Subcutaneous BCG	3.498 <sup>c</sup> (±0.237)	2.34	2.660 <sup>b</sup> (±0.181)	1.90

<sup>†</sup> Values are log<sub>10</sub> numbers of CFU ± standard error of *M. bovis* from the lungs and spleen of 6 animals per group 37-40 days post-challenge.

5 <sup>#</sup> Data are expressed as levels of log<sub>10</sub> resistance calculated by subtracting the log<sub>10</sub> mean number of bacilli in the organs of vaccinated animals from the log<sub>10</sub> mean number of bacilli in the organs of non-vaccinated animals, NA-not applicable.

Figures in columns with the same superscript letter are not significantly different (P>0.05).

10 **TABLE 3. Number of possums responding to bovine PPD in the lymphocyte proliferation assay following oral vaccination.**

BCG formulation	Group size	Weeks after vaccination		
		0	4	6
Formulated BCG	5	0*	2	5
Non-formulated BCG	5	0	0	1
Control (no BCG)	6	0	0	0

\*No. of animals with stimulation index > 3.5

15

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

**TABLE 4. Pathological and microbiological findings for vaccinated possums challenged with *M. bovis***

Vaccine Group	Change in body weight/challenge weight <sup>a</sup>	Lung weight/PM body weight <sup>b</sup>	Lung bacterial count <sup>c</sup>	Spleen bacterial count <sup>c</sup>
Lipid C	-0.060 (±0.033)	22.54 (±2.63)	5.634 (±0.385)	1.301 * (±0.373)
Lipid K	-0.067 (±0.030)	15.49 (±2.12)	5.481 (±0.428)	1.321 * (±0.289)
Lipid N	-0.122 (±0.037)	23.47 (±2.85)	6.038 (±0.273)	2.200 (±0.498)
Lipid F	-0.035 * (±0.031)	16.28 (±4.11)	5.342 (±0.290)	0.934 * (±0.230)
sc BCG	-0.012 * (±0.055)	20.07 (±3.86)	5.384 (±0.427)	1.270 * (±0.309)
Non-vaccinated	-0.147 (±0.048)	24.10 (±3.50)	6.048 (±0.166)	2.553 (±0.465)

5

Change in body weight /challenge body weight: Lipid F, BCG &lt; Non-vaccinated (P&lt;0.05).

Spleen bacterial count: Lipid C, Lipid K, Lipid F, BCG &lt; Non-vaccinated; Lipid F &lt; Lipid N (P&lt;0.05).

- 10 <sup>a</sup> Change in body weight between post mortem and challenge (kg)/ body weight at challenge (kg)  
<sup>b</sup> Lung weight (g) / body weight at post mortem (kg).  
<sup>c</sup> Bacterial count, CFU log<sub>10</sub> / g of tissue.  
\* Significantly different to non-vaccinated group.

**INDUSTRIAL APPLICATION**

15

The antigenic composition includes a lipid formulation which maintains antigens in a stable matrix, through which they are uniformly dispersed. This facilitates administration of consistent doses of antigen, avoiding dose dumping and ineffective low dosing. The lipid formulation has also been shown by the applicants to improve storage and viability of live organisms contained therein. The lipid formulation also protects the antigens and live organisms from degradation by stomach acids and enzymes. Losses in viability of organisms in lipid based formulations are also significantly lower than those reported for freeze-dried products. Storage under humid or moist conditions can also be achieved without deterioration because of the hydrophobic properties of the formulation.

20

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

It has been demonstrated that the viability of organisms, particularly bacteria in vaccine preparations is important for inducing strong and long lasting protective immunity. This may be achieved using the compositions of the invention. The compositions are also simple to  
5 prepare, more affordable to produce, and find increased consumer acceptance and safety where the use of needles and syringes can be avoided.

The inventive compositions may be administered in a variety of ways including subcutaneously, but are particularly amenable to oral delivery. The applicants have found  
10 that the lipid formulation in the composition can protect viability of organisms and their constituent antigens against degradation in the stomach, which enables live organisms to be taken up through the gastrointestinal mucosa for processing, replication and presentation to the immune system. Moreover, the applicants have determined that the doses to be administered can be effective at doses lower than previously anticipated for oral delivery (8).

15 Vaccination of wildlife, such as possums requires antigens to be delivered by the mucosal route. Oral bait vaccines therefore represent a practical and cost effective delivery option. Oral vaccination of humans is also a more cost effective method of vaccination and likely to find favour with users.

20 When administered in other ways such as subcutaneously, the lipid formulation still provides protection from attack, for example, by macrophages. With subcutaneous administration, or administration by injection, the formulation of a lipid depot also allows sustained release to mimic the infection process, and facilitate the mounting of an immune response.

25 It will be appreciated that the compositions of the invention also provide substantial advantages over many higher cost, injectable vaccine formulations.

30 The compositions are effective to induce immune responses to a wide range of infectious organisms, including gastrointestinal and respiratory pathogens, and preferably tuberculosis.

The compositions of the invention may also be used as a vaccine delivery system for a wide range of antigens, or for the co-delivery or conjugated delivery of antigenic molecules, particularly those which for reasons of dose or antigenicity are poorly immunogenic. The  
35 compositions of the invention are also useful as vaccine adjuvants.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

It will further be appreciated by those persons skilled in the art that the present description is provided by way of example only and that the scope of the invention is not limited thereto.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

## REFERENCE LISTING

1. **Aldwell, F. E., D. L. Keen, V. C. Stent, A. Thomson, G. F. Yates, G. W. de Lisle, and B. M. Buddle.** 1995. Route of BCG administration in possums affects protection against bovine tuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal.* **43:**356-359.
2. **Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. M. Buddle.** 1996. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. *Immunol Cell Biol.* **74:**45-51.
3. **Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. N. Buddle.** 1997. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN- $\gamma$  and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. *Immunology and Cell Biology.* **75:**
4. **Buddle, B. M., F. E. Aldwell, D. L. Keen, N. A. Parlane, G. Yates, and G. W. de Lisle.** 1997. Intraduodenal vaccination of brushtail possums with bacille Calmette-Guerin enhances immune responses and protection against *Mycobacterium bovis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1:**377-83.
5. **Buddle, B. M., F. E. Aldwell, A. Pfeffer, and G. W. de Lisle.** 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): pathology, haematology and lymphocyte stimulation responses. *Vet Microbiol.* **38:**241-54.
6. **Daugelat, S., C. H. Ladel, and S. H. Kaufmann.** 1995. Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun.* **63:**2033-40.
7. **Gheorghiu, M., M. Lagranderie, and A. M. Balazuc.** 1996. Stabilisation of BCG vaccines. *New Approaches to Stabilisation of Vaccine Potency. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger.* **87:**251-261.
8. **Lagranderie, M., P. Chavarot, A. M. Balazuc, and G. Marchal.** 2000. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine.* **18:**1186-95.
9. **Masarova, J., Mislovicova, D., Gemeiner, P and Michalkova, E.** 2001. Stability enhancement of *Escherichia coli* penicillin G acylase by glycosylation with yeast mannan. *Biotechnol Appl Biochem* **34:**127-33
10. **Morrison, I. M. and Hawke, J. C.** 1979. Influence of elevated levels of linoleic acid on the thermal properties of bovine milk fat *Lipids* **14:** 391-4.

35

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

## CLAIMS

1. An antigenic composition comprising a lipid formulation and at least one antigenic component comprising live organisms.
- 5
2. A composition according to claim 1 wherein the lipid formulation is in solid form.
3. A composition according to claim 2 wherein the lipid formulation is in solid form at 10°C or above.
- 10
4. An antigenic composition comprising a lipid formulation in solid form at 10°C or above, and at least one antigenic component.
5. A composition according to claim 4 wherein the antigenic component is a protein, glycoprotein, peptide, or factor with a protein or peptide component or mixtures thereof.
- 15
6. A composition according to claim 4 wherein the antigenic component comprises live organisms.
- 20
7. A composition according to any one of claims 1 to 3, or 6 wherein the live organism is selected from the group consisting of fungi, protozoa, bacteria, and viruses.
8. A composition according to claim 7 wherein the virus is HIV or SIV.
- 25
9. A composition according to claim 8 wherein the bacteria is selected from *Brucella*, *Anthrax*, and *Mycobacterium*.
10. A composition according to claim 9 wherein the bacteria is *Mycobacterium*.
- 30
11. A composition according to claim 10 wherein the *Mycobacterium* is selected from *M. tuberculosis* complex (comprising *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microtii*), *M. avium-intracellulare* complex (comprising *M. intracellulare* and *M. avium*), *M. paratuberculosis*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. shimoidi*, *M. gastrii*, *M. terrae* complex, and *M. nonchromogenicum*, including
- 35

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

functionally equivalent variants, natural or genetically engineered clones, mutants, and recombinants of these strains, and antigenic components thereof.

12. A composition according to claim 11 wherein the *Mycobacterium* is *M. bovis*.

5

13. A composition according to claim 12 wherein the *M. bovis* is Bacille Calmette Geurin (BCG).

14. A composition according to any one of claim 1 to 13 which comprises at least two antigenic components.

10

15. A composition according to claim 14 wherein one antigenic component is a living organism and one antigenic component is a protein or peptide.

16. A composition according to claim 15 wherein the living organism is a *Mycobacterium*.

15

17. A composition according to claim 16 wherein the *Mycobacterium* is *M. bovis*.

18. A composition according to claim 17 wherein the *M. bovis* is BCG.

20

19. A composition according to any one of claims 15 to 18 wherein the protein is an immunocontraceptive protein.

20. A composition according to any one of claims 15 to 18 wherein the protein or peptide is poorly immunogenic.

25

21. A composition according to any one of claims 1 to 20 wherein the lipid formulation is in solid form at from about 10°C to 30°C.

22. A composition according to claim 21 wherein the lipid formulation is in solid form at from about 20°C to 30°C.

30

23. A composition according to any one of claims 1 to 22 wherein the lipid formulation undergoes solid to fluid transition between about 30°C to 37°C.

35



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

24. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation contains 40% to 100%, preferably 60% to 100%, preferably 80% to 100%, and more preferably 90% to 100% C<sub>16</sub> and/or C<sub>18</sub> fatty acids.
- 5 25. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation contains 10% to 40%, preferably 20% to 35%, and more preferably 25% to 32% C<sub>16</sub> fatty acids; and 40% to 90%, preferably 50% to 80%, and more preferably 60% to 70% C<sub>18</sub> fatty acids.
- 10 26. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation contains less than 35%, preferably less than 25%, and more preferably less than 10% C<sub>14</sub> fatty acids or shorter.
- 15 27. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation contains less than 5% C<sub>14</sub> fatty acids or shorter; 25% to 32% C<sub>16</sub> fatty acids; and 60% to 70% C<sub>18</sub> fatty acids.
- 20 28. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation contains:  
20% to 60% saturated fatty acids;  
25% to 60% monounsaturated fatty acids; and  
0.5% to 15% polyunsaturated fatty acids.
- 25 29. A composition according to claim 28 wherein the lipid formulation contains:  
30% to 55% saturated fatty acids;  
30% to 60% monounsaturated fatty acids; and  
3% to 11% polyunsaturated fatty acids.
- 30 30. A composition according to claim 29 wherein the lipid formulation contains:  
40% to 50% saturated fatty acids;  
40% to 55% monounsaturated fatty acids; and  
5% to 9% polyunsaturated fatty acids.

WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

31. A composition according to any one of claims 1 to 23 wherein the lipid formulation has the formula: 3% myristic acid; 26% palmitic acid; 15% stearic acid; 40% oleic acid; and 6% linoleic acid.
- 5 32. A composition according to any one of claims 1 to 31 which is essentially free of aqueous components.
33. A composition according to any one of claims 1 to 32 which is formulated for parenteral administration.
- 10 34. A composition according to claim 32 which is formulated for subcutaneous administration.
35. A composition according to any one of claims 1 to 32 which is formulated for oral administration.
- 15 36. A composition according to any one of claims 1 to 35 which is a vaccine.
37. A composition according to any one of claims 1 to 35 which is a vaccine adjuvant.
- 20 38. A method for immunising an animal, the method comprising administering to said animal a composition according to any one of claims 1 to 37.
39. A method for stimulating a mucosal immune response in an animal, the method comprising administering to said animal a composition according to any one of claims 1 to 37.
- 25 40. A method according to claim 38 or claim 39 wherein the administration is oral administration.
- 30 41. A method according to claim 38 or claim 39 wherein the administration is subcutaneous administration.

35

1/7

FIGURE 1

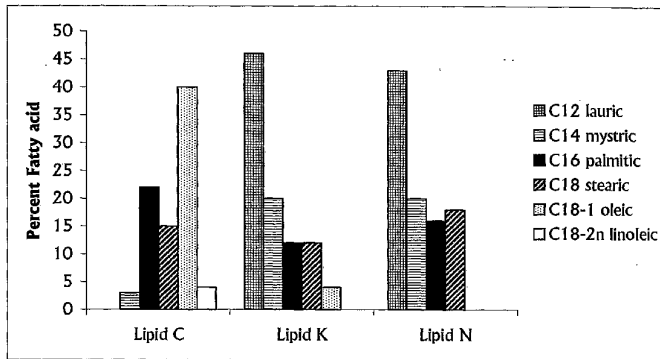
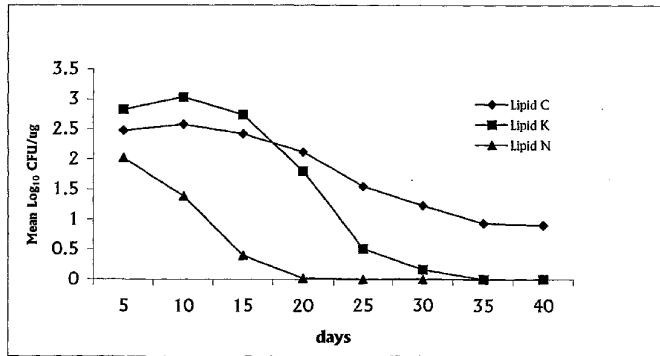


FIGURE 2a



2/7

FIGURE 2b

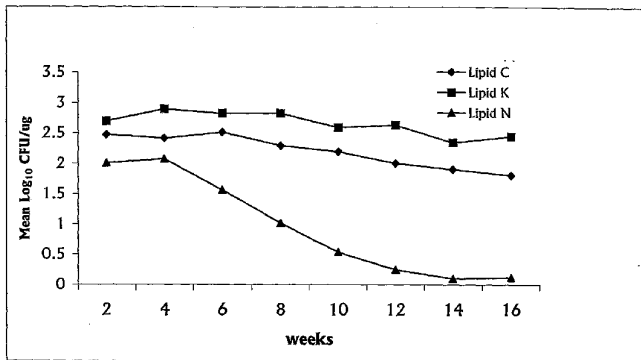
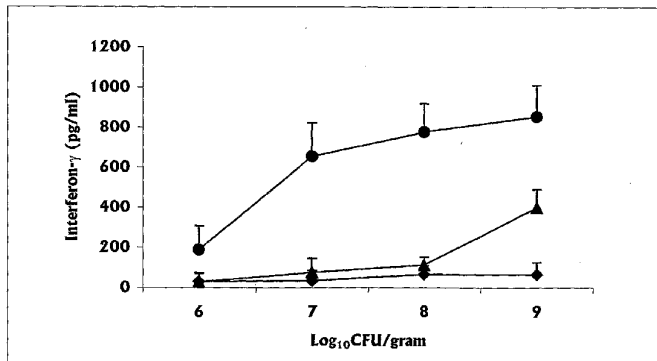


FIGURE 3



3/7

FIGURE 4

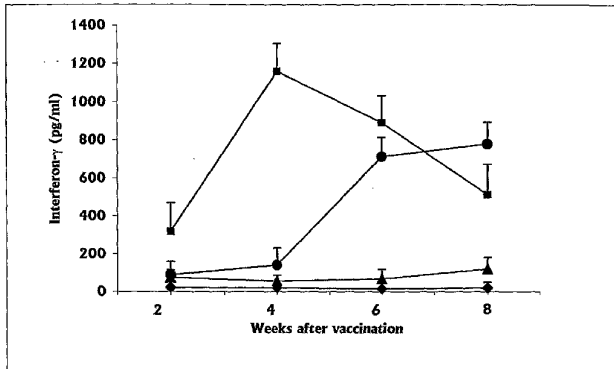
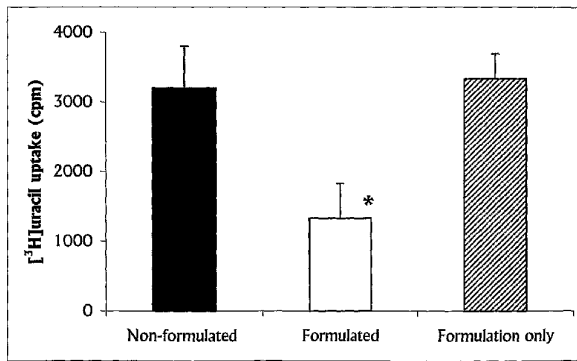


FIGURE 5



4/7

FIGURE 6

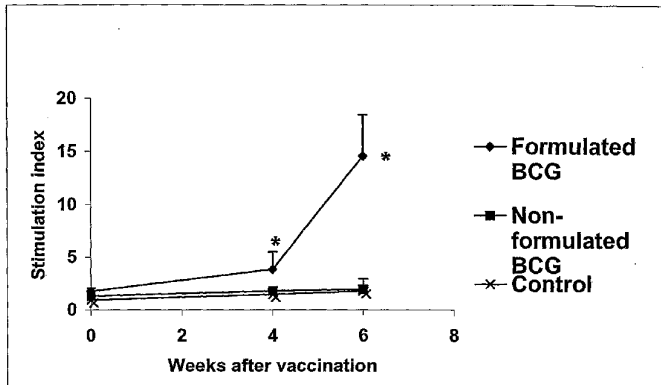
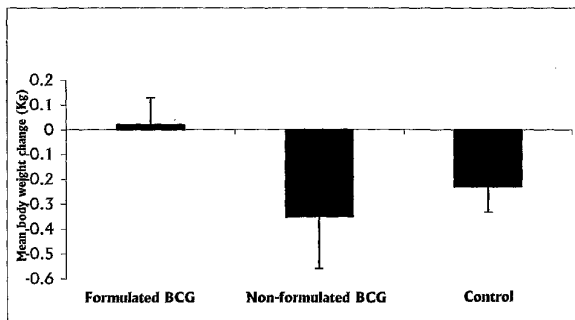


FIGURE 7



WO 03/009868

PCT/NZ02/00132

5/7

FIGURE 8

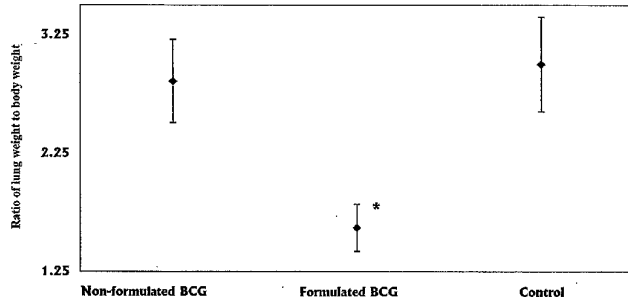


FIGURE 9

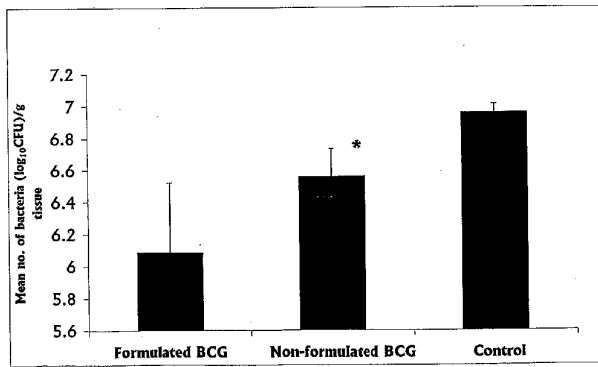


FIGURE 10

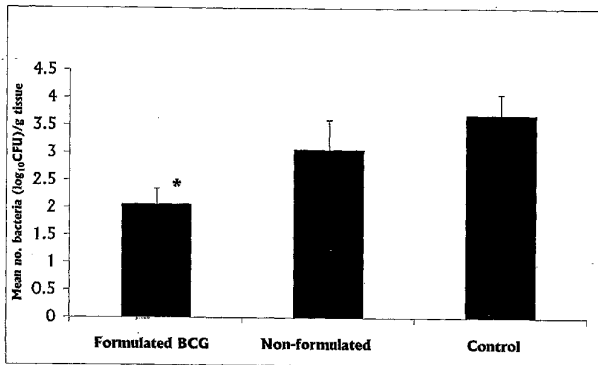


FIGURE 11

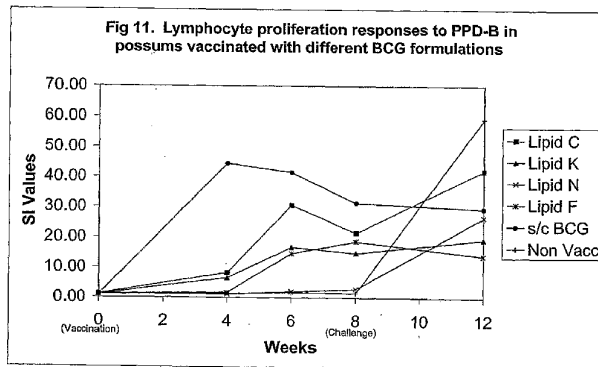
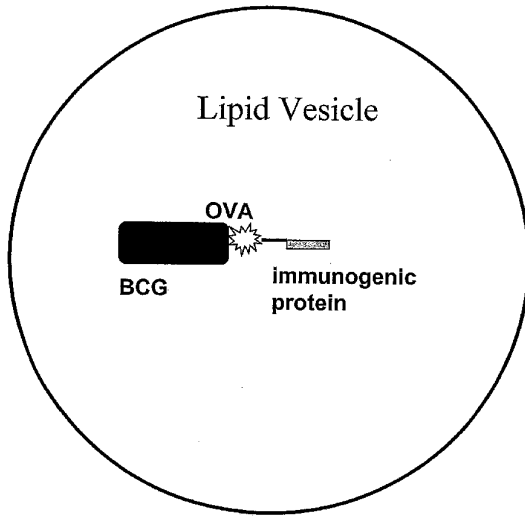




FIGURE 12



【手続補正書】

【提出日】平成15年5月7日(2003.5.7)

【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】

医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量の生きた微生物を含む少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなり、経口投与用に配合されている抗原性組成物。

【請求項2】

脂質配合物が固形である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

脂質配合物が約30 ~ 40 の間で固体から液体への転移を受ける、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

約30 ~ 40 の間で固体から液体への転移を受ける医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量で存在する少なくとも1種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物。

【請求項5】

抗原性成分が単離され及び/又は精製されたものである、請求項4に記載の抗原性組成物。

【請求項6】

抗原性成分がタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド成分を有する因子あるいはこれらの混合物である、請求項4または請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

非経口投与用に配合されている、請求項4~6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

皮下投与用に配合されている、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

経口投与用に配合されている、請求項4~6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

抗原性成分が生きた微生物を含む、請求項4または請求項5に記載の組成物。

【請求項11】

生きた微生物が生物学的に純粋な培養物である、請求項1~3のいずれか一項または請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

生きた微生物が菌類、原生動物、細菌類およびウイルス類からなる群より選択される、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】

ウイルスがHIVまたはSIVである、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

細菌がブルセラ属(Brucella)、炭疽菌(Anthrax)およびマイコバクテリウム(Mycobacterium)属より選択される、請求項12に記載の組成物。

【請求項15】

細菌がマイコバクテリウムである、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

マイコバクテリウムが、マイコバクテリウム・ツベロクロシス複合体(マイコバクテリウ

ム・ツベロクロシス (*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*)、マイコバクテリウム・アフリナム (*M. africanum*) およびマイコバクテリウム・ミクロティ (*M. microtii*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・アビウム - イントラセルラール複合体 (マイコバクテリウム・イントラセルラール (*M. intracellulare*) およびマイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*) を含んでなるもの)、マイコバクテリウム・パラツベロクロシス (*M. paratuberculosis*)、マイコバクテリウム・ワッカ (*M. vaccae*)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*M. smegmatis*)、マイコバクテリウム・チェロナ (*M. chelonae*)、マイコバクテリウム・フォーチュイタム (*M. fortuitum*)、マイコバクテリウム・カンサイ (*M. kansaii*)、マイコバクテリウム・レブラ (*M. leprae*)、マイコバクテリウム・マリナム (*M. marinum*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*M. ulcerans*)、マイコバクテリウム・シミア (*M. simiae*)、マイコバクテリウム・ハエモフィラム (*M. haemophilum*)、マイコバクテリウム・マルモエンス (*M. malmoense*)、マイコバクテリウム・シモイデイ (*M. shimoidei*)、マイコバクテリウム・ガストリ (*M. gastri*)、マイコバクテリウム・テラ (*M. terrae*) 複合体、およびマイコバクテリウム・ノンクロモゲンニカム (*M. nonchromogenicum*)、ならびにこれらの菌株の機能的に等価な変異株、天然または遺伝子工学による純株、突然変異株および組換え体、およびこれらの抗原性成分より選択される、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

マイコバクテリウムがマイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*) である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

マイコバクテリウム・ボービスがカルメット・ゲラン桿菌 (*Bacille Calmette Guerin*) (BCG) である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

少なくとも 2 種の抗原性成分を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

一方の抗原性成分が生きた微生物であり、一方の抗原性成分がタンパク質またはペプチドである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

生きた微生物がマイコバクテリウムである、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

マイコバクテリウムがマイコバクテリウム・ボービス (*M. bovis*) である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

マイコバクテリウム・ボービスが BCG である、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

タンパク質が免疫避妊性タンパク質である、請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

タンパク質またはペプチドが低い免疫原性である、請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

脂質配合物が約 30 ~ 37 の間で固体から液体への転移を受ける、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

脂質配合物が 40 ~ 100%、好ましくは 60 ~ 100%、好ましくは 80% ~ 100%、そして一層好ましくは 90 ~ 100% の C<sub>16</sub> および / または C<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

脂質配合物が 10% ~ 40%、好ましくは 20% ~ 35%、そしてより好ましくは 25%

～ 32%のC<sub>16</sub> 脂肪酸；および40%～90%、好ましくは50%～80%、そしてより好ましくは60%～70%のC<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

脂質配合物が35%未満、好ましくは25%未満、そしてより好ましくは10%未満のC<sub>14</sub> 又はより短鎖の脂肪酸を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

脂質配合物が5%未満のC<sub>14</sub> 又はより短鎖の脂肪酸、25%～32%のC<sub>16</sub> 脂肪酸、および60%～70%のC<sub>18</sub> 脂肪酸を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項31】

脂質配合物が：

20%～60%の飽和脂肪酸；

25%～60%の一不飽和脂肪酸；および

0.5%～15%の多不飽和脂肪酸

を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項32】

脂質配合物が：

30%～55%の飽和脂肪酸；

30%～60%の一不飽和脂肪酸；および

3%～11%の多不飽和脂肪酸

を含む、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

脂質配合物が：

40%～50%の飽和脂肪酸；

40%～55%の一不飽和脂肪酸；および

5%～9%の多不飽和脂肪酸

を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

脂質配合物が次の配合：

3%ミリスチン酸；26%パルミチン酸；15%ステアリン酸；40%オレイン酸；および6%リノール酸を有する、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項35】

水性成分を実質的に含まない、請求項1～34のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項36】

実質的に脂質からなる、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項37】

アルブミン・デキストロース・カタラーゼ(ADC)を更に含む、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項38】

ワクチンである、請求項1～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項39】

ワクチンアジュバントである、請求項1～38のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項40】

動物を免疫化するための方法であって、前記動物に対して請求項1～39のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含んでなる方法。

【請求項41】

動物の粘膜免疫反応を刺激するための方法であって、前記動物に対して請求項1～39のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含んでなる方法。

【請求項42】

投与が経口投与であり、該組成物が経口投与用に配合されている、請求項 4 0 または請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

投与が皮下投与であり、該組成物が皮下投与用に配合されている、請求項 4 0 または請求項 4 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

従って、一つの態様において本発明は、医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量の生きた微生物を含む少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなり、経口投与用に配合されている抗原性組成物を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 0】

別の態様において本発明は、固形であって約 3 0 ~ 4 0 の間で固体から液体への転移を受ける医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量で存在する少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 8】

1 つの実施態様において、抗原性成分は生きた微生物を含む。好ましくは、生物学的に純粋な培養物として含む。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 6】

従って、第 1 の態様において本発明は、医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量の生きた微生物を含む少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなり、経口投与用に配合されている抗原性組成物を提供する。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 8】

別の態様において本発明は、固形であって約 3 0 ~ 4 0 の間で固体から液体への転移を受ける医薬として許容される脂質配合物と、抗原として有効量で存在する少なくとも 1 種の抗原性成分とを含んでなる抗原性組成物を提供する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

上記配合物に用いられる脂質は、動物またはヒトの消費を含む投与のために適していることが好ましく、広範囲の天然（植物および動物由来）または合成の脂質生成物、例えば油、脂肪およびワックスより選択してよい。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

ここで使用するために好適な脂質は、約30 と約40、一般には37の生理学的温度との間で固相から液相への転移を受ける。脂質相の挙動の概説が当該技術分野で利用可能であり、例えば(10)を参照。従って、当業者は当該技術分野における情報および簡単な実験に基づいて、所望の特性および融点を有する脂質を選択することができる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

抗原性成分は、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド成分を有する因子、好ましくは単離され及び/又は精製されたもの、あるいはこれらの混合物であってよい。抗原性成分は、動物における免疫反応を生じさせるために使用し得る物質に由来してよい。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

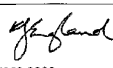
【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

好ましくは、抗原性成分は生きた微生物、好ましくは生物学的に純粋な培養物である。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ02/00132
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <sup>7</sup> : A61K 39/04, 39/21, 39/002, 47/44, 47/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC AS ABOVE		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC AS ABOVE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, World Patent Index: antigen, vaccin*, lipid, fat, oil; HIV, SIV, bruceella, anthrax, mycobacterium; live		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93/16728 A1 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 2 September 1993. See the Examples and claims 8 to 14.	1, 7, 9, 14, 15, 31, 36-39
X	WO 94/16681 A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES, S.E.P.P.I.C) 4 August 1994. See page 4 lines 12 to 38 and the claims.	1, 7, 15, 31, 33, 34, 36-39.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 September 2002		Date of mailing of the international search report - 2 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer K.G. ENGLAND  Telephone No.: (02) 6283 2292

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ02/00132
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Griffin, J.F.T et al, "Vaccine protocols to optimise the protective efficacy of BCG". Tubercle and Lung Diseases Vol 79 No 3, pages 135-143 (1999)	1, 7, 9, 10-13, 33, 34, 36-39, 41
X	Saxegaard, F et al, "Control of paratuberculosis (Johne's Disease) in goats by vaccination" The Veterinary Record Vol 116, No 16 pages 439-441 (20 April 1985)	1, 7, 9-11, 31, 33, 34, 36-38, 41
X	Griffin, J.F.T et al, "BCG vaccination in deer: Distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity". Immunology and Cell Biology Vol 71 pages 559-570 (1993)	1, 7, 9-13, 31, 33, 34, 36-39, 41



INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/NZ02/00132

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO 9316728	AU 37778/93	BR 9305970	EP 627935		
	US 5718903	AU 15732/88	CA 1337269		
	EP 357642	GB 2227936	NZ 224065		
	WO 8807374				
WO 9416681	EP 681470	FR 2700957			

END OF ANNEX

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21	
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 47/12	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/44	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 33/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EC,EE,ES,FI, GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 503012247  
 アグリサーチ リミティド  
 ニュージーランド国,ハミルトン,イースト ストリート,ルアクラ リサーチ センター,タワ  
 ー ブロック フィフス フロア

(74)代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤

(74)代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100129517  
 弁理士 栗田 博道

(74)代理人 100082898  
 弁理士 西山 雅也

(72)発明者 オルドウェル,フランク アーネスト  
 ニュージーランド国,ダニーディン,ロンドン ストリート 80ビー

(72)発明者 バドル,ブライス マルコム  
 ニュージーランド国,アッパー ハット,シェリダン クレセント 34

(72)発明者 タッカー,イアン ジョージ  
 ニュージーランド国,ダニーディン,ポートベロ ロード 211

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB01 BB16 CC06 DD45 EE52 EE53 FF68  
 4C085 AA03 AA38 BA02 BA07 BA09 BA17 BA51 BA69 BA78 BB11  
 CC07 CC08 CC21 EE01 EE06 FF13 FF19 GG04 GG08