

(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2012-517979

(P2012-517979A)

(43) 公表日 平成24年8月9日(2012.8.9)

| (51) Int. Cl.                  | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/12 | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/39 |             |
| <b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b> | A 6 1 P 31/12 |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2011-549593 (P2011-549593) | (71) 出願人 | 305060279<br>グラクソスミスクライン バイオロジカル<br>ズ ソシエテ アノニム<br>ベルギー ベー-1330 リクセンサー<br>ル リュ ドランスティテュ 89 |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年2月16日 (2010. 2. 16)     | (74) 代理人 | 100117787<br>弁理士 勝沼 宏仁   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成23年10月7日 (2011. 10. 7)     | (74) 代理人 | 100091487<br>弁理士 中村 行孝   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2010/051882            | (74) 代理人 | 100107342<br>弁理士 横田 修孝   |
| (87) 国際公開番号   | W02010/094663                | (74) 代理人 | 100111730<br>弁理士 伊藤 武泰   |
| (87) 国際公開日    | 平成22年8月26日 (2010. 8. 26)     | (74) 代理人 | 100126099<br>弁理士 反町 洋  |
| (31) 優先権主張番号  | 61/153, 060                  |          |  |
| (32) 優先日      | 平成21年2月17日 (2009. 2. 17)     |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルミニウム不含アジュバントを添加した不活化 Deng 熱ウイルスワクチン

(57) 【要約】

本開示は、 Deng 熱ウイルスが原因の疾患の予防および / または治療のための免疫原性組成物を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 つの不活化 Deng 熱ウイルス抗原およびアルミニウム不含アジュバントを含む、免疫原性組成物。

## 【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの不活化 Deng 熱ウイルス抗原が、Deng 1 型ウイルス抗原、Deng 2 型ウイルス抗原、Deng 3 型ウイルス抗原および Deng 4 型ウイルス抗原からなる群から選択される、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの不活化 Deng 熱ウイルス抗原が Deng 熱 2 型ウイルス抗原である、請求項 1 または 2 に記載の免疫原性組成物。 10

## 【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの不活化 Deng 熱ウイルス抗原が完全に死滅したウイルスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 5】

前記アジュバントが水中油型乳剤を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 6】

前記アジュバントが、代謝可能油、トコールおよび乳化剤を含む水中油型乳剤キャリアを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 20

## 【請求項 7】

前記代謝可能油がスクアレンである、請求項 5 または 6 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 8】

前記トコロールが トコフェロールである、請求項 6 または 7 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 9】

前記乳剤が非イオン性界面活性剤乳化剤を含む、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 10】

前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートである、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。 30

## 【請求項 11】

スクアレンおよび トコフェロールを 1 以下の比率で含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 12】

前記アジュバントが、  
約 2 % ~ 約 10 % のスクアレン、  
約 2 % ~ 約 10 % の トコフェロール、  
約 0.3 % ~ 約 3 % のポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートを含む用量に処方されてなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 40

## 【請求項 13】

前記アジュバントが、  
約 10 mg ~ 約 12 mg のスクアレン、  
約 10 mg ~ 約 12 mg の トコフェロール、  
約 4 mg ~ 約 6 mg のポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエート  
を含む用量に処方されてなる、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 14】

前記アジュバントが、  
10.68 mg のスクアレン、  
11.86 mg のトコフェロール、

4.85 mg のポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートを含む用量に処方されてなる、請求項 12 または 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記アジュバントが分割量で処方されてなる、請求項 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

前記アジュバントが 3 - 脱アシル化モノホスホリルリピド A (3D-MPL) および QS21 の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

前記アジュバントが 3D-MPL および QS21 をリポソーム製剤として含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

前記アジュバントがさらにコレステロールを含む、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

前記アジュバントがさらに 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) を含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

前記アジュバントがコレステロール、DOPC、3D-MPL および QS21 を含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

前記アジュバントが、  
 約 0.1 ~ 約 0.5 mg のコレステロール、  
 約 0.25 ~ 約 2 mg の DOPC、  
 約 10 µg ~ 約 100 µg の 3D-MPL、および  
 約 10 µg ~ 約 100 µg の QS21  
 を含む用量で処方されてなる、請求項 20 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

コレステロールの QS21 に対する比率が 5 : 1 (w/w) である、請求項 16 ~ 21 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 23】

コレステロールの QS21 に対する比率が 1 : 1 (w/w) である、請求項 16 ~ 21 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

前記アジュバントが、  
 約 0.25 mg のコレステロール、  
 約 1.0 mg の DOPC、  
 約 50 µg の 3D-MPL、および  
 約 50 µg の QS21  
 を含む用量で処方されてなる、請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

前記アジュバントが QS21 およびコレステロールを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 26】

Dengue 熱ワクチンを製造する方法であって、  
 少なくとも 1 つの精製不活化 Dengue 熱ウイルス抗原を用意し、かつ、  
 少なくとも 1 つの精製不活化 Dengue 熱ウイルス抗原をアルミニウム不含アジュバントと共に処方すること  
 を含む、方法。

【請求項 27】

少なくとも 1 つの精製不活化 Dengue 熱ウイルス抗原が、ホルムアルデヒド、ベタプロピ

10

20

30

40

50

オラクトン（BPL）、過酸化水素、紫外線照射および 線照射の群から選択される作用因子に生のウイルスを接触または露出させる1つまたは複数の工程により不活化されてなる完全に死滅したウイルスである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

患者の Dengue 熱ウイルスによる疾患を予防、改善または治療する方法であって、請求項1～25のいずれか一項に記載の免疫原性組成物をその患者に投与することを含む、方法。

【請求項29】

患者が5才未満である、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

患者が1才未満である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記ワクチンが非経口で投与される、請求項27または29に記載の方法。

【請求項32】

医薬として用いるための、請求項1～25のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2009年2月17日出願の米国仮出願第61/153060号の出願日遡及の特典を主張し、参照によりその開示を本明細書に包含する。

【背景技術】

【0002】

Dengue 熱はヒトの急性ウイルス性疾患で、蚊を通じて伝染する。これは世界中の熱帯地方と亜熱帯地方の風土病であり、年間100,000,000件の症例が発生していると推定されている。比較的希な症状であるが、Dengue 熱出血熱（DHF）と Dengue 熱性ショック症候群（DSS）は、小児の死亡の大きな原因である。現在、Dengue 熱に対して防御するワクチンは存在せず、蚊ベクターを規制して疾患を予防する試みは概して有効ではないことがわかってきた。このように、Dengue 熱ウイルスによって引き起こされる疾患を防御できる安全で効果的なワクチンの必要性は未だ残されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本開示は、Dengue 熱ウイルスに対し免疫応答を誘発する組成物に関する。さらに具体的には、本開示はアジュバントを含む不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンに関する。本明細書で開示の組成物は、アルミニウム不含有アジュバント、例えば、Th1免疫応答を促進可能なアルミニウム不含有アジュバント、を含む。本開示には、これらの使用方法、例えば、薬剤の処方方法、Dengue 熱ウイルスによる疾患の治療の予防方法も記載されている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の詳細な説明

緒言

本発明は、安全で有効な Dengue 熱ワクチンに対する要求を満たすワクチンに関する。精製不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンは弱毒化生 Dengue 熱ウイルスに比べ大きな利点がある。不活化ウイルスは感染力を持たず、そのため病原性に戻ることはなく、あるいは疾患の原因となることもあり得ないからである。弱毒化生 Dengue 熱ウイルスに比べ精製不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンの1つの欠点は、高い力価の Dengue 熱特異的中和抗体を誘導する能力が低く、防御免疫応答期間が比較的短い可能性があることである。これらの欠点は、適切なアジュバントを加えた精製不活化 Dengue 熱抗原の製剤により克服される。本明細書で開示されているように、アジュバントは、アルミニウム不含有（alum-free）アジ

10

20

30

40

50

ュバント（またはアジュバント系）で、高い力価の Dengue 熱特異的中和抗体を効果的に誘発する。一実施形態では、アジュバントは主に Th 1 応答またはインターフェロン（IFN）の製造に特徴付けられる均衡した Th 1 / Th 2 応答を誘発する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】未処置 C57BL / 6 マウスの抗 Dengue 2 型中和抗体価を示す棒グラフ。

【図2】未処置 C57BL / 6 マウスの抗 Dengue 2 型中和抗体価を示す棒グラフ。

【図3】未処置 C57BL / 6 マウスの抗 Dengue 2 型中和抗体価を示す棒グラフ。

【図4】末梢血細胞中の細胞内サイトカイン染色による細胞性免疫応答特性を示す棒グラフ。

10

【発明を実施するための形態】

【0006】

本明細書で開示された免疫原性組成物は、アルミニウム不含アジュバントと組み合わせ、少なくとも1つの（すなわち、1つまたは2つ以上の）不活化 Dengue 熱ウイルス抗原を含む。不活化 Dengue 熱ウイルス抗原は、Dengue 1 型ウイルス抗原、Dengue 2 型ウイルス抗原、Dengue 3 型ウイルス抗原および Dengue 4 型ウイルス抗原から選択可能である。従って免疫原性組成物は、Dengue 1 型、Dengue 2 型、Dengue 3 型または Dengue 4 型から選択された単一株由来の単一不活化 Dengue 熱ウイルス抗原を含む一価組成物であっても、またはこれら Dengue 熱ウイルス株の2つ以上の不活化抗原を含む多価（例えば、二価、三価、四価）組成物であってもよい。1つの代表的実施形態では、免疫原性組成物は Dengue 2 型ウイルス抗原を含む。例えば、免疫原性組成物は不活化 Dengue 2 型抗原を含む一価組成物であってもよい。あるいは、免疫原性組成物は二価、三価または四価の組成物であって、1つ、2つまたは3つの追加の不活化 Dengue 熱ウイルス抗原と組み合わせ不活化 Dengue 2 型ウイルス抗原を含んでもよい。例えば、一実施形態では、組成物は四価の組成物であり、不活化 Dengue 1 型ウイルス抗原、不活化 Dengue 2 型ウイルス抗原、不活化 Dengue 3 型ウイルス抗原および不活化 Dengue 4 型ウイルス抗原を含む。

20

【0007】

1つまたは複数の不活化 Dengue 熱ウイルス抗原がアルミニウムまたはアルミニウム塩不含アジュバント、すなわち、アルミニウム不含アジュバントまたはアジュバント系を加えて処方される。一実施形態では、アジュバントは水中油型乳剤を含む。例えば、水中油型乳剤には、代謝可能油を包含する油相を含んでもよく、また任意選択としてトコロールのような追加の油相成分を含んでもよい。また、水中油型乳剤は、緩衝生理食塩水（例えば、リン酸塩緩衝食塩水）のような水性成分も含む。さらに、水中油型乳剤は、通常、乳化剤を含む。一実施形態では、代謝可能油はスクアレンである。一実施形態では、トコロールはトコフェロールである。一実施形態では、乳化剤は非イオン性界面活性剤乳化剤（ポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエート、TWEEN 80（商標）、等）である。代表的実施形態では、水中油型乳剤はスクアレンと トコフェロールを含み、その比率は 1 (w/w) 以下である。

30

【0008】

1つの具体的な例では、免疫原性組成物は、水中油型乳剤アジュバント系を含み、これは、約2%～約10%のスクアレン、約2%～約10%の トコフェロール、および約0.3%～約3%のポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートを含む用量に処方されている。例えば、免疫原性組成物は、約10mg～約12mgのスクアレン、約10mg～約12mgの トコフェロール、および約4mg～約6mgのポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートを含む用量に処方されたアジュバント含んでもよい。1つの具体的な例では、アジュバントは一回（全）用量中に、10.68mgのスクアレン、11.86mgのトコフェロール、4.85mgのポリオキシエチレン ソルビタン モノオレエートを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は前出の成分量の分割量（すなわち、前出の組成物の一回用量処方分率、例えば、前出の成分量の半分、前出の成分量の1/4または1/3、1/6等の他の分率）で処方される。

40

50

## 【0009】

特定の実施形態では、不活化 Deng 熱ウイルス抗原は、3-脱アシル化モノホスホリルリピド A (3D-MPL) および/または QS21 を含むアルミニウム不含アジュバント系を添加して処方される。一実施形態では、アジュバント系は、3D-MPL および QS21 を含む。例えば、一実施形態では、アジュバントは 3D-MPL および QS21 をリポソーム製剤中に含む。任意選択として、アジュバント系はコレステロールを含んでもよい。一具体的実施形態では、アジュバントは QS21 とコレステロールを含有する。任意選択として、アジュバント系は、1、2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)を含んでもよい。例えば、不活化 Deng 熱ウイルス抗原に添加して処方される1つの具体的なアジュバント系としては、コレステロール、DOPC、3D-MPL および QS21 がある。

10

## 【0010】

1つの具体的な例では、免疫原性組成物は、約0.1~約0.5mgのコレステロール、約0.25~約2mgのDOPC、約10 $\mu$ g~約100 $\mu$ gの3D-MPL、および約10 $\mu$ g~約100 $\mu$ gのQS21を含む用量に処方されたアジュバントを含む。一実施形態では、アジュバント中のコレステロールとQS21の比は、5:1(w/w)である。例えば、アジュバント中のコレステロールとQS21の比は、およそまたは正確に1:1(w/w)であってもよい。1つの具体的処方では、約0.25mgのコレステロール、約1.0mgのDOPC、約50 $\mu$ gの3D-MPL、および約50 $\mu$ gのQS21を含む一回用量に処方される。他の実施形態では、免疫原性組成物は前出の成分量の分割量(すなわち、前出の組成物の一回用量処方の分率、例えば、前出の成分(DOPC、3D-MPL および QS21)の量の半分、前出の成分の量の1/4または1/3、1/6等の他の分率)で処方される。

20

## 【0011】

別の態様では、本開示は Deng 熱ワクチンを製造するための、次の工程を含む方法に関する。すなわち、少なくとも1つの精製不活化 Deng 熱ウイルス抗原を提供する工程、および少なくとも1つの精製不活化 Deng 熱ウイルス抗原にアルミニウム不含アジュバントを加えて処方する工程である。例えば、免疫原性組成物は、不活化または死滅させた病原性または弱毒化株から製造した全ウイルス抗原を用いて処方可能である。例えば、ホルムアルデヒド、ベタプロピオラクトン(BPL)、もしくは過酸化水素、等の化学薬品を用いて、または紫外線照射を用いて、または2つ以上の不活化工程の組み合わせ(同じ種類であっても、異なるものであってもよく、例えば、ホルムアルデヒドとBPL、ホルムアルデヒドとUV照射、BPLとUV照射、過酸化水素とUV照射等任意の組み合わせ)を使って、生の(病原性または弱毒化)ウイルスを死滅または不活化させ、複製不能にすることができる。任意選択として、不活化 Deng 熱ウイルスは、抗原サブユニットの分割または追加精製のような追加処理に供してもよい。

30

## 【0012】

別の態様では、本開示は Deng 熱ウイルスによる患者の疾患を予防、改善または治療する方法に関し、この方法は、アルミニウム不含アジュバント(本明細書記載のように)と組み合わせて少なくとも1つの不活化 Deng 熱ウイルス抗原を含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)を投与することを含む。一実施形態では、この方法は、免疫原性組成物を小児、例えば、5歳未満または1歳未満の小児、に投与することを含む。一実施形態では、免疫原性組成物は1歳未満の未処置患者に投与される。他の実施形態では、免疫原性組成物は成人患者、例えば、約60または65才を越える高齢患者、に投与される。このような患者は以前に Deng 熱ウイルスに接触した可能性がある。通常、ワクチンは、非経口で、例えば、筋肉内に、投与される。別の態様では、本開示は、Deng 熱ウイルス感染および/または Deng 熱ウイルス誘導疾患、例えば、出血熱(DHF)や Deng 熱性ショック症候群(DSS)の予防、改善または治療のため、医薬品に使用する目的でアルミニウム不含アジュバントと組み合わせて使用される、少なくとも1つの精製不活化 Deng 熱ウイルス抗原を含む免疫原性組成物に関する。

40

50

## 【 0 0 1 3 】

## 用語

本開示の様々な実施形態の検討を容易にするため、次に用語の説明を行う。追加の用語と説明は、本開示の中で提供される。

## 【 0 0 1 4 】

他に説明がなければ、本明細書で使われている全ての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。分子生物学における共通用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) に記載されている。

10

## 【 0 0 1 5 】

単数形用語「a」、「an」および「the」は、文脈から明確に別義が示されていないければ、複数の指示対象を含む。同様に、文脈から明確に別義が示されていないければ、単語「または (or)」は「および (and)」を含むことが意図される。用語「複数 (plurality)」は2つ以上を意味する。さらに、核酸またはポリペプチドの塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値は近似値であり、説明のために用意されている点は理解されるべきである。また、抗原等の物質の濃度やレベルに関して与えられている数値限定は近似値であることが意図されている。従って、濃度が少なくとも (例えば) 200 pg と示されている場合は、その濃度は少なくとも約 (approximately) (または「約 (about)」または「~」) 200 pg であると理解されることが意図されている。

20

## 【 0 0 1 6 】

本明細書記載のものと同様の方法と材料を本開示の実践または試験に使用するのとは可能であるが、適切な方法と材料は以下に記載する。用語「含む (comprises)」は「含む (includes)」を意味する。従って、文脈から明確に別義が示されていないければ、単語「comprise」およびその変化形、例えば、「comprise」および「comprising」は表明された化合物もしくは組成物 (例えば、核酸、ポリペプチド、抗原) もしくは工程、または化合物群もしくは工程群を包含するが、他の任意の化合物、組成物、工程、またはこれらの群を排除しないことを意味すると理解されるべきである。省略形「e.g.」はラテン語の「例えば (exempli gratia)」からきたもので、本明細書では非限定的例を示すために使われる。従って、省略形「e.g.」は、「例えば (for example)」と同義である。

30

## 【 0 0 1 7 】

免疫原性組成物はヒトの患者または実験動物 (例えば、実験的設定の場合) への投与に適した、 Dengue 熱ウイルス等の病原体などに対して特異的免疫応答を誘発することが可能な物質の組成物である。免疫原性組成物それ自体は、1つまたは複数の抗原 (例えば、全精製ウイルスまたはその抗原サブユニット、例えば、ポリペプチド) または抗原エピトープを含む。また、免疫原性組成物は、免疫応答を誘発または促進することができる1つまたは複数の追加の成分、例えば、賦形剤、キャリアおよび/またはアジュバント、を含むことも可能である。特定の例では、免疫原性組成物を投与して、病原体により誘導された症状または病状に対して患者を防御する免疫応答を誘発する。いくつかの例では、病原体が原因の症状または疾患は、患者を病原体 (例えば、 Dengue 熱ウイルス) に曝した後、その病原体の複製を抑制することにより予防 (または治療、例えば、減弱または改善) される。本開示中では、免疫原性組成物という用語は、 Dengue 熱に対する防御的または緩和的免疫応答を誘発する目的で患者または患者集団へ投与される組成物 (すなわち、ワクチン組成物またはワクチン) を包含すると理解されるべきである。

40

## 【 0 0 1 8 】

50

用語「精製 ( purification )」(例えば、病原体または病原体を含む組成物に関して)は、組成物から望ましくない成分を除去するプロセスを指す。精製は相対的な用語で、望ましくない成分の全痕跡を組成物から除くことを要求するものではない。ワクチン製造に関連する精製には、遠心分離、透析、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティー精製法または親和沈殿法等のプロセスがある。従って、用語「精製された ( purified )」は、絶対的純度を意味するのではなく、むしろ相対的な用語としての使用が意図されている。従って例えば、精製ウイルスの調製は、ウイルスがその発生環境、例えば、自然または人工環境下そのウイルスが複製された細胞または細胞集団中、にある場合よりもより濃縮されているプロセスである。実質的に純粋なウイルスの調製は、所望のウイルスまたはウイルス成分が、調製物の全タンパク質の少なくとも50%であるように精製することであってもよい。特定の実施形態では、実質的に純粋なウイルスは、調製物の全タンパク質の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%以上を意味する。

10

20

30

40

50

#### 【0019】

「単離された ( isolated )」生物学的成分(例えば、ウイルス、核酸分子、タンパク質または細胞器官)は、その成分が発生した、または製造された細胞および/または生命体中の他の生物学的成分から実質的に分離または精製されている。「単離された」ウイルスおよびウイルス成分、例えば、タンパク質には、標準的精製法で精製されたウイルスおよびタンパク質が含まれる。また、この用語は、宿主細胞中で組換え発現により調製されたウイルスおよびウイルス成分(ウイルスタンパク質など)を含む。

#### 【0020】

「抗原」は、動物中で抗体の製造および/またはT細胞応答を促進することができる化合物、組成物または物質で、注入、吸収または他の方法で動物に導入された組成物を含む。用語「抗原」は、全ての関連する抗原エピトープを含む。用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、Bおよび/またはT細胞が反応する抗原上の部位を指す。「優性抗原エピトープ」または「優性エピトープ」は、機能的に重要な宿主免疫応答、例えば、抗体応答またはT細胞応答がなされるエピトープである。従って、病原体に対する防御免疫応答に関しては、優性抗原エピトープはこれらの抗原性部分であり、これが宿主免疫系により認識されると、病原体が原因の疾患に対して保護が提供される。用語「T細胞エピトープ」は、適切なMHC分子に結合するとT細胞により特異的に結合(T細胞受容体経由)されるエピトープを指す。「B細胞エピトープ」は、抗体(または、B細胞受容体分子)に特異的に結合されるエピトープである。

#### 【0021】

本開示では、デング熱ウイルス抗原は、通常、完全に死滅したまたは不活化したウイルスである。デング熱ウイルスワクチンに関して、用語「不活化した ( inactivated )」は、抗原成分(例えば、ウイルス)がインビボまたはインビトロで複製不能であることを意味する。例えば、用語「不活化した」は、インビトロ等で複製され、次いで化学的または物理的手段を使ってもはや複製できないように死滅させられたウイルスを包含する。また、この用語は追加のプロセス(例えば、分割、分画等)により製造された抗原、および組換え法、例えば、細胞培養中の組換え法により製造された成分を含む。

#### 【0022】

「アジュバント」は、この薬剤が無い場合に比較して抗原特異的免疫応答の製造を促進する薬剤である。通常のアジュバントは、アルミニウム含有アジュバントを含み、これは無機質(または無機質塩、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、アルミニウムヒドロキシホスファート)の懸濁物を含み、この無機質の上に抗原が吸着される。本開示では、アジュバントはalum(アルミニウム)不含アジュバントで、前述のようないずれのアルミニウム塩も存在しない状態で処方される。アルミニウム不含アジュバントは、油および水乳剤、例えば、油中水型、および水中油型(およびその改変型で複乳剤および可逆的乳剤を含む)乳剤、リポ糖類、リポ多糖類、免疫賦活性核酸(CpGオリゴ



ヌクレオチド等)、リポソーム、トール様受容体アゴニスト(特に、TLR2、TLR4、TLR7/8およびTLR9アゴニスト)、およびこれらの成分の種々の組み合わせを含む。

【0023】

「免疫応答」は、免疫系細胞、例えばB細胞、T細胞、または単球、の刺激に対する応答である。免疫応答は、抗原特異的中和抗体のような特異的抗体を製造するB細胞応答であってもよい。また、免疫応答は、CD4+応答またはCD8+応答のようなT細胞応答であってもよい。一部の例では、応答は特定の抗原に対し特異的(すなわち、「抗原特異的応答」)である。抗原が病原体由来である場合は、抗原特異的応答は「病原体特異的応答」である。「防御免疫応答」は病原体の有害な機能または活動を抑制し、病原体による感染を減らす、または病原体の感染による症状(死亡を含む)を軽減する免疫応答である。防御免疫応答は、例えば、ウイルス複製の抑制、またはプラーク減少アッセイもしくはELISA中和アッセイによるプラーク形成抑制により、またはインビボで病原体攻撃に対する抵抗性を測定することにより計測可能である

10

【0024】

「Th1」に偏った免疫応答は、IL-2とIFNを製造するCD4+Tヘルパー細胞の存在、従ってIL-2とIFNの分泌または存在により特徴付けられる免疫応答である。一方、「Th2」に偏った免疫応答は、IL-4、IL-5、およびIL-13を製造する圧倒的多数のCD4+ヘルパー細胞が特徴の免疫応答である。

20

【0025】

「患者(subject)」は、生きている多細胞性脊椎動物生命体である。本開示では、患者は、非ヒト動物、例えば、マウス、コトラット、または非ヒト霊長類等の実験的対象であってもよい。あるいは、患者はヒトの患者であってもよい。

【0026】

本明細書で開示の免疫原性組成物は、デング熱ウイルスの感染による疾患の予防、改善および/または治療に好適である。

【0027】

本明細書で開示の免疫原性組成物は、1つまたは複数の精製不活化デング熱ウイルス抗原を含む。例えば、免疫原性組成物は、単一のデング熱ウイルス株を含んでも(すなわち一価組成物)、または2つ以上のデング熱ウイルス株を含んでも(すなわち、多価組成物)よい。通常、多価組成物は、異なる血清型から選択された株を含む。疾患の原因となる4つのデング熱ウイルスの血清型、すなわち、1型デング熱(DEN-1)、2型デング熱(DEN-2)、3型デング熱(DEN-3)、4型デング熱(DEN-4)、があり、交差反応性非中和抗体がより重症型のデング熱疾患の病因になるので、各血清型から1つずつが選択されて最終のワクチンに含有され、従って4つの血清型のいずれかによって引き起こされる疾患に対する保護が保証されている。従って、一実施形態では、免疫原性組成物は四価の組成物であり、デング熱ウイルスの4つの血清型のそれぞれから選択した株を含む。

30

【0028】

抗原として使われるウイルスは、基本的にどのようなデング熱ウイルス株(または複数株)から選択してもよい。例えば、血清型に対する定まった(例えば、共通)配列、例えば、DEN-1共通配列、DEN-2共通配列、DEN-3共通配列、またはDEN-4共通配列、への適合性に基づいて選ばれた各血清型を選択してもよい。このようなウイルスは、自然発生のものであっても合成のものであってもよい。あるいは、ウイルス株は、ワクチン投与が予定されている地域または集団で流行している株に関連して選択してもよい。別の選択肢としては、入手可能性または以前の経験に基づいて便宜上行われる各血清型の選択がある。例えば、代表的な株は、米国特許第6,254,873号に記載されており、本件は参照により本明細書に包含される。追加の適切な株は、例えば、米国特許第7,226,602号に開示されている。さらに追加の株は、例えば、VBRC viral genome database([http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated\\_genes](http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated_genes)), およびthe Deng

40

50

ue Virus Database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/ProjectInfo.html>)で見つけられる。

#### 【0029】

精製不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンに関して、病原性または弱毒化株のいずれかを使用可能である。通常、病原体株は、宿主細胞中でより高い力価に繁殖し、商業スケールでの製造を促進する。しかし、病原性株は製造に関わる作業員の感染を防ぐため取り扱いに特別な注意が必要である。細胞培養中で製造させ、Dengue 熱の蚊ベクター中で病原性減弱化および/または複製減少化を選択するように適応させた弱毒化株は取り扱い上の注意は少なくてもよいが、製造は困難である。不活化 Dengue 熱ウイルスとアルミニウム不含アジュバントを含む免疫原性組成物に関連した、使用に適した代表的弱毒化株は、国際公開第 WO 00/57907 号および米国特許第 6,638,514 号ならびに国際公開第 WO 00/58444 号および米国特許第 6,613,556 号に記載されており、これらは参照により本明細書に包含される。従って、通常、選択株は、ヒトに使用される物質の製造に適した細胞（例えば、病原体が無いことを保障された細胞）中で複製可能な多くの株の中から選ばれる。例えば、株は、最高力価、例えば、少なくとも約  $5 \times 10^6$  pfu/ml、好ましくは少なくとも  $1 \times 10^7$  pfu/ml 以上、に細胞株中で成長するウイルスを特定するためにスクリーニングし、(i i) 選択細胞株中で最高力価に成長する Dengue 熱ウイルス株を選択し、そして (i i i) さらに選択細胞株中で一回から数回の追加継代によりこれら選択株を高成長に適合させることが可能である。選択されたウイルス（例えば、Dengue 熱ウイルスの 4 つの血清型から選択されたウイルス）は、さらに、付加的細胞培養継代または遺伝子操作によって高い力価に成長するよう適合させて、高力価のマスターおよび種子製造ロットを作ることができる。

10

20

#### 【0030】

Dengue 熱ウイルスを繁殖させるための適切な細胞株には、哺乳動物細胞、例えば、ベロ細胞、AGMK 細胞、BHK-21 細胞、COS-1 もしくは COS-7 細胞、MDCK 細胞、CV-1 細胞、LLC-MK2 細胞、胎仔アカゲザル肺 (FRhL-2) 細胞のような初代細胞株、BSC-1 細胞および MRC-5 細胞、またはヒト二倍体繊維芽細胞、ならびに鳥類の細胞、ニワトリもしくはアヒル胎仔誘導細胞株、例えば、AGE1 細胞、および初代ニワトリ胎仔繊維芽細胞、ならびに C6/36 のような蚊細胞株が含まれる。選択細胞は血清または血清誘導蛋白質が無い条件で成長するように適合させ、無血清（および/または無タンパク質）成長条件下、高力価で Dengue 熱ウイルス複製を維持することができるものが好ましい。

30

#### 【0031】

細胞培養でウイルスを繁殖させるため、選択した Dengue 熱ウイルス株を宿主細胞（例えば、前に挙げた適切な細胞型の中から選択した宿主細胞）に感染させる。ウイルス吸着の後に、培養物には細胞成長を支援する培地が与えられる。培地は血清または血清誘導タンパク質、または他の動物誘導タンパク質を含まないことが好ましく、あるいは、製造中に血清添加培地を無血清培地で置き換えてもよい。多くの無血清培地の製剤が市販品として入手可能である。無血清条件下で維持される細胞中でウイルスを製造する方法の詳細については、例えば、US Patent Application No. 20060183224 に記載されている。この文献は参照により本明細書に包含される。

40

#### 【0032】

宿主細胞は培養物中で所望のウイルス力価になるまで数日間維持される。任意選択として、細胞は連続灌流システム中で維持され、このシステムから数日間以上のコースにわたって、間欠的または連続的にウイルスを得てもよい。不連続培養条件下では、感染後 3 ~ 7 日までに少なくとも約  $10^6 \sim 10^7$  PFU/ml の力価であることが望ましい。一部の宿主細胞では、力価は数日間高いままであり、ウイルスは収率を最大化するために多くの時点で回収できる。例えば、ウイルスは、感染後約 3 ~ 約 13 日目から上澄み液を集め、細胞を再供給することにより、培養物から毎日採取可能である。任意選択で、追加処理に先立ち、上澄み液をプールしてもよい。他の宿主細胞では、ウイルスは高い力価に成長

50

させることができるが、持続時間はより短い。このような場合、経験的に決めた手法によりピーク力価のところからウイルスを取り出すことができる。

【0033】

例えば、ベロ細胞はフィシンを添加したVPSFM培地中で継代141代まで増幅可能である。1つの追加の継代を豚トリブシンの存在下実行可能である。細胞をバイオリアクター(4L)中に約 $0.7 \times 10^6$ 細胞/mlで播いて、マイクロキャリア(cytodex-1)上でVPSFM+ブルロニック0.1%中、灌流条件(例えば、一日目:0容積/日;一日目~二日目:1容積/日;次の3日間:1.5容積/日)で、5日間培養可能である。次に約 $3 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞を Dengue 熱ウイルスに感染(35)させる(例えば、DMEM+グルタミン4mM+FBS2%(培地容積を2Lに減らして)培地中で感染の多重度0.01、37で2時間の条件下)。次にバイオリアクター中の培地の容量を4Lに調節する。3日後、大部分の培地(約3L)を除去しDMEM培地+グルタミン4mMで置き換える。感染後7日でウイルスが採取可能となる。

10

【0034】

ウイルスを回収するため、ウイルスを当技術分野で既知の通常の方法、例えば、低速遠心分離(例えば、1500xgで10分間)、または孔径0.45 $\mu$ mのフィルタを通してろ過することにより、採取する。前記ウイルスを濃縮する方法は、当業者の通常の方法の範囲内にあり、例えば、限外濾過法(例えば、300kD以下の孔径の膜を用いた)、またはポリエチレングリコール(PEG)8000沈殿法がある。ウイルスの精製方法は、当業者には既知であり、連続または多段ショ糖勾配法による精製、サイズ排除、イオン交換、吸着もしくはアフィニティカラムを使ったカラムクロマトグラフィーによる精製、またはポリマー2相もしくは多相システムでの分配による精製、およびこれらの組み合わせを含む。ウイルス陽性画分のアッセイ法には、ブランクアッセイ、赤血球凝集(HA)アッセイ、および/または免疫測定のような抗原アッセイが含まれる。

20

【0035】

例えば、Dengue 熱ウイルスは培養上澄み液からポリエチレングリコール(PEG)沈殿法により濃縮可能である。感染細胞からの上澄み液を、遠心分離器(1,500xg)で10分間清澄化する。清澄化した上澄み液を6%PEG8000(Sigma)および0.5M NaClに調整し、静かに攪拌しながら4で45分間保持する。沈殿物を5,000xg、50分の遠心分離により集め、STE緩衝液(0.1M NaCl、10mMトリス、1mM EDTA、pH7.6)に再懸濁する。次に、ウイルス懸濁液を遠心分離(4、12,000xg、10分)により清澄化する。沈渣を廃棄し、さらに上澄み液を遠心分離(4、170,000xg、80分)にかけウイルス沈渣を作る。このウイルス沈渣を所望の濃度でSTE緩衝液に再懸濁する。

30

【0036】

あるいは、または追加的に、Dengue 熱ウイルスを細胞上澄み液から接線流限外濾過により濃縮可能である。感染細胞からの上澄み液を上述の低速の遠心分離により清澄化し、次に0.45 $\mu$ mCNフィルタ(Nalgene)を通して濾過する。濾過した上澄み液を、低タンパク質結合100kDカットオフ膜(例えば、オメガ100Kスクリーンチャンネル、Filtron、Inc.)を使って接線流限外濾過により濃縮する。毎分400mlの流量、毎分約100mlのろ過率および20~30psiの圧力の下、4で濃縮を行う。

40

【0037】

さらなる精製は、ショ糖勾配超遠心分離を使って行うことができる。Dengue 熱ウイルスは基本的には以前記載した方法(Srivastava et al. Arch. Virol. 96: 97-107, 1987)に少し修正を加えたショ糖勾配法で精製できる。15mlショ糖勾配は1"x3.5"(40ml)超遠心チューブ(Ultra-clear(商標), Beckman, Inc.)に磷酸塩緩衝食塩水、pH7.4(PBS、CaおよびMg不含、Whittaker MABio products)中の次のショ糖溶液(w/w)を段階的に添加して作成できる: 2ml 60%、2ml 55%、2ml 50%、2ml 45%、2ml 40%、2ml 3

50

5%、2 ml 30%および1 ml 15%。室温で2～4時間チューブを静置することでスムーズな勾配が形成される。25 mlまでの濃縮ウイルスを各チューブに加える。次に超遠心分離を、例えば、SW28ローター(Beckman)を使って、4、17,000 rpmで18時間、行う。遠心分離の後、1～2 mlの画分をチューブの底部から集めることができる。画分を、総タンパク質量、ウイルスHA、およびウイルス抗原の所望のアッセイに供することが可能である。正の勾配画分は、通常、プールされ、培地199(M199、Gibco-BRL)またはPBSを使って10%以下のショ糖に希釈される。任意選択として、不活化の前に、ウイルスプールを0.22 μm低タンパク質結合フィルタ(GVタイプ、Millipore)を通して濾過してもよい。

#### 【0038】

精製に続いて、回収ウイルスは、その抗原性および免疫原性を保持するが、感染力は破壊するように選択された手段により不活化される。1つの例では、ホルマリンまたはプロプリオラクトン等の有効量の薬剤をウイルスに添加し、この混合物を不活化するまで不活化薬剤と共にインキュベートする。例えば、ホルマリン(37%ホルムアルデヒド)はPBSで1:40に希釈し、pHを1N NaOHで約7.4に調整する。次に0.22 μm CNフィルタ(Nalgene)を通してこの溶液を無菌化する。このホルマリン溶液を精製ウイルス(1:50)に添加し最終ホルマリン濃度を0.05%とする。不活化は、15と25の間で、48時間～14日間(通常、10日以下)で行われる。任意選択で、ウイルスを0.22 μm GVタイプフィルタを通して濾過し、新しい容器に移してもよい。不活化の完了時点で、バルク培養物中の遊離ホルマリンを、例えば、等モル量の無菌の10% w/v 亜硫酸水素ナトリウムの添加により、中和する。

#### 【0039】

あるいは、不活化は、放射エネルギーを使ってウイルスが不活化されるまで照射して達成できる。放射エネルギーの1つの好ましい例には、ウイルスの感染力を不活化するのに十分で、しかも抗原性は基本的に損なわない線量で使用されるコバルト60がある。有用な線量の例は、5.5～7.0 Mradの範囲の線量である。例えば、1.5 mlの無菌ポリプロピレンチューブ中の50 μlウイルス分割量を凍結させ、所望の照射を行うに十分な時間、<sup>60</sup>Co源のガンマセル中でドライアイス上に置く。

#### 【0040】

あるいは、紫外線照射を用いて Dengue 熱ウイルスを不活化することもできる。ウイルスを紫外線照射するための適切な商業ベースの装置は、当技術分野でよく知られ、装置は市販品として、例えば、Bayerから入手可能で、上澄み液(またはウイルスを含む他の流体)を、約254 nm光源を使いウイルスを不活化するのに十分な時間で、かつ、免疫原性を保持する条件で、UV-C光源に曝すことができる。

#### 【0041】

あるいは、Dengue 熱ウイルスに対し過酸化水素を、US Patent Application No. 20070031451に記載のように使用して不活化可能である。本特許は参照により本明細書に包含される。

#### 【0042】

所望なら、2つ以上の不活性化工程を用いることも可能である。2つ以上の不活性化工程を用いる場合、かかる工程は同じであっても、異なってもよい。例えば、前出の不活化プロセス等、任意の適切な不活化プロセスの組み合わせを、ヒトの患者へ投与する免疫原性組成物処方のために Dengue 熱ウイルスを精製および不活化する際、用いることができる。

#### 【0043】

ウイルス調製の品質は当技術分野で既知の種々の方法でモニターできる。例えば、不活性化の前にブランク滴定アッセイによりウイルスをモニターできる。ウイルスは製造に用いたものと同じまたは異なる宿主細胞上で増幅され、適切な細胞株、例えば、LLC-MK2細胞またはベロ細胞単層、に感染させるために使用される。また、ウイルスブランク数を評価して回収ウイルスの感染力を評価できる(例えば、Sukhavachana et al. WHO Bul

10

20

30

40

50

l. 35: 65-6, 1966参照)。回収抗原の量と品質を評価する別の方法は、ウイルス赤血球凝集(HA)および赤血球凝集阻止(HI)アッセイによるものである。ウイルスHAおよびHIアッセイは以前に記載した方法で行うことができる(Clarke & Casals, Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561-73, 1958)。総タンパク質量は、基本的には、Bradfordによる記載(Anal. Biochem. 72: 248, 1976)のように、市販のキット(BioRad, Hercules, Calif.)および標準としてウシ血清アルブミン(BSA)またはグロブリンを使って測定される。

#### 【0044】

あるいは、抗原は不活性化後、例えば、抗原スポットプロットアッセイにより検出および/または定量可能である。不活化ウイルス調製物中の抗原を検出および定量するため、ウイルス試料を連続的に希釈(通常は倍数希釈)してニトロセルロース紙上に点状に配置する。そのセルロース紙を風乾し、5%カゼインのPBS溶液でブロックして、特異的抗体または抗血清、次に酵素結合2次抗体と一緒にインキュベートする。また、ウイルスはウエスタンプロットによっても検出可能である。簡単に述べれば、抗原調製物をSDS-PAGE試料緩衝液(1%SDS、66mMトリス塩酸、pH6.8、1%グリセロールおよび0.7%ブロムフェノールブルーを含有)に22で10分間溶解し、12.5%ポリアクリルアミドゲル(例えば、Feighny et al. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50(3): 322-8, 1994に記載のように)で電気泳動を行う。分解タンパク質を電気泳動によりナイロンまたはニトロセルロース膜上に移動する。次にタンパク質をコロイド状金で染色して検出し、ウイルス光源をウエスタンプロットプロセスの非同位体修飾を使って免疫学的に同定できる。

#### 【0045】

##### 免疫原性組成物および方法

不活化 Dengue 熱ウイルスを適切なアルミニウム不含アジュバントと混合してヒトの患者の免疫化に適切な免疫原性組成物を製造し、高い力価のウイルス中和抗体を誘発し、免疫化したヒトを Dengue 熱ウイルスが原因の疾患から防御する。通常、不活化 Dengue 熱ウイルスは薬学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤に入れて処方される。

#### 【0046】

薬学的に許容可能なキャリアおよび賦形剤はよく知られており、当業者が選択可能である。例えば、キャリアまたは賦形剤は、好ましくは、緩衝液を含む。また、任意選択として、キャリアまたは賦形剤は、溶解性と安定性を安定化する少なくとも1つの成分を含む。可溶化剤/安定化剤の例には、洗剤、例えば、ラウレルサルコシン、および/またはポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが含まれる。あるいは、可溶化剤/安定化剤にはアルギニンおよびガラス形成ポリオール(ショ糖、トレハロース等)が含まれる。多くの薬学的に許容可能なキャリアおよび/または薬学的に許容可能な賦形剤が当技術分野で既知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (1975)に記載されている。

#### 【0047】

従って、適切な賦形剤およびキャリアを当業者が選択でき、選択した投与経路で患者に送達するために適した製剤を製造することが可能となる。

#### 【0048】

限定されないが、適切な賦形剤には、グリセロール、ポリエチレングリコール(PEG)、ソルビトール、トレハロース、N-ラウロイルサルコシナトリウム塩、L-プロリン、非洗剤スルホベタイン、塩酸グアニジン、尿素、トリメチルアミンオキシド、KCl、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>および他の二価の陽イオン関連塩、ジチオトレイトール、ジチオエリスリトール、および-メルカプトエタノールが挙げられる。また、その他に、洗剤(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、トリトンX-100、NP-40、Empigen BB、オクチルグルコシド、ラウロイルマルトシド、Zwittergent 3-08、Zwittergent 3-0、Zwittergent 3-2、Zwittergent 3-4、Zwittergent 3-6、CHAP

S、デオキシコール酸ナトリウム、ナトリウムドデシルスルファート、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを含む)を賦形剤として使ってもよい。

【0049】

また、本明細書で開示されている免疫原性組成物はアジュバントを含む。 Dengue熱に対する防御免疫応答を誘発する目的で患者へ投与するのに適した免疫原性組成物という観点からは、アジュバントはTh1/Th2バランス応答またはTh1に偏った免疫応答を誘発するように選択されたアルミニウム不含アジュバントである。このような免疫応答は - IFN製造により特徴付けられる。

【0050】

通常、アジュバントは、この組成物が投与される患者または患者集団でTh1/Th2バランス応答またはTh1に偏った免疫応答を促進するよう選択される。例えば、免疫原性組成物が、 Dengue熱感染を受けやすい(またはそのリスクが高い)特定の年齢群の患者に投与する予定である場合、アジュバントはその患者または患者集団に対し安全でかつ有効であるように選択される。従って、新生児もしくは幼児(誕生から1歳のまでの患者等)または小児(例えば、誕生から5歳のまでの患者等)に投与する目的で不活化 Dengue熱ウイルス抗原を含む免疫原性組成物を処方する場合、アジュバントは新生児および幼児および/または小児に対し安全でかつ有効であるように選択される。

【0051】

さらに、通常、免疫原性組成物が投与されるルート経路で投与される場合、アジュバントはTh1免疫応答を促進するよう選択される。例えば、免疫原性組成物が筋肉内投与用として処方されている場合、1つまたは複数の3D-MPL、スクアレン(例えば、QS21)、リポソーム、および/または油および水乳剤を含むアジュバントの選択が望ましい。

【0052】

不活化 Dengue熱抗原と組み合わせて使用するための1つの適切なアジュバントは、無毒性細菌性リポ多糖誘導体である。無毒性リポ多糖誘導体の適切な例は、モノホスホリルリポ多糖A、またはさらに具体的には3-脱アシル化モノホスホリルリポ多糖A(3D-MPL)である。3D-MPLはMPLの名称でGlaxoSmithKline Biologicals N.A.から販売されており、文書中ではMPLまたは3D-MPLと呼ばれている。例えば、米国特許第4,436,727号、4,877,611号、4,866,034号および4,912,094号参照。3D-MPLはIFN- $\gamma$ (Th1)表現型を伴って主にCD4+T細胞応答を促進する。3D-MPLは、GB2220211 Aで開示されている方法により製造可能である。化学的には、これは3、4、5、または6アシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリルリポ多糖Aの混合物である。本発明の組成物には、小粒子3D-MPLが使われる。小粒子3D-MPLは0.22 $\mu$ mフィルタを通して除菌された程度の粒度を有する。この調製はWO94/21292に記載されている。

【0053】

3D-MPL等のリポ多糖類は免疫原性組成物のヒト用量当たり1~100 $\mu$ gを使用可能である。この3D-MPLは約50 $\mu$ g、例えば、40~60 $\mu$ g、適切には、45~55 $\mu$ gまたは46~54 $\mu$ gまたは47~53 $\mu$ gまたは48~52 $\mu$ g、または49~51 $\mu$ g、または50 $\mu$ gのレベルで使用可能である。別の実施形態では、幼児または小児への投与例として、免疫原性組成物の用量は、免疫原性組成物のヒト用量当たり約25 $\mu$ gレベルの3D-MPLの分割量を含む。この3D-MPLは約25 $\mu$ gのレベルで使用可能であり、例えば、20~30 $\mu$ g、適切には、21~29 $\mu$ gまたは22~28 $\mu$ gまたは23~27 $\mu$ gまたは24~26 $\mu$ g、または25 $\mu$ g、で使用可能である。他の実施形態(例えば、非常に若い幼児への投与に適切な)では、免疫原性組成物のヒト用量はさらに低い量の約10 $\mu$ gレベル、例えば、5~15 $\mu$ g、適切には6~14 $\mu$ g、例えば、7~13 $\mu$ gまたは8~12 $\mu$ gまたは9~11 $\mu$ g、または10 $\mu$ g、の3D-MPL分割量を含む。さらなる実施形態では、免疫原性組成物のヒト用量は、約5 $\mu$ gレベル、例えば、1~9 $\mu$ g、または2~8 $\mu$ gまたは適切には3~7 $\mu$ gまたは4

10

20

30

40

50

～ 6 μg、または 5 μg、の 3D-MPL を含む。

【0054】

他の実施形態では、米国特許第6,005,099号および欧州特許番号第0 729 473 B1号に記載のように、リポ多糖類は (1-6) グルコサミン二糖類であってもよい。当業者なら、これらの参考文献の教示に基づいて 3D-MPL 等の種々のリポ多糖類を容易に製造できるであろう。それでもなお、これらの文献は参照により本明細書に包含される。前述の免疫賦活剤 (LPS または MPL または 3D-MPL と類似構造を有する免疫賦活剤) のほかに、上記 MPL の構造の一部であるアシル化単糖および二糖誘導体もまたアジュバントとして適切である。他の実施形態では、アジュバントはリポド A の合成誘導体で、その一部のみは TLR4 アゴニストとして記載され、限定されないが、OM174 (2-デオキシ-6-*o*-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-*o*-ホスホノ-D-グルコピラノシル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-D-D-グルコピラノシルジヒドロゲンホスファート)、(WO 95/14026); OM 294 DP (3S、9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1、10-ジオール、1、10-ビス(ジヒドロゲンオホスファート) (国際公開第WO 99/64301号およびWO 00/0462号); および OM 197 MP-Ac DP (3S、9R)-3-D(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1、10-ジオール、1-ジヒドロゲンオホスファート 10-(6-アミノヘキサノアート) (WO 01/46127) が挙げられる。

10

20

【0055】

使用可能な他の TLR4 リガンドには、アルキルグルコサミニドリン酸塩 (AGP)、例えば、WO 98/50399 または米国特許第6,303,347号 (AGP 合成プロセスも開示されている) に開示のものがあり、より適切なものとしては、RC527 または RC529、または米国特許第6,764,840号に開示の AGP の薬学的に許容可能な塩がある。AGP の一部は TLR4 アゴニストであり、一部は TLR4 アンタゴニストである。

【0056】

TLR4 を通してシグナル伝達応答を起こすことが可能な他の適切な TLR4 リガンド (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5) には、例えば、グラム陰性菌由来のリポ多糖類とその誘導体、またはその断片、特に、LPS の非毒性誘導体 (3D-MPL 等の) がある。他の適切な TLR4 アンタゴニストには、熱ショックタンパク質 (HSP) 10、60、65、70、75 または 90、サーファクタントタンパク質 A、ヒアルロン酸オリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノーゲンペプチドおよび b-デフェンシン-2、およびムラミルジペプチド (MDP) がある。一実施形態では、TLR4 アゴニストは、HSP 60、70 または 90 である。他の適切な TLR4 リガンドは、WO 2003/011223 および WO 2003/099195 に記載されており、例えば、WO2003/011223 の 4～5 ページまたは WO2003/099195 の 3～4 ページに開示の化合物 I、化合物 II および化合物 III および特に WO2003/011223 で ER 803022、ER 803058、ER 803732、ER 804053、ER 804057、ER 804058、ER 804059、ER 804442、ER 804680、および ER 804764 として開示されている化合物がある。例えば、1つの適切な TLR4 リガンドは ER 804057 である。

30

40

【0057】

Dengue 熱ウイルス抗原を含んだ免疫原性組成物に混合して使用可能な他のアジュバントには、例えば、本明細書記載の 3D-MPL または別のアジュバントの代替品として、またはそれと組み合わせて使用できる、QS21 等のサポニンがある。

【0058】

サポニンについては、Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386) から学ぶことが出来る。サポニンはステロイドまたはトリテルペン配糖体で、植物お

50

よび海生動物界に広く分布している。サポニンは水中でコロイド溶液を形成し振盪で発泡すること、およびコレステロールを沈殿させることで知られる。サポニンが細胞膜の近くにあると、膜中に気孔様構造を形成し膜を破裂させる。赤血球の溶血はこの現象の例であるが、これは特定のサポニンの特性であり、全てに当てはまる特性ではない。

#### 【 0 0 5 9 】

サポニンは、全身投与のためのワクチンに入れるアジュバントとして知られる。それぞれのサポニンのアジュバントおよび溶血作用が当分野で広範囲に研究されてきた(Lacaille-Dubois and Wagner、上記参照)。例えば、Q u i l A (南米の木であるキラジャ サポナリア モリナの樹皮由来) およびその画分がUS 5,057,540および“Saponins as vaccine adjuvants”, Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-5 5、およびEP 0 362 279 B1に記載されている。免疫刺激複合体 ( I S C O M S ) と名付けられた Q u i l A の画分を含む粒子状の構造は溶血性であり、ワクチンの製造に用いられてきた (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739, および米国特許第 6,846,489号)。溶血性サポニン Q S 2 1 および Q S 1 7 ( Q u i l A の H P L C 精製画分) は強力な全身性アジュバントといわれており、その製造方法は、米国特許第5,057,540号および欧州特許第0 362 279 B1号に開示されている。これらの特許は参照により本明細書に包含される。このサポニン、またはその画分は単独、または組み合わせて使用でき、また、任意選択として I S C O M S として処方してもよい。全身性の予防接種研究に使われてきた他のサポニンには、他の植物種、例えば、カスミソウおよびサポナリア属 (Bo mford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992) 由来のものが含まれる。

#### 【 0 0 6 0 】

Q S 2 1 は、H P L C 精製キラジャ サポナリア モリナの樹皮由来無毒画分である。Q S 2 1 製造方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。Q S 2 1 を含む非反応原性 (non-reactogenic) アジュバント製剤は、WO 96/33739に記載されている。前述の参考文献は参照により本明細書に包含される。前記免疫学的に活性な Q S 2 1 等のサポニンは、免疫原性組成物のヒト用量当たり 1 ~ 5 0  $\mu$  g の量を使用してもよい。免疫原性組成物のヒト用量当たり約 1 ~ 1 0 0  $\mu$  g のレベルで使用するのが好都合である。例えば、Q S 2 1 は、約 5 0  $\mu$  g のレベル、例えば、4 0 ~ 6 0  $\mu$  g、適切には 4 5 ~ 5 5  $\mu$  g または 4 6 ~ 5 4  $\mu$  g または 4 7 ~ 5 3  $\mu$  g または 4 8 ~ 5 2  $\mu$  g、または 4 9 ~ 5 1  $\mu$  g、または 5 0  $\mu$  g で使用できる。別の実施形態では、例えば、幼児または小児に対する投与向けに、免疫原性組成物用量は、2 5  $\mu$  g の分割量、例えば、2 0 ~ 3 0  $\mu$  g、適切には 2 1 ~ 2 9  $\mu$  g または 2 2 ~ 2 8  $\mu$  g または 2 3 ~ 2 7  $\mu$  g または 2 4 ~ 2 6  $\mu$  g、または 2 5  $\mu$  g の分割量を含む。別の実施形態では、免疫原性組成物のヒト用量は、約 1 0  $\mu$  g のレベル、例えば、5 ~ 1 5  $\mu$  g、適切には 6 ~ 1 4  $\mu$  g、例えば、7 ~ 1 3  $\mu$  g または 8 ~ 1 2  $\mu$  g または 9 ~ 1 1  $\mu$  g、または 1 0  $\mu$  g の Q S 2 1 をふくむ。さらなる実施形態では、免疫原性組成物のヒト用量は、約 5  $\mu$  g、例えば、1 ~ 9  $\mu$  g、または 2 ~ 8  $\mu$  g または適切には 3 ~ 7  $\mu$  g または 4 ~ 6  $\mu$  g、または 5  $\mu$  g の Q S 2 1 を含む。Q S 2 1 およびそれにコレステロールを含むこのような製剤 (リボソーム製剤が適切) は、抗原と一緒に処方した場合、T h 1 刺激を可能にするアジュバントであることが示されている。従って、例えば、不活化 Dengue 熱ウイルス抗原は、Q S 2 1 とコレステロールの組み合わせを含むアジュバントと共に免疫原性組成物中に包含されることが好ましい。任意選択として、このアジュバントは、1、2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホホコリン (D O P C) を含んでもよい。Q S 2 1 等のサポニンは、1つまたは複数の追加の免疫賦活剤 (例えば、本明細書で議論されているような 3 D - M P L、例えば、C p G オリゴヌクレオチド、または他の T L R アゴニスト、等) と一緒に処方することもできる。

#### 【 0 0 6 1 】

前述した様な異なるアジュバントの組み合わせも不活化 Dengue 熱ウイルス抗原を含む組成物として使用可能である。例えば、すでに示したように、Q S 2 1 は 3 D - M P L と一緒に処方可能である。Q S 2 1 : 3 D - M P L の比率は、通常は 1 : 1 0 ~ 1 0 : 1 のオーダー、例えば、1 : 5 ~ 5 : 1 であり、また、実質的に 1 : 1 であることも多い。通常



、この比率は2.5 : 1 ~ 1 : 1の3D-MPL : QS21の範囲にある。任意選択として、QS21と3D-MPLの組み合わせに、コレステロールおよびDOPCのどちらか一方または両方を含めてもよい。このような組み合わせの処方と投与量、特に幼児や小児への投与に適する用量(分割量)に関するさらなる詳細については、WO2007068907およびUS 20080279926に記載されており、これらは参照により本明細書に包含される。組み合わせの処方をした場合は、かかる組み合わせは抗原特異的Th1免疫応答を促進することができる。

【0062】

一部の例では、アジュバント製剤は水中油型乳剤を含む。

【0063】

水中油型乳剤の1つの例では、スクアレン等の代謝可能油やトコフェロール例えば、トコフェロール等のトコール、および、水性キャリア中のポリソルベート80またはトween80等の界面活性剤を含み、追加の免疫促進薬を含まない。例えば、水性キャリアは磷酸塩緩衝食塩水であってもよい。この水中油型乳剤の1つの好ましい例は、本明細書中でAS03と命名されている。さらに、水中油型乳剤がソルビタントリオレート(SPAN 85(商標))および/またはレシチンおよび/またはトリカプリリンを含んでもよい。水中油型乳剤の別の例は、MF59で、これはスクアレンベース乳剤系でNovartis Vaccine and Diagnosticsから販売されている。

【0064】

本発明の別の実施形態では、抗原または抗原組成物および水中油型乳剤を含むアジュバント組成物を含むワクチン組成物が提供され、前記水中油型乳剤は0.25 ~ 10mgの代謝可能油(スクアレンが好適)、0.25 ~ 11mgのトコール(トコフェロールのようなトコフェロールが好適)および0.125 ~ 4mgの乳化剤を含む。一部の例では、例えば、小児への投与用として、水中油型乳剤は標準成人用量の1/2、1/4、または1/8の分割量で添加される。不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンと組み合わせた使用に適した水中油型乳剤の分割量のさらなる詳細については、WO 2008043774, USSN 12/445,090に記載されており、これは参照により本明細書に包含される。

【0065】

水中油型乳剤を使った特定の製剤では、かかる乳剤は、追加の成分として、例えば、コレステロール、スクアレン、トコフェロール、および/またはポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(TWEEN 80(登録商標))またはソルビタントリオレート等の洗剤を含んでもよい。代表的製剤では、かかる成分は、約1 ~ 50mgのコレステロール、2 ~ 10%のスクアレン、2 ~ 10%のトコフェロールおよび0.3 ~ 3%のポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(全て容量/容量)のように添加される。より安定な乳剤を得るためには、通常、スクアレン対トコフェロールの比率は、1以下である。一部の例では、製剤は安定剤を含んでもよい。

【0066】

任意選択として、油および水乳剤アジュバントは、1つまたは複数のさらなる免疫賦活剤を含む。一具体的実施形態では、アジュバント製剤は、水中油型乳剤等の乳剤の形に調製された3D-MPLを含む。一部の例では、WO 94/21292に開示されているように、乳剤は、粒径0.2μm未満の小粒度を有する。例えば、3D-MPL粒子は0.22ミクロン膜を通して細菌濾過されるのに十分な細粒にすることができる(欧州特許第0689454号に記載)。あるいは、3D-MPLはリポソーム製剤としても調整可能である。任意選択として、3D-MPL(またはその誘導体)を含むアジュバントは、追加の免疫賦活剤成分を含んでもよい。

【0067】

例えば、不活化 Dengue 熱ウイルス抗原を含む免疫原性組成物が幼児への投与用に処方される場合、アジュバントの投与量は、幼児患者に対し有効で克つ非反応原性であるように決定される。一般的に、幼児製剤中のアジュバントの投与量は、成人(例えば、65才以上の成人)への投与用製剤に使われるよりも少ない。例えば、3D-MPL粒子の量は、

10

20

30

40

50

通常、用量として $1\mu\text{g} \sim 200\mu\text{g}$ 、例えば、 $10 \sim 100\mu\text{g}$ 、または $10\mu\text{g} \sim 50\mu\text{g}$ の範囲である。幼児用量は通常この範囲の低い方の端にあり、例えば、約 $1\mu\text{g} \sim 50\mu\text{g}$ 、例えば、約 $2\mu\text{g}$ から、または約 $5\mu\text{g}$ から、または約 $10\mu\text{g}$ から、約 $25\mu\text{g}$ まで、または約 $50\mu\text{g}$ までの範囲である。通常、製剤中にQS21が使われる場合は、その範囲は同程度である（および上述の比率に従う）。成人と高齢者に対しては、通常の製剤は、幼児製剤に通常使われるよりも多くのアジュバント成分を含む。

【0068】

免疫原性組成物は、通常、免疫防護量（またはその分割量）の抗原を含み、従来法の技術で調製可能である。ヒトの患者への投与を目的とした組成物を含め、免疫原性組成物の調製は、Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995およびNew Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978に一般的に記載されている。リポソームへの封入に関しては、例えば、by Fullerton, U.S. Patent 4,235,877に記載されている。タンパク質の高分子への接合については、例えば、Likhiteによる米国特許第4,372,945号およびArmorらによる米国特許第4,474,757号に開示されている。

【0069】

通常、免疫原性組成物の各用量中の抗原の量は、通常の患者に対し大きな有害副作用の無い状態で免疫防御応答を誘導する量が選択される。ここでの免疫防御は、必ずしも感染に対し完全な防御を意味するものではなく、ウイルスに関連する症状や疾患、特に重症疾患に対する防御を意味する。抗原の量は用いられる免疫原に依存して変化してもよい。一般に、ヒト用量は、 $0.05 \sim 100\mu\text{g}$ の不活化ウイルス、例えば、約 $0.1\mu\text{g}$ （例えば、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$ 、 $0.4$ 、または $0.5\mu\text{g}$ ）から約 $50\mu\text{g}$ まで、例えば、約 $0.5\mu\text{g} \sim 30\mu\text{g}$ 、例えば、約 $1\mu\text{g}$ 、約 $2\mu\text{g}$ 、約 $3\mu\text{g}$ 、約 $4\mu\text{g}$ 、約 $5\mu\text{g}$ 、約 $10\mu\text{g}$ 、約 $15\mu\text{g}$ 、約 $20\mu\text{g}$ 、または約 $25\mu\text{g}$ の各不活化 Dengue 熱ウイルス株を含みうる。免疫原性組成物で利用される量は患者の集団（例えば、幼児）に基づき選択される。特定の組成物に対する至適量は患者における抗体力価や他の応答の観察を含む標準的調査により確認できる。初回接種に続いて、患者は適切な間隔（例えば、4週間）の後、追加免疫を受けることができる。

【0070】

選択されたアジュバントに関わらず、最終製剤中の濃度は標的集団に対し安全で有効であるように計算されることに留意すべきである。例えば、ヒトの Dengue 熱ウイルスに対して免疫応答を誘発する免疫原性組成物は、幼児（例えば、初回投与の年齢として、 $0 \sim 6$ ヶ月等の誕生から1才までの幼児）に投与することが望ましい。Dengue 熱に対して免疫応答を誘発する目的の免疫原性組成物はヒトの成人への投与も好ましい（例えば、単独または、例えば、「旅行者用」ワクチンに関連して、他の病原体の抗原と組み合わせた投与）。アジュバントの選択はこれらの異なる用途により異なる可能性があり、各状況に対する至適アジュバントと濃度は当業者により経験的に決定可能である。

【0071】

患者の Dengue 熱に対する免疫応答を誘発する方法もまた本開示の特徴である。この方法には、免疫学的に有効な量の、不活化 Dengue 熱ウイルス抗原とアルミニウム不含アジュバントを含む組成物をヒトの患者等の患者に投与することが含まれる。例えば、組成物は Th1 に偏った免疫応答を誘発するアジュバントを含む。この組成物は、Dengue 熱特異的免疫応答を誘発するように処方されている。すなわち、この組成物は Th1 に偏った免疫応答向けに処方され、またこの応答を得て Dengue 熱ウイルスの感染を減らすか、または防ぐ、および/または Dengue 熱ウイルスに感染後の病的反応を減らすか、または防ぐ。

【0072】

通常、ワクチンは注射可能なように液体溶液または懸濁液として調製される。また、注射の前、液体への溶解用または懸濁用に適した固体形態としても調製される。組成物は種々の異なる経路で投与できるが、免疫原性組成物では、筋肉内、皮下または皮内経路投与

10

20

30

40

50

での送達が最も一般的である。一般的に、ワクチンは、中和抗体の製造と保護に有効な用量を皮下、皮内、または筋肉内投与できる。ワクチンは投与製剤に適した方法で、予防上および/または治療上有効な量を投与する。投与量は通常用量で0.05~100 $\mu$ gの範囲の各不活化ウイルス株であるが、治療される患者、抗体を合成する患者の免疫系の能力、および所望の防御レベルに依存する。正確なワクチンの投与量は、開業医の判断に任せてよく、各患者に固有であってよい。

#### 【0073】

ワクチンは用量スケジュールを組んで投与可能で、また好ましくは反復投与スケジュールをつくり、予防接種の基本的コースでは1~10回投与し、その後免疫応答の持続または強化に必要な後続の時間間隔で別の用量を投与する。例えば、1~4ヶ月で2番目の用量を、さらに必要なら数ヶ月または数年後に後続の用量を投与することもできる。また、投与計画の少なくとも一部は個人の要求に応じて決定され、また開業医の判断に依存している。適切な免疫スケジュールの例には、第一回目の用量、続いて7日~6ヶ月の間に2回目の用量、および任意選択として、最初の免疫接種後1ヶ月~2年の間の3回目の用量、または、防御免疫を付与するウイルス中和抗体価を誘発するのに十分な他のスケジュール、例えば、定着した小児科ワクチンスケジュールに相当するよう選択されたスケジュール、が挙げられる。1~3接種を含む免疫の基本的コースの後に、不活化 Dengue 熱ウイルスワクチンによる Dengue 熱に対する防御免疫の生成が十分に期待できる。これは防御免疫の良好レベル維持のため計画された間隔（例えば、2年ごと）の追加免疫により補強可能である。

10

20

#### 【0074】

##### 実施例

実施例 I - 精製不活化 Dengue 熱ウイルス (1 $\mu$ g および 10 $\mu$ g) とアルミニウム不含アジュバントを含む代表的免疫原性組成物の免疫原性

15匹の未処置成熟雌 C57BL/6 マウス群に2種の用量の Dengue 2 型 (Den-2) 株の精製不活化ウイルス (PIV) を含む代表的ワクチン候補の筋肉内ワクチン接種を行った。ワクチンは合計 50 $\mu$ l の容量で投与した。マウスは Dengue 熱 PIV 単独を含む製剤、または Alum (水酸化アルミニウム)、水酸化アルミニウム上に吸着した 3-脱アシル化モノホスホリルリピド A (3D-MPL) (AS04D)、水中油型乳剤 (AS03A)、およびリポソーム製剤に入れた 3D-MPL と QS21 (AS01B) (下記表 1 の群参照) をアジュバントとして添加した Dengue 熱 PIV ワクチンを含む製剤で免疫化した。AS03A および AS01B は、アルミニウム (alum) 不含アジュバントの非限定的な2つの例である。製剤用に使われた Dengue 熱 PIV 抗原は基本的に本明細書に記載された方法で、野生型 Den-2 ウイルスの培養物を、0.185% のホルマリンで7日間、22 $^{\circ}$ C で不活化して得た精製バルクである。

30

#### 【0075】

本明細書の実施例全てについて、UNISTAT を使って接種後の CD4+ 頻度と中和力価に関する統計分析を行った。分散分析に適用したプロトコルを簡単に記述すると、データの対数変換、各集団 (群) に対しシャピロ-ウィルク検定を行い群の分布の正規性を検証、コクラン検定を行い異なる集団 (群) 間の分散の均一性を検証、選択されたデータに対し分散分析、一元配置分散分析における相互作用検定、および多重比較のためのチューキー HSD 検定である。

40

【表 1】

| 群  | 抗原/処方                        | PIV Den-2<br>(総タンパク<br>質/用量) | 他の処理          |
|----|------------------------------|------------------------------|---------------|
| 1  | PIV Den-2 プレーン (アジュバント無添加)   | 10 µg                        | Days 0 and 21 |
| 2  | PIV Den-2 + AS22A (Al(OH)3)  | 10 µg                        | Days 0 and 21 |
| 3  | PIV Den-2 + AS04D            | 10 µg                        | Days 0 and 21 |
| 4  | PIV Den-2 + AS03A            | 10 µg                        | Days 0 and 21 |
| 5  | PIV Den-2 + AS01B            | 10 µg                        | Days 0 and 21 |
| 6  | PIV Den-2 + プレーン (アジュバント無添加) | 1 µg                         | Days 0 and 21 |
| 7  | PIV Den-2 + AS22A (Al(OH)3)  | 1 µg                         | Days 0 and 21 |
| 8  | PIV Den-2 + AS04D            | 1 µg                         | Days 0 and 21 |
| 9  | PIV Den-2 + AS03A            | 1 µg                         | Days 0 and 21 |
| 10 | PIV Den-2 + AS01B            | 1 µg                         | Days 0 and 21 |
| 11 | PBS                          |                              | Days 0 and 21 |

10

20

## 【0076】

液性免疫応答を最初の免疫後21日目(Day 0に設定)と2回目の免疫後(Day 21)、すなわち、免疫後21日目と42日目、に測定した。血清サンプルを抗 Deng 熱中和アッセイを使って試験した。簡単に述べれば、Deng 熱ウイルスに対するマウス血清中和力価を測定するため、濾過して加熱不活性化した血清を固定量の単一特異性 Deng 熱ウイルス(Deng 2型)と共にインキュベートした。次いで、血清とウイルスの混合物をベロ細胞単層(WHOセルバンクから入手)に添加し4日間インキュベートした。血清サンプルによるウイルス感染抑制をELISAを使って測定し、96ウエルマイクロプレートに接着したベロ細胞上の細胞結合型ウイルス抗原を検出した。得られた光学密度の読み値を自動処理によりエクセル表計算シートに取り込み、対数中間点線形回帰プログラムモデルを使ってウイルスの感染減少率パーセント(マイクロ中和試験50パーセント減少率、またはMN50と呼ぶ)を算出した。ウイルスの中和力価(MN50)は、血清が無いウイルス用量対照(TV)と比較して、アッセイの吸光度の読み取り値が50%減少する血清希釈値の逆数として定義している。

30

## 【0077】

中和抗体価はday 21の各群に対しプールした血清、およびday 42の各血清で測定した。結果を図1に示した。試験した両方の用量(1および10 µg 総タンパク質量)に対し同じ免疫学的特性が観察された。中和抗体価は、1 µg または 10 µg Deng 熱 PIV ワクチンを2回投与後、一回量の組成物投与後の応答に比べて改善された。試験した2つの用量の Deng 熱 PIV ワクチンの中で、アジュバントを添加した Deng 熱 PIV ワクチンに比べ有意に低い中和抗体応答が、アジュバント無添加ワクチンで観察された( $p < 0.00001$ )。10 µg の総タンパク質量に関し、AS04Dアジュバントを添加した Deng 熱 PIV ワクチンは、alum 単独アジュバント(AS22A)添加の Deng 熱 PIV ワクチンの応答に比べ、有意に高い中和抗体応答を誘導した( $p = 0.0027$ )。1 µg の総タンパク質量では、これら2つのアジュバント間に差は認められなかった( $p > 0.05$ )。図1に示すように、AS04DまたはAS22Aを添加した組成物よりも、アルミニウム不含アジュバントを添加した組成物(AS03A( $p < 0.01$

40

50

73) または AS01B ( $p < 0.0001$ ) は、有意に高い中和抗体応答を誘導した。AS03A および AS01B アジュバントを添加した Dengue 熱 PIV ワクチンは、同等レベルの中和抗体価を誘導した ( $p > 0.05$ )。

【0078】

Dengue 熱 PIV の 1 または 10  $\mu\text{g}$  総タンパク質用量で、アルミ含有アジュバント (例えば、AS22A または AS04D) と組み合わせた同じ抗原により誘導される応答と比較して、アルミニウム不含アジュバント系 (本明細書で示された AS03A または AS01B の例で示されるように) を含む組成物で免疫したマウスにおいて、より高い中和抗体価が観察されたことをこれらの結果が示している。

【0079】

実施例 II - 異なるアジュバント希釈度に対する精製不活化 Dengue 熱ウイルス (1  $\mu\text{g}$  および 10  $\mu\text{g}$ ) とアルミニウム不含アジュバントを含む代表的免疫原性組成物の免疫原性

15 匹の未処置成熟雌 C57BL/6 マウス群に 2 種の用量の代表的 Dengue 熱 PIV ワクチンを合計 50  $\mu\text{l}$  の容量で筋肉内投与した。マウスは Dengue 熱 PIV 単独を含む製剤、または Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> (AS22A、水酸化アルミニウム) を含むアジュバント、または異なるアジュバント系の希釈物、例えば、AS04D の標準用量の 1/2 (AS04D/2)、AS03B (5、93 mg のトコフェロールを含む水中油型乳剤ベースアジュバント系)、および AS01E (AS01B の半分の用量) (表 2 に詳細記載)、を添加した Dengue 熱 PIV 抗原を含む製剤で免疫化した。製剤用に使われた PIV は、野生型 Den-2 ウイルスの培養物を、0.185% のホルマリンで 7 日間、22°C で不活化して得た精製バルクである。

【表 2】

| 群 | 抗原/処方                                    | PIV Den-2<br>総タンパク質<br>/用量 | 他の処理          |
|---|--|----------------------------|---------------|
| 1 | PIV Den-2 プレーン (アジュバント無添加)               | 1 $\mu\text{g}$            | Days 0 and 21 |
| 2 | PIV Den-2 + AS22A (Al(OH) <sub>3</sub> ) | 1 $\mu\text{g}$            | Days 0 and 21 |
| 3 | PIV Den-2 + AS04D/2                      | 10 $\mu\text{g}$           | Days 0 and 21 |
| 4 | PIV Den-2 + AS03B                        | 10 $\mu\text{g}$           | Days 0 and 21 |
| 5 | PIV Den-2 + AS01E                        | 10 $\mu\text{g}$           | Days 0 and 21 |
| 6 | PIV Den-2 + AS04D/2                      | 1 $\mu\text{g}$            | Days 0 and 21 |
| 7 | PIV Den-2 + AS03B                        | 1 $\mu\text{g}$            | Days 0 and 21 |
| 8 | PIV Den-2 + AS01E                        | 1 $\mu\text{g}$            | Days 0 and 21 |
| 9 | PBS                                      |                            | Days 0 and 21 |

【0080】

免疫に対する液性免疫応答を最初と 2 回目の免疫後 21 日目 (最初の免疫後 21 日目と 42 日目) に 15 マウス/群について測定した。血清サンプルを前述の中和アッセイを使って試験した。

【0081】

21 日目のプール血清での群当たりの中和抗体価、および 42 日目のそれぞれの血清による群当たりの中和抗体価を図 2 に示す。同じ免疫学的特性が試験した両方の用量 (1 および 10  $\mu\text{g}$  総タンパク質量) で観察された。Dengue 熱 PIV 抗原の 1  $\mu\text{g}$  または 10  $\mu$

g の一回投与のみの誘導応答に比べ、免疫原性組成物の2回投与後の方が、より高い中和抗体価が観察された。試験した2つの用量の Dengue 熱 P I V ワクチンの中で、アジュバントを添加した Dengue 熱 P I V ワクチンに比べ、アジュバント無添加ワクチンで、有意に低い中和抗体応答が観察された ( $p < 0.00001$ )。1  $\mu$ g 総蛋白用量で、A S 0 4 D / 2 のアジュバントを添加した Dengue 熱 P I V ワクチンは、a l u m 含有アジュバント単独添加 Dengue 熱 P I V ワクチンにより誘導された応答と同等の中和抗体応答を誘導した ( $p > 0.05$ )。試験した同じワクチン用量に関し、A S 0 3 B または A S 0 1 E のアジュバント添加 Dengue 熱 P I V ワクチンは、A S 0 4 D (A S 0 3 B に対して  $p < 0.029$  および A S 0 1 E に対して  $p < 0.00001$ ) または a l u m (A S 0 3 B に対して  $p < 0.0035$  および A S 0 1 E に対して  $p < 0.00001$ ) のアジュバント添加ワクチンに比較して、有意に高い中和抗体価を誘導した。

10

## 【0082】

結論として、1または10  $\mu$ g 総タンパク質用量の Dengue 熱 P I V 抗原で、アルミニウム含有アジュバント (A S 2 2 A または A S 0 4 D / 2) を添加した同じ抗原により誘導された応答に比べ、希釈したアルミニウム不含アジュバント系 (A S 0 3 B または A S 0 1 E) を添加した組成物で免疫したマウスにおいて、より高い中和抗体価が観察された。

## 【0083】

実施例 I I I - 異なるアジュバント希釈度に対する精製不活化 Dengue 熱ウイルス (2  $\mu$ g および 200 ng) とアルミニウム不含アジュバントを含む代表的免疫原性組成物の免疫原性

20

25匹の成熟雌 C 5 7 B 1 / 6 マウス群に2種の用量の代表的 Dengue 熱 P I V ワクチン合計 50  $\mu$ l の容量を筋肉内投与して免疫した。マウスに対し Dengue 熱 P I V 単独を含む製剤、または A l u m (A S 2 2 A、水酸化アルミニウム) を含むアジュバント、または異なるアジュバントの希釈物、例えば、A S 0 4 D (A S 0 4 D / 2)、A S 0 3 B (5、93 mg のトコフェロールを含む水中油型乳剤ベースアジュバント系)、および A S 0 1 E (A S 0 1 B の半分の用量) (表3に群の詳細記載) を添加した Dengue 熱 P I V 抗原を含む製剤で免疫した。製剤用に使われた P I V は、野生型 D e n - 2 ウイルスの培養物を、0.185% のホルマリンで7日間、22 で不活化して得た精製バルクである。

## 【表3】

30

| 群 | 抗原/処方                       | PIV Den-2<br>総タンパク質<br>/用量 | 他の処理          |
|---|-----------------------------|----------------------------|---------------|
| 1 | PIV Den-2 プレーン (アジュバント無添加)  | 200 ng                     | Days 0 and 14 |
| 2 | PIV Den-2 + AS22A (Al(OH)3) | 200ng                      | Days 0 and 14 |
| 3 | PIV Den-2 + AS04D/2         | 2 $\mu$ g                  | Days 0 and 14 |
| 4 | PIV Den-2 + AS03B           | 2 $\mu$ g                  | Days 0 and 14 |
| 5 | PIV Den-2 + AS01E           | 2 $\mu$ g                  | Days 0 and 14 |
| 6 | PIV Den-2 + AS04D/2         | 200 ng                     | Days 0 and 14 |
| 7 | PIV Den-2 + AS03B           | 200 ng                     | Days 0 and 14 |
| 8 | PIV Den-2 + AS01E           | 200 ng                     | Days 0 and 14 |
| 9 | PBS                         |                            | Days 0 and 14 |

40

## 【0084】

50

免疫原性組成物投与に対する液性免疫応答を最初と2回目の免疫後14日目(それぞれ最初の免疫後14日目と28日目)に15マウス/群について測定した。血清サンプルを前述の中和アッセイを使って評価した。

【0085】

免疫後7日目に各群から10匹のマウスが屠殺され、それぞれ2つの脾臓からなる5つのプールを使ってICSにより細胞性免疫応答を評価した。AS04D/2、AS03B、AS01Eのアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV ワクチン 2  $\mu$ g で免疫したマウスとアジュバント無添加ワクチンまたは AS22A (1~5群) のアジュバント添加ワクチンの 200 ng で免疫したマウス、および PBS (9群) を受けたマウスに対してのみ CMI を評価した。15匹の他のマウスの血清を最初の免疫後の14日目 (day 14) および2回目の免疫後の14日目 (day 28) に集めた。

10

【0086】

最初の免疫後14日目 (day 14) のプールした血清による群当たりの中和抗体価および28日目 (day 28) のそれぞれの血清による群当たりの中和抗体価を測定した。この結果を図3に示す。2  $\mu$ g または 200 ng の Dengue 熱 PIV ワクチン 2 回投与の場合、一回投与後の力価に比べ高い中和抗体価が観察された。アジュバント無添加製剤に比較し、アジュバント添加した Dengue 熱 PIV 製剤において有意に高い中和抗体応答が観察された ( $p < 0.0089$ )。200 ng の Dengue 熱 PIV 用量について、AS22A または AS04D/2 を添加した同じ抗原製剤による誘発に比べ、AS03B および AS01E のアジュバントを添加した製剤で実質的に、より高い中和抗体応答を誘発した。より低い 200 ng 総タンパク質用量で、AS22A および AS04D/2 のアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV は、同等の中和抗体応答を誘導した ( $p > 0.05$ )。より高い 2  $\mu$ g 総タンパク質用量で、AS04D/2 添加の製剤は、AS03B のアジュバントを添加したワクチンと同等の中和抗体価を誘導した ( $p > 0.05$ )。しかしながら、低い抗原用量 (200 ng) では、AS03B を添加した製剤が AS04D/2 添加よりも有意に高い中和抗体価を誘発した ( $p = 0.0012$ )。興味深いことに、AS01E のアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV が他の全ての群に比較して優位に高い中和抗体価を誘導した ( $p < 0.0028$ )。

20

【0087】

前述の希釈アジュバントと組み合わせた Dengue 熱 PIV の2回の投与に続いて細胞性免疫応答も評価した。2回目の免疫の7日後 (Day 21) CD4 + T細胞サイトカイン応答をICSにより評価した (図4)。

30

【0088】

アジュバント無添加 Dengue 熱 PIV ワクチンにより誘導された CD4 + T細胞応答が、他の全ての群に比べ低かった ( $p < 0.001$ )。AS01E のアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV で免疫したマウスは、他の全ての群に比較して最も高い CD4 + T細胞応答を誘導した ( $p < 0.00001$ )。AS22A、AS04D/2 および AS03B のアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV ワクチンで得られた CD4 + T細胞応答は、統計的に差が無かった ( $p > 0.05$ )。

【0089】

結論として、水酸化アルミニウム (AS22A) のアジュバントを添加した Dengue 熱 PIV ワクチンに比べ、より高い中和抗体価が alum (AS03B または AS01E) を含まないアジュバント系を添加した当該ワクチンを免疫したマウスで観察された。注目すべきは、alum 含有アジュバント、AS22A を添加した Dengue 熱 PIV ワクチンに比べ、AS01E のアジュバント添加した当該ワクチンでより高い中和抗体応答と CD4 + T細胞応答が誘導されたことである。

40

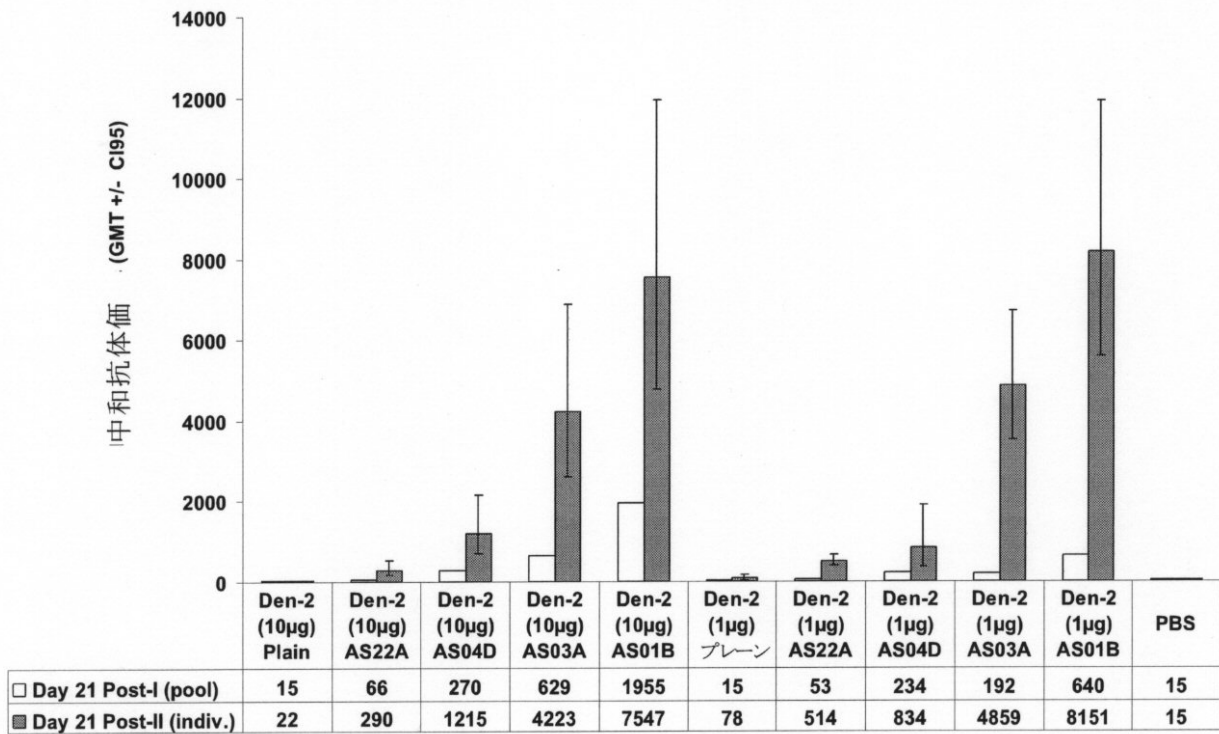
【0090】

要約すると、alum 含有アジュバント (AS22A、AS04D または AS04D/2) で製剤した Dengue 熱 PIV で免疫したマウスに比べ、アルミニウム不含アジュバント系 (例えば、アルミニウムを含まない AS01B または AS01E) で製剤したワクチン

50

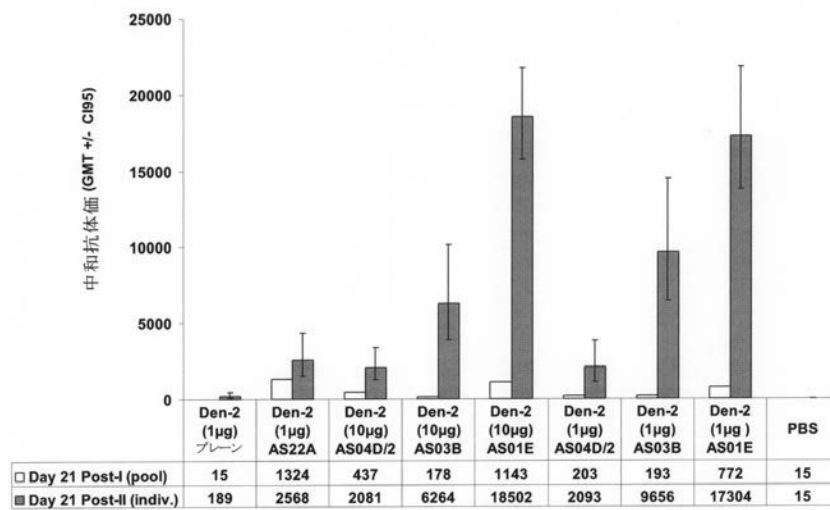
で免疫したマウスで、実質的により高い中和抗体応答およびCD4+T細胞応答が誘発された。これらの結果は、alum不含アジュバントで処方された Dengue 熱 PIV ワクチンの好ましい免疫特性を実証している。

【 図 1 】

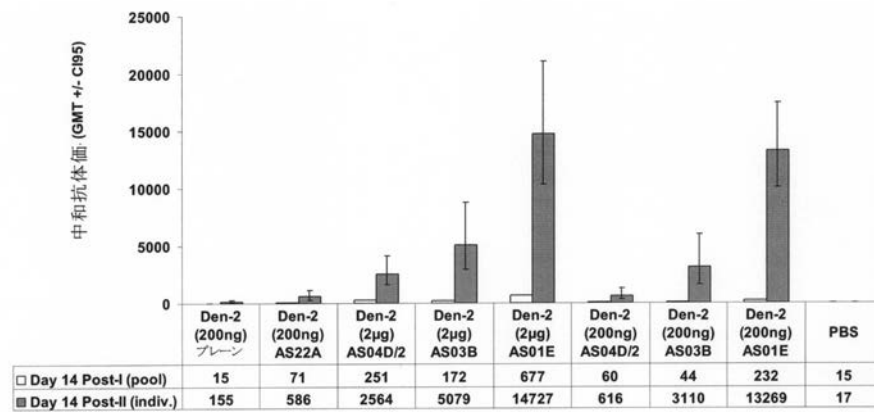




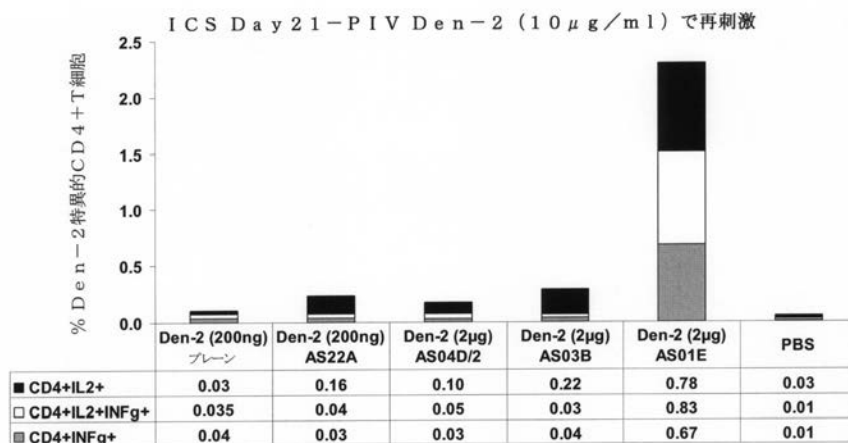
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/051882

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                         |
|--|--|-------------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| Y  | <p>LI Y ET AL: "Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/JVI.80.3.1414 1426.2006, vol. 80, no. 3, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 1414-1426, XP009115093 ISSN: 0022-538X abstract</p>                                  | 6,8,<br>11-25,<br>29,30 |
| Y  | <p>LEROUX-ROELS ET AL: "Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial" LANCET THE, LANCET LIMITED, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/S0140-6736(07)61297-5, vol. 370, no. 9587, 16 August 2007 (2007-08-16), pages 580-589, XP022202258 ISSN: 0140-6736 abstract page 581, left-hand - right-hand column, bridging paragraph</p>                         | 6,8,<br>11-25,<br>29,30 |
| Y  | <p>VANDEPAPELIERE ET AL: "Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2007.12.038, vol. 26, no. 10, 14 January 2008 (2008-01-14), pages 1375-1386, XP022492632 ISSN: 0264-410X abstract; pg. 1377, left-hand col., last paragraph</p> | 6,8,<br>11-25,<br>29,30 |
| Y  | <p>WO 2007/068907 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; GLAXO GROUP LTD [GB]; VANDEPAPELIERE P) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document in particular examples VI and VII, figures 9 and 11</p>   | 6,8,<br>11-25,<br>29,30 |

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/051882

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A  | <p>WHITEHEAD STEPHEN S ET AL: "Prospects for a dengue virus vaccine"<br/>NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB LNKD-<br/>DOI:10.1038/NRMICRO1690,<br/>vol. 5, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01),<br/>pages 518-528, XP008089325<br/>ISSN: 1740-1526<br/>the whole document<br/>in particular page 518</p>  | 1-32                  |
| A  | <p>SIGMA: "TiterMax Classic Adjuvant"<br/><br/>October 2006 (2006-10), XP007913247<br/>Retrieved from the Internet:<br/>URL:<a href="http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/2/h4397dat.Par.0001.File.tmp/h4397dat.pdf">http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/2/h4397dat.Par.0001.File.tmp/h4397dat.pdf</a><br/>[retrieved on 2010-05-28]<br/>the whole document</p> | 1-32                  |
| A  | <p>PICHICHERO MICHAEL E: "Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems"<br/>HUMAN VACCINES, LANDES BIOSCIENCE,<br/>GEORGETOWN, TX, US,<br/>vol. 4, no. 4, 1 July 2008 (2008-07-01),<br/>pages 262-270, XP001538660<br/>ISSN: 1554-8600<br/>the whole document<br/>in particular page 264</p>  | 1-32                  |
| A  | <p>ROBERT PUTNAK J ET AL: "An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model"<br/>VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD-<br/>DOI:10.1016/J.VACCINE.2005.03.042,<br/>vol. 23, no. 35,<br/>15 August 2005 (2005-08-15), pages<br/>4442-4452, XP004973246<br/>ISSN: 0264-410X<br/>the whole document</p>                                   | 1-32                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
**PCT/EP2010/051882**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date            |
|--|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| US 6254873                             | B1               | 03-07-2001              | NONE                        |
| -----                                  |                  |                         |                             |
| WO 2007068907                          | A2               | 21-06-2007              | AR 058543 A1 13-02-2008     |
|  |                  |                         | AU 2006325377 A1 21-06-2007 |
|  |                  |                         | CA 2633008 A1 21-06-2007    |
|  |                  |                         | EA 200801307 A1 30-12-2008  |
|  |                  |                         | EP 1959992 A2 27-08-2008    |
|  |                  |                         | JP 2009519309 T 14-05-2009  |
|  |                  |                         | KR 20080079312 A 29-08-2008 |
|  |                  |                         | US 2008279926 A1 13-11-2008 |
| -----                                  |                  |                         |                             |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ブノワ、バラ

ベルギー国ベー 1330、リクセンサール、リュ、ド、ランスティテュ、89、グラクソスミスクライン、バイオロジカルズ、ソシエテ、アノニム

(72)発明者 ディルク、ヘイセン

ベルギー国ベー 1330、リクセンサール、リュ、ド、ランスティテュ、89、グラクソスミスクライン、バイオロジカルズ、ソシエテ、アノニム

(72)発明者 イザベル、ソランジュ、リュシ、ノット

ベルギー国ベー 1330、リクセンサール、リュ、ド、ランスティテュ、89、グラクソスミスクライン、バイオロジカルズ、ソシエテ、アノニム

(72)発明者 ジャン ポール、プリエール

ベルギー国ベー 1330、リクセンサール、リュ、ド、ランスティテュ、89、グラクソスミスクライン、バイオロジカルズ、ソシエテ、アノニム

(72)発明者 ジャン フランソワ、トゥーサン

ベルギー国ベー 1330、リクセンサール、リュ、ド、ランスティテュ、89、グラクソスミスクライン、バイオロジカルズ、ソシエテ、アノニム

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA64 CC08 DD01 DD86 EE06 FF11 GG01