

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6096675号
(P6096675)

(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/04 (2006.01) A 6 1 K 39/04
A 6 1 K 9/127 (2006.01) A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/24 (2006.01) A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/26 (2006.01) A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 9/107 (2006.01) A 6 1 K 9/107

請求項の数 29 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-547850 (P2013-547850)	(73) 特許権者	513169928
(86) (22) 出願日	平成24年1月4日(2012.1.4)		アルチベル・ファルマ, ソシエダッド・リ
(65) 公表番号	特表2014-501768 (P2014-501768A)		ミターダ
(43) 公表日	平成26年1月23日(2014.1.23)		スペイン国 08916 バダロナ, ポリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/050080		ゴン・インダストリアル・ボナヴィスタ,
(87) 国際公開番号	W02012/093137		ケア・オブ・フォガルス・デ・トルデーラ
(87) 国際公開日	平成24年7月12日(2012.7.12)		61
審査請求日	平成26年12月22日(2014.12.22)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	11150072.4		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年1月4日(2011.1.4)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	11183487.5	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成23年9月30日(2011.9.30)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118902
微生物の受託番号	NCTC NCTC 13536		弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結核の治療又は予防に適切なりポソーム製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リポソーム製剤であって、

(a) 2010年にロンドンのNCTCに寄託されたMTB-C株NCTC 13536のフラグメントを含む、結核菌群(MTB-C)株由来のフラグメント、

(b) 水素化、部分水素化又は非水素化されてよいリン脂質であるリポソーム形成剤、4~6%(w/v)のスクロースを含み、粒子のZ-平均粒径が120nm以下であり、MTB-C細胞のフラグメントが細胞壁フラグメントであるか又は細胞壁フラグメントを含むリポソーム製剤。

【請求項2】

粒子のZ-平均粒径が40~110nmの範囲である、請求項1に記載のリポソーム製剤。

【請求項3】

リポソーム製剤がエマルジョンである、請求項1又は2のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項4】

粒子の多分散指数が0.4以下である、請求項1~3のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項5】

結核菌群(MTB-C)株が毒性結核菌群(MTB-C)株である、請求項1~4のい

れかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 6】

さらに、

(d) コール酸塩、デオキシコール酸塩、コレステロール及びコレステロールヘミスクシネートから選ばれる張力活性剤

及び／又は

(e) 一つ又は複数の非イオン界面活性剤を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 7】

(a) と (d) の比率が 0.05 : 1～1 : 5 (w/w) である、請求項 6 に記載のリポソーム製剤。 10

【請求項 8】

リポソーム形成剤が、レシチンである、請求項 1～7 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 9】

下記：

(i) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で 70 kDa の分子量を有する第一のポリペプチド、

(ii) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で 38 kDa の分子量を有する第二のポリペプチド、 20

(iii) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で 30 kDa の分子量を有する第三のポリペプチド、及び

(iv) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で 10 kDa の分子量を有する第四のポリペプチド、及び

(v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で 6 kDa の分子量を有する第五のポリペプチドの少なくとも 2 つを含み、(i)～(v) のポリペプチドが、MTB-C 株由来のフラグメントとして含有される、請求項 1～8 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 10】

下記の結核菌の抗原、すなわち HSP70、38 kDa タンパク質及び Ag85B、又はそのフラグメントの少なくとも一つが存在する、請求項 1～9 のいずれかに記載のリポソーム製剤。 30

【請求項 11】

一つ又は複数のミコール酸及び／又は糖複合ミコール酸を含む、請求項 1～10 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 12】

一つ又は複数の非イオン界面活性剤をさらに含む、請求項 1～11 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 13】

一つ又は複数の塩又はその溶液をさらに含有する、請求項 1～12 のいずれかに記載のリポソーム製剤。 40

【請求項 14】

前記塩は塩化ナトリウムである、請求項 13 に記載のリポソーム製剤。

【請求項 15】

リポソーム製剤が凍結乾燥されている、請求項 1～14 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 16】

請求項 1～15 のいずれかに記載のリポソーム製剤が溶媒中に再構成されている懸濁液。

【請求項 17】

医薬組成物であって、請求項 1～15 のいずれかに記載の製剤又は請求項 16 に記載の懸 50

濁液と、製薬学的に許容しうる担体又は希釈剤、及び／又は製薬学的に許容しうるアジュバントとを含む医薬組成物。

【請求項 18】

療法によるヒト又は動物の身体の治療法に使用するための、請求項 1 ～ 15 のいずれか一つ又は複数に記載のリポソーム製剤、請求項 16 に記載の懸濁液、又は請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

結核の治療又は予防法に使用するための、請求項 18 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 20】

下記：

(a) 潜伏結核感染を有する個人における活動性結核の予防法に使用するため；

(b) 疾患に暴露されているがまだ感染していない個人の感染を予防するための結核の一次予防法に使用するため、又は

(c) 潜伏性結核の治療又は予防法に使用するため

から選ばれる、請求項 19 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 21】

結核菌群 (M T B - C) 株由来のフラグメントの $1 \sim 1000 \mu\text{g}$ / 用量を含む投与量で人体に投与するための、請求項 18 ～ 20 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 22】

結核菌群 (M T B - C) 株由来のフラグメントの $25 \mu\text{g}$ の単回接種用量で人体に投与するための、請求項 18 ～ 20 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 23】

併用療法に使用するための、請求項 18 ～ 22 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 24】

抗生物質を含む、併用療法に使用するための、請求項 18 ～ 22 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 25】

イソニアジド及びアンサマイシンの 1 以上を含む、併用療法に使用するための、請求項 18 ～ 22 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 26】

アンサマイシンがリファンピシンである、併用療法に使用するための、請求項 25 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 27】

補助療法に使用するための、請求項 22 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 28】

補助療法において H I V 陽性ヒト対象に投与するための、請求項 27 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【請求項 29】

H I V 陰性ヒト対象に投与するための、請求項 22 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、結核菌群 (Mycobacterium tuberculosis-complex) 株由来のフラグメントを含むリポソーム製剤、これらの製剤を含む懸濁液及び医薬組成物、及び治療、特に結核を治

10

20

30

40

50

療又は予防する方法におけるそれらのそれぞれの使用を提供する。本発明の製剤は、スクロースを含有し、そして／又は従来の結核療法のリポソーム系薬剤より小さい平均粒径を有しているため、より高いバイオアベイラビリティ及び効率をもたらす。

【背景技術】

【0002】

結核は、マイコバクテリウム種の（ヒト）型結核菌(*M. tuberculosis*)、ウシ型結核菌(*M. bovis*)、ネズミ型結核菌(*M. microti*)及びマイコバクテリウム・アフリカヌム(*M. africanum*)を含む結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis-complex*) (MTB-C) の桿菌(*bacillus*)によって引き起こされる慢性感染症である。マイコバクテリアの細胞エンベロープの主な独自特徴は、厚くてろう状の細胞壁である。この細胞壁バリアの性質は、宿主とMTB-C桿菌間の免疫反応の直接モジュレーターとして作用することにより、微生物の細胞内生存にも貢献している。エンベロープは、二つの異なる部分、すなわち細胞膜とその周囲の壁からなる。細胞壁は、ペプチドグリカンと、ホスホジエステル結合によって結合された分枝鎖多糖、アラビノガラクトタンとの共有結合構造によって形成される骨格である。アラビノガラクトタンの遠位端は、マイコバクテリアに特有のサイズ及び構造の高分子量脂肪酸であるミコール酸でエステル化されている。

10

【0003】

世界保健機関によれば、世界中で毎年9,000,000人の新規発症例が記録され、約2,000,000人が死亡している。世界中に2,700,000,000人を超える感染者がおり、毎年9千万人～1億人を超える新規感染が発生していると考えられている。

20

【0004】

マイコバクテリウムの毒性(virulent)又は非毒性(avirulent)株の細胞壁フラグメントを基にした様々な抗結核ワクチンが現状の技術に報告されている。結核に対する予防的治療で現在使用されているワクチンは、ウシ型結核菌の弱毒変異株であるBCG(カルメットーゲラン桿菌(*Bacillus Calmette-Guerin*))と呼ばれる株の細菌を基にしたものである。ワクチンの組成物に使用されるアジュバントはその有効性に大きく影響しうることも知られている。

【0005】

トレハロースミコール酸、特にトレハロースジミコール酸は、結核菌抽出物の最も生物活性な脂質で、肉芽腫形成に影響する前炎症性カスケードを誘導する。結核菌の細胞壁に存在するこれらの化合物の量に関する書誌データがないことに注意すべきである。この種から抽出されるどのサンプルも高度な生物学的複雑さを有している。従って、定量分析を実施するには、積極的、複雑かつ長期の精製工程が必要とされる結果、あまりにも少量の精製化合物しか得られず、さらなる構造分析を実施することができない。これが結核菌の細胞壁中の各化合物の正確な割合に関する公表データが存在しない理由である。リポアラビノマンナンのようないくつかの糖脂質は、MTB-C細胞の典型的な構成要素である。リポアラビノマンナンは、MTB-Cの毒性(virulence)に関連している。

30

【0006】

E. Ribicらは、*Nature* 1963, 198, 1214～1215ページに、非毒性カルメットーゲラン桿菌(BCG)株の細胞壁フラグメントと鉱油を含む組成物を用いて実施した免疫付与アッセイについて記載している。前記フラグメントは、前記株の培養物を鉱油中でホモジナイズすることによって得られる。該組成物は、従来のワクチン(BCG)よりも有効である。にもかかわらず、同じ論文に、細胞壁フラグメントは、それらを水中でのホモジナイズにより鉱油の不在下で得た場合、何の免疫応答も誘導しないことが記載されている。

40

【0007】

D. P. Palらは、*Indian J. Med. Res.* 1977, 65, 340～345ページに、毒性H37Rv株の細胞壁フラグメントと鉱油を用いて調製されたワクチンについて記載している。この場合、細胞壁フラグメントは、死細胞の水性相中ホモジ

50

ナイズによって得られ、鉱油はその後組成物に加えられている。ここでも、水性相中でホモジナイズされた細胞壁フラグメントは免疫原性がないこと、ワクチンが有効であるためには鉱油の存在が必要であることが述べられている。

【0008】

G. K. Khullerらは、Folia Microbiol., 1992, 37, 407～412ページに、フロイント不完全アジュバントを用いて製剤化された結核菌の非毒性H37Ra株の細胞壁の様々な画分の保護効果を記載しているが、これも鉱油を含んでいる。

【0009】

E. M. Aggerらは、Scand. J. Immunol., 2002, 56, 443～447ページに、毒性H37Rv株の細胞壁フラグメントを含むワクチンは、カチオン界面活性剤のジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミドをアジュバントとして含む場合、有効であることを記載している。また、上記アジュバントを含有していないホモジナイズされた結核桿菌を用いて実施されたアッセイは、マウスモデルの結核に対して抵抗レベルを生じないことも記載されている。

10

【0010】

I. M. Ormeは、Vaccine, 2006, 24, 2～19ページ（対結核ワクチンの総説記事）に、従来のカルメット－ゲラン桿菌（BCG）を基にしたワクチンは、本質的に成人を結核から保護するのに無効であると記載している。

【0011】

20

結核に関連した治療又は予防から利益を受けられる個人は、以下の4つのサブグループに分けることができる。

【0012】

（I）疾患に暴露されていない個人。予防接種はそのような個人の感染を防止することができる。

【0013】

（II）疾患に暴露されてはいるが未感染の個人。皮膚ツベルクリン検査（TST）は陰性である。一次予防はそのような個人の感染を防止することができる。

【0014】

（III）発病していない潜伏性結核を有する個人。発症のリスクが化学療法の適用によって低減できる。化学療法は、これらの個人が高リスク感染源となることを基本的に止めるという利益ももたらす。

30

【0015】

（IV）病気である、すなわち疾患（通常、疾患の一次形態であるが、ほとんど又は全く感染力がない）を患っている個人。化学療法は、これらの個人が感染力を持つようになることを回避する。

【0016】

感染が起きた場合、感染した個人、すなわち潜伏性結核を有する個人に活動性結核が発症するのを防御するための様々な治療法が現状の技術に記載されている。

【0017】

40

例えば、特許出願EP2196473 A1には、感染した個人（疾患をまだ発症していない人も疾患を既に発症した人も）の結核を治療するために、イソニアジドを含む様々な薬物を数ヶ月に及ぶ期間投与できることが記載されている。

【0018】

特許出願ES2231037 A1には、イソニアジド又はリファンピシンのような他の薬物と組み合わせて感染した個人の結核を治療するための医薬の製造に、結核菌群（MTB-C）の毒性株の細胞フラグメントを含む免疫療法薬を使用することが記載されている。この特許出願は、MTB-C株の細胞壁フラグメントを含む免疫療法薬の製造法も開示している。

【0019】

50

WO2010/031883 A1に概説されているように、潜伏結核感染の伝播は、主に結核菌に感染したエアゾールを呼吸することによって発生する。従って、肺結核に罹患している、従って感染エアゾールを撒き散らすことができる患者と直接接触する人、例えば同居人又は彼らと何らかのその他のタイプの緊密又は頻繁な接触を持つ人はリスク群と見なされる。

【0020】

現在、I群の個人（上記）に通常投与される感染の一次予防は、5mg/kgの用量のイソニアジドを300mg/日を超えずに毎日投与することに基づく一次化学的予防である。この治療法は、感染個人と同居している及び／又は何らかのその他のタイプの緊密接触を持つTST陰性のあらゆる年齢のすべての個人に適応される。この場合、化学的予防は、感染源との接触中止後、又は感染源が感染性でなくなった後3ヶ月間維持される必要がある。しかしながら、化学的予防は、Martinezら, Arch. Bronchopneumol., 2005, 41(1), 27-33ページに記載されているように、場合によっては望まざる二次的影響をもたらすこともある。

10

【0021】

毒性結核菌群（MTB-C）株のフラグメントを含む医薬が、例えば、EP1690549 B1、EP2090318 A1及びPCT/ES2009/000436に記載されている。EP2090318 A1及びPCT/ES2009/000436は、任意に他の薬物と組み合わせて、結核の予防に適切な医薬として使用するための毒性結核菌群（MTB-C）株のフラグメントを含む医薬組成物を開示している。他方、EP1690549 B1は、任意に他の薬物と組み合わせて、結核の治療に適切なMTB-Cフラグメントを含む医薬組成物を開示している。

20

【0022】

特許出願EP2090318 A1に、MTB-Cの毒性株の細胞壁フラグメントを基にした薬剤を含む薬物の投与は、結核菌特異抗原に対してTh1型インターフェロン-γ産生応答を誘導できると報告されている。前記抗原は、細胞壁の生合成に決定的役割を果たす低分子量タンパク質のファミリーからなる複合体Ag85の一部であるAg85B及びAg85Aを含み、細菌培養が対数増殖（log）期にあるときに相当量産生される。さらに、EP2090318 A1には、従来のカルメット-ゲラン桿菌（BCG）を基にしたワクチンは、複合体Ag85の抗原に対して免疫保護応答を生じないことも報告されている。特異的リンパ球によるインターフェロン-γの産生は重要な役割を持つ。すなわち、感染マクロファージが桿菌の増殖を停止させることができる（North & Young, Ann. Rev. Immunol., 2004, 22:599-623）。

30

【0023】

世界保健機関は、結核（TB）発症のリスクは、HIV感染者ではHIV非感染者よりも20～37倍高いと推定されるということを認識している。概説が“資源制約環境におけるHIV感染者のための結核症例発見の強化及びイソニアジド予防療法のためのガイドライン(Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings)”

WHO Guidelines 2011, ISBN: 978 92 4 150070

40

8に示されている。しかしながら、イソニアジド予防療法は、HIV陽性個人に対して長く持続する保護を提供するような予防接種ではない。それどころか、イソニアジドは定期的に投与される必要があり、イソニアジド耐性がこの療法を弱体化させている。従って、HIV陽性ヒト対象のためにより強力な予防的及び療法的治療を提供することが依然として求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0024】

【特許文献1】EP2196473 A1

【特許文献2】ES2231037 A1

50

【特許文献3】WO2010/031883 A1

【特許文献4】EP1690549 B1

【特許文献5】EP2090318 A1

【特許文献6】PCT/ES2009/000436

【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】E. Ribicら, Nature 1963, 198, 1214~1215 ページ

【非特許文献2】D. P. Palら, Indian J. Med. Res. 1977, 65, 340~345 ページ

【非特許文献3】G. K. Khullerら, Folia Microbiol., 1992, 37, 407~412 ページ

【非特許文献4】E. M. Aggerら, Scand. J. Immunol., 2002, 56, 443~447 ページ

【非特許文献5】I. M. Orme, Vaccine, 2006, 24, 2~19 ページ

【非特許文献6】Martinezら, Arch. Bronchoneumol., 2005, 41(1), 27-33 ページ

【非特許文献7】North & Young, Ann. Rev. Immunol., 2004, 22: 599-623)

【非特許文献8】WHO Guidelines 2011, ISBN: 978 92 4 150070 8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

本発明の目的は、HIV陽性及びHIV陰性ヒト対象における結核の予防又は治療、例えば潜伏性結核の予防、潜伏性又は活動性結核の一次予防、及び／又は治療に適切な、改良された薬剤を提供することである。更なる目的は、薬剤の製造に適切なMTB-C株の提供である。薬剤の製造法も本発明の更なる目的である。

【課題を解決するための手段】

【0027】

定義

“FCMt b”は、結核菌群(Mycobacterium tuberculosis-complex) (MTB-C) 株由来のフラグメントを表す。

【0028】

“粒径”は、特に断りのない限り、粒子の直径のことである。粒径が正確に決定できない場合、およその粒径を意味する。

【0029】

“z-平均”は平均粒径であり、材料及び方法の部に記載の通りに決定できる。

【0030】

略語

AIDS 後天性免疫不全症候群

B CG カルメットーゲラン桿菌(Bacillus Calmette-Guerin)

C F U コロニー形成単位

D P 薬物製品

D S 薬物物質

E L I S A 酵素免疫吸着アッセイ (エライザ法)

E L I S P O T 酵素免疫スポットアッセイ (エリスロット法)

E M E A 欧州医薬品庁

F C M t b 結核菌細胞のフラグメント

F I M ヒト初回投与

10

20

30

40

50

H I V ヒト免疫不全ウイルス
 I F N - γ インターフェロンガンマ
 I G T I P インスティトゥート・ペル・ア・ラ・レセルカ・エン・シエンサス・デ・
 ラ・サルート・ジェルマン・ス・トリアス・イ・プジョール(Institut per a la Recerca e
 n Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol)
 I M P 治験中医薬品
 I P C 工程内管理
 L C S リポソーム濃縮物懸濁液
 L T B I 潜伏結核感染
 L P S リポ多糖 10
 M t b (ヒト型) 結核菌(Mycobacterium tuberculosis)
 M t b 結核菌群(Mycobacterium tuberculosis-complex)
 N Z B ニュージーランドブラック (マウス)
 N Z W ニュージーランドホワイト (マウス)
 P P D タンパク質精製誘導体 (精製ツベルクリンタンパク体) (Protein-purified de
 rivative)
 q . s . 足るだけ十分に(Quantum sufficit)
 T B 結核
 T S T 結核に関する皮膚試験 (ツベルクリン検査)
 W H O 世界保健機関 20
 w / v 重量 / 体積
 w / w 重量 / 重量

発明の概要

本発明は、結核菌群 (M T B - C) 株由来のフラグメント (F C M t b) とリポソーム形成剤とを含むリポソーム製剤を提供する。

【0031】

特別な態様において、例えば動的光散乱によって測定可能な粒子の z - 平均粒径は、120 nm 以下、好ましくは 110 nm 以下、さらに好ましくは 95 nm 以下、最も好ましくは 80 nm 以下である。代替の態様において、リポソーム製剤は、1 ~ 20 % (w / v) のスクロース、好ましくは 2 ~ 12 % (w / v) のスクロース、さらに好ましくは 3 ~ 8 % (w / v) のスクロース、最も好ましくは 4 ~ 6 % (w / v) のスクロースを含む。これら二つの態様はそれぞれ個別に実施されうるが、これらの態様は相互排他的と見なされるべきではなく、組み合わせて実施されてもよいことに注意することは重要である。

【0032】

一つの特別な態様において、上記リポソーム製剤は、40 ~ 120 nm、好ましくは 50 ~ 110 nm、さらに好ましくは 55 ~ 95 nm、最も好ましくは 55 ~ 80 nm の範囲の z - 平均粒径を有する。

【0033】

代替の特別な態様において、上記リポソーム製剤の平均粒径は、リポソーム製剤がエマルジョンとなるようにさらに小さくてもよい。すなわち、この特別な態様において、粒子の z - 平均粒径は好ましくは 40 nm 未満である。

【0034】

上記態様のいずれか一つ又は複数の好適な態様において、リポソーム製剤は、粒子の多分散指数が 0.4 以下、好ましくは 0.3 以下であるリポソーム製剤である。

【0035】

上記態様のいずれかのさらに好適な態様において、結核菌群 (M T B - C) 株は毒性結核菌群 (M T B - C) 株である。

【0036】

上記態様のいずれかにおいて、(a) 結核菌群 (M T B - C) 株由来のフラグメントと (b) リポソーム形成剤の比率は 0.01 : 1 ~ 1 : 1、好ましくは 0.06 : 1 ~ 0. 50

1 : 1であることがさらに好適である。

【0037】

上記いずれかのさらに好適な態様において、リポソーム製剤は、さらに（d）張力活性剤(tensioactive agent)を含む。なおさらに好適な態様において、（d）張力活性剤を含むリポソーム製剤は、（a）と（d）の比率が0.1 : 1 ~ 10 : 1（w/w）、好ましくは0.5 : 1 ~ 2 : 1（w/w）、最も好ましくは0.6 : 1 ~ 0.8 : 1（w/w）であるリポソーム製剤である。

【0038】

上記の特別な態様において、リポソーム製剤のリポソーム形成剤は、リン脂質、好ましくはレシチン、さらに好ましくは卵レシチン又は大豆レシチンからなる群から選ばれる一つ、最も好ましくは大豆レシチンであり、そのそれぞれは、水素化されていても、部分水素化されていても又は非水素化でもよい。

10

【0039】

界面活性剤含有リポソーム製剤の好適な態様において、張力活性剤は、コール酸塩、デオキシコール酸塩、コレステロール及びコレステロールヘミスクシネートから選ばれる。

【0040】

さらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、MTB-C細胞のフラグメントが細胞壁フラグメントであるか又は細胞壁フラグメントを含むリポソーム製剤である。

【0041】

別のさらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、2010年にロンドンのNC TCに寄託されたMTB-C株NC TC 13536のフラグメントを含む。この株は同義的に511とも呼ばれるので、NC TC 13536と511の名称は互換的に使用できる。

20

【0042】

なおさらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、以下の少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくはすべてを含む。

【0043】

（i）結核菌のHSP70タンパク質（Rv0350）の質量フィンガープリントに類似した約70 kDaの分子量を有する第一のポリペプチド、

（ii）結核菌の38 kDaタンパク質（Rv0934）の質量フィンガープリントに類似した約38 kDaの分子量を有する第二のポリペプチド、

30

（iii）結核菌のAg85Bタンパク質（Rv1866c）の質量フィンガープリントに類似した約30 kDaの分子量を有する第三のポリペプチド、

（iv）結核菌のCFP10タンパク質（Rv3874）の質量フィンガープリントに類似した約10 kDaの分子量を有する第四のポリペプチド、及び

（v）結核菌のESAT-6タンパク質（Rv3875）の質量フィンガープリントに類似した約6 kDaの分子量を有する第五のポリペプチド。

【0044】

なおさらに好適な態様において、リポソーム製剤は、結核菌の19 kDaリポタンパク質抗原前駆体LpqH（Rv3763）の質量フィンガープリントに類似した約19 kDaの分子量を有するリポポリペプチドを含む。

40

【0045】

なおさらに好ましくは、上記リポソーム製剤は、さらに、下記の結核菌の抗原、又はそのフラグメントの少なくとも一つが存在することを特徴とする。すなわち、HSP70、38 kDaタンパク質及びAg85Bである。この意味におけるフラグメントは、これらのポリペプチドのいずれかの任意の部分、例えば分解産物である。

【0046】

さらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、結核菌又はその誘導体に典型的に見出される脂質、例えば糖複合脂質のような複合生成物を含有する。好ましくはI、III又はIV型のいずれか一つ又は複数に属するミコール酸の一つ又は複数を含むのがさらに好

50

適である。あるいは又はさらに、糖複合ミコール酸、好ましくはトレハロースジミコール酸が製剤に含まれてもよい。あるいは又はさらに、少なくとも一つのMTBC由来の糖脂質が本発明によるリポソーム製剤中に存在するのがさらに好適であり、好適な糖脂質はリポアラビノマンナンである。

【0047】

上記リポソーム製剤は、さらに、好ましくは非イオン界面活性剤の群からの一つ又は複数の界面活性剤を含みうる。

【0048】

さらに好適な態様において、前記請求項のいずれかによるリポソーム製剤は、さらに一つ又は複数の塩又はその溶液を含み、好適な塩は塩化ナトリウムである。

10

【0049】

上記いずれかのなおさらに好適な態様において、本発明のリポソーム製剤は凍結乾燥される。

【0050】

本発明は懸濁液も提供し、その場合、前記請求項のいずれかのリポソーム製剤は溶媒中に再構成される。好適な態様において、この懸濁液の溶媒は水性であり、好ましくは生理的血清であるか又は生理的血清を含む。

【0051】

本発明はまた、上記態様のいずれか一つ又は複数に記載のリポソーム製剤、又は上記態様のいずれか一つ又は複数に記載の懸濁液、及び製薬学的に許容しうる担体又は希釈剤又は賦形剤（担体、希釈剤又は賦形剤として適切な任意の物質が使用できる）を含む医薬組成物も提供する。その好適な態様において、この医薬組成物はさらに製薬学的に許容しうるアジュバントも含む。

20

【0052】

本発明はまた、療法によってヒト又は動物の身体の治療法に使用するための製品も提供する。すなわち、療法によってヒト又は動物の身体の治療法に使用するための、上記態様のいずれか一つ又は複数によるリポソーム製剤、上記態様のいずれか一つ又は複数による懸濁液、又は上記態様のいずれか一つ又は複数による医薬組成物を提供する。特別な態様において、本発明は、このリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物を注射用として提供する。別の特別な態様において、本発明は、このリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物を結核の治療又は予防法に使用するために提供する。これらの特別な態様は、個別でも又は組み合わせても実施できる。

30

【0053】

さらに特別な態様において、本発明は、療法による人体の治療法におけるその使用に関連して上記された事に従うリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物が、さらに、1～1000、好ましくは3～250、さらに好ましくは4～80、最も好ましくは約5、約25又は約50 µg / 用量のFCMt bを含む用量で人体に投与するためのものであることを特徴とするリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物を提供する。

【0054】

(a)～(c)のさらに三つの特別な態様において、療法によるヒト又は動物の身体の治療法におけるその使用に関連して上記された事に従うリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物は、(a)潜伏結核感染を有する個人における活動性結核の予防法に使用するため、(b)疾患に暴露されているがまだ感染していない個人の感染を予防するための結核の一次予防法に使用するため、又は(c)潜伏性結核の治療又は予防法に使用するためのものである。

40

【0055】

療法によるヒト又は動物の身体の治療法に使用するための上記リポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物の好適な態様において、その使用は併用療法又は補助療法における使用である。補助療法は、一次治療と組み合わせた追加療法又は二次療法で、状態の治療における効果を増大する。併用療法の特別な態様は、併用療法が抗生物質、好ましくはイソニア

50

ジド及びアンサマイシンの一つ又は複数を含むものであり、アンサマイシンは最も好ましくはリファンピシンである。本発明の特別な態様において、補助療法は、H I V陽性ヒト対象に投与され、25 μ gのFCMt bの単回投与が好適である。

【0056】

本発明はまた、リポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物である薬剤のいずれかの製造法も提供する。

【0057】

本発明はさらに、2010年にロンドンのNCTCに寄託されたMTB-C株NCTC 13536も提供する。

【図面の簡単な説明】

10

【0058】

【図1】図1は、薬物物質FCMt bの上流工程を示すフローチャートである。工程に関する材料及び試薬及び適切な工程内管理を含む。

【図2】図2は、薬物物質FCMt bの下流工程を示すフローチャートである。工程に関する材料及び試薬及び適切な工程内管理を含む。

【図3】図3は、タンパク質特性分析のフローチャートを示す。

【図4】図4は、SDS-PAGE及びクーマシーブルー染色方法論による抗原の同定。基準抗原ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38 kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4)、ならびに分子量マーカーMW (5)を示す。

20

【図5a】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5aは、タンパク質プロフィール：標準品FCMt b-52.1 (1~6)の、最終濃度15.6 μ g FCMt b/mL (1、2)、6.25 μ g FCMt b/mL (3、4)及び1.56 μ g FCMt b/mL (5、6)におけるタンパク質プロフィールを示す。SDS pageの後、クーマシー染色。MWの単位はkDa。

【図5b】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5bは、19 kDaバンドの同定を示す。SDS pageの後、銀染色。

【図5c】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5cは、タンパク質プロフィール：Lionex社製ESAT-6標準と並行して実施された、示されたFCMt bバッチ中のバンド (10 kDa及び6 kDa)のSDS-PAGE及び銀染色方法論による同定を示す。様々なFCMt bバッチ (1、2、3、9、10、11、(バッチFCMt b-52.1はレーン9))、様々な濃度のLionex社製ESAT-6標準 (4~8)。

30

【図5d】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5dは、結核菌HSP70標準と並行して特異的抗体を用いるウェスタンブロットによるFCMt bバッチ中の抗原、結核菌HSP70 (Rv0350)のウェスタンブロット同定を示す。様々なFCMt bバッチ (1、2、3、4、7、8、9)、HSP70標準 (5、6)。

【図5e】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5eは、特異的抗体を用い、Lionex社製結核菌38 kDa標準と並行して実施されたFCMt bバッチ中の抗原、結核菌38 kDa (Rv0934)のウェスタンブロット方法論による同定を示す。Odyssey Systemを用いる蛍光検出。様々なFCMt bバッチ (1、2、3、6、7)、38 kDa標準 (4、5)。

40

【図5f】図5はタンパク質の特性分析を示す。図5fは、特異的抗体を用い、Lionex社製結核菌Ag85B標準と並行して実施されたFCMt bバッチ中の抗原、Ag85B (Rv1886c)のウェスタンブロット方法論による同定を示す。Odyssey Systemを用いる蛍光検出。様々なFCMt bバッチ (1、2、3、5、6、7)、Ag85B標準 (4)。

【図6】図6は、様々なFCMt bバッチ (50 μ g/レーン)の示されたタンパク質バンドと、本発明によるリポソーム製剤を基にした医薬ワクチン組成物を2回接種された後の感染マウスから得た1/8000希釈血清との相互作用を示す。ウェスタンブロット方法論を使用。

50

【図7a】図7は脂質分析を示す。図7aは、基準株（H37Rv（2）及びNCTC 13536（1））及び様々なFCMt bバッチ（3～9）、及びTDM標準（10）中のポリアシルトレハロース（PT）、トレハロース6, 6'-ジミコール酸（TDM）及びジアシルトレハロース（DAT）のTLC方法論による同定を示す。

【図7b】図7は脂質分析を示す。図7bは、FCMt bバッチ中のトレハロース6, 6'-ジミコール酸（TDM）のTLC方法論による同定を示す。パネル（A）及び（B）は二つの独立したアッセイを表す。（A）TDM標準（11）及び（12）、他のレーンは様々なFCMt bバッチ。B：（1）TDM標準（1）、他のレーンは様々なFCMt bバッチ。

【図7c】図7は脂質分析を示す。図7cは、TLC方法論によるFCMt bバッチ中のミコール酸I、III及びIVのパターンを示す。パネル（A）、（B）及び（C）は三つの独立したアッセイを表す。（A）FCMt bバッチ（1～6（FCMt b-51.2標準は6））、（B）例示／参照用、（C）ミコール酸標準（2）と比較したバッチFCMt b-47b（1）。

【図7d】図7は脂質分析を示す。図7dは、LAMの同定を示す（左側レーンは基準、残りのレーンは本発明によるリポソーム由来のサンプル）。

【図8】図8は、注射用水（WFI）で再懸濁されたFCMt b対リポソームを用いて製剤化されたFCMt b（RUTIワクチン、バッチ10aと表示）の、同一用量（50 µg／用量）における細胞免疫効力の比較を示す。

【図9】図9は、リポソーム濃縮物（LCS）バルクの凍結割断標本を示す（電子顕微鏡法）。

【図10a】図10aは、効力試験において2種類のワクチン製剤を用いて試験されたバッチあたりの細胞免疫応答を示す（1回ワクチン接種）。

【図10b】図10bは、aと同様であるが、ただし2回のワクチン接種の場合を示す。“製剤II”は本文書の表1に従って5%（w/w）のスクロースを含む。“製剤I”は、スクロースが存在しないことを除いて製剤IIと同様である。µgはµg FCMt b／用量のことである。85BはAg 85Bである。

【図11】図11は、本発明を実施するための好適な様式による工程のフローチャートを示す。

【図12】図12は、実施例12に記載の通り、RUTI 25 µgの1回接種の免疫学的プロフィールを示す。

【図13】図13は、実施例12に記載の通り、免疫原性（HIV-及びHIV+）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0059】

本発明は、結核菌群（MTB-C）株由来のフラグメント（FCMt b）とリポソーム形成剤とを含むリポソーム製剤を提供する。

本発明の態様

態様1 リポソーム製剤であって、

（a）結核菌群（MTB-C）株由来のフラグメント、

（b）リポソーム形成剤、

1～20%（w/v）のスクロース、好ましくは2～12%（w/v）のスクロース、さらに好ましくは3～8%（w/v）のスクロース、最も好ましくは4～6%（w/v）のスクロースを含み、粒子のz-平均粒径が120 nm以下であるリポソーム製剤。

態様2 粒子のz-平均粒径が40～110 nm、さらに好ましくは55～95 nmの範囲である、態様1に記載のリポソーム製剤。

態様3 リポソーム製剤がエマルジョンであり、粒子のz-平均粒径が好ましくは40 nm未満である、態様1又は2のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様4 粒子の多分散指数が0.4以下、好ましくは0.3である、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様5 結核菌群（MTB-C）株が、毒性結核菌群（MTB-C）株、好ましくは2010年にロンドンのNCTCに寄託されたMTB-C株NCTC 13536である、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様6 さらに、

（d）張力活性剤

及び／又は

（e）一つ又は複数の非イオン界面活性剤

を含む、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様7 MTB-C細胞のフラグメントが細胞壁フラグメントであるか又は細胞壁フラグメントを含む、前記態様のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。

態様8 （a）と（d）の比率が0.05：1～1：5（w/w）である、態様6に記載のリポソーム製剤。

態様9 リポソーム形成剤が、水素化、部分水素化又は非水素化リン脂質、好ましくはレシチン、最も好ましくは大豆レシチンである、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様10 張力活性剤が、コール酸塩、デオキシコール酸塩、コレステロール及びコレステロールヘミスクシネートから選ばれる、態様10～12のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様11 MTB-C細胞のフラグメントが細胞壁フラグメントであるか又は細胞壁フラグメントを含む、前記態様のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。

態様12 2010年にロンドンのNCTCに寄託されたMTB-C株NCTC 13536のフラグメントを含む、前記態様のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。

態様13 下記：

（i）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約70kDaの分子量を有する第一のポリペプチドであって、その第一のポリペプチドは、結核菌のHSP70タンパク質（Rv0350）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する第一のポリペプチド、

（ii）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約38kDaの分子量を有する第二のポリペプチドであって、その第二のポリペプチドは、結核菌の38kDaタンパク質（Rv0934）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する第二のポリペプチド、

（iii）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約30kDaの分子量を有する第三のポリペプチドであって、その第三のポリペプチドは、結核菌のAg85Bタンパク質（Rv1866c）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する第三のポリペプチド、及び

（iv）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約10kDaの分子量を有する第四のポリペプチドであって、その第四のポリペプチドは、結核菌のCFP10タンパク質（Rv3874）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する第四のポリペプチド、及び

（v）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約6kDaの分子量を有する第五のポリペプチドであって、その第五のポリペプチドは、結核菌のESAT-6タンパク質（Rv3875）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する第五のポリペプチド

の少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくはすべてを含む、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様14 下記の結核菌の抗原、すなわちHSP70、38kDaタンパク質及びAg85B、又はそのフラグメントの少なくとも一つが存在する、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様15 一つ又は複数のミコール酸及び／又は糖複合ミコール酸、好ましくはトレハロースジミコール酸及び／又は糖脂質、好ましくはリポアラビノマンナンを含む、前記態

10

20

30

40

50

様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様 16 一つ又は複数の非イオン界面活性剤をさらに含む、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様 17 一つ又は複数の塩又はその溶液をさらに含有し、前記塩は好ましくは塩化ナトリウムである、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様 18 リポソーム製剤が凍結乾燥される、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤。

態様 19 懸濁液であって、前記態様のいずれかに記載のリポソーム製剤が溶媒中に再構成されており、前記溶媒は、好ましくは水性であり、さらに好ましくは生理的血清であるか又は生理的血清を含む懸濁液。

10

態様 20 医薬組成物であって、態様 1～18 のいずれかに記載の製剤又は態様 19 に記載の懸濁液と、製薬学的に許容しうる担体又は希釈剤、及び／又は製薬学的に許容しうるアジュバントとを含む医薬組成物。

態様 21 療法によるヒト又は動物の身体の治療法に使用するための、態様 1～18 のいずれか一つ又は複数の記載のリポソーム製剤、態様 19 に記載の懸濁液、又は態様 20 に記載の医薬組成物。

態様 22 結核の治療又は予防法に使用するための、態様 21 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 23 下記：

(a) 潜伏結核感染を有する個人における活動性結核の予防法に使用するため；

20

(b) 疾患に暴露されているがまだ感染していない個人の感染を予防するための結核の一次予防法に使用するため、又は

(c) 潜伏性結核の治療又は予防法に使用するため

から選ばれる、態様 22 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 24 1～1000、好ましくは3～250、さらに好ましくは4～80、最も好ましくは約5、約25又は約50 μg / 用量の FCMtb を含む用量で人体に投与するための、態様 21～23 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 25 25 μg FCMtb の単回接種用量で人体に投与するための、態様 21～23 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 26 併用療法、好ましくは抗生物質、さらに好ましくはイソニアジド及びアンサマイシンの一つ又は複数を含み、ここでアンサマイシンは最も好ましくはリファンピシンである併用療法に使用するための、態様 21～25 のいずれかに記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

30

態様 27 補助療法に使用するための、態様 25 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 28 補助療法において HIV 陽性ヒト対象に投与するための、態様 27 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

態様 29 HIV 陰性ヒト対象に投与するための、態様 25 に記載のリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物。

40

【0060】

特に明記しない限り、“含む(comprising)”という用語は、本願の文脈においては、“含む”によって導入されたリストのメンバーのほかに、更なるメンバーが存在してもよいことを示すために使用される。しかしながら、本発明の特定の態様として、“含む”という用語は、更なるメンバーは存在しない可能性を包含する、すなわちこの態様の目的のために“含む”は“からなる(consisting of)”の意味を有すると理解されることを想定している。

【0061】

詳細な説明に、本発明の個々の特徴の特定の変形及び／又は好適な変形が開示されている。本発明はまた、特別に好適な態様として、本発明の特徴の二つ以上について記載され

50

た特定の変形及び／又は好適な変形の二つ以上を組み合わせることによって生じるような態様も想定している。

【0062】

リポソーム化の工程は脂質環境を生じて溶解を促進し、F C M t bのような物質の懸濁液をもたらすことが一般に認められている。本発明の意味の範囲内にあるリポソームは、単層、多重層又はそれらの組合せでありうる。

【0063】

F C M t bは、M T B - C株由来の任意のタイプの物質であってよいが、タンパク質及び／又は脂質から誘導されたフラグメントが好適である。本願の意味の範囲内のF C M t bは、典型的には、M T B - C細胞由来の様々なタンパク質抗原と脂質の混合物である。

10

【0064】

細胞フラグメントは、微生物細胞又は細菌細胞、例えば具体的にはM T B - C細胞をフラグメント化するのに適切な当業者に公知の任意の方法、例えばホモジナイズによって得ることができる。ホモジナイズは、超音波処理によって、又は直径約0.1 mmの小ビーズ、例えばシリカ又はジルコニア／シリカビーズを機械的ホモジナイザーと共に使用することによって実施できる。使用できる機械的ホモジナイザーは、例えばB i o S p e c B e a d B e a t e r（登録商標）モデルである。M T B - C細胞は、このホモジナイズ工程によって破壊され、その結果、典型的には小細胞壁フラグメントを含む小細胞フラグメントが得られる。細胞フラグメントの製造に通常関連する特徴は、脱脂による細胞壁フラグメントの“解毒”である。これは、当業者に周知の通り、エンドトキシン様分子の除去を可能にする工程である。従って、F C M t bは好ましくは解毒及び低温殺菌されるので、得られたリポソーム製剤は無菌であり、エンドトキシンを含まない。細胞フラグメントの緩衝液中分散物は、その貯蔵を容易にするために凍結乾燥されてもよい。そのためには、分散物をバイアルに分配し、 -15°C ～ -120°C 、例えば -45°C の温度及び0.1～0.5 m b a rのような真空を用いて凍結乾燥すればよい。

20

【0065】

本発明によるリポソームは、通常、少なくとも99.9%（数による）が $1\mu\text{m}$ より小さいサイズ分布を有する。特別な態様において、動的光散乱によって測定可能な粒子のz-平均粒径は、 120nm 以下、好ましくは 110nm 以下、さらに好ましくは 95nm 以下、最も好ましくは 80nm 以下である。動的光散乱では、z-平均パラメーターはその技術によって得られる安定で重要な数と見なされ、そのサイズ数は品質管理目的のために好適に使用される。好ましくは、本発明による製剤のリポソームは単峰性である、すなわち動的光散乱測定で単一のピークしか示さない。さらに好ましくは、本発明による製剤のリポソームは球形である。これは、実施例9に示されているように、リポソーム製剤の凍結割断標本の電子顕微鏡法によって検査することができる。球形とは、リポソーム粒子の少なくとも90%（数による）について、個々の粒子のすべての表面点がリポソームの中心に対して類似又は同一の距離を有している、すなわちそのような粒子の最小半径は同じ粒子の最大半径の0.6以上、0.7以上、0.8以上又は0.9以上の割合となるような関係性にあることを意味する。本発明によるリポソーム製剤は、多重層又は単層リポソーム、又はそれらの混合物を含みうる。当業者に標準的知識に従って、動的光散乱測定は、適切な緩衝液中で実施されるべきである。すなわち、それ自体、リポソームの破壊、崩壊又は融合を起こさない、又は何らかのその他の様式で物理的にそれらを著しく不安定にしない緩衝液である。大まかに言えば、イオン強度とpH値の両方がリポソームが形成された緩衝液に匹敵している限り、任意の緩衝液が適切でありうる。好ましくは、リポソームが形成された緩衝液に類似した又は同一の組成の緩衝液が使用される。

30

40

【0066】

代替の態様において、リポソーム製剤はさらに、1～20%（w/v）のスクロース、好ましくは2～12%（w/v）のスクロース、さらに好ましくは3～8%（w/v）のスクロース、最も好ましくは4～6%（w/v）のスクロースを含む。約5%のスクロースが特に好適である。

50

【0067】

これらの態様のそれぞれ（一つは特別な粒径に関し、もう一つはスクロースの存在に関する）は個別に実施されうるが、これらの態様は相互排他的と見なされるべきではなく、組み合わせて実施されてもよいことに注意することは重要である。

【0068】

一つの特別な態様において、上記リポソーム製剤は、40～120 nm、好ましくは50～100 nm、さらに好ましくは55～95 nm、最も好ましくは55～80 nmの範囲のz-平均粒径を有する。z-平均粒径は、上記一般的記載の通り及び“材料及び方法”の部で詳細に記載の通り、好ましくは動的光散乱によって測定される。

【0069】

代替の特別な態様において、上記リポソーム製剤のz-平均粒径は、リポソーム製剤がエマルジョンとなるようにさらに小さくてもよい。すなわち、この特別な態様において、粒子のz-平均粒径は好ましくは40 nm未満である。

【0070】

上記態様のいずれか一つ又は複数の好適な態様において、本発明による製剤のリポソームはさらに単分散である。つまり、サイズ分布の有意な幅が観察されないことを意味する。これは、技術的には、動的光散乱によって測定される低い多分散指数（PDI）によって検査される。例えば、0.4以下、好ましくは0.3以下である。従って、リポソーム製剤は、動的光散乱によって測定可能な粒子の多分散指数が0.4以下、好ましくは0.3以下、最も好ましくは0.25以下であるリポソーム製剤である。

【0071】

結核菌群（MTB-C）株由来のフラグメントは、上流工程及び下流工程を含む工程によって得ることができる。説明目的のために、5つの主な工程をここに簡単に記載する。工程を実施するための特別な形態は以下の実施例2及び3に示す。

【0072】

上流工程（実施例2）：

工程1：結核菌の培養

工程2：結核菌の収穫及び粗抽出物の凍結

下流工程（実施例3）：

工程3：細胞のフラグメント化及び脱脂

工程4：低温殺菌

工程5：凍結乾燥（任意）

上記態様のいずれかのさらに好適な態様において、結核菌群（MTB-C）株は毒性結核菌群（MTB-C）株である。毒性とは、場合により病原性のこと及び／又は宿主の組織を侵襲する桿菌の能力のことを言う。毒性株はMTB-Cに属する種のいずれかの任意の毒性株でよいが、（ヒト型）結核菌（*M. tuberculosis*）に属する株が好適である。本発明によるMTB-C株は、当業者に周知の培地、例えばミドルブルック（Middlebrook）7H10又は7H11寒天、ソートン培地（Sauton's medium）又はプロスカウアーベック培地（Proskauer-Beck medium）に播種することによって培養できる。毒性株の培養は、好ましくは長期間にわたって実施される。例えば、3週間に等しいか又はそれより長い期間、好ましくは3～4週間を含む。培養温度は、好ましくは34℃～38℃に維持される。培養が終了したら、細胞を収穫し、例えば特許出願ES2231037-A1に記載されているような当該技術分野で周知の技術を用いて単離される。

【0073】

リポソーム製剤のリポソーム剤は、好ましくは、水素化、部分水素化又は非水素化リン脂質である。使用されるリン脂質は、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン及びホスファチジールイノシトールでありうるか又はそれらを含む。最も典型的なのはホスファチジルコリンで、様々な天然源から合成又は単離できる。好ましくは、リポソーム形成剤は、卵レシチン及び大豆レシチンからなる群から選ばれるレシチンであるか又はそれを含む。大豆レシチンは、とりわけホスファチジルコリンを含むリン脂質の複合混

合物であり、特に好適である。リポソーム形成剤そのものとして又は更なる成分として製剤に含めてもよい典型的な脂質は、ジセチルホスフェート（DCP）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPc）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジオレオイルホスファチジルセリン（DOPS）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ホスファチジルコリン（PC）及び／又はホスファチジルセリン（PS）であり、各脂質は、水素化されていても、部分水素化されていても、又は非水素化でもよい。リポソームは、従来の補助脂質と特許出願ES 2 2 3 1 0 3 7 - A 1に記載されているような当業者に周知の技術とを用いて形成できる。

10

【0074】

上記態様のいずれかにおいて、（a）結核菌群（MTB-C）株由来のフラグメントと（b）リポソーム形成剤の比率は0.01：1～1：1、好ましくは0.06：1～0.1：1であることがさらに好適である。上記いずれかのさらに好適な態様において、リポソーム製剤は、さらに（d）張力活性剤(tensioactive agent)を含む。一般的に、表面張力の値を変えることができるすべてのタイプの薬剤が本発明の意味における張力活性剤として使用できるが、除外されるのは、上記リポソーム形成剤の定義下に入る化合物である。様々なタイプの張力活性剤が当業者に知られており、本発明によるリポソーム製剤に使用できる。当業者には分かる通り、張力活性剤は、一般的に、極性-非極性構造を有する化学物質である。何らかの特定理論に限定したくはないが、張力活性剤は、一般的に、粒子の表面に位置する傾向があるため、界面に単分子層を生じ、それが表面張力値を低減する。張力活性剤は、界面活性剤又は活性表面剤とも呼ばれる。界面活性剤含有リポソーム製剤の好適な態様において、張力活性剤は、ステロール及びその誘導体、例えばコレステロール及び／又は胆汁塩又はその誘導体、例えばコール酸塩から選ばれる。特に好適な態様は、張力活性剤が、コール酸塩、デオキシコール酸塩、コレステロール及びコレステロールヘミスクシネートから選ばれる態様である。本発明を実施する好適な様式（しかし、これに限定されない）は、製剤のリポソームが大豆誘導レシチン及びコール酸ナトリウムの両方を含有する場合である。

20

【0075】

なおさらに好適な態様において、（d）張力活性剤を含むリポソーム製剤は、（a）と（d）の比率が0.05：1～3：5（w/w）であるリポソーム製剤である。当業者に周知の通り、様々なタイプのリポソーム形成剤が使用できる。

30

【0076】

リポソームは、それらの安定性を改良する添加剤を任意に含有することもできる。例えばビタミンEなどで、これは脂質抗酸化剤として作用すると考えられている。

【0077】

さらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、MTB-C細胞のフラグメントが細胞壁フラグメントであるか又は細胞壁フラグメントを含むリポソーム製剤である。

【0078】

MTB-Cに属する任意の株、好ましくは（ヒト型）結核菌に属する任意の株が使用できる。別のさらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、MTB-C株NC TC 13536のフラグメントを含む。これは2010年にロンドンのNC TCに寄託されたものである（実施例1）。使用できる別の株（従ってそのフラグメントがリポソーム製剤に含まれる）は、H37Rvと呼ばれる。これは、例えば、英国ロンドンのナショナル・コレクション・オブ・タイプ・カルチャー（National Collection of Type Cultures, NC TC）から入手することができ（寄託番号NC 007416）、この分野の研究者によく利用されている。2種以上の株を使用することも可能である。すなわち、リポソーム製剤は、様々な、例えば2種、3種、又はそれ以上の株のフラグメントを含む。

40

【0079】

結核菌の約4000もの推定抗原のことを考えると、これらすべてのタンパク質につい

50

て薬物物質を分析することは不可能である。にもかかわらず、ある種のMTB-Cタンパク質は所望の免疫応答に関係していることが示されている。これらは、およそ6、10、30、38、及び70 kDaのサイズを有する5つのタンパク質である（Renshawら、2005、EMBO Journal 24, 2491-2498; Singhaら、2005、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12 (2), 354-358）。従って、なおさらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、以下の少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくはすべてを含む。

【0080】

(i) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約70 kDaの分子量を有する第一のポリペプチド。この第一のポリペプチドは、結核菌のHSP70タンパク質（Rv0350）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。

10

【0081】

(ii) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約38 kDaの分子量を有する第二のポリペプチド。この第二のポリペプチドは、結核菌の38 kDaタンパク質（Rv0934）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。

【0082】

(iii) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約30 kDaの分子量を有する第三のポリペプチド。この第三のポリペプチドは、結核菌のAg85Bタンパク質（Rv1866c）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。及び

20

(iv) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約10 kDaの分子量を有する第四のポリペプチド。この第四のポリペプチドは、結核菌のCFP10タンパク質（Rv3874）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。及び

(v) ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約6 kDaの分子量を有する第五のポリペプチド。この第五のポリペプチドは、結核菌のESAT-6タンパク質（Rv3875）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。

30

【0083】

そのなおさらに好適な態様において、リポソーム製剤は、さらにドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動による測定で約19 kDaの分子量を有するリポポリペプチドを含み、そのリポポリペプチドは、結核菌の19 kDaリポタンパク質抗原前駆体LpqH（Rv3763）の質量フィンガープリントに類似した質量フィンガープリントを有する。それぞれのバンドは、当該技術分野で公知の方法、例えば銀染色によって可視化できる。本発明の研究者らは、驚くべきことに、このポリペプチドは、高い総IgG体液性応答を誘導することを見出した。これは、製剤中のすべての抗原の中で最も高い体液性応答でありうる。

【0084】

ポリペプチド又はリポポリペプチドの同定法の例は実施例4に示す。

40

【0085】

なおさらに好ましくは、上記リポソーム製剤は、さらに、下記の結核菌の抗原、又はそのフラグメントの少なくとも一つが存在することを特徴とする。すなわちHSP70、38 kDaタンパク質、Ag85B、最も好ましくはHSP70、38 kDaタンパク質及びAg85Bの少なくとも一つである。この意味におけるフラグメントは、これらのポリペプチドのいずれかの任意の部分、例えば分解産物である。そのようなフラグメントを得る様々な方法が可能である。例えば、化学的又は酵素的加水分解で、この場合、フラグメント化が意図的に起こされたか否か、リポソーム形成の前か後かは関係ない。各フラグメントは、例えば、アミノ酸配列の実質的オーバーラップ、例えば少なくとも5個、少なく

50

とも10個、少なくとも20個の連続アミノ酸によって、そのそれぞれの起源に帰属させられるのが好適である。

【0086】

本発明によるフラグメントは、飢餓、低酸素及び低pHというストレス条件下で増殖させた桿菌から得るのが好ましい。低酸素は、増殖期間中、例えば21日間、気密バッグに閉じ込めた（これによって微好気性微生物的(microaerobiotic)環境がもたらされる）プレート上で細菌を増殖させることによる。低pHは次のように説明される。培養開始時、pH値は7.0～6.8であり、終了時、典型的には培養21日後、pH値は6.4～6.5である。これらの条件下で、細菌の代謝は低下し、定常増殖がもたらされる。当然のことながら、これは桿菌をよりストレス耐性にする。そのような条件下で、培養桿菌はLTBI（潜伏結核感染）におけるインビボ潜伏桿菌と同様の特徴を発現する。従って、FCMt b中に存在する抗原は、潜伏桿菌の抗原、すなわち、いわゆる“構造”抗原ならびにストレス応答に関連する抗原に対して新しい免疫応答を引き起こすと期待される。

【0087】

マイコバクテリアの糖脂質は、長い間、免疫調節活性（顕著には肉芽腫性応答の誘導）を有し、強力なアジュバント様効果を発揮すると認識されてきた。従って、さらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、結核菌又はその誘導体に典型的に見出される脂質、例えば糖複合脂質のような複合生成物を含有する。いくつかの免疫原性脂質成分が結核菌サンプルで確認されており（Brennan, Tuberculosis (Edinburgh), 2003, 83(1-3), 91-97）、それらの決定のための分析法が開発されている（電気泳動、SDS-PAGE、薄層クロマトグラフィー）。各脂質成分の単離は積極的な処理を必要とするので、MTB-C抽出物中又はリポソーム製剤中に検出可能な各成分の定量的データ又はパーセンテージを得るのは難しいが、定性的な特徴付けは、本発明の更なる好適な態様を特徴付ける役割を果たしてくれるであろう。この更なる好適な態様に従って、好ましくはI、III又はIV型のいずれか一つ又は複数に属するミコール酸の一つ又は複数が含まれる。あるいは又はさらに、糖複合ミコール酸、好ましくはトレハロースジミコール酸が製剤中に含まれてもよい。あるいは又はさらに、糖脂質のリポアラビノマンナン(LAM)が製剤中に含まれてもよい。さらに、フラグメントの多抗原性（精製された抗原単独の代わりに、多抗原性タンパク質混合物+脂質）は有益であると考えられているので、細胞フラグメント化法は最適な細胞抗原混合物が可能となるように当業者によって適応できる。

【0088】

MTB-C細胞のホモジナイズは、一つ又は複数の界面活性剤、好ましくは非イオン界面活性剤の存在下で実施される。従って、上記リポソーム製剤はさらに一つ又は複数のそのような界面活性剤を含みうる。多数のそのような界面活性剤が当業者の標準的知識の範囲内にある。好ましくは、使用される非イオン界面活性剤は、アルキルフェノールエトキシレート、及びソルビタンエステルエトキシレートからなる群から選ばれる。さらに好ましくは、非イオン界面活性剤はオクチルフェノールエトキシレートの群から選ばれる。なおさらに好ましくは、7～8モルを含むエチレンオキシド含有量を有するオクチルフェノールエトキシレートが使用される。この界面活性剤は、市場ではトリトンX-114（登録商標）の名称で見つけることができる。細胞壁フラグメントを含有するホモジナイズ物(mass)を従来の処理に付して、非フラグメント化細胞及び可溶化成分を分離及び除去する。例えば、特許出願ES2231037-A1に記載のように、異なる速度での遠心分離及び緩衝溶液による洗浄が使用できる。細胞壁フラグメントを含有する沈殿物は、前述の精製法の実施後に得られる。前記沈殿物をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)緩衝液中に分散させ、従来の処理に付して、フラグメント化及び精製工程の後にも生存し続けているかもしれないMTB-C細胞の完全不活化を確実にする。前述の処理法は、例えばホルムアルデヒドを用いた処理による化学的方法でも、又は例えば加圧滅菌（オートクレーブ）又は低温殺菌処理による物理的方法でもよい。脂質の特性分析の例は、以下の実施例5に示されている。

10

20

30

40

50

【0089】

さらに好適な態様において、上記リポソーム製剤は、さらに一つ又は複数の塩又はその溶液を含み、好適な塩は塩化ナトリウムである。

【0090】

上記いずれかのなおさらに好適な態様において、リポソーム製剤は凍結乾燥される。リポソームを凍結乾燥に付すことにより、凍結リポソームの形態の免疫療法薬を得ることができる。そのためには、分散物をバイアルに分配し、 -15°C ～ -120°C 、例えば -45°C の低温及び $0.1\sim 0.5\text{ mbar}$ のような真空中で凍結乾燥すればよい。凍結乾燥後に得られたバイアルは、免疫療法薬として適切なリポソーム製剤を含有する。それらは好ましくは極低温、例えば -70°C で貯蔵される。

10

【0091】

本発明は懸濁液も提供し、その場合、前記請求項のいずれかのリポソーム製剤は溶媒中に再構成される。好適な態様において、この懸濁液の溶媒は水性であり、さらに好ましくは、及び最も好ましくは、生理的血清であるか又は生理的血清を含む。リポソーム製剤を溶媒中に懸濁させる方法は当業者に周知である。MTB-Cフラグメントを含む従来のリポソーム製剤よりも速く懸濁化できるというのは、本発明による製剤の特に有利な性質である（実施例9参照）。

【0092】

本発明の一つの目的は、医薬組成物の製造のためのMTB-C株の細胞壁フラグメントを含む薬剤を提供することであり、その薬剤は、記載された態様のいずれかにおける上記リポソーム製剤又はその組合せであるか又はそれを含む。薬物物質の医薬製剤／ガレヌス製剤(galenic formulation)の主目的は、細胞によく認識されるために十分効果的かつ安定な、そしてヒト又は動物の身体において関連細胞免疫応答を引き起こす可能性を有する懸濁液を得ることである。そのために、本発明は、上記態様のいずれか一つ又は複数に記載のようなリポソーム製剤、又は懸濁液と、製薬学的に許容しうる担体、賦形剤又は希釈剤とを含む医薬組成物も提供する。各種のそのような担体、賦形剤及び希釈剤は当業者に公知であり、それらは本開示によって決して制限されない。それどころか、担体、賦形剤又は希釈剤として適切な任意の物質が使用できる。好適な態様において、この医薬組成物はさらに、製薬学的に許容しうるアジュバントも含む。従って、アジュバントは、本発明のこの態様に含まれる物質と理解される。ここで、アジュバントは、ヒト又は動物の身体に適用された場合に、標的抗原に応答して免疫系を刺激できる物質であるが、アジュバント自体は免疫を与えない。何らかの特定のアジュバント物質に制限するつもりはないが、好適な態様は、アジュバントがアルミニウム塩、例えば塩化アルミニウム、又は鉱油又は鉱油を含む組成物、例えば不完全フロイントアジュバント（IFA）又は完全フロイントアジュバント（CFA）、又はハロゲン化アンモニウム、例えばアルキル化臭化アンモニウム、例えばジメチルジオクタデシルー臭化アンモニウムの場合である。

20

30

【0093】

本発明はまた、療法によってヒト又は動物の身体の治療法に使用するための製品も提供する。すなわち、療法によってヒト又は動物の身体の治療法に使用するための、上記態様のいずれか一つ又は複数によるリポソーム製剤、上記態様のいずれか一つ又は複数による懸濁液、又は上記態様のいずれか一つ又は複数による医薬組成物を提供する。

40

【0094】

薬物は、粘膜、例えば、眼、鼻腔内、口腔、胃、腸、膈、又は尿路の粘膜に、又は非経口的に、例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、又は腹腔内に投与できる。非経口投与が好適である。特別な態様において、本発明は、このリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物を注射用として提供する。

【0095】

別の特別な態様において、本発明は、このリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物を結核の治療又は予防法に使用するために提供する。これらの特別な態様は、個別でも又は組み合わせても実施できる。本研究の発明者らは、本発明による製剤は、増殖する桿菌に対

50

して免疫を高めることによって、及び非複製桿菌に対して免疫を誘導することによって、細胞免疫応答の増大をもたらすほか、潜伏結核感染においてさもなければ起こりうる持続再感染の過程も制御することを見出した。

【0096】

療法による人体の治療法におけるその使用に関連して上記された事に従うリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物の適切な用量は、投与方法及び治療される対象を含むいくつかのパラメーターに依存する。好適な態様において、それは人体への投与用である。その好適な態様において、これは、1～1000、好ましくは3～250、さらに好ましくは4～80、最も好ましくは約5、約25又は約50 µg / 用量のFCMt bを含む用量で投与される。25 µgの用量が特に好適である。

10

【0097】

(a)～(c)のさらに三つの特別な態様において、療法によるヒト又は動物の身体の治療法におけるその使用に関連して上記された事に従うリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物は、(a)潜伏結核感染を有する個人における活動性結核の予防法に使用するためのものである。代替のさらに特別な態様において、(b)疾患に暴露されているがまだ感染していない個人の感染を予防するための結核の一次予防法に使用するため、又は(c)潜伏性結核の治療又は予防法に使用するためのものである。

【0098】

療法によるヒト又は動物の身体の治療法に使用するためのリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物は、単回投与又は数回投与、例えば、一定の時間間隔での反復によって2回、3回、4回、5回又は5回より多い用量の形態で投与できる。好ましくは、2回の用量を2～5週間、好ましくは3～4週間を含む期間を隔てて投与する。

20

【0099】

実施例8、10及び12は、本発明によるリポソーム製剤をいかにヒト又は動物対象に適用できるかの例である。

【0100】

上記物質の好適な態様は、併用療法又は補助療法に使用するためのリポソーム製剤、懸濁液又は医薬組成物である。医師は、より良好な治癒率又は一次治療に対するより迅速な応答を得るために補助療法をしばしば利用する。併用療法又は補助療法は、ヒト又は動物の身体を療法によって治療するために二つ以上の医薬を使用することを含む。併用療法の第一の特別な態様は、併用療法が抗生物質、好ましくはイソニアジド及びアンサマイシンの一つ又は複数を含むものであり、アンサマイシンは最も好ましくはリファンピシンである。その第二の特別な態様は、併用療法が結核に対する他の予防ワクチン、例えばS. H. E. Kaufmann, Nature Rev. Immunol., 2006, 6, 699-704ページに記載されているようなもの、例えばカルメットーグラン桿菌(BCG)ワクチン、サブユニットワクチン又は組換えBCGワクチンを含むものである。第一及び第二の特別な態様は組み合わせてもよい。

30

【0101】

併用療法又は補助療法では、これら二つ(又はそれ以上)の物質の投与は、同時であっても、又は時間を隔てて2回(又はそれ以上)の接種で実施されてもよい。接種間の期間は数年間の長さに及ぶことすらある。併用療法の場合、時間を隔てられた接種は、最初に結核に対する予防ワクチンが好ましくは投与され、次に、MTB-Cの毒性株の細胞壁フラグメントを含む薬物(これは最初に接種されたワクチンの再刺激剤(ブースター)として作用する)が投与される。一態様では、1回量だけがヒト対象に投与され、この用量は好ましくは25 µgのFCMt bである。

40

【0102】

あるいは、補助療法においていくつかの異なる治療戦略又は治療タイプ又はケアが同時に使用される。本発明の特別な態様において、補助療法は、免疫系が障害されたヒト対象、例えばHIV患者、又はそれ以外に結核感染に罹りやすい及び/又はそのような療法を必要としている任意の個人に投与される。イソニアジドも補助療法で投与できる。さらに

50

、補助療法は、障害された免疫系を治療するため、例えばH I V感染を治療するための何らかの薬物又は薬物の組合せの投与も含みうる。H I V感染を治療するための典型的薬物は抗レトロウイルス薬で、非制限的概要を、“成人及び青年におけるH I V感染のための抗レトロウイルス療法 公衆衛生対策のための勧告：2010年版(Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents Recommendations for a public health approach: 2010 revision)”、著者：世界保健機関、I S B N：9 7 8 9 2 4 1 5 9 9 7 6 4に見出すことができる。このように、本発明は、H I V陽性ヒト対象に対して、有効な結核予防、例えば予防接種を提供するというニーズのための解決策を提供している。

【0103】

10

個人がH I V陽性で見なされるか否か（すなわちH I V陰性）は、検査される個人の体液中におけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）、すなわち後天性免疫不全症候群（A I D S）を引き起こすウイルスの存在の検出を可能にする任意の試験によって検査できる。ここで、体液は、典型的には、血清、唾液、又は尿から選ばれるいずれか一つである。そのような試験は、抗体、抗原、又はR N Aを検出できる。適切なスクリーニング試験の概要は、Chouら、Ann. Intern. Med. 2005 Jul 5; 143 (1) : 55-73に示されている。

【0104】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、H I V陽性ヒト対象に投与された単回投与の25 μ g F C M t bは強力な応答を提供することを見出した。

20

【0105】

単回投与の25 μ g F C M t bは、H I V陰性ヒト対象に投与した場合も強力であった。本発明者らは、これは、潜伏性結核を患っている対象において特に有用であることを示した（実施例12）。従って、H I V陽性又はH I V陰性の個人に投与される単回投与の25 μ g F C M t bは、本発明の好適な態様である。

【0106】

本発明は製造法も提供し、その方法は、上記態様のいずれか一つ又は複数によるリボソーム製剤、懸濁液、又は同じものを含む医薬組成物を得るのに適切であることを特徴とする。その一つの非制限的实施例を以下の実施例11に示す。

【0107】

30

本発明はさらに、2010年にロンドンのN C T Cに寄託されたM T B - C株N C T C 13536も提供する。この株は遺伝的多様性が低い。従って、N C T C 13536のフラグメントを含む製剤は、その低い遺伝的多様性のために非常に高い再現性があるという利点を有する。

【0108】

発明の好適な実施様式

50 μ g F C M t b / 用量、又は25 μ g F C M t b / 用量又は5 μ g F C M t b / 用量の特定用量を使用するのが好適である。例えば、用量が50 μ g F C M t bの場合、表1に示されている量 / 物質が製剤の1バイアル中に存在する。

【0109】

40

【表 1】

成分	バイアルあたりの 単位	機能
薬物物質		
FCMt b	66.7 μg	免疫原
更なる成分		
スクロース	20,000.0 μg	チャージ物質 (凍結乾燥) 及び抗凍結剤
大豆レシチン ¹	845.8 μg	リポソーム形成剤
コール酸ナトリウム	92.0 μg	張力活性剤
塩化ナトリウム ²	20.8 μg	溶媒
粒子の特性分析		
z-平均粒径	75 +/- 20 nm	
多分散指数	≤ 0.350	

¹ ホスファチジルコリン含有 (94.0% (w/w))² NaCl 0.9% 溶液として添加

表 1.

【0 1 1 0】

25 μg / 用量又は 5 μg / 用量を適用する場合、他のバイアルを用意し、表 1 に示されているスクロース以外の全数値をそれぞれ 2 又は 10 で割る。製剤 (50 μg 、25 μg 及び 5 μg) 中のスクロースの含有量は常に 20,000 μg 単位 / バイアルである。

【0 1 1 1】

ホスファチジルコリン (94.0% (w/w)) で高富化された大豆レシチン (リポソーム形成剤) 及びコール酸ナトリウム (張力活性剤) から製造されたリポソーム製剤は、製造中も再構成懸濁液中でも、薬物物質の高溶解度を保証するのに適切であることが示された。リポソーム製剤中の FCMt b の安定性にとって一つの重要なパラメーターは、リポソームを構成する成分の割合である。FCMt b / 脂質成分の様々な比率を試験した結果、非常に良好な比率はおおよそ 0.03 : 0.2 : 0.7 (FCMt b : コール酸ナトリウム : 大豆レシチン、w/w/w) であることが確立された。さらに、リポソーム形成は水性相中に塩が存在することによって増強されることも観察された。従って、塩化ナトリウムがこの特別な製剤中に含まれる。

【0 1 1 2】

10

20

30

【表 2】

パラメーター			許容基準	試験法
外観			白色～オフホワイト色粉末	目視検査
ケーキの形態			平坦～ほぼ平坦、均質	目視検査
用量均一性	質量均一性 (mg/バイアル)		21.02 ± 15%	秤量, 社内法
	質量平均 (mg/バイアル)		質量 ± 5%	秤量, 社内法
水分含有量 (%)			≤ 3 %	カール・フィッシャー電量分析, Ph.Eur.2.5.12 (USP<921>)
FCMtb の総タンパク質含有量			90-140 µg /mg FCMtb	BCA アッセイ, Ph. Eur. 2.5.33 (USP <1057>)
再構成までの時間 (s)			良く再構成された ≤10s	目視検査
pH			7-8	電位差測定法, Ph.Eur 2.2.3 (USP<791>)
粒径	z-平均 (nm) (多分散指数 ¹)		75 ± 20 (≤ 0.310)	動的光散乱法 Ph.Eur. 2.9.31
結核菌感染マウスモデルにおける免疫原性効力	抗原 - 特異的 IFN-γ スポット形成単位	PPD	3-12 基準値に対する 比 SFU/10 ⁶ 細胞 (SFU/10 ⁶ 細胞における基準値)	エリスロット法
タンパク質プロフィール	SDS-PAGE		バンド: 70, 38, 30, 10, 6 kDa に 対して陽性	SDS-PAGE による 電気泳動法
	ウェスタンブロット		HSP70 (Rv0350), 38 kDa (Rv0934), Ag85B (Rv1886c)に 対して陽性	ウェスタンブロット法
無菌性			無菌	Ph. Eur. 2.6.1 (USP<71>)
細菌性エンドトキシン (IU/用量)			≤ 10 IU/ バイアル	Ph. Eur. 2.6.14 方法 D (USP<85>)

表 2: 薬物製品 (FCMtb), 凍結乾燥リポソーム組成物の再構成後に測定

【0113】

好適な様式において、本発明は、本発明によるリポソーム製剤が表 2 の性質を有するよう実施される。

【0114】

生存対象への投与の場合、バイアルは 0.4 ml の注射用水で再構成でき、166.7 µg/ml の FCMtb を含有する懸濁液となる。

【0115】

表 3 に、50 µg/用量における再構成後のバイアルあたりの各成分の濃度を示す。25 µg/用量又は 5 µg/用量を適用する場合、他のバイアルを使用し、表 1 で述べたように表 3 に示されているスクロース以外の全数値をそれぞれ 2 又は 10 で割る。製剤 (50 µg、25 µg 及び 5 µg) 中のスクロースの含有量は常に 50,000 µg/mL である。

【0116】

【表 3】

成分	濃度 mLあたり
薬物物質	
FCMtb	166.7 µg/mL
賦形剤	
スクロース	50,000.0 µg/mL
大豆レシチン	2,114.4 µg /mL
コール酸ナトリウム	230.0 µg /mL
塩化ナトリウム	52.1 µg /mL

10

表 3 0.4 mL の注射用水中に再構成後の成分の濃度

【0117】

材料及び方法

標準物質

a) モノクローナル抗体：特異的モノクローナル抗体（抗-HSP70、抗-38kDa、抗-Ag85B（ドイツ・ブラウンシュワイグ(Braunschweig)のLionex Diagnostica GmbH社製））を、FCMtbバッチのタンパク質プロファイルの同定のために使用する。

20

【0118】

b) アルブミン標準：タンパク質含有量の決定のために使用されるこの標準は、0.9%生理食塩水中ウシアルブミン（2mg/ml）（保存剤：アジ化ナトリウム）で構成される（製造業者：Pierce社）。

【0119】

c) 結核菌由来のトレハロース6,6'-ジミコール酸（TDM）標準：市販のTDM（Sigma社）をFCMtbバッチのTDMの同定のために使用する。

【0120】

d) 結核菌由来のミコール酸標準：市販のミコール酸（Sigma社）をFCMtbバッチのミコール酸の同定のために使用する。

30

【0121】

e) 分子量マーカー：SeeBlue（登録商標）Plus予備染色標準（Invitrogen社）という名の市販分子量マーカーを使用する。

【0122】

パラメーターの測定

a) pH

FCMtbの再構成懸濁液（20mg/ml）のpHは、Ph. Eur.（欧州薬局方）2.2.3及びUSP（米国薬局方）<791>に従って電位差測定法によって測定する。

【0123】

b) 水分含有量

凍結乾燥FCMtbの残留水を測定するための試験は、電量式カール・フィッシャー(Coulometric Karl Fischer)装置を用い、Ph. Eur.、方法2.5.12、及びUSP<921>水分の測定の一般的指示に従って実施される。

40

【0124】

c) 総タンパク質含有量の測定

FCMtbの総タンパク質含有量の測定試験は、市販キット（BCAキット、Pierce社）を用い、Ph. Eur.、方法2.5.33、方法4（ビシンコニン酸又はBCAアッセイ）及びUSP<1057>に従って実施される。

【0125】

50

d) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によるタンパク質プロファイルの同定

試験は、Ph. Eur., 方法2. 2. 31及びUSP<726>に従って実施される；ゲル中のタンパク質の検出は、適合クーマシー染色(adapted Coomassie staining)又は銀染色によって実施される。試験サンプル：精製水中に40又は20mg/mlの濃度でFCMt bを再構成。標準液：分子量マーカー、精製抗原、FCMt b標準品

【0126】

【表4】

精製抗原
結核菌 HSP70 タンパク質(Rv 0350)
結核菌 38 kDa タンパク質(Rv0934)
結核菌 Ag85B タンパク質(Rv1886c)
結核菌 19 kDa タンパク質(Rv 3763)
結核菌 CFP10 タンパク質(Rv3874)
結核菌 ESAT6 タンパク質(Rv3875)

10

表 4: 基準抗原

【0127】

クーマシー染色の場合、Gel-Code Blue Stain 試薬溶液 (Pierce 社) を製造業者の使用説明書に従って使用する。銀染色の場合、Invitrogen 社製の PROTSIL1 キットを製造業者の使用説明書に従って使用する。ウェスタンブロット分析の場合、タンパク質を当該技術分野で公知の標準法に従って SDS-PAGE によって分離し、次いで PVDf 膜に電気泳動的に転移し、特異的モノクローナル抗体を用いて免疫検出する。抗原-抗体相互作用は、化学発光反応を引き起こす抗抗体とのインキュベーションによって可視化される。Lionex (ドイツ・ブラウンシュワイグ) 社製抗原 (結核菌の HSP70 タンパク質 (70 kDa)、結核菌の 38 kDa タンパク質、結核菌の Ag85B タンパク質 (30 kDa)、及び Lionex 社製の特異的モノクローナル抗体、抗-HSP70、抗-38 kDa、及び抗-Ag85B) を使用する。

20

【0128】

e) ミコール酸の同定

30

FCMt b 中のミコール酸は、一次元 TLC により、Ph. Eur., 方法2. 2. 27に従って試験される。試験サンプル：凍結乾燥 FCMt b、40mg。標準液：ミコール酸標準 (Sigma 社)。手順：

a) 抽出工程：サンプルをクロロホルム：メタノール (1:1) で抽出し、その後一晩インキュベートする。上清画分を除去する。

【0129】

b) ミコール酸のエステル化：2mLのメタノール：トルエン：硫酸 (30:15:1 vol/vol) を各管に加える。エステル化は一晩で達成される。次に、4mLのn-ヘキサンを加える。それを窒素流下で乾燥させ、500µLのヘキサンで再懸濁させる。

40

【0130】

c) TLC：10µLの各サンプルをプレート (シリカゲル60 (20×20cm) (Merck 社) の縁に平行な線上に適用する。クロマトグラフィー分離は、移動相 (エチルエーテル (ethylic ether)：n-ヘキサン (15:85、vol/vol)) で飽和させたタンク中で3回実施する。次にプレートを空気中で乾燥させる。

【0131】

d) ミコール酸は、リンモリブデン酸の96°エタノール中溶液をプレートにスプレーし、120°Cで10分間加熱することによって現れる。

【0132】

FCMt b サンプル中のミコール酸は、ミコール酸の市販標準スポットとの比較によ

50

て決定される。結果は、評価されたミコール酸の定性的データとして表される（存在（陽性）／不在（陰性））。

【0133】

f) トレハロース6, 6'-ジミコール酸(TDM)の同定：試験サンプル：凍結乾燥FCMt b、40mg。標準液：TDM標準(Sigma社)。手順：

(i) 抽出工程：サンプルをクロロホルム：メタノール(1：1；vol/vol)で抽出し、その後一晩インキュベートする。上清画分を窒素流下で乾燥させ、秤量する。最後に、乾燥サンプルをクロロホルム中に40mg/mLの最終濃度で再懸濁させる。

【0134】

(ii) TLC：10μlの各サンプルをプレート(シリカゲル60(20×20cm)(Merck社)の縁に平行な線上に適用する。クロマトグラフィー分離は、移動相(クロロホルム：メタノール：水(60：12：1；vol/vol))で飽和させたタンク中で実施する。次にプレートを空气中で乾燥させる。

10

【0135】

(iii) 検出：TDMは、硫酸中アントロン(antrone)1%溶液をプレートにスプレーし、120℃で5分間加熱することによって現れる。

【0136】

(iv) 同定：FCMt bサンプル中のTDMは、標準スポットの生成用に使われる市販TDMとの比較によって決定される。結果は、評価されたTDMの定性的データ、すなわち存在（陽性）／不在（陰性）として表される。

20

【0137】

g) リポアラビノマンナン(LAM)の同定：LAMのウェスタンブロット分析の場合、化合物を標準法に従ってSDS PAGEによって分離し、次いでニトロセルロース膜に電気泳動的に転移し、特異抗体CS35を用いて免疫検出する。抗原-抗体相互作用は、蛍光反応を引き起こす抗抗体(IgGヤギ抗マウスIR染料800CW)とのインキュベーションによって可視化される。

【0138】

h) 無菌性

無菌であることを必要とするすべての工程は、当業者の知識に従って無菌条件下で実施される。これは、同じことを必要とする任意の所与の工程について無菌性が明記されていない場合も適用される。無菌試験は、Ph. Eur. 2. 6. 1(USP<71>)に規定の通りに評価される。

30

【0139】

i) マイコバクテリアの不活化

マイコバクテリアの不活化は、Ph. Eur. 2. 6. 2に従って評価される。

【0140】

j) 細菌性エンドトキシン

細菌性エンドトキシンの試験(LAL試験、カプトガニ変形細胞溶解物(カプトガニ血球抽出物)(Limulus Amoebocyte Lysate))は、Ph. Eur. , 方法2. 6. 14の一般的指示に従い、方法D(発色速度論的方法(Chromogenic kinetic method))ならびにUSP<85>に従って実施される。

40

【0141】

桿菌のフラグメント化

桿菌のフラグメント化を選択すると、細胞抗原、特に細胞壁抗原の最適な提示を可能にすると考えられる。FCMt bのフラグメント化は、動的光散乱法(以下に記載の通り)及びレーザー回折方法論の両方によって測定される。

【0142】

レーザー回折は、0.04μm~2000μmの範囲のフラグメント化の測定を可能にする。アッセイは、スペイン・バルセロナ大学のServicios Científicos-Técnicosで実施される。装置：ユニバーサル・リキッド・モジュール(U

50

LM)を備えたCoulter LS 13320。溶媒：精製水／鉱油。結果：粒子直径(0.04 μm～2000 μm)に対する粒子数の相対頻度(%)を表すヒストグラムとしてプロットされる。

【0143】

z-平均粒径及び多分散指数の決定

本文書に記載の平均粒径は、動的光散乱法(DLS)によって測定される。これはストークス-アインシュタイン式に定義された粒子のブラウン運動の物理的概念に基づいている。

【0144】

$$d(H) = (\kappa T) / (3 \pi \eta D)$$

10

式中、

$d(H)$ = 流体力学直径

D = 移動拡散係数

κ = ボルツマン定数

T = 絶対温度

η = 粘度

何らかの特定理論に限定したくはないが、ストークス-アインシュタイン式は、液体媒体中に懸濁された粒子は絶えずランダムな運動をしており、速度はそれらのサイズに依存し、粒子が大きいほどブラウン運動は遅くなることを確立している。

【0145】

20

動的光散乱測定では、測定される粒子を含有するサンプルに単色光源、好ましくはレーザーを照射し、散乱光の強度が時間と共にいかに変動するかを相関関数にして分析する。例えば、大きな粒子を測定する場合、それらは動きが遅いので、散乱光強度のゆらぎは緩やかで、相関の減衰に時間がかかる。これに対し、小さな粒子を測定する場合、それらは動きが速いので、散乱光の強度は急激に変動し、信号の相関はより急速に減衰する。

【0146】

本発明によれば、粒子は好ましくは下記の装置を用いて測定される。Zetasizer ナノ ZS (Malvern Instruments 社)、精製水／鉱油を溶媒として使用。

それと異なる指示がない限り、装置は、製造業者の使用説明書に従って使用され、調整及び校正も、該当する場合、製造業者の使用説明書に従う。

30

【0147】

サイズは、様々なアルゴリズムを用いて相関関数から計算される。本例では、ISO 13321のパート8に定義されている‘キウムラント解析(cumulants analysis)’を適用する。相関関数は単一指数曲線となり、以下のパラメーターの計算が可能になる。

【0148】

—粒子分布の平均サイズ、又はz-平均直径。この平均サイズは強度平均である。

【0149】

—多分散指数(pdi)、すなわち粒径分布の幅に相当する。

【0150】

40

結果は、典型的には、粒子直径(1 nm～3 μmの範囲を含む任意の直径でありうる)に対する粒子数の相対頻度(%)を表すヒストグラムとしてプロットされる。

【0151】

効力試験

特定病原体未感染、6～7週齢、雌のC57BL/6マウスをHarlan Iberica(スペイン)から入手する。試験サンプル：表3の製剤及びプラセボ(活性成分を含まないワクチン製剤)。

【0152】

a) ワクチン単回投与のインビボ結核菌感染マウスモデル：実験計画は次の通り：第0日：マウスの下腹部にMtb株H37Rv Pasteur (4×10^4 CFU)の皮

50

下感染。第14日：リファペンチン（25mg/kg）及びイソニアジド（10mg/kg）の単回経口投与による動物の化学予防的処置。これにより1週間の抗生物質効果がもたらされる。第21日：頸部の皮下にワクチン／プラセボ及び／又はH₂Oの単回投与によるワクチン接種。すべてのサンプルを入手し、個々のマウスについて分析する。各実験は、感染マウス＋プラセボの基本群及び感染マウス＋ワクチン接種の実験群を含む。各群は6～7匹の動物からなり、実験は二重に実施される。第28日：動物をイソフルオラン(isoflurane)で麻酔する。

【0153】

b) ワクチン2回投与のインビボ結核菌感染マウスモデル：実験計画は次の通り：第0日：マウスの下腹部にMt b株H37Rv Pasteur（4×10⁴ CFU）の皮下感染。第14日：リファペンチン（25mg/kg）及びイソニアジド（10mg/kg）の単回経口投与による動物の化学予防的処置。これにより1週間の抗生物質効果がもたらされる。第21日：頸部の皮下に第1回のワクチン／プラセボ及び／又はH₂O接種。第36日：頸部の皮下に第2回のワクチン／プラセボ及び／又はH₂O接種。すべてのサンプルを入手し、個々のマウスについて分析する。各実験は、感染マウス＋プラセボの基本群及び感染マウス＋ワクチン接種の実験群を含む。各群は6～7匹の動物からなり、実験は二重に実施される。第42日：動物をイソフルオランで麻酔する。

【0154】

上記a) 及びb) とも、犠死後、細胞免疫応答を調べるために、ELISPOTによるインターフェロンγスポット形成単位(SFU)パラメーターのエキスビボ分析を脾臓細胞懸濁液を用いて実施する。

【0155】

結核菌健常マウスモデルにおける免疫原性効力の決定。特定病原体未感染、6～7週齢、雌のC57BL/6マウスをHarlan Iberica（スペイン）から入手する。ワクチン2回投与のインビボ結核菌健常マウスモデル：実験計画は次の通り：第0日：頸部の皮下に本発明を実施するための好適な様式に従って第1回のワクチン、又はプラセボ及び／又はH₂O接種。第21日：頸部の皮下に第2回のワクチン／プラセボ及び／又はH₂O接種。すべてのサンプルを入手し、個々のマウスについて分析する。各実験は、健常マウス＋プラセボの基本群及び健常マウス＋ワクチン接種の実験群を含む。第28日：動物をイソフルオランで麻酔する。犠死後、体液性免疫応答を調べるために、ELISAによるIgG抗体の分析をマウス血清を用いて実施する。

【0156】

結核の診断

結核の診断法は当業者には周知である。クオンティフェロン試験及びTSTは、信頼性のある結果を出すことで知られており、本発明の製品による療法を受けさせることの適切性について対象を分類するために、単独で又は組み合わせて使用できる。QFTとしても知られるクオンティフェロン(QuantIFERON)は、オーストリア・ピクトリア州・メルボルン・チャドストーンのCellectis Limited社製の、結核感染又は潜伏性結核用の市販試験である。QFTは、結核診断に使用されるインターフェロンγ放出アッセイ(IGRA)である。これは製造業者の使用説明書に従って使用される。マントー(Mantoux)試験(マントー・スクリーニング試験、ツベルクリン感受性試験(TST試験)、ピルケ(Pirquet)試験、又は精製ツベルクリン(Purified Protein Derivative)のためのPPD試験としても知られる)は、結核の診断ツールである。両試験の概要は、Frankenら, Clin Vaccine Immunol. 2007, April; 14(4): 477-480に見出すことができる。

【実施例】

【0157】

以下の実施例は、当業者に、本発明のいくつかの特定態様の実行可能な様式及び説明を提供するために示される。これらの実施例は説明を目的としたものであって、本発明の範囲の制限を意図したものでは決してない。

【0158】

実施例1：結核菌株NC T C 13536の単離

F C M t bを製造するための出発材料は、スペインのバルセロナで肺結核と診断された免疫応答性(immunocompetent)患者から単離された結核菌株であるNC T C 13536株(同義的に511又は結核菌NC T C 13536とも呼ばれる)の播種物(inoculum)である。これは、ブダペスト条約による公式寄託機関であるロンドンのNC T Cに2010年に寄託されている。この株はさらに、スペイン・バルセロナのサン・パウ病院の微生物学部門(Service of Microbiology of the Hospital de Sant Pau)の株コレクションによっても寄託されている。

【0159】

原株の二つの継代がそれぞれ1995年及び1996年に実施された。M S L P B # 1は、結核菌NC T C 13536の原株の第二の継代に相当する。これは、1996年10月に実施され、100バイアル(3mlの無菌ガラスバイアル)を得て $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で貯蔵された。株は、当該技術分野における標準法により、低い遺伝的多様性を有していることが確認された。

【0160】

実施例2：M T B - C細胞を製造するための上流工程

この工程のフローチャートを図1に示す。F C M t bを製造するための出発材料は、結核菌株NC T C 13536の播種物である(実施例1)。この出発材料の連続供給を確保するために、好ましくはシードロット・システム(seed lot system)を使用する。従って、マスターシードロット(M S L)から誘導されたワーキングシードロット(W S L)を使用してF C M t bを製造する。結核菌NC T C 13536(実施例1)を3~5週間、ローウェンスタイン-ジェンセン(Lowenstein-Jensen)培地で培養する。次に、細菌増殖物をプロスカウアー-ベック培地中、 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $100 \pm 5 \text{ rpm}$ で攪拌しながら継代培養する。最大細菌濃度(目視検査による)に達したら、プロスカウアー-ベック培地での継代培養を開始し、インキュベートする。類似の細菌濃度に達したら小分量を採取する。生菌数は、 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で3~4週間のインキュベーション後、ミドルブルック(Middlebrook)寒天培地で得られたコロニー形成単位(C F U)の数によって決定する。細菌数は $2 \sim 5 \times 10^7 \text{ C F U/ml}$ でなければならない。

【0161】

(1) 結核菌の培養

F C M t bの製造は、7 H 1 1寒天プレートに0.2mlのW S Lを播種し、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 15 ± 2 日間インキュベートすることによって始まる。次いで、コロニーを少量のガラスビーズ入り管に移す。混合後、約5mlの注射用水(W F I)を加えて細菌懸濁液を得る。この時点で、生菌数カウント及び無菌試験を実施する。約100のミドルブルック7 H 1 1寒天培地に、細菌懸濁液に浸した綿棒を用いて結核菌を播種し、集密的(コンフルエント)培養物を得る。プレートを $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 21 ± 2 日間インキュベートする。

【0162】

工程内管理としての無菌試験は以下のように実施する：

無菌試験の目的は、真菌やマイコバクテリア以外の細菌が存在しないことを確かめることである。試験は、無菌試験のためのP h . E u r 2 . 6 . 1に記載の条件に従い、直接播種によって実施する。試験されるサンプルは無菌でなければならない。培地7 H 1 1を7 H 1 0の代わりに使用する(P h . E u r 2 . 6 . 2に記載の通り)。7 H 1 1は、結核菌の株の増殖を増強するために、培地7 H 1 0を基にして、カゼインの胨液消化物1グラムを加えたものである。

【0163】

(2) 結核菌の収穫と粗抽出物の凍結

インキュベーション期間後、細菌培養物の純度は寒天プレートを目視検査と無菌試験の実施によって管理される。次に、細菌増殖物を寒天プレートから採取し、無菌管に移す。得られた粗抽出物を秤量する($20 \sim 22 \text{ g}$)。混合物を $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ に保つ。

【0164】

実施例3：粗抽出物から得られたリポソームを製造するための下流工程

この工程のフローチャートを図2に示す。

【0165】

(3) 細胞のフラグメント化及び脱脂

凍結粗抽出物（実施例2）を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で解凍した後、4%（w/w）のトリトン-X 114入り無菌PBS緩衝液（pH 7.0～7.5）を 4°C で加える。混合後、無菌シリカ／ジルコニアビーズ入り無菌ポリカーボネート容器に移す。次に、細胞のフラグメント化をビードビーター（Beadbeater）内で下記フラグメント化法の適用により実施する。すなわち、3サイクルで、各サイクルは5周期のオン／オフ＋10分間の休止からなる。工程が終了したら、細胞フラグメント化画分を、4%トリトン-X 114入り無菌PBS緩衝液（pH 7～7.5）中でのその後の洗浄（振とうと沈降の繰り返し）によってビーズから分離する。次に、細胞フラグメント化画分の洗浄懸濁液の一定分量をpH管理のために採取し、最終遠心分離を845g、 4°C で30分間進行させる。

細胞質性画分を除去し、細胞フラグメントに富む懸濁液を得るために、高速遠心分離を2回、20000g、約60分間、 4°C で実施する。最初の遠心分離後、帯黄色上清（可溶性タンパク質及び脂質に富む）を廃棄し、ペレットをPBS中に再懸濁し、上記と同じ条件下でさらに遠心分離する。その後、廃棄上清の外観は無色透明でなければならない。最後に、得られたペレットを最終体積50～60mlのPBS中に再懸濁する（FCMt b懸濁液）。

【0166】

(4) 低温殺菌

次に、FCMt b懸濁液を $65 \pm 2^\circ\text{C}$ で60分間低温殺菌する。低温殺菌が終了したら、低温殺菌FCMt bのpHをリトマス紙で測定する。pH 6.5～7.5の範囲であれば容認可能と考えられる。無菌及び発熱物質除去バイアルに0.5mlの生成物懸濁液を充填し、無菌性に関するIPC（工程内管理）及びマイコバクテリアの不活化を実施する。最後に、充填バイアルを $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ で凍結する。材料を低温殺菌に付したら、未処理材料から物理的に分離される。すなわち、低温殺菌前に使用される空間は、その後の充填工程中に使用される空間から明らかに分離される。

【0167】

(5) 凍結乾燥

次に、凍結された生成物を含有するすべてのバイアルを約 -45°C ～ 30°C の温度及び0.310mbarで約18時間凍結乾燥する（バイアルあたり0.5mlの体積）。無菌技術を使用し、 N_2 雰囲気下で、バイアルに栓をし、標識する。包装された薬物物質はその後 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ で12ヶ月間まで貯蔵される。

【0168】

実施例4：タンパク質の特性分析

図3に、タンパク質プロフィールに関する特性分析戦略の概観を示す。

【0169】

文献を基に（Andersen P., 1997, Scand J. Immunol. ; 45 (2) : 115-31; Geiselら, 2005, J. Immunol. ; 174 (8) : 5007-15; Stewartら 2005, Infect. Immun. , 73 (10) : 6831-7., Wangら, 2007, J. Mol. Biol. , 366 (2) : 375-81）、6個のタンパク質バンドをタンパク質プロフィール評価の代表として選択した。すなわち、HSP70タンパク質（Rv0350）、38kDaタンパク質（Rv0934）、Ag85B（Rv1866c）、19kDaタンパク質（Rv3763）、CFP10タンパク質（Rv3874）、及びESAT-6タンパク質（Rv3875）。

【0170】

A. 総タンパク質含有量の測定：FCMt b中の総タンパク質レベルはビシンコニン酸

10

20

30

40

50

(BCA) 方法論によって定量化される。総タンパク質は、FCMt b 含有量の約 10% (w/w) に相当する。標準品 FCMt b-0429-16 及び FCMt b-52.1 は、それぞれ 167 µg タンパク質/mg FCMt b 及び 115 µg タンパク質/mg FCMt b を含有する。

【0171】

B. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によるタンパク質プロファイルの同定：薬物物質 FCMt b のタンパク質プロファイルを、ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38 kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4) に相当する結核菌由来の基準抗原、ならびに分子量マーカー MW (5) との比較によって決定した。これらを図 4 に示す。薬物物質 FCMt b のタンパク質プロファイルの決定及びバンドの同定 (およそ 70 kDa、38 kDa、30 kDa、10 kDa 及び 6 kDa) はクーマシー染色によって実施される。19 kDa バンド (リボポリペプチド) の同定は銀染色によって実施される。

10

【0172】

C. 特異的モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによるタンパク質プロファイルの同定：薬物物質 FCMt b のタンパク質プロファイルを、モノクローナル抗体 (mAb)、すなわち抗-HSP70 (70 kDa、図 5c)、抗-38 kDa (図 5d)、抗-Ag85B (30 kDa、図 5e) によるウェスタンブロット分析を用いて得られたパターンにより決定する。

20

【0173】

FCMt b-52.1 は、本発明を実施するための好適な様式による FCMt b の基準バッチである。

【0174】

実施例 5：脂質の特性分析

FCMt b の脂質プロファイルの特性分析は、クロロホルム：メタノール (1:1) 抽出に基づく分画工程からなる。これらの研究で実施される分画工程は、Delmasら、1997, Glycobiology 7 (6), 811-7 に記載の手順に基づいている。薄層クロマトグラフィー (TLC) が、FCMt b 中に存在する脂質及び糖脂質の含有量を分析するために使用される方法である。具体的には、ポリアシルトレハロース (PT)、トレハロースジミコール酸 (TDM)、ジアシルトレハロース (DAT)、ホスファチジルイノシトールマンノシド (PIMs) 及びその他のリン脂質、ならびにフチオセロールジミコセロシン酸 (PDIM) 及びミコール酸が、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって、基準株 H37rv 及び NCTC 13536 でも、様々な FCMt b バッチでも同定されている。図 7a 参照。トレハロース 6, 6'-ジミコール酸 (TDM) の含有量は、上清の TLC によって分析される。ミコール酸の測定は TLC 法に従って沈殿物で実施される。MTB-C の脂質プロファイルに関する定量的データは知られていないが、この研究で確立された定性的な脂質プロファイルは現在の科学知識と一致しており、これまでに知られている免疫原性脂質の標準的な特性分析が可能である。FCMt b は、結核菌株 NCTC 13536 及び H37Rv の全細胞脂質画分及び TDM 市販標準と比較されている (図 7a 及び 7b 参照)。概して、脂質含有量は、本発明による FCMt b を含むリボソームの様々なバッチで一致していることが示された。図 7d は LAM の同定を示す。

30

40

【0175】

実施例 6：フラグメント化された細胞材料の特性分析

二つの方法論を用いた予備的結果から、FCMt b のフラグメントサイズは主に 1 µm 未満 (99% < 1 µm) であることが示されている。これは、FCMt b の電子顕微鏡法によって裏付けられている。すなわち、フラグメントサイズは主に 100~300 nm の範囲である。

【0176】

50

フェノール／クロロホルム混合物による抽出後の残留DNAのレベルを260nmにおける吸光度によって調べた（検出限界：0.2 μg DNA/mg FCMtb）。これまでに得られた典型的な結果は15 μg DNA/mg FCMtb未満である。

【0177】

薬物物質の製造工程の一貫性（ばらつきのなさ）は、様々なFCMtbバッチで再現性がある脂質及びタンパク質プロファイルによって示されている。

【0178】

実施例7：マウスの免疫感作及び生物活性の可視化

FCMtbのタンパク質バンドとマウスの免疫血清(immunoserum)との相互作用：ウェスタンブロット方法論を用いて、本発明によるリポソーム製剤を基にしたワクチンを2回接種された感染マウスから得た血清中に存在するIgG抗体と相互作用するFCMtbタンパク質バンドを可視化することは可能であった。これは、生物活性の指標と考えられる（図6）。

10

【0179】

実施例8：FCMtbを含むリポソーム製剤のインビボ活性

リポソームなしのFCMtb（注射用水、WFIで再構成された）及び本発明を実施するための最良の様式によるリポソーム製剤（5%スクロース、上記参照）中のFCMtbの免疫原性効力を評価することによって、ワクチンの生物活性をインビボモデルで研究する（図8）。これらの結果は、スクロース入りリポソーム製剤の利益を示している。

20

【0180】

リポソームの凝集又は融合状態は、ワクチンの生物活性に重大な影響を及ぼすことが実証されているパラメーターである。そこで、本発明の研究者らは、ワクチンの製造中及びバッチ出荷時の粒径及び多分散指数の徹底的管理を実施している。

【0181】

実施例9：スクロースの効果

初期の試験で、下記賦形剤の一つ（a）1.5%グリシン及び（b）5%スクロースをMTB-C株NCTC 13536のフラグメントを含むリポソーム製剤にそれぞれ任意に配合した。その後、両製剤に関連する物理化学的性質及び生物活性に関する比較評価を実施する。

【0182】

凍結乾燥リポソーム組成物の再構成後、及び現行のバッチ出荷仕様パラメーターに従った試験後、測定によって得られた結果を表5に示す。

30

【0183】

【表 5】

パラメーター		許容基準	リポソーム懸濁液に製剤化された FCMtb			
			賦形剤なし	スクロース 5%	グリシン 1.5%	
			リポソーム懸濁液に製剤化された FCMtb			
外観		白色～オフホワイト色 粉末	ND	適合	適合	
ケーキの形態		平坦～ほぼ平坦、均質	ND	適合	適合	
水分含有量(%)		≤ 3 %	ND	1.4	3.0	
再構成までの時間(s)		良く再構成された ≤10s	ND	5	12	
pH		7-8	8.1	7.4	7.0	
粒径	z- 平均 (nm) Pdi ^(a)	75 ± 20 (≤ 0.250)	370 ⁽¹⁾ (0.492)	66 (0.215)	504 ⁽¹⁾ (0.569)	
結核菌感染マウスモデルにおける免疫原性効力	抗原-特異的 IFN-γ スポット形成単位	PPD	3-12 基準値に対する比 SFU/10 ⁶ 細胞 (SFU/10 ⁶ 細胞における基準値)	3.6 (183)	5.1 (183)	2.8 (183)
		Ag85B (30 kDa)	5-20 基準値に対する比 SFU/10 ⁶ 細胞 (SFU/10 ⁶ 細胞における基準値)	5.5 (73)	9.6 (73)	5.4 (73)

^(a) 多分散指数⁽¹⁾ リポソーム凝集体の存在
ND = 測定せず

表 5: 3 種類の異なる製剤の仕様の結果, 凍結乾燥リポソーム組成物の再構成後に測定

【0184】

本研究の研究者らは、驚くべきことに、5 %スクロース製剤は、水分含有量又は再構成までの時間など、それぞれ良好な物理化学的結果の利益を提供することを見出した。しかしながら、最も決定的な事実、他の二つの製剤と比較した場合にスクロース含有製剤で示されたリポソーム凝集（粒径、z-平均）の重要な低減である。動的光散乱による分析によれば、スクロース含有リポソームのz-平均は75 ± 20 nm（多分散指数 ≤ 0.350）であることが示された。スクロース含有リポソーム製剤の凍結切断標本の電子顕微鏡法は、40～100 nmのサイズを有する多重層及び単層リポソームの混合物であることを示している（図9）。

【0185】

5 %スクロース製剤に関するこの改良されたパラメーターと、観察された少ない水分含有量（≤ 2 %）のために、この製剤には改良された安定性の結果が予想される。これは実

10

20

30

40

50

際その通りである。本研究の研究者らの、1.5%グリシンを用いて製剤化され、室温で3ヶ月間貯蔵された実験バッチのデータは、PPDの生物活性（免疫原性効力）の劇的喪失を示していた。これに対し、5%スクロース含有製剤を室温で3ヶ月間貯蔵後に試験した場合、PPDの生物活性は基本的に不変のままである。従って、スクロースは生物活性の良好な維持という利益も提供する。

【0186】

実施例10：スクロース含有製剤の生物学的性質

表3による製剤を生物学的研究のために使用した。結核菌感染マウスモデルにおいて、本発明を実施するための好適な様式によるワクチンの接種（単回接種）によって引き起こされた細胞免疫応答は、ELISPOTによって測定できる。結果を表6に示す。

【0187】

【表6】

パラメーター		バッチ (50 µg/用量, 166.7 µg/mL)			
		a09	c09	d09	e09
抗原 - 特異的 IFN-γ スポット 形成単位 (SFU)	PPD 基準値に対する 比 SFU/10 ⁶ 細胞 (基準値: SFU/10 ⁶ 細胞)	5.1 (基準: 183 SFU/10 ⁶ 細胞)	6.3 (基準: 98 SFU/10 ⁶ 細胞)	7.2 (基準: 164 SFU/10 ⁶ 細胞)	6.5 (基準: 164 SFU/10 ⁶ 細胞)
	Ag85B 基準値に対する 比 SFU/10 ⁶ 細胞 (基準値: SFU/10 ⁶ 細胞)	9.6 (基準: 73 SFU/10 ⁶ 細胞)	9.9 (基準: 44 SFU/10 ⁶ 細胞)	11.9 (基準: 90 SFU/10 ⁶ 細胞)	12.3 (基準: 88 SFU/10 ⁶ 細胞)

ND: 測定せず

表 6: マウスへの接種後の細胞応答

【0188】

リポソーム製剤を基にしたワクチンの接種は、ELISPOTを用いて応答レベルを測定した場合、感染動物の基準値と比べて、インビボにおける細胞免疫応答の顕著な増大をもたらす。基準応答に対する比率はPPDの場合4～8倍、Ag85Bの場合8～14倍である。リポソーム製剤を基にしたワクチンは、多抗原性の体液性応答も誘導できるので、特に感染の高蔓延がある場合、保護効果を発揮する（Guiradoら, 2006, Microbes Infect. 8, 1252-1259）。

【0189】

スクロースなしの製剤とスクロースを主賦形剤として含有する製剤で得られた免疫原性効力のデータ間の比較を具体的に実施した。得られた結果は、単回ワクチン接種モデルにおいて、スクロース入り製剤の50 µg FCMtb用量によって発揮された細胞免疫応答は、スクロースなしの製剤の同一用量で得られたそれより約1.5倍高いことを明らかに示している。これらの細胞免疫応答のレベルの高さは二つの効力試験で得られている。すなわち、バッチ出荷仕様について実施された試験（単回ワクチン接種モデル）と同等性／同質性評価(comparability exercise)のために追加された試験（2回ワクチン接種モデル）の二つである。さらに、どちらの効力試験でも、スクロース入り製剤の50 µg FCMtb用量によって発揮された細胞免疫応答は、スクロースなし製剤の200 µg FCMtbで得られたものと同等のレベルを示す。凍結乾燥リポソーム組成物の再構成後に測定された結果を図10a及び10bに示す。スクロース含有製剤はリポソーム凝集の顕著な低減を示す。これが免疫原性の増大の理由と考えられている。新規製剤の50 µg用量で達成された細胞免疫応答は、スクロースなし製剤で得られた200 µgの用量で見られたそれにほぼ匹敵する。当該技術分野では、細胞応答は関連応答と見なされるということが知られている（North RJ, Jung YJ (2004). Annu. Rev

10

20

30

40

50

. Immunol. 22:599-623)。

【0190】

実施例11：凍結乾燥リポソーム製剤の製造法

本発明によるリポソーム製剤を含む医薬組成物の製造法の一つの態様を図11a及び11bに示す。手短に言うと、下記工程1～5を含む。

【0191】

(1) L C S バルク成分の製造

L C S バルクの大豆レシチンをエタノールに溶解し(1:1; w/w)、コール酸ナトリウムを水に溶解する(1:5; w/w)。溶液をろ過滅菌する。大豆レシチン溶液とコール酸ナトリウム溶液の混合後、凍結乾燥 F C M t b (実施例1)を攪拌しながら加える。成分の比率は、0.03:0.2:0.7 (F C M t b:コール酸ナトリウム:大豆レシチン; w/w/w)。

【0192】

(2) L C S バルク製造

水性相を滅菌ステンレススチールミキサーに移す。大豆レシチン、コール酸ナトリウム、及び F C M t b を含有する(1)の脂質相を0.7:0.3の比率(水性相:脂質層、w/w)で加える。相をホモジナイズ及びリポソーム形成のために2200 rad/sで3分間混合する。ホモジナイズ後、バルク L C S を別の容器に移し、少なくとも5分間放置する。粒径に関する I P C を L C S バルクに対して実施する。

【0193】

(3) L C S バルクの希釈、リポソーム懸濁液の最終製剤

スクロースの10% (w/w) 溶液を準備し、滅菌する。スクロース溶液を水及び L C S バルクと適切な割合で混合し、5%スクロース溶液中21mg L C S /mlで構成される最終リポソーム懸濁液(L S)のバルクを得る。pH、無菌性、及び粒径は工程内管理として試験する。

【0194】

(4) 充填

バイアルに0.4mlのL Sを充填し(連続攪拌下で)、凍結及び凍結乾燥のために部分的に閉じる。

【0195】

(5) 凍結乾燥、包装、及び標識

バイアルは凍結乾燥が進行するまで $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ で凍結される。凍結乾燥工程は、 $-45^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ の範囲の温度及び0.150mbarで実施される。この工程を24時間続ける。凍結乾燥終了時、バイアルを N_2 雰囲気下で完全に栓をし、被包化し、標識して $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ で貯蔵する。

【0196】

実施例12：L T B I に対する補助療法は25 μg の F C M t b の単回注射しか必要としない

潜伏結核感染(L T B I)を有する(T S T+及びクオンティフェロン+)96人のH I V陽性(H I V+)及びH I V陰性(H I V-)対象において、3種の用量のF C M t b (5、25、50 μg 、それぞれ本発明を実施するための好適な様式に記載の通りに製造された)とプラセボを評価するために第II相二重盲検無作為化臨床試験を設定した。対象は、1ヶ月のイソニアジド処置を受けた後、群(arm)当たり $n=12$ のグループに無作為に割り振られた。対象に、イソニアジド化学療法直後及び4週間隔ててF C M t b (5、25、50 μg 、それぞれ本発明を実施するための好適な様式に記載の通りに製造された)を2回接種した。

【0197】

免疫学的プロフィール：F C M t b (5、25、50 μg 、それぞれ本発明を実施するための好適な様式に記載の通りに製造された)は、すべての用量において刺激された分泌抗原(E S A T-6、A g 85 B)及び構造抗原(16kDa、38kDa)に対し、釣

10

20

30

40

50

鐘状の多抗原性応答を発揮した（図12及び13）。FCMt b（5、25、50 μ g、それぞれ本発明を実施するための好適な様式に記載の通りに製造された）は、高用量で予防効果に対応する長期メモリー応答（WHO試験）も発揮した。驚くべきことに、世界的に免疫応答はHIV+よりHIV-においてより強力であるが、25 μ gのFCMt b（5、25、50 μ g、それぞれ本発明を実施するための好適な様式に記載の通りに製造された）の単回接種はどちらの集団でも最良の免疫応答を発揮した（図12及び13）。

【0198】

結論：25 μ gの単回接種は、HIV陰性及びHIV陽性対象におけるLTBIに対する補助療法の最良の選択である。

【0199】

【数1】

152486WO 2012/093137

46

PCT/EP2012/050080

PCT

紙面による写し（注意 電子データが原本となります）

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	
0-1-1		PCT Online Filing Version 3.5.000.225 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	152486aa/ans
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	NCTC National Collection of Type Cultures
1-3-2	寄託機関のあて名	Health Protection Agency, Microbiology Services Colindale, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, United Kingdom
1-3-3	寄託の日付	03 December 2010 (03.12.2010)
1-3-4	受託番号	NCTC 13536 page 11, line 8
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	yes
0-4-1	権限のある職員	Pasche, Constantinus

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

10

20

30

40

【図 4】

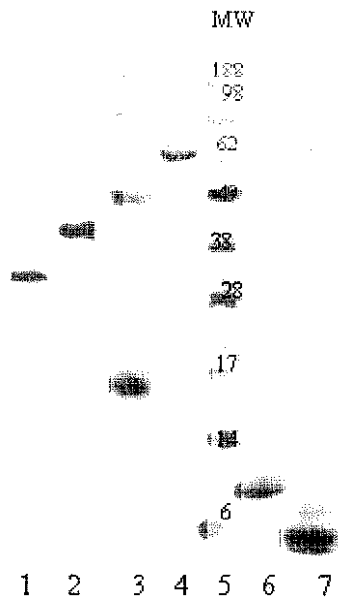


Figure 4

【図 5 a】

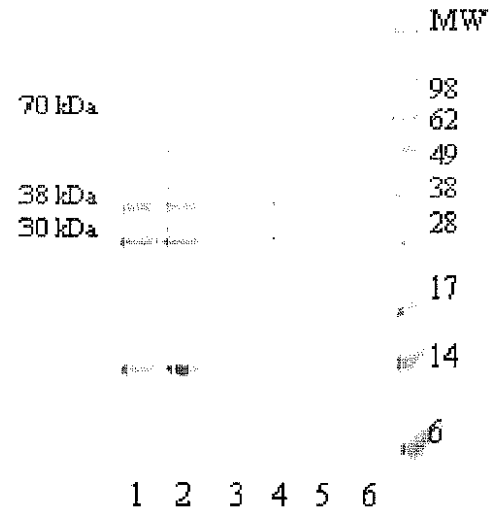


Figure 5a

【図 5 b】

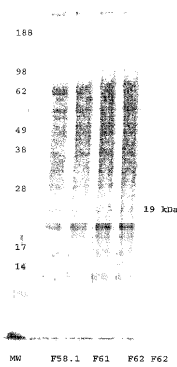


Figure 5b

【図 5 e】

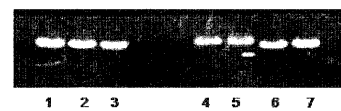


Figure 5e

【図 5 f】

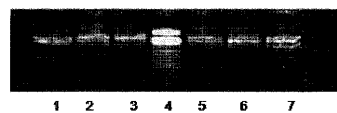


Figure 5f

【図 5 c】

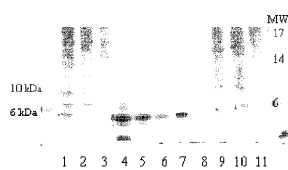


Figure 5c

【図 5 d】

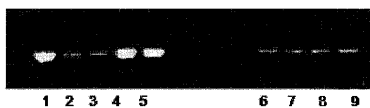


Figure 5d

【図 6】

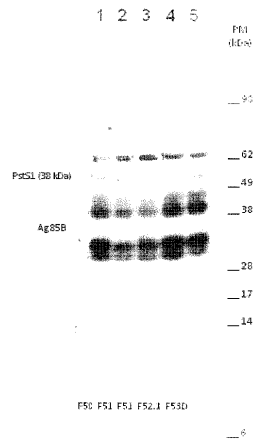


Figure 6

【図 7 a】

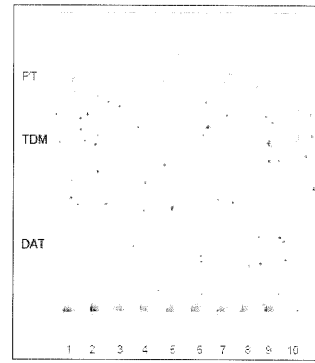


Figure 7a

【図 7 b】

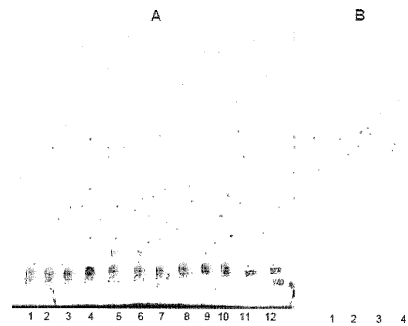


Figure 7b

【図 7 c】

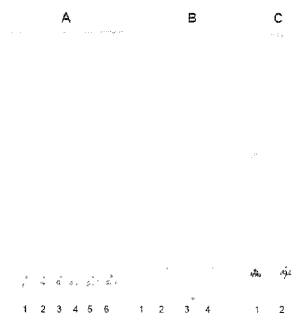


Figure 7c

【図 7 d】

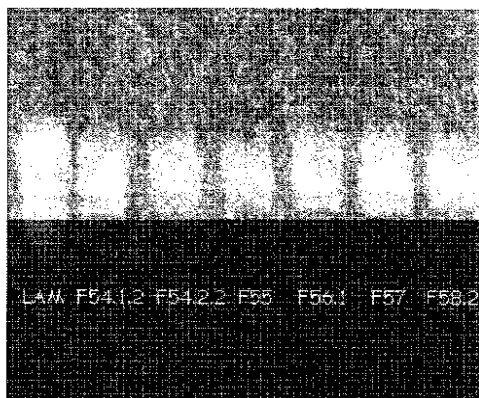


Figure 7d

【図 9】

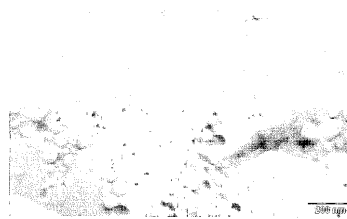
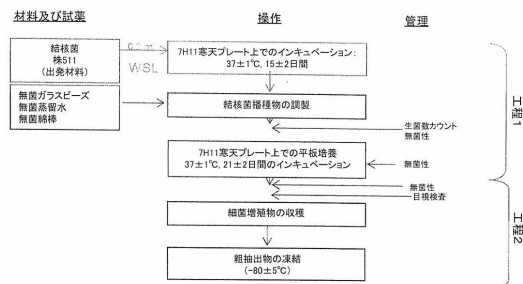
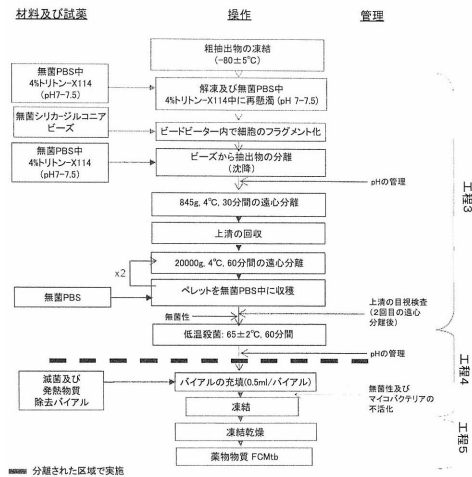


Figure 9

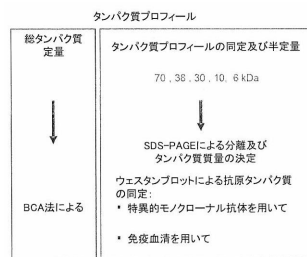
【図 1】



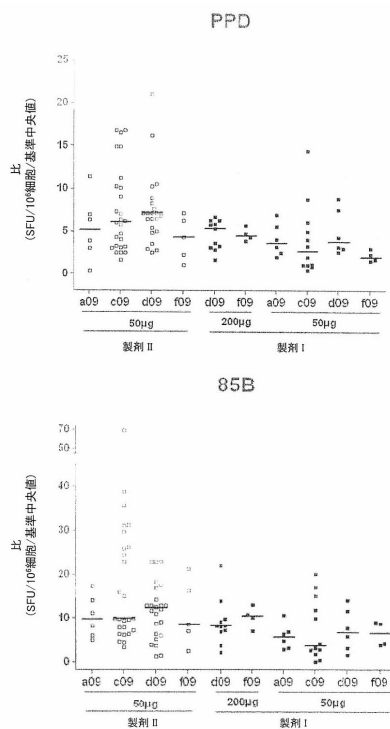
【図 2】



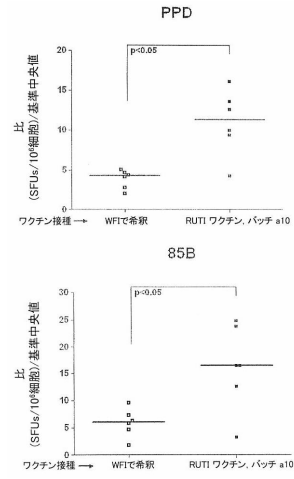
【図 3】



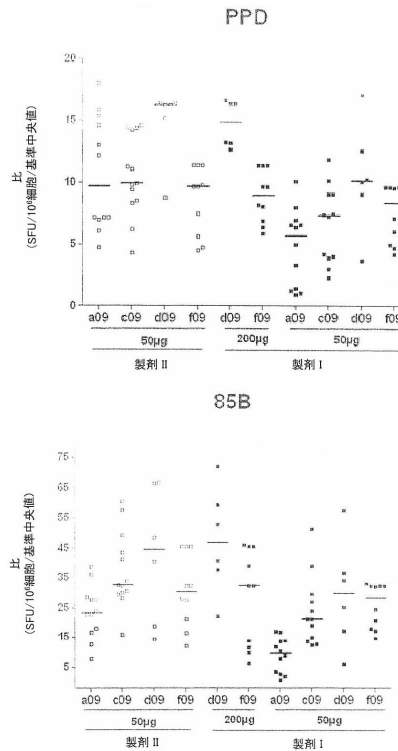
【図 10 a】



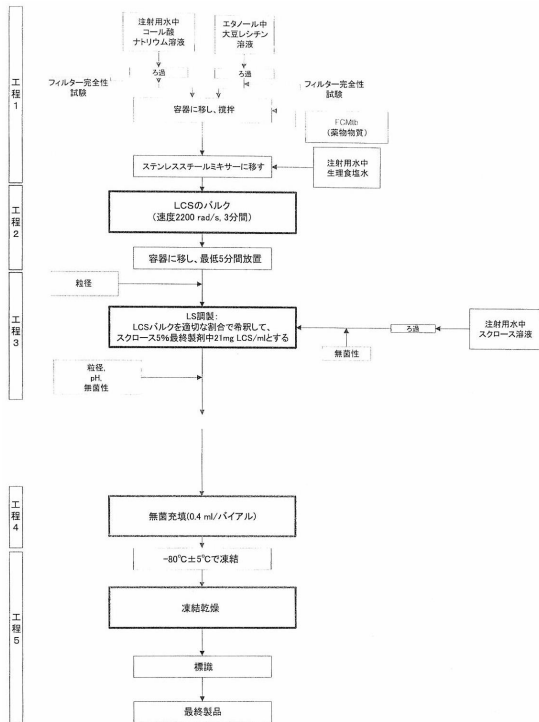
【図 8】



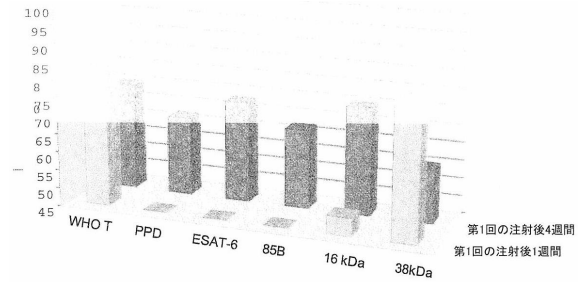
【図 10 b】



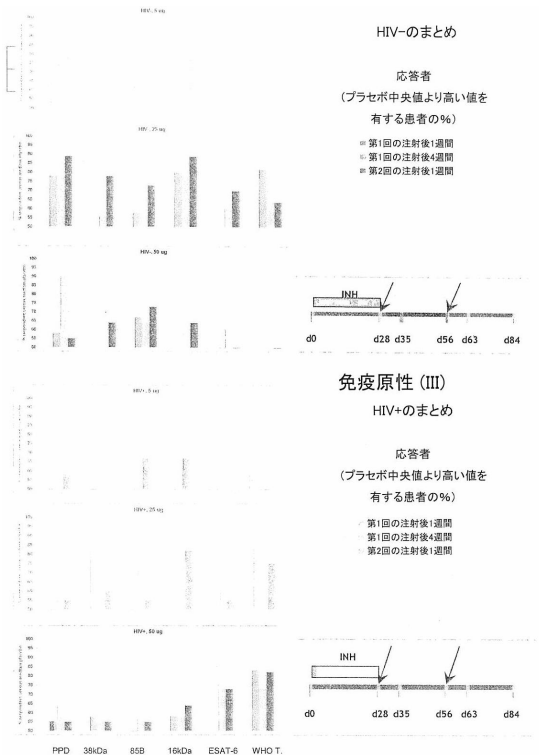
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 K	47/46	(2006.01)	A 6 1 K 47/46
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K 9/19
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/06
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	31/4409	(2006.01)	A 6 1 K 31/4409
A 6 1 K	31/496	(2006.01)	A 6 1 K 31/496

前置審査

- (74)代理人 100106080
弁理士 山口 晶子
- (72)発明者 カルドナ・イグレスias, ペレ・ホアン
スペイン国 08023 バルセロナ, アティック・レラ 3, ケア・オブ・オソナ
- (72)発明者 アマット・リエラ, イザベル
スペイン国 08023 バルセロナ, アティック・レラ 3, ケア・オブ・オソナ
- (72)発明者 レイエス, ブランカ
スペイン国 08830 サン・ボイ・デ・リョブレガート, ケア・オブ・アランサー 3 2
- (72)発明者 セルガ, アリアドナ
スペイン国 08015 バルセロナ, ケア・オブ・コンセル・デ・セント 1 1 1 4-1
- (72)発明者 アマット, メルセ
スペイン国 08006 バルセロナ, ケア・オブ・ビック 2 0 5-2

審査官 長岡 真

- (56)参考文献 特表2008-505106 (JP, A)
国際公開第2010/121618 (WO, A1)
特表平11-500906 (JP, A)
特表2009-518306 (JP, A)
特表2009-530380 (JP, A)
国際公開第2012/080369 (WO, A1)
Methods, 2006, vol.40, p.30-38
Methods in Enzymology, vol.464, p.79-104
Vaccine, 2005, vol.23, p.1393-1398

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/04
A 6 1 K 9/00-9/19
A 6 1 K 47/00-47/48
A 6 1 K 31/4409
A 6 1 K 31/496
A 6 1 P 31/06
A 6 1 P 43/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

