

(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2016-502997

(P2016-502997A)

(43) 公表日 平成28年2月1日 (2016. 2. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2015-547078 (P2015-547078)	(71) 出願人	513078985
(86) (22) 出願日	平成25年12月17日 (2013. 12. 17)		ユーロシネ ヴァクシンズ アクチエボラ
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月3日 (2015. 8. 3)		ーグ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/077007		スウェーデン王国 ソルナ フォグデヴレ
(87) 国際公開番号	W02014/095944		テン 2 カロリンスカ インスティテュ
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)		テット サイエンス パーク
(31) 優先権主張番号	12197522.1	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成24年12月17日 (2012. 12. 17)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫無防備状態の集団において使用するためのワクチン組成物

(57) 【要約】

本発明は、免疫無防備状態の集団における感染に対して有効な経鼻投与ワクチン組成物に関する。本発明の一面は、小児において有効な季節性インフルエンザウイルス株ワクチンを含む本発明のワクチンの小児科的使用に関する。本発明のさらなる局面は、前記組成物がパンデミック用の場合、全年齢群の対象に関する。

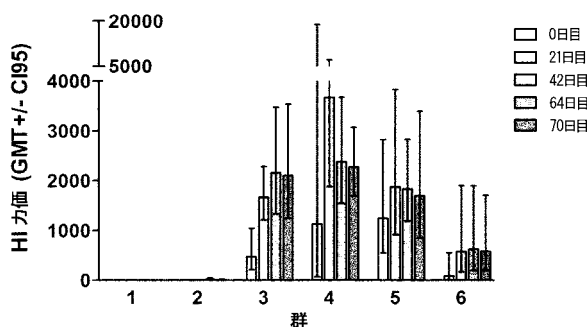
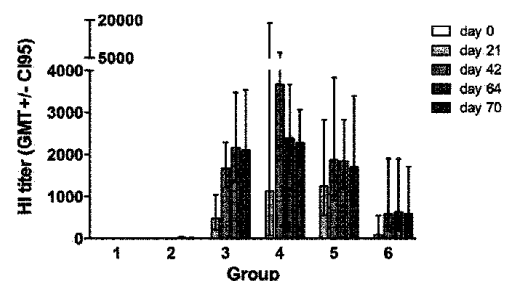


Figure 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

i)1種または複数種の非生抗原、および
ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント
を含む、鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物であって、
ワクチンが免疫無防備状態の対象に免疫性を与えるためのものである、組成物。

【請求項 2】

ワクチンがインフルエンザに対する免疫性を与えるためのものである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

10

【請求項 3】

ワクチンが65歳以上の人に免疫性を与えるためのものである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

ワクチンが、パンデミック地域にいる任意の年齢の免疫無防備状態の人において使用するためのものである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

ワクチンが、ペリパンデミック (peri-pandemic) 感染性病原体またはパンデミック感染性病原体に対する免疫性を与えるためのものである、請求項1~4のいずれか一項記載の使用のための組成物。

20

【請求項 6】

ワクチンが、全年齢の免疫無防備状態の人、例えば、乳幼児、小児、成人、および高齢者に、ペリパンデミック感染性病原体またはパンデミック感染性病原体に対する免疫性を与えるためのものである、請求項1~4のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

非生インフルエンザウイルス抗原が、不活化全ウイルス、スプリットウイルス、およびサブユニットインフルエンザ抗原からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

ウイルス排出の低減のために65歳以上の免疫無防備状態の個体において使用するためのものである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

30

【請求項 9】

非生インフルエンザウイルス抗原がスプリット抗原である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

1種または複数種のモノグリセリドが、ラウリン酸(C12)、ミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、ステアリン酸、ヘキサノ酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、ネルボン酸からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

40

【請求項 11】

1種または複数種のモノグリセリドが、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、およびリノール酸(C18:2)からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 12】

1種または複数種のモノグリセリドが、オレイン酸でモノエステル化されたグリセリド(オレイン酸グリセリル)である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

50

1種または複数種のカルボン酸が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、およびネルボン酸からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 4】

1種または複数種のカルボン酸がオレイン酸およびラウリン酸からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 5】

カルボン酸がオレイン酸である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 6】

アジュバントがオレイン酸グリセリル、オレイン酸、および水性媒体を含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 7】

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0g、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のモノグリセリドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 8】

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のカルボン酸を含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 1 9】

アジュバントミックス中の1種または複数種のモノグリセリドおよび1種または複数種のカルボン酸が、ワクチンの多くても10%w/v、または多くても5%w/v、または多くても4%w/v、または多くても3%w/v、または多くても2%w/v、または多くても1%w/vである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 2 0】

1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバントを含む、免疫無防備状態の対象への鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物。

【請求項 2 1】

65歳以上の人へのインフルエンザ鼻腔内投与ワクチンとして使用するための、請求項20記載の組成物。

【請求項 2 2】

免疫無防備状態の対象が、65歳以上の人、妊婦、未熟児、および以下の患者クラス；癌患者、化学療法を受けている人、放射線療法を受けている人、臓器移植患者、実質臓器移植を受けている人、幹細胞移植患者、同種造血幹細胞移植を受けている人、自家造血幹細胞移植を受けている人、HIVに感染した患者、AIDSにかかっている人、移植片対宿主病患者、免疫抑制剤を服用している人、例えば、グルココルチコイド療法およびステロイド療法を受けている人、慢性疾患、例えば、末期腎臓病、糖尿病、硬変にかかっている人からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 3】

i)1種または複数種の肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

10

20

30

40

50

を含む、肺炎連鎖球菌感染の予防または肺炎連鎖球菌感染に関連した症状の重篤度の低下のために、免疫無防備状態の対象において使用する鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物。

【請求項 2 4】

ワクチンが65歳以上の人に免疫性を与えるためのものである、請求項23記載の使用のための組成物。

【請求項 2 5】

i)1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む組成物を鼻腔内投与することによって、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法。

【請求項 2 6】

それを必要とする人に、請求項1~25のいずれか一項記載の組成物を含む治療の有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、ペリパンデミック期またはパンデミック期の期間中に免疫性を与える方法。

【請求項 2 7】

それを必要とする人に、請求項1~26のいずれか一項記載の組成物を含む治療の有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法。

【請求項 2 8】

それを必要とする人に、請求項1~26のいずれか一項記載の組成物を含む治療の有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、65歳以上の人に免疫性を与える方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、免疫無防備状態の集団における感染に対して有効な経鼻投与ワクチン組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

現在、一般に用いられているインフルエンザワクチンは生ウイルスまたは不活化ウイルスをベースとしており、不活化ウイルスワクチンは、全ウイルス、「スプリット」ウイルス、サブユニットタンパク質、または精製された表面抗原(赤血球凝集素およびノイラミニダーゼを含む)をベースとしうる。

【0003】

インフルエンザの社会経済的影響および高齢者を含む免疫無防備状態の対象におけるインフルエンザの医学的負担がますます認識されるようになっている。さらに、免疫無防備状態の個体、例えば、65歳以上の高齢者は、他の年齢群と比較して季節性インフルエンザによる入院および死亡のリスクが高い。さらに、免疫無防備状態の個体は流行期間中のインフルエンザ発病率が高い。残念なことに、免疫無防備状態の個体はワクチン接種に十分に応答しない。これらの対象は、インフルエンザ血球凝集素に対して、年下の成人と比較して低い抗体価を生じることでインフルエンザワクチン接種に応答することが分かっている。

【0004】

免疫無防備状態の個体の数は、化学療法レジメンの強さおよび複雑さの増大による特定の悪性腫瘍における生存率の劇的な改善、治療的かつ命を救う造血幹細胞移植および実臓器移植後に免疫抑制療法を受けている個体の数、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)に感染した個体における罹病率および死亡率の劇的な減少ならびに生活の質の改善の結果として

10

20

30

40

50

過去30年間に着実に増加してきた。

【 0 0 0 5 】

疾患または療法が原因で免疫機能が最適以下となっている個体はインフルエンザ関連合併症のリスクが高いと認識されている。免疫無防備状態集団内でのインフルエンザについての懸念には、ワクチン接種に対する応答が弱いこと、併発する感染症のリスクと死亡率が高いこと、ウイルス排出が多量かつ長期間にわたること、潜在的には伝播および起こりうるワクチン接種副作用のコントロールが含まれる。

【 0 0 0 6 】

免疫無防備状態の対象には、65歳以上の人に加えて、妊婦、化学療法を受けている人、免疫抑制剤を服用している人、例えば、臓器移植を受けた患者、HIVに感染した個体が含まれる。免疫無防備状態の対象とみなされる人の非限定的なリストを表1に示した。

【 0 0 0 7 】

(表 1) 免疫無防備状態の対象には以下の個体が含まれる

65歳以上の人
妊婦
癌にかかっている人
化学療法を受けている人
放射線療法を受けている人
同種造血幹細胞移植を受けている人
自家造血幹細胞移植を受けている人
実質臓器移植を受けている人
移植片対宿主病にかかっている人
HIVにかかっている人
免疫抑制薬物療法、例えば、グルココルチコイド療法を受けている人
慢性疾患、例えば、末期腎臓病、糖尿病、硬変にかかっている人

【 0 0 0 8 】

研究から、従来の非経口ワクチンは、免疫無防備状態の個体では、概して免疫応答性の集団と比較して満足の行く防御免疫を誘導する能力が低いことが分かっている。従って、インフルエンザA(H1N1)パンデミックのような「軽度の」インフルエンザパンデミックでさえ、高齢者および免疫無防備状態の個体ではかなりの死亡率に関連していた。

【 0 0 0 9 】

妊娠は免疫無防備な状態である。妊娠中、免疫系は全能力では働いていない。このため、妊娠中の身体の免疫系はインフルエンザウイルスと闘うのが困難な状況にあり、従って、インフルエンザは重篤になる傾向がある。実際に、妊婦は、過去一世紀にわたる全てのインフルエンザパンデミックにおいて、不釣り合いなほど多く重篤な疾患に罹患している。例えば、1918年のインフルエンザパンデミックでは、インフルエンザにかかった全妊婦の半数が肺炎になった。このうち半数が死亡し、結果として、インフルエンザにかかった妊婦では25%という驚異的かつ悲惨な死亡率となった。1957年のパンデミックでは、生殖可能年齢の女性のうち、報告された全死亡の半数が妊婦で起こった。

【 0 0 1 0 】

パンデミックとパンデミックの間の期間、循環しているインフルエンザウイルスは、前に起こった流行からのインフルエンザウイルスと関係がある。ウイルスは、人生の早い時点での感染から様々な程度の免疫をもつ人の間で蔓延する。このような循環は抗原ドリフトとして知られる現象であり、通常、2~3年にわたり、一般集団間で再流行を引き起こすのに十分な程変化した新株の選択を促進する。ドリフト変種は、任意の1年では、異なる生活共同体、地域、国、または大陸において異なる影響を及ぼしうるが、数年を通しては、全体的な影響は似ていることが多い。典型的なインフルエンザ流行は、入院率または死亡率の増加によって証明されるように肺炎および呼吸器下部疾患の発生率を増加させる。免疫無防備状態の個体、特に、高齢者または基礎慢性疾患のある個体は、このような合併症にかかる可能性が最も高く、若年乳幼児も重篤な疾患に罹患する可能性がある。ある意

10

20

30

40

50

味では、若年小児も免疫が十分に発達しておらず、成人の免疫系と同様に応答しないので、免疫無防備状態とみなすことができる。乳幼児は生後3ヶ月間においては、これより年上の個体では稀な感染症(例えば、ストレプトコッカス・アガラクチア(*Streptococcus agalactiae*))にかかりやすく、生後数ヶ月間は母親由来抗体に頼っている。乳幼児はある特定のワクチンには成人と同じようには応答せず、5歳ごろまで多糖類抗原に対する有効な抗体を産生することができない。免疫系は小児と共に成長および発達し、性ホルモンが小児免疫系の完全成熟を担うと考えられる思春期になるまで成人免疫系と完全には類似しない。

【0011】

予測不可能な間隔を開けて、「抗原シフト」として知られるプロセスによって新たなインフルエンザウイルスが現れ、パンデミックを引き起こすことができる。抗原シフトは、2つ以上の異なるウイルス株が組み合わさって、2種以上のオリジナル株の表面抗原の混合物を有する新たなサブタイプを形成するプロセスである。抗原シフトは、表現型変異を付与する再集合またはウイルスシフトの具体例である。従って、ヒト集団に既存の免疫がない新たなインフルエンザウイルスが現れたときにインフルエンザパンデミックが起こる。

10

【0012】

抗原シフトは、免疫の消失またはワクチン不適合につながりうる、既知インフルエンザ株の経時的な自然変異である抗原ドリフトとは異なる。抗原ドリフトは、インフルエンザウイルスA、インフルエンザB、およびインフルエンザCを含む全てのタイプのインフルエンザにおいて発生する。しかしながら、抗原シフトはインフルエンザウイルスAにしか起こらない。なぜなら、インフルエンザウイルスAはヒト以外にも感染するからである。

20

【0013】

パンデミックの期間中、抗ウイルス薬は、潜在的に生命を脅かすインフルエンザ疾患のリスクのある個体のニーズおよび数をカバーするに十分でもなく有効でもない。免疫学的にナイーブな対象において防御抗体レベルを実現するためには適切なワクチンの開発が不可欠である。

【0014】

これらの問題は、アジュバント添加および/または最適ワクチン送達によって対処される場合がある。アジュバント添加および/または最適ワクチン送達の目的は、抗原含有量を減らし、従って、利用可能なワクチン投与の数を増やすことができるようにワクチンの免疫原性を高めることである。アジュバントの使用はまた、特定のインフルエンザ株に対する既存の免疫がない集団において、抗原に対して免疫系を初回刺激するのを助けることができる。アジュバントはまたワクチン送達を強化し、それによって、免疫応答を誘導するのに必要な抗原量を減らすこともできる。ワクチン送達および/またはワクチン接種経路は極めて重要でありうる。ほとんどのインフルエンザワクチンは非経口送達され、従って、主に、血中でインフルエンザに対する免疫を誘導する。しかしながら、インフルエンザウイルスは鼻または口、すなわち、粘膜から体内に入る。インフルエンザワクチンを鼻に送達することによって、粘膜内および血中の両方でインフルエンザ特異的免疫を誘導することができる。これは、特に、インフルエンザワクチン株に対する以前の免疫のない、またはいかなるインフルエンザに対しても以前の免疫のない個体において、インフルエンザに対する防御免疫を誘導することを目的としているときに有益でありうる。

30

40

【0015】

ワクチン抗原に対する既存の免疫がない個体においてインフルエンザ疾患に対する防御免疫を誘導することができる新しい非生ワクチン、例えば、不活化全ウイルスをベースとする、または不活化ウイルスに由来する一部分をベースとするワクチンが必要とされている。インフルエンザに対する十分な既存の免疫がない、および/または免疫状態が弱まっている個体には、免疫無防備状態の個体、若年小児、およびパンデミックの場合には世界中の集団の大部分(または全て)が含まれる。本発明は、特に、免疫無防備状態の人、例えば、高齢者を対象とする。特に、この群は、インフルエンザに対する免疫学的応答をブーストすることができる安全な非生ワクチンを必要とする。パンデミック宣言の前またはパ

50

ンデミック宣言の際にパンデミック株に対して免疫学的にナイーブな集団を初回刺激するためのペリパンデミック(peripandemic)ワクチンとして使用することができる新しいワクチンも必要とされる。本発明は特に、免疫無防備状態の個体を対象とし、とりわけ、経鼻投与用に製剤化されており、例えばウイルスやウイルスの一部といった病原体からの不活化抗原しか含有せず、従って、医学的な訓練を受けた人を必要としないので容易に投与することができる。ワクチン抗原と強力なアジュバントとの製剤は免疫応答を増強することができる。

【発明の概要】

【0016】

本発明の目的は、免疫系が十分な機能を果たさない対象において、季節性ウイルス株およびパンデミックウイルス株ならびに他の病原性生物に対して免疫応答を誘導し、防御免疫を提供することができるワクチンを提供することである。本発明の一局面は、小児において有効な季節性インフルエンザウイルス株ワクチンを含む本発明のワクチンの小児科的使用に関する。本発明のさらなる局面は、前記組成物がパンデミック用の場合、全年齢群の対象に関する。

10

【0017】

本発明の第1の局面は、

i)1種または複数種の非生抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

20

を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与えるための鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0018】

前記組成物は、鼻腔内投与用インフルエンザワクチンとして使用するために製剤化される。本発明は、免疫無防備状態の対象において、インフルエンザに対する鼻腔内免疫化用ワクチンとして使用するために開発された。

【0019】

本発明の第2の局面は、

1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

30

を含む、免疫無防備状態の対象への鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0020】

本発明の第3の局面は、

i)1種または複数種の肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、肺炎連鎖球菌感染の予防または肺炎連鎖球菌感染に関連した症状の重篤度の低下のために免疫無防備状態の対象において使用する鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

40

【0021】

本発明の第4の局面は、

i)1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む組成物を鼻腔内投与することによって、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

50

【図 1】H1N1 A/Ned/602/09(A) に対する HI 抗体価の発生。群1、群3～群6のフェレットには0日目、21日目、および42日目に点鼻によって鼻腔内接種し、群2のフェレットには21日目および42日目に皮下注射した。0日目、21日目、および42日目に免疫化前に収集した血清ならびに64日目および70日目に最後の免疫化後に収集した血清の HI 抗体価を求めた。群1(対照、i.n. 食塩水)、群2(s.c. TIV)、群3(5 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群4(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群5(30 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、および群6(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加不活化全ウイルス抗原)。バーは、95%CIで一群あたり6匹の動物の幾何平均を表す(GMT+/-CI95)。

【図 2】遠縁ウイルス(distant virus)に対する HI 力価。群1、群3～群6のフェレットには0日目、21日目、および42日目に点鼻によって鼻腔内接種し、群2のフェレットには21日目および42日目に皮下注射した。0日目、21日目、および42日目に免疫化前に収集した血清ならびに64日目および70日目に最後の免疫化後に収集した血清の HI 抗体価を求めた。群1(対照、i.n. 食塩水)、群2(s.c. TIV)、群3(5 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群4(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群5(30 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、および群6(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加不活化全ウイルス抗原)。バーは、95%CIで一群あたり6匹の動物の幾何平均を表す(GMT+/-CI95)。GMT計算のために、5の値を絶対値5で置き替えた。A: H1N1 A/Swine/Ned/25/80に対する抗体価。B: H1N1 A/Swine/Italy/14432/76に対する抗体価。C: H1N1 A/New Jersey/08/76に対する抗体価。

【図 3】H1N1 A/Ned/602/09に対する VN 抗体価の発生。群1、群3～群6のフェレットには0日目、21日目、および42日目に点鼻によって鼻腔内接種し、群2のフェレットには21日目および42日目に皮下注射した。0日目、21日目、および42日目に免疫化前に収集した血清ならびに64日目および70日目に最後の免疫化後に収集した血清の VN 抗体価を求めた。群1(対照、i.n. 食塩水)、群2(s.c. TIV)、群3(5 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群4(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群5(30 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、および群6(15 μ g HA の i.n. Endocrine(商標)アジュバント添加不活化全ウイルス抗原)。バーは、95%CIで一群あたり6匹の動物の幾何平均を表す(GMT+/-CI95)。

【図 4】インフルエンザに対してナイーブなフェレットにおける、本発明のワクチン(15 μ g HA スプリットインフルエンザ抗原と20mg/ml (2%) Endocrine(商標)とを含む Immunose(商標)FLU)と、他のアジュバント添加ワクチン製品 FluMist(弱毒生ワクチン)および注射用ワクチンとの比較。

【図 5 a】Immunose(商標)Fluによって免疫化した老齢マウス(丸)、アジュバントなしで免疫化した老齢マウス(四角)、鼻腔内に食塩水を与えた老齢マウス(プラス記号)、および Immunose(商標)Fluを与えた若齢マウス(三角)における、経時的なインフルエンザ特異的 IgG1 力価応答を示す。

【図 5 b】Immunose(商標)Fluによって免疫化した老齢マウス(丸)、アジュバントなしで免疫化した老齢マウス(四角)、鼻腔内に食塩水を与えた老齢マウス(プラス記号)、および Immunose(商標)Fluを与えた若齢マウス(三角)における、経時的なインフルエンザ特異的 IgG2a 力価応答を示す。

【図 5 c】Immunose(商標)Fluによって免疫化した老齢マウス(丸)、アジュバントなしで免疫化した老齢マウス(四角)、鼻腔内に食塩水を与えた老齢マウス(プラス記号)、および Immunose(商標)Fluを与えた若齢マウス(三角)における、経時的なインフルエンザ特異的 IgA 力価応答を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

発明の詳細な説明

本発明の態様の説明では、理解しやすくするために特定の用語が用いられる。しかしながら、本発明は、そのように選択された特定の用語に限定されることは意図されず、それ

10

20

30

40

50

ぞれの特定の用語は、同様の目的を達成するために同様に働く全ての技術的同等物を含むことが理解される。

【0024】

「免疫無防備状態の」という用語は65歳以上の対象および妊婦を意味する。この用語はまた、遺伝的欠陥や病原体によって誘導される免疫系抑制、または薬物によって誘導される免疫系抑制の結果として、免疫系が正常に機能しない全年齢群の人を含む。

【0025】

従って、免疫無防備状態の患者には、以下の患者クラス;癌患者、化学療法を受けている人、放射線療法を受けている人、臓器移植患者、実質臓器移植を受けている人、幹細胞移植患者、同種造血幹細胞移植を受けている人、自家造血幹細胞移植を受けている人、HIVに感染した患者、AIDSにかかっている人、移植片対宿主病患者、免疫抑制剤を服用している人、例えば、グルココルチコイド療法およびステロイド療法を受けている人、慢性疾患、例えば、末期腎臓病、糖尿病、硬変にかかっている人が含まれるが、これに限定されない。

【0026】

「ペリパンデミック期」という用語はパンデミック前後の期間を指す。パンデミックがWHOによって公的に認定された期間だとしたら、本発明は、ワクチン接種が推奨される期間である、パンデミックが公認される直前の期間とパンデミック直後の期間に関する。

【0027】

本発明の組成物中の1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原は、A株、B株、および/またはC株の1種または複数種のインフルエンザ株に由来してもよい。パンデミックインフルエンザ株に対する免疫応答を初回刺激し、防御免疫を提供することができるワクチン組成物は、通常、1種のインフルエンザA株に由来する抗原しか含まないが(一価)、季節性インフルエンザ株に対する免疫応答を初回刺激し、防御免疫を提供することができるワクチン組成物は、通常、3種以上の異なる株(三価または四価)、最も一般的には、2種の異なるインフルエンザA株および1種または複数種のインフルエンザB株に由来する抗原を含む。

【0028】

さらに、本発明は、本発明の組成物を含むワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、エピソード期もしくはパンデミック期の前またはエピソード期もしくはパンデミック期の期間中に免疫性を与える方法に関し、本発明の組成物を含むワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、小児科対象に免疫性を与える方法、なおさらに、本発明の組成物を含むワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、ナイーブな対象に免疫性を与える方法に関する。

【0029】

免疫無防備状態の個体、例えば、高齢者は、一般的なワクチン戦略に関して言えば問題があることから、本発明はこの集団を対象とする。人間は年をとるにつれて、免疫系に非常に多くの変化が起こる。免疫系は年齢と共にその機能の一部を失い始め、概して免疫応答性の成人集団のようには素早くも効率的にも刺激に対して応答できなくなることは、十分に解明されている。加齢と共に起こる変化は、感染症(例えば、肺炎およびインフルエンザ)の高発生率などの重大な臨床発現と関連する。加齢と共に、体液性免疫応答の変化および細胞性免疫応答の変化の両方が起こり、高齢者集団において見られる免疫応答性減少の多くはT細胞応答の変化と関連する。有効な免疫活性の消失は、主に、一つには胸腺退縮の結果として起こるT細胞区画内の変化によるものである。年齢と共に、人間は免疫老化の結果として免疫無防備な状態になる。免疫老化は、65歳以上の高齢者における免疫機能低下について説明するために用いられる用語である。従って、加齢は、感染症に対する高感受性およびワクチン接種に対する不十分な応答を伴う。これらの理由から、本発明のような高齢者集団用のさらに効率的なワクチンが必要とされている。

【0030】

免疫無防備状態の集団は免疫系が弱まっている。人間は、妊娠および加齢などの自然経

10

20

30

40

50

過の結果として、または疾患もしくは治療的処置の結果として免疫無防備状態になる場合がある。年齢に関連する免疫老化に加えて、個体は、免疫系に影響を及ぼす疾患ならびに治療的処置の結果として免疫無防備状態になる場合がある。慢性ウイルス感染症、例えば、免疫系のCD4 T細胞を直接標的とするヒト免疫不全症ウイルス(HIV)に罹患した個体は、低いウイルス数を維持するために生涯にわたって抗ウイルス剤および免疫抑制剤を服用し、その結果として免疫系が弱まっている。長期間にわたる処置を必要とする他の慢性ウイルス感染症、例えば、B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)も免疫無防備状態に関連し、その結果として細菌病原体、真菌病原体、または他のウイルス病原体に対する感受性を高める。臓器移植患者は、免疫系の移植臓器拒絶を阻止するために免疫抑制剤を服用していることから免疫無防備状態と分類される別の患者群である。さらに、一部の悪性腫瘍処置も、癌を死滅させ癌成長を阻止するだけでなく免疫系をひどく損なうことから、免疫無防備状態につながる場合がある。

10

【0031】

免疫無防備状態の個体にとって共通の問題は、免疫無防備状態の個体が非経口ワクチンに十分に応答しないことであり、従って、この集団におけるワクチンの成功率を高める新たなアプローチが必要とされている。本発明は、このような新たなアプローチを提供する。

【0032】

免疫抑制状態の成人および小児ならびに65歳以上の高齢者ならびに妊婦に適した、季節性インフルエンザおよび他の日和見性病原体に対する安全かつ有効なワクチンが必要とされている。免疫無防備状態の対象は、重篤な、または併発する感染症、例えば、インフルエンザによる感染症に対して脆弱である。例えば、米国では、一年につき推定平均225,000件の入院および36,000件の死亡が季節性インフルエンザに起因する。

20

【0033】

弱毒生ウイルスワクチンは安全上の懸念が伴う。Flumist(登録商標)/Fluenzは、この安全上の問題のために、2歳未満の小さな子供、高齢者、または他の免疫無防備状態の個体における使用には認可されていない。逆説的ではあるが、これは、インフルエンザに対して特に高いリスク群である免疫無防備状態の対象である。Flumist(登録商標)は、より年上の小児に対して認可されているが、弱毒生ウイルスワクチンである。さらに、Fluenzは、活性物質もしくは他の任意の成分、ゲンタマイシンまたは卵もしくは卵タンパク質に対して過敏性(アレルギー性)の人に使用してはならない。Fluenzはまた、血液障害、症候性HIV感染、および癌などの状態により、またはある特定の医学的処置の結果として免疫系が弱まっている人にも与えてはならない。Fluenzはまた、サリチル酸塩(例えば、アスピリンなどの鎮痛剤)による処置を受けている小児にも与えてはならない。

30

【0034】

驚いたことに、ワクチン抗原に対する既存の免疫がないフェレットにおいて、アジュバント添加非生インフルエンザワクチンを鼻腔内投与すると非常に高い免疫応答が誘導され、その後、インフルエンザ疾患からの完全な防御が誘導されたことが発見された。全およびスプリット非生抗原ワクチンはいずれも、実施例1によって例示される、市販の注射用インフルエンザワクチンであるFluarix(登録商標)よりも優れた結果を示した。

40

【0035】

本発明の組成物は弱毒生ウイルスではなく非生インフルエンザウイルス抗原を利用する。さらに、本発明の組成物は鼻腔内投与することができる。本発明の組成物の鼻腔内投与によって、専門訓練なく一般に使用および投与すること、例えば、ペリパндеミック期およびパндеミック期に自己投与によって集団全体に使用および投与することが可能になる。非生インフルエンザウイルス抗原の使用によって、弱毒生ウイルスワクチンに付随する安全上の懸念なく小さな子供において使用することが可能になる。本発明者らは、鼻腔内投与することができ、それによって、上述の利点を有し、脆弱な集団および患者クラスにとって重要な要望を満たす、免疫無防備状態の対象において有効なワクチンを開発した。

【0036】

50

本発明は、第1の局面では、

i)1種または複数種の非生抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与えるための鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0037】

本発明の組成物は鼻腔内投与用インフルエンザワクチンとして使用するのに適している。本発明の組成物は、免疫無防備状態の対象におけるインフルエンザ鼻腔内免疫化用ワクチンとしての使用を対象とする。一態様において、前記組成物は、65歳以上の人に免疫性を与えるためのワクチンとして使用するためのものである。一態様において、前記組成物は、妊婦に免疫性を与えるためのワクチンとして使用するためのものである。

10

【0038】

インフルエンザウイルスは3つの型A、B、およびCからなる。インフルエンザAウイルスは、ヒト、ウマ、ブタ、フェレット、およびニワトリを含む多種多様な鳥類および哺乳動物に感染する。インフルエンザBはヒト、フェレットおよびアザラシに存在し、Cはヒト、イヌ、およびブタに存在する。インフルエンザAに感染した動物は、ヒト集団に伝播する遺伝的および抗原的に多様なウイルスのプールを生じることによってインフルエンザウイルスの保有宿主として働く場合が多い。伝播は、ヒトと感染動物が密接に接触することによって、例えば、家畜を手で触ることによって起こりうる。ヒトからヒトへの伝播は、密接に接触することによって、または咳もしくはくしゃみによって生じた飛沫を吸入することによって起こりうる。

20

【0039】

インフルエンザAウイルス粒子の外面は、糖タンパク質である赤血球凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)を含有する脂質エンベロープからなる。HA糖タンパク質は、HA1およびHA2と呼ばれる2つのサブユニットから構成される。HAは、上気道および下気道の上皮細胞の外膜に見られるシアル酸に結合し、受容体によって媒介されるエンドサイトーシスを介して細胞に吸収されるシアル酸結合部位を含有する。インフルエンザウイルス粒子は細胞内に入ると、そのゲノムを放出し、ゲノムは核に入り、新たなインフルエンザウイルス粒子の産生を開始する。NAも産生され、放出されたインフルエンザウイルス粒子の再捕獲を阻止するために細胞表面からシアル酸を切断する。ウイルスは短期間、典型的な例ではおおよそ5日間、潜伏するが、潜伏期はかなりの差がある場合がある。ウイルスは病気発症の約1日前に分泌され、典型的には3~5日間まで続く。典型的な症状には、発熱、疲労、倦怠感、頭痛、痛みおよび疼痛、咳、ならびに咽喉痛が含まれる。いくつかの症状は、感染後、数週間持続することがある。

30

【0040】

主としてHAおよびNA糖タンパク質の変異によって、異なるインフルエンザウイルス株が特徴付けられており、従って、HAおよびNAはウイルスサブタイプを特定するために用いられる(すなわち、H5N1はHAサブタイプ5およびNAサブタイプ1を示す)。従って、インフルエンザワクチンはHA分子およびNA分子を標的とする場合が多い。従来のインフルエンザウイルスワクチンは、適切なHA分子および/またはNA分子を有する不活化全ウイルスを利用する場合が多い。または、組換え型のHAタンパク質およびNAタンパク質またはそのサブユニットがワクチンとして用いられる場合が多い。ワクチン組成物中の抗原は、不活化抗原、例えば、不活化全ウイルス、スプリット抗原、サブユニット抗原、組換え抗原またはペプチドでもよい。「抗原」または「免疫原」という用語は、免疫応答の標的として働きうる全てのものと定義される。この用語はまた、タンパク質抗原、組換えタンパク質成分、ウイルス様粒子(VLP)、ならびに遺伝子操作されたRNAまたはDNAを含む。遺伝子操作されたRNAまたはDNAが身体の細胞に注入されると、宿主細胞の「内部機構(inner machinery)」がDNAを「読み取り」、それを用いて病原体のタンパク質を合成する。これらのタンパク質は宿主細胞によって処理され宿主細胞の表面に表示されたときに異物と認識されるので、

40

50

免疫系は警戒態勢をとり、次いで、ある範囲の免疫応答を誘発する。この用語はまた、不活化された細菌もしくはウイルスまたはその一部分を模倣する物質も含む。免疫応答は細胞性または体液性のいずれであってもよく、全身区画および/または粘膜区画において認められうる。

【0041】

しかしながら、インフルエンザはRNAウイルスであり、従って、頻繁な変異を受けやすく、その結果、ウイルスの抗原性組成物は常にかつ永久に変化する。抗原性組成物とは、免疫系によって認識されるポリペプチドの一部分、例えば、抗体結合エпитープを指す。抗原性組成物に対する小さく軽微な変化は抗原ドリフトと呼ばれることが多い。インフルエンザAウイルスはまた、再集合と呼ばれるプロセスにおいて他のサブタイプに由来する遺伝物質を「交換」し、その結果として抗原性組成物を大きく変えることもできる。これは抗原シフトと呼ばれる。ウイルス粒子に対する免疫応答は抗体とHAおよびNA糖タンパク質との結合に依存するので、これらの糖タンパク質が頻繁に変わると、インフルエンザウイルスに対して獲得した免疫応答の有効性は時間とともに低下し、最終的に免疫がなくなる。インフルエンザAは急速な抗原ドリフトおよび抗原シフトを起こすことができるので、新株に対する既存の免疫がないことによるインフルエンザ流行がしばしば誘発される。

【0042】

インフルエンザを予防するワクチン接種は、インフルエンザによる重篤な合併症のリスクが高い人またはインフルエンザに関連する外来、ED、または通院のリスクが高い人にとって特に重要である。米国疾病管理予防センター(CDC)は、ワクチン供給が限られた状況では、ワクチン接種活動が、インフルエンザに起因する重篤な合併症を発症するリスクのある人にワクチン接種を届けることに集中すべきだと勧告している。リスクの高い人には、

6～59ヶ月の小児全員；

50歳以上の人全員；

慢性の肺障害(喘息を含む)もしくは心血管障害(孤立性高血圧を除く)、腎臓障害、肝臓障害、神経障害、血液障害、または代謝障害(糖尿病を含む)のある成人および小児；

免疫抑制している人(薬またはHIV感染によって引き起こされる免疫抑制を含む)；

インフルエンザシーズン中に妊娠している人または妊娠の予定のある人；

長期アスピリン療法を受けており、インフルエンザウイルス感染後にライ症候群となるリスクがありうる小児および青少年(6ヶ月～18歳)；

ナースিংホームおよび他の長期療養所の入所者

が含まれうるが、これに限定されない。

【0043】

パンデミックアウトブレイクを引き起こす能力をインフルエンザウイルス株に与えるインフルエンザウイルス株の特徴は、最近循環している株の赤血球凝集素と比較して新しい赤血球凝集素を含有していること、これはノイラミニダーゼサブタイプの変化を伴ってもよく、伴っていなくてもよい；ヒト集団内で水平伝播できること；およびヒトに対する病原性があることである。新たな赤血球凝集素は、長期間、おそらく何十年にもわたってヒト集団内で明らかでなかったもの、例えば、H2でもよい。または、新たな赤血球凝集素は、以前にヒト集団内で循環していなかった赤血球凝集素、例えば、鳥類で発見されたH5、H9、H7、またはH6でもよい。いずれの場合でも、集団の大部分または少なくとも大きな割合、さらには集団全体がその抗原に以前に遭遇しておらず、その抗原に対して免疫学的にナ

【0044】

本発明のワクチンは、特に、免疫無防備状態の対象、例えば、65歳以上の高齢者を対象とする。本発明はまた、疾患または療法によって誘導される免疫無防備状態をもつ対象を対象としている。一態様において、本発明の組成物は癌患者において使用するためのものである。一態様において、前記組成物は妊婦において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、化学療法を受けている人において使用するためのものであ

る。一態様において、本発明の組成物は、放射線療法を受けている人において使用する
ためのものである。一態様において、本発明の組成物は、臓器移植患者において使用する
ためのものである。一態様において、本発明の組成物は、実質臓器移植を受けている人にお
いて使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は幹細胞移植患者にお
いて使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、同種造血幹細胞移
植を受けている人において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物
は、自家造血幹細胞移植を受けている人において使用するためのものである。一態様にお
いて、本発明の組成物はHIVに感染した患者において使用するためのものである。一態様
において、本発明の組成物はAIDSにかかっている人において使用するためのものである。
一態様において、本発明の組成物は、移植片対宿主病患者において使用するためのもので
ある。一態様において、本発明の組成物は、免疫抑制剤を服用している患者、例えば、グ
ルココルチコイド療法を受けている患者において使用するためのものである。一態様にお
いて、本発明の組成物は、ステロイド療法を受けている人において使用するためのもので
ある。さらに、本発明の組成物は、パンデミック期またはペリパンデミック期の期間中に
、全年齢群の免疫無防備状態の個体用のワクチンとして意図される。一態様において、本
発明は、免疫無防備状態の小児科対象を対象とする。

10

20

30

40

50

【0045】

従って、前記組成物は、特に、パンデミック期間中に、免疫無防備状態の小児科対象を
対象とする。免疫無防備状態の小児科対象は、18歳以下の小児、例えば、0歳～18歳の小
児、特に、12歳以下の小児でもよい。典型的に、小児は、8歳未満、例えば、6歳以下であ
る。本発明のワクチンの意図された重要な患者クラスは、特に、2ヶ月～9歳未満の免疫無
防備状態の小児、典型的には、月齢3ヶ月～9歳未満、例えば、月齢6ヶ月～8歳未満の免疫
無防備状態の小児、最も典型的には、月齢6ヶ月～7歳未満、例えば、月齢6ヶ月～72ヶ月
未満、または月齢6ヶ月～60ヶ月、または月齢6ヶ月～24ヶ月の免疫無防備状態の小児であ
る。本発明の組成物は、少なくとも部分的に、免疫無防備状態の対象における小児科的使
用のためのワクチンとして意図される。

【0046】

前記組成物が、特に、パンデミック期またはペリパンデミック期の期間中に使用するた
めのワクチンを対象とする場合、免疫無防備状態の対象は全年齢群の免疫無防備状態の対
象でもよい。

【0047】

鼻腔内投与は、任意の投与方法、例えば、鼻腔内へのワクチン噴霧、または鼻腔内もし
くは鼻粘膜壁上へのワクチンの滴下によるピペットを介したワクチン投与による、鼻への
投与を意味することが意図される。

【0048】

有利なことに、前記組成物は、弱毒生ウイルスではなく1種または複数種の非生インフ
ルエンザウイルス抗原を含む。述べられたように、これにより、患者クラスの選択だけで
なく作製、配布、および廃棄の点での安全上の懸念が回避される。非生インフルエンザウ
イルス抗原は、不活化全ウイルス、スプリットウイルス、サブユニットインフルエンザ抗
原、および組換え抗原からなる群より選択されてもよい。組換えタンパク質の使用は、ウ
イルス抗原投与に対して産生される中和抗体の力価を高めるために使用することができる
。HAのグリコシル化は、免疫応答が抗体応答を誘発する能力およびウイルスが免疫系を逃
れる能力において重要な役割を果たしている。従って、免疫原性の高い異種の複合体型グ
リカンならびにモノグリコシル化組換えタンパク質または非グリコシル化組換えタンパク
質を含有する、組換えHAタンパク質を作製することができる。

【0049】

好ましくは、非生インフルエンザウイルス抗原はスプリット抗原またはサブユニットイ
ンフルエンザ抗原であり、より好ましくは、スプリット抗原である。

【0050】

インフルエンザAゲノムは、8個のRNA断片上に、11個のタンパク質：赤血球凝集素(HA)、

ノイラミニダーゼ(NA)、核タンパク質(NP)、M1、M2、NS1、NS2(NEP:核外輸送タンパク質)、PA、PB1(塩基性ポリメラーゼ1)、PB1-F2、およびPBをコードする11個の遺伝子を含む。非生インフルエンザウイルス抗原は、ウイルスからのいずれか1つのタンパク質またはタンパク質の組み合わせより選択されてもよい。

【0051】

本発明の組成物は任意の不活化インフルエンザウイルスを含んでもよい。当業者に理解されるように、インフルエンザウイルスは季節ごとに異なり、インフルエンザウイルスが感染する地域および集団によっても異なる。本発明は、本発明のアジュバントと1種または複数種のインフルエンザウイルスからの非生インフルエンザウイルス抗原とを含むワクチンに関する。本発明のワクチン組成物において用いられる非生インフルエンザ抗原は、不活化インフルエンザウイルスに由来する任意の抗原性物質である。例えば、非生インフルエンザ抗原は不活化全ウイルス粒子を含んでもよい。または、非生インフルエンザ抗原は、例えば、免疫原性タンパク質、例えば、M2イオンチャンネルタンパク質または糖タンパク質が保持されている破壊されたウイルス(スプリットウイルス)を含んでもよい。ワクチン組成物中の抗原性物質として、インフルエンザ膜糖タンパク質、赤血球凝集素(HA)、および/またはノイラミニダーゼ(NA)の精製調製物が用いられてもよい。本発明によるワクチン組成物は1つまたは複数のタイプの抗原性物質を含んでもよい。もちろん、ワクチン組成物を調製するために用いられるインフルエンザ型ウイルスは、ワクチン接種者を防御しようとするときに対象となるインフルエンザによって決まる。

【0052】

例えば、非生インフルエンザウイルス抗原は、1種または複数種の抗原、例えば、以下のインフルエンザウイルス: A/Ann Arbor/6/60(A/AA/6/60)、B/Ann Arbor/1/66ウイルス、FluMist MDV-A(ca A/Ann Arbor/6/60)、FluMist MDV-B(ca B/Ann Arbor/1/66)、A/Leningrad/17ドナー株バックボーン、およびPR8の1つまたは複数の遺伝子バックボーンの1種または複数種の抗原を含む。

【0053】

別の具体例では、本発明のワクチン組成物は、以下: B/Yamanashi; A/New Caledonia; A/Sydney; A/Panama; B/Johannesburg; B/Victoria; B/Hong Kong; A/Shandong/9/93; A/Johannesburg/33/94; A/Wuhan/395/95; A/Sydney/05/97; A/Panama/2007/99; A/Wyoming/03/2003; A/Texas/36/91; A/Shenzhen/227/95; A/Beijing/262/95; A/New Caledonia/20/99; B/Ann Arbor/1/94; B/Yamanashi/166/98; B_Johannesburg.sub.--5.sub.--99; B_Victoria/504/2000; B/Hong Kong/330/01; B_Brisbane.sub.--32.sub.--2002; B/Jilin/20/03; H1N1インフルエンザAウイルス、H3N2インフルエンザAウイルス、H9N2インフルエンザAウイルス、H5N1インフルエンザAウイルス、H7N9インフルエンザAウイルス; インフルエンザBウイルス; および(WHOによって指定された、またはヒト集団において循環していない)パンデミックインフルエンザ株の1つまたは複数からの非生インフルエンザウイルス抗原、例えば、HAポリペプチド配列もしくはNAポリペプチド配列である(またはこのような配列と少なくとも90%同一の、もしくは少なくとも95%同一の)非生インフルエンザウイルス抗原を含む。

【0054】

一態様において、インフルエンザウイルス株は、WHOによってインフルエンザワクチンにおける使用が以前に推奨された株である1つまたは複数のインフルエンザウイルス株でもよい。

【0055】

本発明の組成物のアジュバントは、鼻腔内投与に対する本発明の組成物の適合性および本発明の組成物の効力において極めて重要である。鼻腔内投与に適したアジュバントは、グリセロールモノエステルと脂肪酸との組み合わせを任意で含むアジュバントでもよく、脂肪酸の組み合わせでもよい。このようなアジュバントにおいて用いられるカルボン酸は、分枝または非分枝であってもよく、環式または非環式であってもよく、1つ、2つ、または複数の不飽和(二重結合または三重結合)を有してもよい長鎖(C4-C30)アルキル、アルケ

ニル、またはアルキニルカルボン酸を含み、前記不飽和はさらに、異なる種類の不飽和であってもよい。

【0056】

このようなアジュバントにおいて用いられるモノグリセリドはグリセリンのカルボン酸エステルでもよく、カルボン酸は、分枝または非分枝であってもよく、1つ、2つ、または複数の不飽和(二重結合または三重結合)を有してもよい長鎖(C4-C30)アルキル、アルケニル、またはアルキニルカルボン酸であってもよく、前記不飽和はさらに、異なる種類の不飽和であってもよい。

【0057】

ワクチン組成物中のモノグリセリドの濃度は、例えば、約1～約50mg/ml、例えば、約1～約25mg/ml、約5～約15mg/mlの範囲、または約10mg/mlでもよい。

10

【0058】

ワクチン組成物中の脂肪酸の濃度は、例えば、約0.5～約50mg/ml、例えば、約1～約25mg/ml、約1～約15mg/ml、約1～約10mg/ml、約2～約8mg/ml、または約6～7mg/mlの範囲でもよい。一態様において、ワクチン組成物中の脂肪酸のモルベースでの濃度は、モノグリセリドの(モルベースでの)濃度に相当する。

【0059】

モノグリセリドおよび脂肪酸について前述された濃度範囲の任意の組み合わせが本願の文脈の中にある。さらに、述べられた最も広い範囲が好ましい範囲を示し、そして、この範囲は最も好ましい範囲に狭められる。

20

【0060】

本発明者らは、ワクチン接種が、経鼻経路を介して、例えば、鼻腔粘膜への投与を介して行われたときに、前記の、およびWO2012/042003(その全体が参照により本明細書に含まれる)に開示されたアジュバントが特に有用であることを見出した。本発明者らは、経鼻経路を介したワクチン接種において、このようなアジュバントを使用するとワクチン接種時の免疫応答が改善されることを見出した。本発明者らは、このようなアジュバントの使用が、ヒトを含むいくつかの種において安全かつ許容可能であることを見出した。

【0061】

従って、前記組成物は、ラウリン酸(C12)、ミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、ネルボン酸からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドであるモノグリセリドを含んでもよい。

30

【0062】

さらなる態様において、モノグリセリドは、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、およびリノール酸(C18:2)からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである。

【0063】

好ましくは、モノグリセリドは、オレイン酸でモノエステル化されたグリセリド(オレイン酸グリセリル)である。

40

【0064】

アジュバントは、好ましくは、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、およびネルボン酸からなる群より選択される1種または複数種のカルボン酸を含む。好ましくは、1種または複数種のカルボン酸はオレイン酸およびラウリン酸からなる群より選択される。

50

【 0 0 6 5 】

適切な態様の組み合わせにおいて、アジュバントは、オレイン酸グリセリル、オレイン酸、および水性媒体を含む。本発明のワクチン組成物はまた、さらなる薬学的賦形剤も含んでよい。このような薬学的賦形剤は以下でもよい：

1. ワクチンの張性/容量オスモル濃度を制御するための物質。このような物質は、例えば、塩化ナトリウムのような生理学的な塩である。他の生理学的な塩は、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化マグネシウムなどである。このような薬剤は、イオン強度および安定性に影響を及ぼす他のイオン性物質でもよい。ワクチンの浸透圧モル濃度は、約200～約400mOsm/kgの範囲、好ましくは、約240～約360mOsm/kgの範囲の値に調節されてもよく、または浸透圧モル濃度は生理学的レベルに近くなければならない、例えば、約290～約310mOsm/kgの生理学的範囲になければならない。
2. ワクチン組成物のpHを調節するための、またはワクチン組成物を緩衝するための物質。通常、ワクチン組成物のpHは約5～約8.5の範囲にある。適切なpH調節剤または緩衝物質には、塩酸、水酸化ナトリウム(pHを調節する)、ならびにリン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液など(ワクチンを緩衝する)が含まれる。
3. 例えば、界面活性剤、酸化防止剤、キレート剤、抗菌剤、ウイルス失活因子、防腐剤、色素、消泡剤、安定剤もしくは界面活性剤、またはその組み合わせのような他の添加物。

10

【 0 0 6 6 】

界面活性剤は、親水性、不活性、および生体適合性の界面活性剤、例えば、ポリキサマー、例えば、PluronicF68またはPluronic127でもよい。

20

【 0 0 6 7 】

抗菌剤は、例えば、アンホテリシンまたはその任意の誘導体、クロロテトラサイクリン、ホルムアルデヒドもしくはホルマリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ポリミキシンBもしくはその任意の誘導体、ストレプトマイシン、またはその任意の組み合わせでもよい。

【 0 0 6 8 】

酸化防止剤は、例えば、アスコルビン酸もしくはトコフェロールまたはその任意の組み合わせでもよい。

【 0 0 6 9 】

ウイルス失活因子は、例えば、ホルマリン、 γ -プロピオラクトン、紫外線、加熱、またはその任意の組み合わせでもよい。

30

【 0 0 7 0 】

防腐剤は、例えば、塩化ベンゼトニウム、EDTA、フェノール、2-フェノキシエタノール、もしくはチメロサル、またはその任意の組み合わせでもよい。EDTAはまたキレート剤、酸化防止剤、および安定剤であることも示されている。

【 0 0 7 1 】

色素は、例えば、任意の指示薬(例えば、フェノールレッド)もしくはブリリアントグリーンまたはその任意の組み合わせでもよい。

【 0 0 7 2 】

消泡剤は、例えば、ポリジメチルシロゾン(polydimethylsiloxane)でもよい。

40

【 0 0 7 3 】

表面活性剤は、例えば、アニオン性、カチオン性、または非イオン性、または双性イオン性の表面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンおよびその誘導体、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20もしくはポリソルベート80)、Tween80、ポリキサマー(例えば、PluronicF68)、またはその任意の組み合わせでもよい。

【 0 0 7 4 】

典型的に、ワクチン組成物中のモノグリセリドの濃度は、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量である。

50

【 0 0 7 5 】

さらに、1種または複数種のカルボン酸の濃度は、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量である。

【 0 0 7 6 】

ワクチン組成物中の1種または複数種のモノグリセリドと1種または複数種のカルボン酸は、多くても10%w/v、または多くても5%w/v、または多くても4%w/v、または多くても3%w/v、または多くても2%w/v、または多くても1%w/v、または多くても0.5%w/v、または多くても0.1%w/v、または多くても0.05%w/vの量でもよい。

【 0 0 7 7 】

アジュバントは、モノオレイン、オレイン酸、ラウリン酸、およびダイズ油からなる群より選択される脂質の組み合わせを含んでもよい。適切な一態様において、アジュバントは、Tris緩衝液に溶解したオレイン酸、ラウリン酸を含む。適宜、この態様は、7～15mLのTris緩衝液(pH7～9)中に0.25g～0.75gのオレイン酸、0.25g～0.75gのラウリン酸を含む。具体例は、8～10mLの0.1M Tris緩衝液(pH7～9)中に0.4g～0.5gのオレイン酸、0.3g～0.4gのラウリン酸を含む。さらに適切な態様では、アジュバントは、Tris緩衝液中にオレイン酸およびモノオレインを含む。適宜、この態様は、7～15mLのTris緩衝液中に0.25g～0.75gのオレイン酸、0.25g～0.75gのモノオレインを含む。具体例は、8～10mLの0.1M Tris緩衝液(pH7～9)中に0.3g～0.4gのオレイン酸、0.4g～0.5gのモノオレインを含む。さらなる態様は、7～15mLのTris緩衝液中に0.5g～0.25gのモノオレイン、0.5g～0.25gのオレイン酸、および0.25g～0.75gのダイズ油を含む。この態様の具体例は、8～12mLのTris緩衝液(pH7～9)中に0.1g～0.2gのモノオレイン、0.8g～1.5gのオレイン酸、および0.5g～0.6gのダイズ油を含む。

【 0 0 7 8 】

以下の例では3つのタイプのアジュバントが首尾良く用いられた。8～10mLの0.1M Tris緩衝液(pH7～9)中に0.4g～0.5gのオレイン酸、0.3g～0.4gのラウリン酸を含む、アジュバント例A; 8～10mLの0.1M Tris緩衝液(pH7～9)中に0.3g～0.4gのオレイン酸、0.4g～0.5gのモノオレインを含む、アジュバント例B; ならびに8～12mLのTris緩衝液(pH7～9)中に0.1g～0.2gのモノオレイン、0.8g～1.5gのオレイン酸、および0.5g～0.6gのダイズ油を含む、アジュバント例C。これらのアジュバントは、典型的に、2～12%脂質含有率(100mLあたり6g～12g)、最も典型的には、3～10%、例えば、4%、5%、6%、7、8%、または9%のw/v濃度で調製される。これらの濃度はアジュバントミックスそのものの濃度である。次いで、8%脂質濃度のアジュバントから開始したときに4%脂質含有率のワクチン組成物となるように、このアジュバントは抗原含有組成物と2:1～1:8比、例えば、1:1比で混合される。典型的に、本発明のワクチン組成物中の脂質含有率は、0.5%～6%w/v、典型的には1%～6%w/v、より典型的には1%～4%である。

【 0 0 7 9 】

例Bの組成物は、等モル量のモノオレイン酸グリセロールおよびオレイン酸(8～10mLの0.1M Tris緩衝液(pH7～9)に0.3g～0.4gのオレイン酸、0.4g～0.5gのモノオレイン)を含むEndocrine(商標)製剤であり、抗原に対して既存の免疫がないナイーブな対象において群を抜いて有効なことが見出されている。極めて好ましい態様において、この8%脂質製剤は、1～4%w/vの脂質濃度のワクチン組成物となるように抗原含有組成物で希釈される。

【 0 0 8 0 】

述べられたように、前記組成物は、本発明のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、ペリパンデミック期またはパンデミック期の期間中に免疫性を与えるための方法において使用するのに適している。ペリパンデミック期またはパンデミック期の期間中に免疫性を与えるための方法は全年齢の対象に使用することができる。さらに、本発明は、説明されたようにワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、季節性流行の間に免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法に関する。

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

述べられたように、本発明は、ワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法に関する。

【0082】

下記の実施例は、インフルエンザにナイーブな対象(フェレット)および免疫無防備状態の対象、例えば、高齢者における、このワクチン組成物の効力を示す。

【0083】

驚いたことに、ナイーブな個体において免疫応答誘発に効力があることは、本発明のワクチンが、強力な免疫防御を個体がもっていない侵入ウイルスに応答できる点で、免疫系が弱まっている個体において免疫応答を誘発できることを暗に示している。免疫無防備状態の個体は本発明のワクチン組成物から大きな利益を得るだろう。従って、本発明のさらなる局面は、免疫老化のある人;HIV患者;免疫抑制剤を服用している対象、最近臓器を受けた患者;未熟児、および術後患者を含む免疫無防備状態の患者に鼻腔内投与される、インフルエンザに対するアジュバント添加非生抗原に関する。この局面は、

10

i)1種または複数種の非生抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与えるための鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0084】

実施例2によって例示される本発明の驚くべき効果は、本発明の組成物がウイルス排出を低減することである。免疫無防備状態の対象は免疫応答性の健常成人より多くのウイルスを排出する。従って、免疫無防備状態の対象は、免疫応答性の健常成人より多くのウイルスを、近くににいる人、例えば、世話をする人(taker)、家族、ナーシングホームの入所者に蔓延させうる。従って、本発明は、免疫無防備状態の対象、例えば、65歳以上の個体、妊婦、癌患者、化学療法を受けている患者、放射線療法を受けている患者、HIVに感染した個体を治療するのに適切でありうる。本発明は、表1で特定された免疫無防備状態の対象によるウイルス蔓延を予防するのに適切でありうる。一態様において、本発明の組成物は、ウイルス排出の低減を目的として65歳以上の免疫無防備状態の個体において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、ウイルス排出の低減を目的として妊婦において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、ウイルス排出の低減を目的としてHIVに感染した対象において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、ウイルス排出の低減を目的として、免疫抑制薬物療法、例えば、グルココルチコイド療法を受けている人において使用するためのものである。さらに、本発明の組成物は、ウイルス蔓延を低減することによってパンデミックを封じ込めるのに特に適切でありうる。一態様において、本発明の組成物は、パンデミック地域におけるウイルス排出の低減を目的として免疫無防備状態の対象において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、ペリパンデミック期の期間中にウイルス排出の低減を目的として免疫無防備状態の対象において使用するためのものである。一態様において、本発明の組成物は、ペリパンデミック期の期間中にウイルス排出の低減を目的として免疫無防備状態の対象において使用するためのものである。

20

30

40

【0085】

上述のように組成物の鼻腔内投与によって免疫無防備状態の患者においてインフルエンザに対する免疫性を与える方法は、驚くべき結果の興味深い側面である。

【0086】

米国では、一年に30,000件を超えるインフルエンザ関連死の約90%が65歳以上の人の間で起こる。これは、この集団の高い脆弱性を示している。現行のインフルエンザワクチンの高齢者での効果(17~53%)は若年成人(70~90%)と比較して弱い。高齢者集団内でウイルス感染に対する感受性が高く、ワクチン接種の効力が弱いのは免疫老化のせいである。免疫老化は、自然免疫および獲得免疫の両方に影響を及ぼす進行性の年齢依存的な免疫系の機能低下である。自然免疫系の必要不可欠な部分がパターン認識受容体(PRR)である。

50

パターン認識受容体(PRR)は数多くのいろいろな病原体の保存的構造を認識する。トール様受容体(TLR)として知られるPRRの一種はインフルエンザウイルスの認識に参与する。樹状細胞(DC)は、TLRを発現し、抗原を捕獲することによって自然免疫系と獲得免疫系との間に必要不可欠な架け橋を形成する。いくつかの研究から、加齢性のDC機能変化、例えば、抗原捕獲能力の低下、TLR発現および機能の低下、移動能力の減少、ならびにT細胞活性化能力の低下が証明されている。

【0087】

加齢はまた、ナイーブB細胞の段階的な減少およびエフェクターB細胞の増加を伴う。これにより多様性が低下し、抗体応答親和性が低くなる。2つの主要なサブセットがCD4 T細胞およびCD8 T細胞であるT細胞区画も加齢の影響を大きく受ける。最も劇的な変化は胸腺退縮であり、その結果として高齢者個体の末梢にあるナイーブT細胞が減少する。胸腺からのナイーブT細胞流出(thymic output)の低下はT細胞集団に非常に大きな影響を及ぼし、その結果としてT細胞受容体(TCR)レパトリーの多様性が減少する。TCRレパトリーの低下は、インフルエンザウイルスに対する不十分なワクチン接種応答および正常に機能しない免疫に結びつけられてきた。免疫系が病原体に対して効率的な応答を誘発する能力の加齢性低下は、様々な細胞タイプにおける複数の変化によって引き起こされる複雑な現象である。

【0088】

これらの理由から、高齢者は特に脆弱な集団であり、この患者クラスのために、本発明として実施例4に例示される、さらに効率的なワクチンが必要とされている。

【0089】

述べられたように、本発明の興味深い局面は、1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドを含む、アジュバントを含む、免疫無防備状態の対象への鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0090】

前記組成物は、典型的には、免疫無防備状態の対象への感染性病原体、例えば、インフルエンザに対する鼻腔内投与ワクチンとして使用するためのものである。免疫無防備状態の対象は、65歳以上の対象、妊婦、未熟児、ならびに以下の患者クラス;癌患者、化学療法を受けている人、放射線療法を受けている人、臓器移植患者、実質臓器移植を受けている人、幹細胞移植患者、同種造血幹細胞移植を受けている人、自家造血幹細胞移植を受けている人、HIVに感染した患者、AIDSにかかっている人、移植片対宿主病患者、免疫抑制剤を服用している人、例えば、グルココルチコイド療法およびステロイド療法を受けている人からなる群より適宜選択されるが、これに限定されない。

【0091】

述べられたように、免疫老化は一般的に高齢者において見られる。従って、本発明の興味深い一態様は、高齢者対象、例えば、55歳以上、典型的には60歳以上、最も典型的には65歳以上、例えば、75歳以上、例えば、80歳以上、例えば、85歳以上、例えば、90歳以上の高齢者対象において鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関し、前記組成物は本明細書において説明された通りである。

【0092】

本発明のさらなる局面は、同じく免疫無防備状態の患者である小児科対象などのナイーブな対象において使用するためのワクチンに関する。本発明のアジュバントは、インフルエンザにナイーブな対象において効力を証明している。このため、本発明は、ナイーブな患者クラスおよび免疫無防備状態の患者全般に適切なものとなっている。

【0093】

従って、本発明のもう一つの局面は、

i)1種または複数種の非生抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、免疫無防備状態の小児科患者において使用する鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0094】

ナイーブな対象および免疫無防備状態の小児科患者に免疫性を与えるのに適したタイプのワクチンは、本発明によれば、ワクチンによって免疫化または治療されることが意図される、それぞれ関連する病原体の抗原を含む。これは、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルス、非A非B型肝炎ウイルス、ポックスウイルスおよび天然痘ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、エンテロウイルス、レトロウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ロタウイルス、ヒトパピローマウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、黄熱病ウイルス、SARSウイルス、動物ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹、エプスタイン-バーウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、ピコルナウイルス、ライノウイルス、風疹ウイルス、パポウイルス(papovirus)、およびムンプスウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する免疫原を含むが、これに限定されない。前述したインフルエンザウイルス抗原以外の公知のウイルス抗原の非限定的ないくつかの例は、以下:HIV-1に由来する抗原、例えば、tat、nef、gp120またはgp100、gp40、p24、gag、env、vif、vpr、vpu、rev、またはその一部分および/もしくはは組み合わせ;ヒトヘルペスウイルスに由来する抗原、例えば、gH、gL、gM、gB、gC、gK、gE、もしくはgD、またはその一部分および/もしくはは組み合わせ、あるいは最初期タンパク質、例えば、HSV1またはHSV2に由来するICP27、ICP47、ICP4、ICP36;サイトメガロウイルス、特に、ヒトサイトメガロウイルスに由来する抗原、例えば、gBまたはその誘導体;エプスタイン-バーウイルスに由来する抗原、例えば、gp350またはその誘導体;水痘帯状疱疹ウイルスに由来する抗原、例えば、gp1、11、111、およびIE63;肝炎ウイルスに由来する抗原、例えば、B型肝炎ウイルス抗原、C型肝炎ウイルス抗原、またはE型肝炎ウイルス抗原(例えば、HCVのenvタンパク質E1またはE2、コアタンパク質、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b、p7、またはその一部分および/もしくはは組み合わせ);ヒトパピローマウイルスに由来する抗原(例えばHPV6、11、16、18、例えば、L1、L2、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、またはその一部分および/もしくはは組み合わせ);他のウイルス病原体に由来する抗原、例えば、呼吸器合胞体ウイルスに由来する抗原(例えば、Fタンパク質およびGタンパク質もしくははその誘導体)、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、フラビウイルス(例えば、黄熱病ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス)に由来する抗原、またはその一部分および/もしくはは組み合わせを含んでもよい。

【0095】

前記抗原は、例えば、非生全抗原、例えば、不活化全ウイルスでもよい。前記抗原はまた、病原体の一部分、例えば、不活化ウイルスの一部分でもよい。使用される抗原成分は、例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、マイコバクテリア(mycobacterial)、または寄生生物抗原であるが、これに限定されない。細菌病原体は、例えば、結核およびハンセン病を引き起こすマイコバクテリア、肺炎球菌(pneumococci)、好気性グラム陰性またはグラム陽性桿菌、マイコプラズマ、ブドウ球菌感染、連鎖球菌感染、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、サルモネラ菌、およびクラミジアでもよい。疾患はまた、細菌感染、例えば、結核およびハンセン病を引き起こすマイコバクテリア、肺炎球菌、好気性グラム陰性桿菌、マイコプラズマ、ブドウ球菌(staphylococcal)感染、連鎖球菌感染、ヘリコバクター・ピロリ、サルモネラ菌、ジフテリア、ならびにクラミジアによって引き起こされる感染でもよい。

【0096】

免疫無防備状態の患者に免疫性を与えるのに好ましいタイプのワクチンは、肺炎球菌ワクチン、A~E型肝炎ワクチン、髄膜炎菌ワクチン、インフルエンザ菌b(Hib)ワクチン、ジ

10

20

30

40

50

フテリアワクチンからなる群より選択されてもよい。

【0097】

疾患はまた、寄生生物性疾患、マラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、トキソプラズマ症、住血吸虫症、フィラリア症、または様々なタイプの癌、例えば、乳癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、悪性メラノーマ、喉頭癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌でもよい。

【0098】

疾患はまた、ハウスダスト、ダニ、花粉、および他の環境アレルゲンによるアレルギー、ならびに自己免疫疾患、例えば、全身性エリテマトーデスでもよい。

【0099】

ワクチン組成物中の抗原は、非生全抗原、例えば、不活化全ウイルス、スプリット非生抗原、またはサブユニット非生抗原でもよい。熱不活化、紫外線による照射不活化、またはホルマリン不活化もしくは - プロピオラクトン処理による不活化などの不活化プロセスが当技術分野において周知である。

【0100】

本発明の組成物は、免疫無防備状態の患者に免疫性を与えるためのワクチンとして使用するためのものである。免疫無防備状態の患者は、免疫老化のある人；HIVに感染した対象；免疫抑制剤を服用している対象、例えば、最近臓器移植を受けた患者；未熟児、および術後患者からなる群より適宜選択される。述べられたように、免疫老化は一般的に高齢者において見られる。従って、本発明の興味深い一態様は、高齢者対象、例えば、55歳以上、典型的には60歳以上、最も典型的には65歳以上の高齢者対象において鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関し、前記組成物は本明細書において説明された通りである。免疫無防備状態の小児科対象は、18歳以下の小児、例えば、0～18歳の小児、特に12歳以下の小児でもよい。本発明は、特に、8歳未満、例えば、6歳以下の免疫無防備状態の小児を対象とする。本発明のワクチンの重要な意図された患者クラスは、特に2ヶ月～9歳未満の免疫無防備状態の小児、典型的には月齢3ヶ月～9歳未満の小児、例えば、月齢6ヶ月～8歳未満、最も典型的には月齢6ヶ月～7歳未満、例えば、月齢6ヶ月～72ヶ月未満、または月齢6ヶ月～60ヶ月、または月齢6ヶ月～24ヶ月の小児である。本発明の組成物は、少なくとも部分的に、免疫無防備状態の対象における小児科的使用のためのワクチンとして意図される。

【0101】

前記組成物が、特に、パンデミック期またはペリパンデミック期の期間中に使用するためのワクチンを対象とする場合、免疫無防備状態の対象は全年齢群の免疫無防備状態の対象でもよい。

【0102】

肺炎連鎖球菌は、全世界での罹病および死亡の主要な原因の一つであり、毎年、推定160万人が侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)で死亡している(WHO, 2002)。IPDは、非常に幼い子供(<24ヶ月)および高齢者(>65歳)の間で最もよく発生する。高齢者のIPD死亡率が最も高い。現在、肺炎連鎖球菌感染予防のために4種類のワクチンを利用することができる。肺炎連鎖球菌の鼻腔内ワクチンは利用することができない。

【0103】

本発明の興味深い一態様は、特に、小児および他のナイブな対象および高齢者を対象とする、肺炎連鎖球菌感染を予防するための鼻腔内投与の選択肢に関する。なぜなら、この後者の群は免疫無防備状態であると知られているからである。本発明の組成物は弱毒生細菌ではなく非生肺炎連鎖球菌抗原を利用する。驚いたことに、本発明のワクチンの効力は、使用したアジュバントの結果であり、この驚くべき結果はナイブな対象に特異的であった。免疫無防備状態の対象についても同様の結果が予想される。

【0104】

従って、本発明のさらなる局面は、

i)1種または複数種の非生肺炎連鎖球菌抗原、および

10

20

30

40

50

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、肺炎連鎖球菌感染の予防または肺炎連鎖球菌感染に関連した症状の重篤度の低下のために免疫無防備状態の対象において使用する鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関する。

【0105】

免疫無防備状態の患者は、免疫老化のある人;HIVに感染した対象;免疫抑制剤を服用している対象、例えば、最近臓器移植を受けた患者;未熟児、および術後患者からなる群より適宜選択される。述べられたように、免疫老化は一般的に高齢者において見られる。従って、本発明の興味深い一態様は、高齢者対象、例えば、55歳以上、典型的には60歳以上、最も典型的には65歳以上の高齢者対象において鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物に関し、前記組成物は本明細書において説明された通りである。

10

【0106】

本発明の重要な態様は、気管支炎、肺炎、敗血症、心外膜炎、髄膜炎、および腹膜炎からなる群より選択される疾患状態を予防するための、ならびに/または前記疾患状態の症状を軽減するための肺炎球菌感染に対するワクチンに関する。

【0107】

一態様は、免疫無防備状態の対象における、特に、60歳または65歳以上の高齢者および/あるいは肺炎球菌感染症の既往歴のある成人または高リスクの成人(例えば、解剖学的無脾症もしくは機能的無脾症、免疫無防備状態、または心臓慢性疾患、肝臓慢性疾患、肺慢性疾患、もしくは腎臓慢性疾患、または臓器、骨髄、もしくは蝸牛移植片のレシピエント)に対する肺炎球菌ワクチン、例えば、肺炎球菌多糖類ワクチン(PPV)の使用に関する。

20

【0108】

さらなる態様において、本発明の肺炎球菌ワクチン組成物は、生後4週間~6歳の対象(例えば、ナイーブであり、免疫系が十分に発達していない「免疫無防備状態の」対象)、および高齢者、例えば、50歳以上、典型的には60歳以上、より典型的には65歳以上の人において用いられる。

【0109】

本発明によるワクチン組成物は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、PluronicF68またはPluronic127などのポロキサマーを含む親水性および不活性および生体適合性でありうる界面活性剤をさらに含む水性媒体でありうる媒体、をさらに含んでもよい。

30

【0110】

本発明による肺炎球菌ワクチンは、本明細書に記載の抗菌剤、酸化防止剤、ウイルス失活因子、防腐剤、色素、安定剤、消泡剤、表面活性剤(非イオン性、アニオン性、もしくはカチオン性)、またはその任意の組み合わせをさらに含んでもよい。抗菌剤は、例えば、アンホテリシンもしくはその任意の誘導体、クロロテトラサイクリン、ホルムアルデヒドまたはホルマリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ポリミキシンBもしくはその任意の誘導体、ストレプトマイシンまたはその任意の組み合わせでもよい。酸化防止剤は、例えば、アスコルビン酸もしくはトコフェロールまたはその任意の組み合わせでもよい。ウイルス失活因子は、例えば、ホルマリン、 γ -プロピオラクトン、紫外線、加熱、またはその任意の組み合わせでもよい。

40

【0111】

本発明の態様の説明の際に、可能性のある全ての態様の組み合わせおよび並べ換えは明確には説明されなかった。しかしながら、ある特定の手段が、互いに異なる従属クレームに列挙されているか、または異なる態様に説明されているという単なる事実は、これらの手段の組み合わせを有利に使うことができないことを示すものではない。本発明は、説明された態様の可能性のある全ての組み合わせおよび並べ換えを想定する。

【実施例】

【0112】

実施例1

50

目的

本研究の目的は、本発明に従って、鼻腔内投与された、アジュバントを用いて製剤化されたインフルエンザスプリット抗原およびアジュバントを用いて製剤化された不活化全インフルエンザウイルス抗原の、フェレットモデルにおける免疫原性および防御効力を調べることであった。

【0113】

H1N1/California/2009スプリット抗原をベースとするワクチン(ワクチンA)は、5 μ g、15 μ g、または30 μ g HAの抗原用量を用いて研究した。H1N1/California/2009不活化全ウイルス抗原をベースとするワクチン(ワクチンB)は、15 μ g HAの抗原用量を用いて研究した。ワクチン効力は、野生型H1N1 A/The Netherlands/602/2009ウイルスを攻撃として用いて研究した。

10

【0114】

Endocine(商標)アジュバントは、ワクチン組成物中に、等モル量のモノオレイン酸グリセロールおよびオレイン酸を最終濃度20mg/ml(2%)で含む。この実験では、Immunose(商標)FLUは、Endocine(商標)と混合した非生インフルエンザ抗原を意味する。

【0115】

(表2) 実験群の免疫化の様相

群の番号	動物の数	試験物質	抗原用量 (μ g HA, H1N1)	免疫化の経路
1	6	食塩水	0	経鼻
2	6	Fluarix(登録商標)	15	皮下
3	6	ワクチンA	5	経鼻
4	6	ワクチンA	15	経鼻
5	6	ワクチンA	30	経鼻
6	6	ワクチンB	15	経鼻

20

【0116】

ワクチンの調製および投与

食塩水:0.9%食塩水pH5~5.5。

Fluarix(登録商標):非経口ワクチン(A/California/7/2009(H1N1)様、A/Perth/16/2009(H3N2)様、およびB/Brisbane/60/2008様ワクチン株から構成される。各ワクチン株HAを15 μ g含む)。21日目および42日目に、群2の動物に0.5ml Fluarix(GlaxoSmithKline Biologicals)を皮下ワクチン接種した。

30

ワクチンA:インフルエンザワクチン点鼻、5 μ g、15 μ g、および30 μ g HA/0.2ml、ワクチン組成物中に等モル量のモノオレイン酸グリセロールおよびオレイン酸(pH8、Tris 0.1Mに溶解した)を最終濃度20mg/mlで含むEndocine(商標)製剤を含むアジュバント製剤。H1N1/California/2009スプリット抗原。

40

ワクチンB:インフルエンザワクチン点鼻、15 μ g HA/0.2ml、ワクチン組成物中に等モル量のモノオレイン酸グリセロールおよびオレイン酸(pH8、Tris 0.1Mに溶解した)を最終濃度20mg/mlで含むEndocine(商標)製剤を含むアジュバント製剤。H1N1/California/2009不活化全ウイルス抗原。

【0117】

フェレット

約12ヶ月齢、体重760~1210g、かつ赤血球凝集抑制(HI)アッセイによる実証において循環インフルエンザウイルスB、A/H1N1、A/H3N2、およびA/pH1N1に対する抗体について血清陰性であった健常雌フェレット(Mustela putorius furo: 非近交系)を使用した。動物を、免疫化前段階には最大8匹の群で、免疫化段階には6匹の試験群で標準的なケージに入れ

50

た。抗原投与日に、陰圧がかかったグローブボックス隔離飼育ケージに試験群を移した。試験全体を通して、動物に市販のフードペレットおよび水を自由に与えた。

【0118】

免疫化

0日目、21日目、および42日目に、6匹のフェレットの5つの群に、ケタミンおよびドミトール(domitor)による麻酔下で、3回の鼻腔内免疫化を(液滴: フィルターチップ付きピペットを用いて各外鼻孔に100 μ lずつ)行った。群1の動物には滅菌生理食塩水(0.9%食塩水pH5~5.5)200 μ lを与えた。群3、群4、および群5をそれぞれ、5 μ g、15 μ g、および30 μ g HAを含有する、Endocine(商標)を用いて製剤化されたH1N1/California/2009スプリット抗原200 μ lで鼻腔内免疫化した。群6を、15 μ g HAを含有する、Endocine(商標)を用いて製剤化されたH1N1/California/2009全ウイルス抗原200 μ lで鼻腔内免疫化した。対照群1には鼻腔内に食塩水200 μ lを与えた。21日目および42日目に、6匹のフェレットの1つの群(群2)の皮下に、0.5mlのFluarix(登録商標)(GlaxoSmithKline Biologicals)(2010/2011シーズン、各ワクチン株HA 15 μ gを含有するアジュバント無添加三価インフルエンザワクチン(TIV))をワクチン接種した。

10

【0119】

0日目、21日目、および42日目の免疫化前ならびに試験64日目および70日目の抗原投与前に、血清調製用の血液試料を収集した。

【0120】

攻撃ウイルスの調製および投与

試験70日目に、全動物を、気管内経路によってインフルエンザウイルス(H1N1株A/The Netherlands/602/2009)野生分離株で抗原投与した。攻撃ウイルスを調製するために、H1N1 A/The Netherlands/602/2009攻撃ウイルスストック(7.8 log₁₀ TCID₅₀/ml)を3.3x10⁵ TCID₅₀/mlの濃度まで氷冷PBSで希釈した。全動物を、10⁶ TCID₅₀を含有する攻撃ウイルス調製物3mlで気管内に抗原投与した。攻撃ウイルス調製物を気管鏡を用いて小さなカテーテルで気管に投与し、分岐部のすぐ上で放出した。攻撃ウイルスの調製および投与はBSL3条件下で行った。抗原投与の1日後に、ウイルスの感染性を確かめるために、残っている攻撃ウイルス希釈液の試料をメディン・ダービー(Madin Darby)イヌ腎(MDCK)細胞において滴定した。接種して1日後の攻撃ウイルス希釈液の逆滴定から、この物質は依然として4.8 log₁₀ TCID₅₀を含んでいることが分かった。

20

30

【0121】

処置および試料収集

実験中に、フェレットに対していくつかの処置を行った。温度センサー埋め込み、免疫化、ウイルス抗原投与、およびコンピュータ断層撮影(CT)イメージングのために、動物をケタミン(4~8mg/kg: i.m.; Alfasan, Woerden, The Netherlands)およびドミトール(0.1 mg/kg: i.m.; Orion Pharma, Espoo, Finland)のカクテルで麻酔した。サンプリング(血液、スワブ、および鼻洗浄液)ならびに放血による安楽死のために、動物をケタミンで麻酔した。実験開始の2週間前に、温度ロガー(DSTマイクロ-T超小型温度ロガー; Star-Oddi, Reykjavik, Iceland)をフェレット腹腔内に入れた。この装置は10分ごとに動物の体温を記録した。各免疫化の前に(0日目、21日目、および42日目)、ならびに抗原投与および安楽死の日(70日目および74日目)にフェレットを秤量した。64日目、71日目、72日目、73日目、および74日目に、群1、群2、および群4の動物をCTイメージングによってモニタリングした。0日目、21日目、および42日目、64日目の免疫化前に、ならびに70日目の抗原投与前に、血液試料を収集した。70日目の抗原投与前、および抗原投与後の毎日、鼻スワブおよび咽頭スワブを収集した。

40

【0122】

血液試料および血清の収集

血液試料を収集し、2つの等しい体積に分けた。一方の体積をPBMC分離に使用し、すぐに、EDTA抗凝血剤含有チューブに移した。他方の体積を血清収集に使用し、凝血活性化剤含有セラムチューブに移した。セラムチューブを全て約2000xgで室温で10分間、遠心分離

50

した。血清を0.1ml 試料に分注し、約-80 で保管した。

【0123】

PBMCおよび血漿の単離

PBMCを分離するのに使用した血液試料を、すぐに、EDTA抗凝血剤含有チューブに移し、880xGで5分間、遠心分離し、血漿を約-80 で保管した。細胞ペレットを3.5ml 洗浄用緩衝液(D-PBS: lot #: RNBB7791, V-CMS: 10700395およびEDTA: lot #: 079K8712, V-CMS: 10700037)で再懸濁し、3ml リンホプレップ(lymphoprep)上に層状に積み重ね、800xGで30分間、遠心分離した。遠心分離後、細胞を含有する境界面を収集し、新たなチューブに移し、洗浄用緩衝液で4回洗浄した。後の洗浄工程には、600xg、465xg、および350xgで10分間、ならびに250xgで15分間の遠心分離が含まれた。最後の洗浄工程後に、細胞ペレットを再懸濁し、少なくとも10分間、氷上に置き、1ml 氷凍結培地(RPMI lot # 1MB078、20% FCS VC # 201110194、10% DMSO VC # 10700203)に再懸濁し、アンプルに移し、-80 で保管した。

10

【0124】

血清学

H1N1 A/The Netherlands/602/2009ならびに2種類の遠縁ウイルスH1N1 A/Swine/Ned/25/80およびH1N1 A/Swine/Italy/14432/76に対する抗体価を赤血球凝集抑制アッセイ(HI)およびウイルス中和アッセイ(VN)によって求めた。遠縁ウイルスH1N1 A/New Jersey/08/76に対する抗体価を赤血球凝集抑制アッセイによって求めた。

20

【0125】

HIアッセイ

HIアッセイは、インフルエンザウイルス赤血球凝集素特異的抗体が赤血球のインフルエンザ誘導凝集をブロックする能力に基づく標準的な結合アッセイである。非特異的な抗赤血球凝集素活性を除去するために、試料をコレラ濾液(コレラ菌(*Vibrio cholerae*)培養物から入手した)で前処理した。37 で16時間インキュベートした後に、試料を56 で1時間インキュベートすることによってコレラ濾液を不活化した。試料の2倍段階希釈液を、(1:20の希釈度から開始して96ウェルプレート中で2回繰り返して)リン酸緩衝硫酸(phosphate buffered sulphate)(PBS)で作製し、試料が特異的赤血球凝集を示したときにシチメンチヨウ赤血球で前処理した。これらの赤血球を除去した後に、試料を4赤血球凝集単位(hemagglutination unit)(HAU)の一定濃度の関係するインフルエンザウイルスと4 で1時間インキュベートした。最後に、2人の技術者が、複数のプレートを独立に、赤血球沈降によって示される赤血球凝集の抑制についてスコア付けした。対応するフェレット対照血清を全測定に含めた。

30

【0126】

VNアッセイ

VNアッセイは、インフルエンザウイルス特異的抗体のサブセットが、細胞培養物中のウイルス複製がなくなるようにウイルスを中和する能力に基づく、標準的なアッセイである。試料を56 で30分間、熱失活させ、その後に、96ウェルプレート中で3回繰り返して、1:8の希釈度から開始して試料の2倍段階希釈液を感染培地(20mM Hepes、0.075% 重炭酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、100IU/mlのペニシリンおよびストレプトマイシン、17.5 μg/mlトリプシン、ならびに2.3ng/mlアンホテリシンBを添加したイーグル最小必須培地)で作製した。次いで、試料希釈液を、25~400 TCID₅₀の関係するウイルスと5%CO₂、37 で1時間インキュベートした。1時間のインキュベーション期間が終了した後に、ウイルス-抗体混合物を、95~100%コンフルエントなメディン・ダービーイヌ腎(MDCK)細胞培養単層を有するプレートに移した。次いで、これらのプレートを5%CO₂、37 で1時間インキュベートし、その後に、ウイルス-抗体混合物を除去し、感染培地と交換した。5%CO₂、37 で6日間のインキュベーション期間後に、インフルエンザウイルス赤血球凝集素の存在を検出するためにシチメンチヨウ赤血球を用いてプレートを読み取った。VN力価は、Reed and Muench(Reed, L.J.; Muench, H. (1938). 「A simple method of estimating fifty percent endpoints」. The American Journal of Hygiene 27: 493-497)に記載の方法に

40

50

従って計算した。

【0127】

上気道および下気道におけるウイルス複製

抗原投与後、0日目、1日目、2日目、3日目、および4日目に、麻酔下の動物から鼻スワブおよび咽頭スワブを採取した。抗原投与して4日後に、フェレットを麻酔下で放血によって安楽死させ、この後に全身肉眼所見を行い、組織を収集した。右鼻甲介ならびに右肺全葉および副葉の試料を収集し、さらに処理するまで-80℃で保管した。鼻甲介および肺試料を秤量し、その後に、0.5%ラクトアルブミン、10%グリセロール、200U/mlペニシリン、200µg/mlストレプトマイシン、100U/mlポリミキシンB硫酸塩、250µg/mlゲンタマイシン、および50U/mlナスタチン(ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, The Netherlands)を含有するハンクス液に溶解したFastPrep-24(MP Biomedicals, Eindhoven, The Netherlands)と一緒にホモジナイズし、短時間、遠心分離した後に、希釈した。

10

【0128】

収集後、鼻スワブおよび咽頭スワブを、組織試料処理に使用したのと同じ培地に入れて-80℃で保管した。以前に述べられたように(Rimmelzwaan GF et al., J Virol Methods 1998 Sep;74(1)57-66)、肺上清およびスワブ上清の4つの同じ10倍段階希釈液を用いて、MDCK細胞コンフルエント層でのウイルス力価を求めた。

【0129】

抗体価の結果

0日目、21日目、42日目、64日目、および70日目に、抗体の血清中濃度を各免疫化前に求めた。H1N1 A/The Netherlands/602/2009ならびに2種類の遠縁ウイルス(H1N1 A/Swine/Ned/25/80およびH1N1 A/Swine/Italy/14432/76)に対する力価を赤血球凝集抑制アッセイ(HI)およびウイルス中和アッセイ(VNT)によって求めた。遠縁ウイルス(H1N1 A/New Jersey/08/76)に対する抗体価を赤血球凝集抑制アッセイ(HI)によって求めた。

20

【0130】

HI抗体価-同種: H1N1 A/The Netherlands/602/2009

幾何平均HI力価を図1に示した。幾何平均を計算するために、5の値を、対応する絶対値5で置き替えた。全ての前血清(0日目)がHI抗体陰性(力価: 5)であった。

【0131】

群ごとのHI力価の分析から以下の結果が明らかになった。

30

【0132】

群1(食塩水;感染対照)

全血清試料がHI抗体陰性であった。

【0133】

群2(Fluarix(登録商標); 非経口対照)

1回目の免疫化後(42日目)に収集した1個の血清試料が、低いHI抗体陽性であった(力価: 13)。2回目の免疫化後に、6匹の動物のうち5匹の血清中に低いHI力価(範囲13~70)が検出された。

【0134】

群3(ワクチンA、5µg HA; 鼻腔内)

40

1回目の免疫化後に収集した全試料がHI抗体陽性であった(21日目; GMT: 477、範囲160~1120)。HI抗体価は、2回目の免疫化後(42日目; GMT: 1669、範囲1120~2560)、および3回目の免疫化後にも6匹の動物のうち4匹(64日目; GMT: 2158、範囲1280~3840)において大幅に増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するHI力価を示した(70日目; GMT: 2103、範囲1120~3840)。

【0135】

群4(ワクチンA、15µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した6個の試料のうち5個がHI抗体陽性であった(21日目; GMT: 1130範囲、5~5760)。2回目の免疫化後に収集した全試料がHI抗体陽性であった。HI抗体価は5匹の動物において大幅に増加した(42日目; GMT: 3673、範囲、1120~5760)。3回目の

50

免疫化によってHI抗体価は増加しなかった(64日目; GMT: 2386、範囲1920~4480)。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するHI力価を示した(70日目; GMT: 2281、範囲1280~2560)。

【0136】

群5(ワクチンA、30 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した全試料がHI抗体陽性であった(21日目; GMT: 1249、範囲400~3200)。HI抗体価は、2回目の免疫化後に6匹の動物のうち5匹(42日目; GMT: 1874、範囲640~3840)、および3回目の免疫化後にも2匹の動物(64日目; GMT: 1837 範囲1280~3200)において増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するHI力価を示した(70日目; GMT: 1699、範囲640~3200)。

10

【0137】

群6(ワクチンB、15 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した6個の試料のうち5個がHI抗体陽性であった(21日目; GMT: 87、範囲5~1280)。HI抗体価は、2回目の免疫化後に全動物(42日目; GMT: 577、範囲100~2880)、および3回目の免疫化後にも2匹の動物(64日目; GMT: 626、範囲160~2560)において大幅に増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するHI力価を示した(70日目; GMT: 583、範囲160~2240)。

【0138】

異種:H1N1 A/Swine/Ned/25/80、H1N1 A/Swine/Italy/14432/76、およびH1N1 A/New Jersey/08/76

20

遠縁ウイルスH1N1 A/Swine/Ned/25/80、H1N1 A/Swine/Italy/14432/76、およびH1N1 A/New Jersey/08/76に対するHI抗体価を検出した。遠縁ウイルスに対する幾何平均HI力価を図2に示した。幾何平均を計算するために、5の値を、対応する絶対値5で置き替えた。全ての前血清(0日目)がHI抗体陰性(力価: 5)であった。交差反応性HI抗体価は、同種H1N1 A/The Netherlands/602/2009 HI抗体価よりかなり低かった。

【0139】

群ごとのHI力価の分析から以下の結果が明らかになった。

【0140】

群1(食塩水; 感染対照)

1個を除く全血清試料がHI抗体陰性であった。64日目に収集した1個の試料は、H1N1 A/Swine/Italy/14432/76に対して7.5という非常に低いHI抗体価を示した。

30

【0141】

群2(Fluarix(登録商標); 非経口対照)

全試料がH1N1 A/Swine/Ned/25/80およびH1N1 A/Swine/Italy/14432/76 HI抗体陰性であった。1回目の免疫化後、42日目に収集した血清中に、6匹の動物のうち3匹においてH1N1 A/New Jersey/08/76に対する低いHI力価が検出された。

【0142】

群3(ワクチンA、5 µg HA; 鼻腔内)

全動物が3種類の遠縁ウイルスに対する交差反応性HI抗体を生じた。2回目および/または3回目の免疫化後に最も高い力価が測定された。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Ned/25/80 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、6(範囲5~7.5)、24(範囲5~60)、32(範囲20~80)、および19(範囲5~70)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Italy/14432/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、16(範囲5~50)、38(範囲10~80)、63(範囲40~160)、および42(範囲20~120)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/New Jersey/08/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、5、26(範囲7.5~70)、39(範囲5~80)、および29(範囲20~50)であった。

40

【0143】

群4(ワクチンA、15 µg HA; 鼻腔内)

全動物が2回目の免疫化後に3種類の遠縁ウイルスに対する交差反応性HI抗体を生じた。3回目の免疫化によってHI力価は増加しなかった。21日目、42日目、64日目、および70日

50

目のH1N1 A/Swine/Ned/25/80 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、42(範囲5~90)、239(範囲20~120)、88(範囲50~160)、および75(範囲40~160)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Italy/14432/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、78(範囲5~280)、327(範囲35~1280)、153(範囲80~320)、および105(範囲70~160)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/New Jersey/08/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、25(範囲5~80)、176(範囲60~400)、64(範囲40~140)、および63(範囲40~160)であった。

【0144】

群5(ワクチンA、30 µg HA; 鼻腔内)

1匹を除く全動物がH1N1 A/Swine/Ned/25/80に対する交差反応性HI抗体を生じた。全動物がH1N1 A/Swine/Italy/14432/76およびH1N1 A/New Jersey/08/76に対する交差反応性HI抗体を生じた。2回目および/または3回目の免疫化後に最も高い力価が測定された。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Ned/25/80 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、23(範囲5~80)、41(範囲5~320)、42(範囲5~320)、および34(範囲5~320)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Italy/14432/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、39(範囲5~160)、54(範囲5~640)、78(範囲20~720)、50(範囲5~480)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/New Jersey/08/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、9(範囲5~30)、40(範囲5~400)、35(範囲5~160)、および27(範囲5~160)であった。

【0145】

群6(ワクチンB、15 µg HA; 鼻腔内)

全動物がH1N1 A/Swine/Italy/14432/76に対する交差反応性HI抗体を生じた。1匹を除く全動物がH1N1 A/Swine/Ned/25/80に対する交差反応性HI抗体を生じ、1匹を除く全動物がH1N1 A/New Jersey/08/76に対する交差反応性HI抗体を生じた。2回目および/または3回目の免疫化後に最も高い力価が測定された。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Ned/25/80 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、7(範囲5~40)、19(範囲5~80)、15(範囲5~80)、および9(範囲5~40)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/Swine/Italy/14432/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、9(範囲5~160)、32(範囲5~160)、27(範囲5~160)、15(範囲5~80)であった。21日目、42日目、64日目、および70日目のH1N1 A/New Jersey/08/76 HI抗体価(GMT)はそれぞれ、8(範囲5~80)、47(範囲10~240)、19(範囲5~140)、および13(範囲5~80)であった。

【0146】

VN抗体価:

同種: H1N1 A/The Netherlands/602/2009

全実験動物からの血清試料中のVN抗体価を測定した。幾何平均VN力価を図3に示した。全ての前血清(0日目)がVN抗体陰性であった(力価: 8)。

【0147】

群ごとのVN力価の分析から以下の結果が明らかになった。

【0148】

群1(食塩水; 感染対照)

64と測定された42日目に収集した1個を除いて、全血清試料がVN抗体陰性であった。

【0149】

群2(Fluarix(登録商標); 非経口対照)

全血清試料がVN抗体陰性であった。

【0150】

群3(ワクチンA、5 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した6個の試料のうち4個が低いVN抗体陽性であった(21日目; GMT: 19 範囲、8~64)。2回目の免疫化後に収集した全試料がVN抗体陽性であった。VN抗体価は、5匹の動物において2回目の免疫化後(42日目; GMT: 242、範囲、64~859)および3回目の免疫化後(64日目; GMT: 995、範囲362~2436)に大幅に増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料と同等の、または64日目に測定した試料より

10

20

30

40

50

低いVN力価を示した(70日目; GMT: 535、範囲304~859)。

【0151】

群4(ワクチンA、15 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した6個の試料のうち5個がVN抗体陽性であった(21日目; GMT: 147範囲、8~724)。2回目の免疫化後に収集した全試料がVN抗体陽性であった。VN抗体価は、2回目の免疫化後に5匹の動物(42日目; GMT: 2376、範囲、64~8192)および3回目の免疫化後に2匹の動物(64日目; GMT: 1688、範囲662~4871)において大幅に増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するVN力価を示した(70日目; GMT: 1581、範囲351~3444)。

【0152】

群5(ワクチンA、30 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した全試料がVN抗体陽性であった(21日目; GMT: 74、範囲11~627)。VN抗体価は、2回目の免疫化後に6匹の動物のうち5匹(42日目; GMT: 504、範囲41~3435)、3回目の免疫化後に6匹の動物のうち3匹(64日目; GMT: 1673 範囲724~4884)において大幅に増加した。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料に匹敵するVN力価を示した(70日目; GMT: 1699、範囲304~5793)。

【0153】

群6(ワクチンB、15 µg HA; 鼻腔内)

1回目の免疫化後に収集した6個の試料のうち2個が低いVN抗体陽性であった(21日目; GMT: 12、範囲8~64)。2回目の免疫化後に収集した全試料がVN抗体陽性であった(42日目; GMT: 78、範囲32~304)。VN抗体価は3回目の免疫化後に増加した(64日目; GMT: 242、範囲113~747)。70日目(抗原投与日)に収集した試料は、64日目に測定した試料と同等の、または64日目に測定した試料より低いVN力価を示した(70日目; GMT: 177、範囲91~362)。

【0154】

異種: H1N1 A/Swine/Ned/25/80、H1N1 A/Swine/Italy/14432/76

遠縁ウイルスH1N1 A/Swine/Ned/25/80およびH1N1 A/Swine/Italy/14432/76に対するVN抗体価を試験した(データ示さず)。42日目、64日目、および70日目に、群3、群4、群5、および群6の全てが群1および群2より優れていた。

【0155】

実施例2

全ての実験動物について、特定の臨床パラメータおよび病理学的パラメータ、すなわち、死亡率、体温、体重、含気肺容量(aerated lung volume)、鼻甲介および肺におけるウイルス量、上気道におけるウイルス排出、肺重量の肉眼による死後病理検査、肺組織病変部の平均パーセント、鼻甲介および肺の炎症パラメータの顕微鏡検査を測定した。動物群3、動物群4、および動物群5は、試験した全ての肉眼パラメータおよびほとんどの顕微鏡パラメータの点で群1および群2より優れていた(データ示さず)。

【0156】

上気道および下気道におけるウイルス複製

抗原投与後、0日目、1日目、2日目、3日目、および4日目に、麻酔下の動物から鼻スワブおよび咽頭スワブを採取した。抗原投与して4日後に、フェレットを麻酔下で放血によって安楽死させ、この後に全身肉眼所見を行い、組織を収集した。右鼻甲介ならびに右肺全葉および副葉の試料を収集し、さらに処理するまで-80 °Cで保管した。鼻甲介および肺試料を秤量し、その後に、0.5%ラクトアルブミン、10%グリセロール、200U/mlペニシリン、200 µg/mlストレプトマイシン、100U/mlポリミキシンB硫酸塩、250 µg/mlゲンタマイシン、および50U/mlナイスタチン(ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, The Netherlands)を含有するハンクス液に溶解したFastPrep-24(MP Biomedicals, Eindhoven, The Netherlands)と一緒にホモジナイズし、短時間、遠心分離した後に、希釈した。

【0157】

収集後、鼻スワブおよび咽頭スワブを、組織試料処理に使用したのと同じ培地に入れて-80 °Cで保管した。以前に述べられたように(Rimmelzwaan GF et al., J Virol Methods

10

20

30

40

50

1998 Sep;74(1)57-66)、肺上清およびスワブ上清の4つの同じ10倍段階希釈液を用いて、MDCK細胞コンフルエント層でのウイルス力価を求めた。

【0158】

肉眼所見および組織病理学

以前に述べられたように(van den Brand JM et al., PLoS One 2012;7(8)e42343)、標準的なプロトコールに従って動物を屍検した。手短に言うと、胸膜腔を開き、罹患した肺実質の面積を目視により正確に定量するときに肺が収縮しないように、気管をクランプで締めた。左肺の組織学的検査のために試料を採取し、10%中性緩衝ホルマリン(ホルマリンをゆっくりと注入した後)に入れて保管し、パラフィン包埋し、4μm切片を作製し、光学顕微鏡による検査のためにヘマトキシリンおよびエオシン(HE)で染色した。試料は標準的なやり方で採取され、肉眼所見で観察された変化に左右されなかった。以前に述べられたように(表6)(Munster VJ et al., Science 2009 Jul 24;325(5939):481-3)、肺におけるインフルエンザウイルス関連炎症の半定量評価を行った。動物がどのようなものかも動物の処置も知られることなく全スライドを検査した。

【0159】

肺および上気道におけるウイルス量の結果

対照群1(i.n. 食塩水)および対照群2(非経口TIV)の全フェレットが、高力価の複製能力のあるウイルスを肺(平均力価;それぞれ、5.7および5.5 log₁₀ TCID₅₀/グラム組織)ならびに鼻甲介(平均力価:それぞれ、7.2および6.9 log₁₀ TCID₅₀/グラム組織)において示した(表5)。群3、群4、および群5(i.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原pH1N1/09ワクチン)のフェレットの肺および鼻甲介には、検出可能な感染性ウイルスがなかった。群6(15 μg HA のi.n. Endocine(商標)アジュバント添加全ウイルス)のフェレットの肺には、検出可能な感染性ウイルスがなく、鼻甲介のウイルス力価は、対照群1と比較して平均力価4.1 log₁₀ TCID₅₀/グラム組織と有意に少なかった(p=0.02)。

【0160】

Endocine(商標)アジュバント添加pH1N1/09ワクチンを用いた鼻腔内免疫化によって、鼻および咽頭から採取したスワブのウイルス力価は食塩水またはTIV投与と比較して低下した。1~4dpiの間隔で、曲線下面積(AUC)で表した鼻スワブおよび咽頭スワブにおけるウイルス量を表5に示した。群3、群4、および群5(それぞれ、5 μg HA、15 μg HA、および30 μg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)の鼻スワブにおけるウイルス量は群1より有意に少なかったが(群1対群3~5;p 0.03)、群2および群6の鼻スワブにおけるウイルス量は有意に少なくはなかった。群1および群2の咽頭スワブにおけるウイルス量は同等であったが、群3、群4、群5、および群6より有意に多かった(p 0.03)。

【0161】

肉眼所見および組織病理学の結果

Endocine(商標)アジュバント添加pH1N1/09ワクチンを用いて鼻腔内免疫化した群におけるウイルス複製の低下は肺の肉眼所見変化の低下と一致した(表5)。

【0162】

肉眼で見える死後肺病変部は、実質の明確な発赤を特徴とする病巣性または多病巣性の肺硬化からなった。対照群1(i.n. 食塩水)および群2(非経口TIV)の全フェレットが罹患肺組織を示し、平均パーセントはそれぞれ50%および37%であり、それぞれ1.5および1.3の相対肺重量(RLW)平均と一致した(表5)。対照的に、群3、群4、群5、および群6(i.n. Endocine(商標)アジュバント添加pH1N1/09ワクチン)の肺の罹患はより小さく、罹患肺組織の平均パーセントは7~8%であった。これらの4つのEndocine(商標)ワクチン接種群のRLWは、これらの観察と合致した(0.8~0.9の狭い範囲内)。

【0163】

肺硬化は顕微鏡検査時の急性気管支間質肺炎と一致した。これは肺胞の管腔および壁の中にある炎症細胞(主にマクロファージおよび好中球)の存在ならびに裏打ちしている肺胞細胞の膨張または消失を特徴とした。さらに、重篤度の高い肺胞炎症例では、タンパク質に富む浮腫液、肺胞腔内にあるフィブリン鎖および血管外遊出した赤血球、ならびにII型

肺細胞過形成が一般に観察された。スコア付けした組織学的パラメータを表5にまとめた。重篤度が最も高い肺胞病変部が対照群1(i.n. 食塩水)および対照群2(非経口TIV)において見出された。肺胞病変部の全パラメータが群5で最低スコアを付けたが、実際には群3、群4、群5、および群6間の差は有意でなかった。

【0164】

肺に関して、結論的に、このフェレットモデルにおけるH1N1インフルエンザA /Netherlands/602/2009ウイルスを用いた気管内抗原投与によって軽微～重度の肺炎が生じた。しかしながら、全てワクチン接種群からの動物である一部の動物は、肉眼で識別可能な肺病変部に全く侵されていなかった。肺病変部の肉眼による死後評価(罹患した肺の推定%)に基づく、ワクチン接種(ワクチン-A 15 μ g HA)群4およびワクチン接種(ワクチン-A 30 μ g HA)群5は同様に、いずれも7%という非常に低いスコアで最も小さな肺病変部に罹患し、そのすぐ後に、いずれも8%でワクチン接種(ワクチン-A 5 μ g HA)群3およびワクチン接種(ワクチン-B 15 μ g HA)群6が続いた。プラセボ-PBS処置群1の動物は50%という顕著な平均スコアで最も大きな肺病変部に罹患した。非経口ワクチン接種対照群2は、平均37%で、わずかに小さいものの依然として顕著な肺病変部に罹患した。相対肺重量(RLW)平均は、罹患肺組織のこれらの推定パーセントと明らかに一致した。これは、罹患肺組織のこれらの推定パーセントの妥当性を裏付けるものである。

10

【0165】

肺顕微鏡検査の結果は、肺病変部の評価パラメータの大部分について、最大用量ワクチン接種(ワクチン-A 30 μ g HA)群5が最高スコアであったことを裏付け、呼吸器病変部の段階的な進行はワクチン-A(それぞれ、群3および群2)のHA用量の減少と相関関係にあった。ワクチン-B 15 μ g HAを用いたワクチン接種は最小用量ワクチン-A 5 μ g HA(群3)の結果と実質的に等しかった。プラセボ-PBS-処置(群1)は、評価した全病理組織学的パラメータにわたって圧倒的に最も悪いスコアであり、そのすぐ後に非経口ワクチン接種対照群2が続いた。注目すべきことに、鼻腔内ワクチン接種動物(群3、群4、群5、および群6)の全てが肺胞出血から保護された。

20

【0166】

全体的な結論-従って結論としては、このフェレットウイルス抗原投与モデルにおける病変スコアの平均に基づく、ワクチン-A 30 μ g HA(群5)を用いたワクチン接種は成績が最も良く、呼吸器病変部が最小であったのに対して、プラセボ-PBS-処置は成績が最も悪く、呼吸器病変部が最大であった。ワクチン-A 15 μ g HA(群4)を用いたワクチン接種の成績は群5と比較してわずかに悪く、この後にワクチン-A 5 μ g HA(群3)を用いたワクチン接種が続き、その成績はワクチン-B 15 μ g HA(群6)を用いたワクチン接種と比較して実質的に似ていた。鼻腔内ワクチン接種動物の全てが、ワクチンの用量およびタイプに関係なく肺胞出血から保護された。非経口対照ワクチン接種(群2)は成績が良くなく、著しい呼吸器病変部があり、プラセボ-PBS-処置(群1)と比較してわずかに優れていただけであった。

30

【0167】

実施例3:

以下の表3および図4は、ナイーブなフェレットにおいて本発明のワクチンと他の製品FluMistおよび注射用ワクチンとを比較している。

40

【0168】

(表3)

以下から入手した ワクチン	フェレット の数 (ナイーブ)	用量	経路	ワクチン株 (H1N1)	評価株 (H1N1)	NT 力価の 評価
GSK * (GSK H1N1)	N=6	15ug HA, アジュバント 無添加	IM	A/California/7/0 9	A/The Netherlands/602/0 9	抗原投与前 (2回のワクチン 接種後)
GSK *	N=6	15ug HA, AS03 _A	IM			
Novartis # (Novartis TIV)	N=3	15ug HA, アジュバント 無添加	IM	A/Brisbane/59/0 7		抗原投与前 (2回のワクチン 接種後)
Medimmun e # (パンデミック LAIV)	N=3	1x10 ⁷ TCID ₅₀	IN	A/California/7/0 9 (ca)	A/California/7/09	
GSK □ (GSK TIV)	N=6	15ug HA, アジュバント 無添加	SC			42日目 (2回のワクチン 接種後)
Eurocine ワクチン Immunose (商標)FLU □	N=6	15ug HA, Endocine (商標) 20mg/ml	IN	A/California/7/0 9	A/The Netherlands/602/0 9	

10

20

* Baras et al. Vaccine 29 (2011) 2120-2126

Chen et al. JID 2011:203

□

Eurocineワクチン:本研究

【 0 1 6 9 】

GSK一価パンデミックワクチン(GSK H1N1)、Novartis三価不活化ワクチン(Novartis TIV)、GSK三価不活化ワクチン(GSK TIV)群の中和力価(NT)は15未満であった。

【 0 1 7 0 】

この結果から、本発明のワクチン組成物、この場合、15 μg HAスプリットインフルエンザ抗原と20mg/ml (2%) Endocine (商標) とを含むImmunose (商標) FLU (表2、群4) は、MedimmuneのパンデミックLAIVワクチンFluMistと同様の中和力価を示し(図5を参照されたい)、注射ワクチンより優れた力価を示したのに対して、アジュバント無添加TIVは十分な応答を示さないことが分かる。

30

【 0 1 7 1 】

実施例4

15ヶ月齢マウスにおける、Endocine (商標) を含む、またはEndocine (商標) を含まないインフルエンザワクチンの接種後の体液性免疫応答の評価

目的

本研究の目的は、インフルエンザ抗原がEndocine (商標) アジュバントと組み合わせられ、老齢(15ヶ月)マウスに鼻腔内送達されたときの、インフルエンザ抗原に対するインフルエンザ特異的抗体応答を評価することであった。

40

【 0 1 7 2 】

Endocine (商標) アジュバントは、ワクチン組成物中に、等モル量のモノオレイン酸グリセロールおよびオレイン酸を最終濃度20mg/ml (2%) で含んだ。この実験では、Immunose (商標) FLUは、Endocine (商標) と混合した非生インフルエンザ抗原を意味する。

【 0 1 7 3 】

インフルエンザ特異的抗体応答を、H1N1/California/2009/スプリット抗原とEndocine (商標) とを含む製剤またはH1N1/California/2009/スプリット抗原のみを含む製剤をワクチ

50

ン接種した雌マウスにおいて研究した。対照として、食塩水を与えた群を含めた。マウスの鼻腔内に、3週間間隔で3回ワクチン接種した。抗体応答を評価するために、-1日目、20日目、41日目、および63日目に血液試料を収集した。実験群およびワクチン組成物を表4に示した。

【 0 1 7 4 】

(表 4)

群	齢 (ヶ月)	ワクチン 接種の日	投与 経路	1回のワクチン 接種あたりの HAの用量	Endocrine ^(商標) (2%)	マウスの 数 (n)
1 Immunose FLU (老齢)	15	0, 21 および 42	鼻腔内	3 µg	+	8
2 アジュバント無添加 ワクチン(老齢)	15	0, 21 および 42	鼻腔内	3 µg	-	8
3 NaCl(老齢)	15	0, 21 および 42	鼻腔内	-	-	4
4 Immunose FLU (若齢)	2	0, 21 および 42	鼻腔内	3 µg	+	8

10

【 0 1 7 5 】

20

ワクチンの調製および投与

この実験では、Immunose(商標)Fluは、300 µg HA(H1N1/California/2009)/mL + Endocrine(商標)20mg/mL(2%)を含む点鼻薬である。アジュバント無添加ワクチン:300 µg HA(H1N1/California/2009)/mLを含有する点鼻薬。NaCl:食塩水0.9wt%を含有する点鼻薬。

【 0 1 7 6 】

雌Balb/cマウスの4つの群を試験に使用した。3つの群は試験開始時に15ヶ月齢のマウス(老齢)を含む。1つの群は、試験開始時に2ヶ月齢のマウス(若齢)を含んだ。各外鼻孔に5 µlの組成物を投与することによってマウスの鼻腔内にワクチン接種した。各免疫化時のインフルエンザウイルス粒子の用量は、3 µgの赤血球凝集素(HA)、2 x 5ul組成物中3 µgのHAに等しかった。マウスには、0日目、21日目、および42日目に3週間間隔で3回鼻腔内ワクチン接種した。

30

【 0 1 7 7 】

試料の収集および分析

-1日目、20日目、41日目、および63日目に血清試料を収集した。試料を、不活化スプリットインフルエンザ抗原(WHOによって公表された2012/2013シーズンの抗原。A/California/07/2009(H1N1)を含む)に対する特異的抗体応答IgG、IgG1、IgG2aおよびIgAについてELISAによって分析した。

【 0 1 7 8 】

データから、Immunose(商標)Fluを老齢マウスに鼻腔内投与すると、アジュバント無添加ワクチンを与えたマウスと比較してIgG1力価が増加することが分かった。さらに、アジュバント無添加ワクチンを与えた老齢マウスでは41日目にインフルエンザ特異的IgG1応答が検出されたのに比べ、Immunose(商標)Fluをワクチン接種した老齢マウスでは20日目にインフルエンザ特異的IgG1応答が検出された。図6a。41日目に、Immunose(商標)Fluを与えた老齢マウスからの血清中には、Immunose(商標)Fluを与えた若齢マウスに匹敵するレベルのIgG2aインフルエンザ特異的抗体が検出されたのに対して、アジュバント無添加ワクチンを与えた老齢マウスではIgG2aインフルエンザ特異的抗体は検出されなかった。図6b。インフルエンザ特異的IgA力価は、Immunose(商標)Fluをワクチン接種したマウスにしか検出されなかった。図6c。

40

【 0 1 7 9 】

まとめると、本研究のデータから、鼻用インフルエンザワクチンにEndocrine(商標)を添

50

加すると、Endocine(商標)を含まないインフルエンザワクチンの経鼻送達によって誘導される力価と比較したときに、老齢マウス血清中のインフルエンザ特異的なIgG力価およびIgG1力価が増加したことが分かる。さらに、Endocine(商標)添加は、老齢マウスに2回および3回投与された後に、より多くのIgG2a応答動物およびさらに高いIgG2a力価を誘導することができた(応答動物の数は示さず)。IgG2a力価の増加から、Immunose(商標)FluはTh1型抗体応答を誘導できることが分かる。さらに、Endocine(商標)添加によって老齢マウスはIgA応答を誘導することができた。IgGおよびIgG1の最終力価の総合分析から、Immunose(商標)Fluをワクチン接種した老齢マウスと若齢マウスとの間に有意差が認められた。このことは、老齢マウス(試験開始時15ヶ月)の免疫能力は低かった、すなわち、若齢マウスと比較してワクチン接種にあまりよく応答しなかったことを証明している。

10

【0180】

実施例で使用した略語：

HA インフルエンザウイルス赤血球凝集素タンパク質
 TCID50 50%組織培養感染量
 PBMC 末梢血単核球
 HI インフルエンザ赤血球凝集抑制アッセイ
 SOP 標準操作手順
 PBS リン酸緩衝食塩水
 EDTA エチレンジアミン四酢酸
 GMT 幾何平均力価(血清学的データを表すために使用した)
 FCS ウシ胎仔血清(培養培地添加物)
 VN ウイルス中和アッセイ
 DMSO ジメチルスルホキシド

20

【0181】

表の説明：

表5:臨床パラメータ、ウイルス学パラメータ、および肉眼所見パラメータによって証明された、Endocine(商標)を用いて製剤化された2009 H1N1ワクチンのフェレットにおける効力。

群1(対照、i.n. 食塩水)、群2(s.c. TIV)、群3(5 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群4(15 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群5(30 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、および群6(15 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加不活化全ウイルス抗原)。

30

臨床スコア：生存率、4dpiまで生存した動物の数；発熱()、最大温度上昇を平均と標準偏差で示し、発熱が観察された動物の数を括弧内に示した。()、群4の1匹の動物の体温は記録計の動作不良により入手できなかった。0~4dpiでの%体重減少を平均と標準偏差で示し、体重が減少した動物の数を括弧内に示した。

ウイルス学：鼻スワブ試料および咽頭スワブ試料におけるウイルス排出、1~4dpiでの滴定結果の曲線下面積(AUC)。1または複数のウイルス陽性スワブを示した動物の数を括弧内に示した；4dpiでの肺および鼻甲介におけるウイルス量(log₁₀TCID₅₀/g)を平均と標準偏差で示した。万、群の動物が全てウイルス陰性であった場合には検出下限を示した。肺/鼻甲介ウイルスがあった動物の数を括弧内に示した。

40

肉眼所見：4dpiでの屍検中に肉眼検査によって見積もられた罹患肺実質の%を平均と標準偏差で示した。罹患肺を有する動物の数を括弧内に示した；4dpiでの肺/体重比(x10²)を平均と標準偏差で示した。

【0182】

表6:4dpiでの病理組織学的パラメータの半定量スコアリング。

^a:群1(対照、i.n. 食塩水)、群2(s.c. TIV)、群3(5 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群4(15 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、群5(30 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加スプリット抗原)、および群6(15 µg HAのi.n. Endocine(商標)アジュバント添加不活化全ウイルス抗原)。

50

組織病理学：4dpiでの病理組織学的パラメータの半定量スコアリング。肺炎/肺損傷の程度、スコア：0、0%；1、25%；2、25～50%；3、>50%；肺炎の重篤度、スコア：炎症細胞なし(0)；少数の炎症細胞(1)；中程度の数の炎症細胞(2)；多数の炎症細胞(3)；肺浮腫、肺出血、およびII型肺細胞過形成を陽性スライドとしてスコア付けした(なし=0、あり=1)；組織病理学結果を全て平均と標準偏差で表した。

【 0 1 8 3 】

(表 5)

		群 ^a					
		1	2	3	4	5	6
臨床スコア	生存率	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	発熱	1.7±0.6 (6/6)	1.1±0.4 (6/6)	1.3±0.3(6/6)	1.2±0.6(4/5*)	1.1±0.6(6/6)	1.3±0.2(6/6)
	体重減少	18.0±4.6 (6/6)	11.5±2.1 (6/6)	-2.2±2.6 (1/6)	1.7±1.5 (4/6)	2.7±3.3 (4/6)	4.7±3.1 (6/6)
ウイルス学	肺ウイルス量 [log ₁₀ TCID ₅₀ /g]	5.7±0.5 (6/6)	5.5±0.9 (6/6)	≤1.5 (0/6)	≤1.4 (0/6)	≤1.3 (0/6)	≤1.3 (0/6)
	鼻甲介ウイルス量 [log ₁₀ TCID ₅₀ /g]	7.2±2.4 (6/6)	6.9±1.5 (6/6)	≤1.9 (0/6)	≤1.7 (0/6)	≤1.7 (0/6)	4.1±2.7 (3/6)
	鼻スワブにおけるウイルス排出	2.6 (5/6)	1.2 (4/6)	0.058 (1/6)	0.0 (0/6)	0.0 (0/6)	1.4 (3/6)
	咽頭スワブにおけるウイルス排出	10 (6/6)	10 (6/6)	0.0 (1/6)	0.14 (1/6)	0.0 (1/6)	4.2 (5/6)
肉眼病変	罹患肺組織 [%]	50±25 (6/6)	37±21 (6/6)	8±4 (5/6)	7±5 (4/6)	7±5 (4/6)	8±4 (5/6)
	相対肺重量	1.5±0.5	1.3±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.2	0.9±0.1

10

20

30

【 0 1 8 4 】

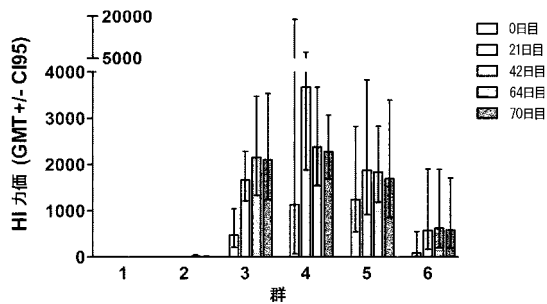
(表 6)

		群 ^a					
		1	2	3	4	5	6
組織病理学	肺炎/肺胞損傷の	2.08±0.74	1.88±0.54	0.42±0.52	0.08±0.20	0.04±0.10	0.42±0.41
	程度(スコア0~3)	(6/6)	(6/6)	(3/6)	(1/6)	(1/6)	(4/6)
	肺炎の重篤度	2.04±0.68	1.63±0.31	0.50±0.69	0.08±0.20	0.04±0.10	0.46±0.46
	(スコア0~3)	(6/6)	(6/6)	(3/6)	(1/6)	(1/6)	(4/6)
	肺胞浮腫	29±29	21±19	4±10	0±0	0±0	8±13
	(%スライド陽性)	(4/6)	(4/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(2/6)
	肺胞出血	21±40	17±26	0±0	0±0	0±0	0±0
	(%スライド陽性)	(2/6)	(2/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)
	II型肺細胞過形成	42±34	46±37	8±20	4±10	0±0	4±10
	(%スライド陽性)	(4/6)	(4/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(1/6)

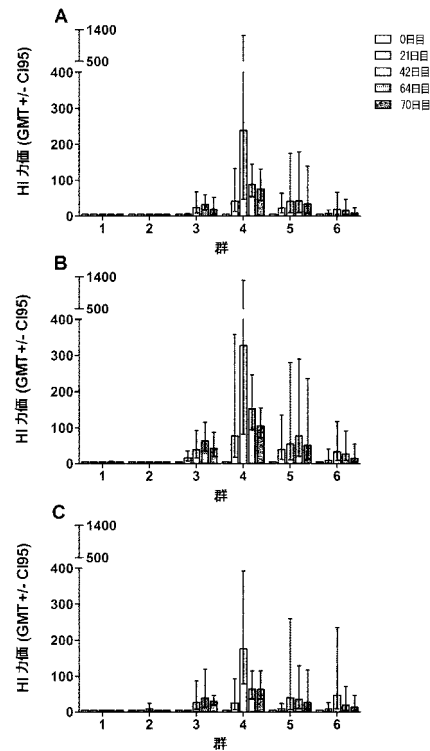
10

20

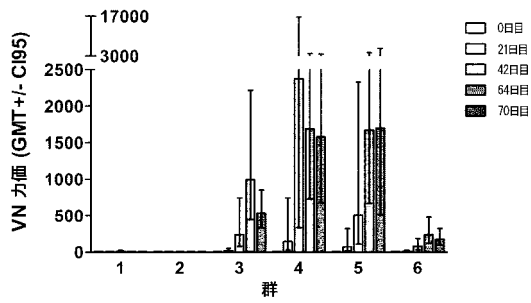
【図1】



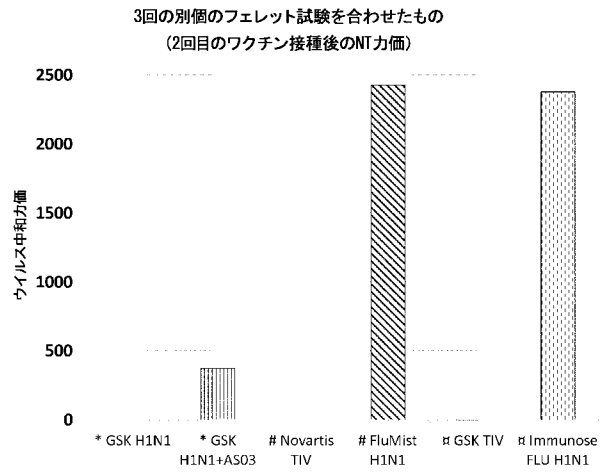
【図2】



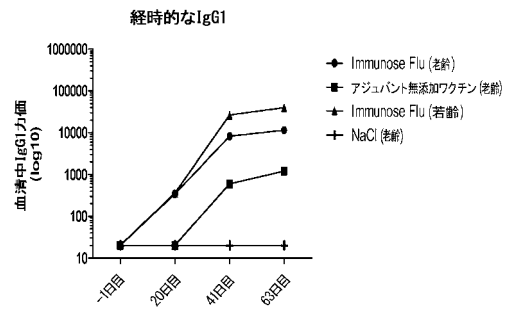
【図 3】



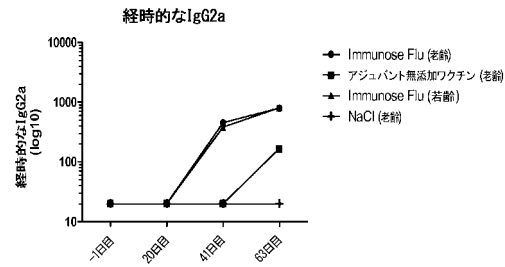
【図 4】



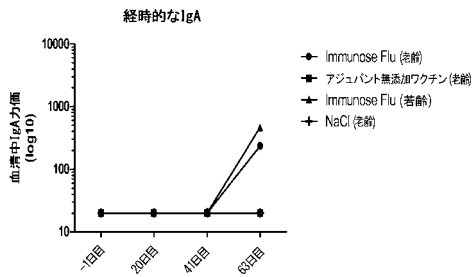
【図 5 a】



【図 5 b】



【図 5 c】



【手続補正書】

【提出日】平成27年8月31日(2015.8.31)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 不活化全ウイルス、スプリットウイルス、サブユニットインフルエンザ抗原、および組換え抗原からなる群より選択される、1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

ii) 1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物であって、
ワクチンがウイルス排出の低減のために免疫無防備状態の対象にインフルエンザに対する免疫性を与えるためのものである、組成物。

【請求項 2】

ワクチンが65歳以上の人に免疫性を与えるためのものである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

ワクチンが、小児の免疫無防備状態の対象に対する免疫性を与えるためのものである、
請求項1又は2のいずれかに記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

非生インフルエンザウイルス抗原がスプリット抗原である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

1種または複数種のモノグリセリドが、ラウリン酸(C12)、ミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、ネルボン酸からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

1種または複数種のモノグリセリドが、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、およびリノール酸(C18:2)からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

1種または複数種のモノグリセリドが、オレイン酸でモノエステル化されたグリセリド(オレイン酸グリセリル)である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

1種または複数種のカルボン酸が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸(カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、およびネルボン酸からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

1種または複数種のカルボン酸がオレイン酸およびラウリン酸からなる群より選択され

る、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

カルボン酸がオレイン酸である、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 11】

アジュバントがオレイン酸グリセリル、オレイン酸、および水性媒体を含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 12】

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0g、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のモノグリセリドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のカルボン酸を含む、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 14】

アジュバントミックス中の1種または複数種のモノグリセリドおよび1種または複数種のカルボン酸が、ワクチンの多くても10%w/v、または多くても5%w/v、または多くても4%w/v、または多くても3%w/v、または多くても2%w/v、または多くても1%w/vである、前記請求項のいずれか一項記載の使用のための組成物。

【請求項 15】

免疫無防備状態の対象が、65歳以上の人、妊婦、未熟児、および以下の患者クラス；癌患者、化学療法を受けている人、放射線療法を受けている人、臓器移植患者、実質臓器移植を受けている人、幹細胞移植患者、同種造血幹細胞移植を受けている人、自家造血幹細胞移植を受けている人、HIVに感染した患者、AIDSにかかっている人、移植片対宿主病患者、免疫抑制剤を服用している人、例えば、グルココルチコイド療法およびステロイド療法を受けている人、慢性疾患、例えば、末期腎臓病、糖尿病、硬変にかかっている人からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明の第4の局面は、

i)1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む組成物を鼻腔内投与することによって、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法に関する。

[本発明1001]

i)1種または複数種の非生抗原、および

ii)1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む、鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物であって、

ワクチンが免疫無防備状態の対象に免疫性を与えるためのものである、組成物。

[本発明1002]

ワクチンがインフルエンザに対する免疫性を与えるためのものである、前記本発明のい

ずれかの使用のための組成物。

[本発明1003]

ワクチンが65歳以上の人に免疫性を与えるためのものである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1004]

ワクチンが、パンデミック地域にいる任意の年齢の免疫無防備状態の人において使用するためのものである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1005]

ワクチンが、ペリパンデミック (peri-pandemic) 感染性病原体またはパンデミック感染性病原体に対する免疫性を与えるためのものである、本発明1001～1004のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1006]

ワクチンが、全年齢の免疫無防備状態の人、例えば、乳幼児、小児、成人、および高齢者に、ペリパンデミック感染性病原体またはパンデミック感染性病原体に対する免疫性を与えるためのものである、本発明1001～1004のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1007]

非生インフルエンザウイルス抗原が、不活化全ウイルス、スプリットウイルス、およびサブユニットインフルエンザ抗原からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1008]

ウイルス排出の低減のために65歳以上の免疫無防備状態の個体において使用するためのものである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1009]

非生インフルエンザウイルス抗原がスプリット抗原である、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1010]

1種または複数種のモノグリセリドが、ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、パルミトオレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸 (カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、ネルボン酸からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1011]

1種または複数種のモノグリセリドが、パルミトオレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、およびリノール酸 (C18:2) からなる群より選択されるカルボン酸でモノエステル化されたグリセリドである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1012]

1種または複数種のモノグリセリドが、オレイン酸でモノエステル化されたグリセリド (オレイン酸グリセリル) である、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1013]

1種または複数種のカルボン酸が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、ヘキサン酸、カプリル酸、デカン酸 (カプリン酸)、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エルカ酸、およびネルボン酸からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1014]

1種または複数種のカルボン酸がオレイン酸およびラウリン酸からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1015]

カルボン酸がオレイン酸である、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1016]

アジュバントがオレイン酸グリセリル、オレイン酸、および水性媒体を含む、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1017]

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0g、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のモノグリセリドを含む、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1018]

ワクチン組成物が、ワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約5.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.1g～約2.0gの範囲、またはワクチン組成物100mLあたり約0.5g～約2.0g、例えば、0.5g～約1.5gの範囲の量のカルボン酸を含む、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1019]

アジュバントミックス中の1種または複数種のモノグリセリドおよび1種または複数種のカルボン酸が、ワクチンの多くても10%w/v、または多くても5%w/v、または多くても4%w/v、または多くても3%w/v、または多くても2%w/v、または多くても1%w/vである、前記本発明のいずれかの使用のための組成物。

[本発明1020]

1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および
1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント
を含む、免疫無防備状態の対象への鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物。

[本発明1021]

65歳以上の人へのインフルエンザ鼻腔内投与ワクチンとして使用するための、本発明1020の組成物。

[本発明1022]

免疫無防備状態の対象が、65歳以上の人、妊婦、未熟児、および以下の患者クラス；癌患者、化学療法を受けている人、放射線療法を受けている人、臓器移植患者、実質臓器移植を受けている人、幹細胞移植患者、同種造血幹細胞移植を受けている人、自家造血幹細胞移植を受けている人、HIVに感染した患者、AIDSにかかっている人、移植片対宿主病患者、免疫抑制剤を服用している人、例えば、グルココルチコイド療法およびステロイド療法を受けている人、慢性疾患、例えば、末期腎臓病、糖尿病、硬変にかかっている人からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの組成物。

[本発明1023]

i) 1種または複数種の肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)抗原、および
ii) 1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント
を含む、肺炎連鎖球菌感染の予防または肺炎連鎖球菌感染に関連した症状の重篤度の低下のために、免疫無防備状態の対象において使用する鼻腔内投与ワクチンとして使用するための組成物。

[本発明1024]

ワクチンが65歳以上の人に免疫性を与えるためのものである、本発明1023の使用のための組成物。

[本発明1025]

i) 1種または複数種の非生インフルエンザウイルス抗原、および
ii) 1種または複数種のカルボン酸と、水性媒体と、任意で1種または複数種のモノグリセリドとを含む、アジュバント

を含む組成物を鼻腔内投与することによって、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法。

[本発明1026]

それを必要とする人に、本発明1001～1025のいずれかの組成物を含む治療的有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、ペリパンデミック期またはパンデミック期の期間中に免疫性を与える方法。

[本発明1027]

それを必要とする人に、本発明1001～1026のいずれかの組成物を含む治療的有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、免疫無防備状態の対象に免疫性を与える方法。

。

[本発明1028]

それを必要とする人に、本発明1001～1026のいずれかの組成物を含む治療的有効量のワクチン組成物を鼻腔内投与する工程を含む、65歳以上の人に免疫性を与える方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/077007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/145 A61K39/39 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/042003 A1 (EUROCINE VACCINES AB [SE]; SCHROEDER ULF [SE]; ARWIDSSON HANS [SE]) 5 April 2012 (2012-04-05)	1,3,4, 7-22, 25-28
Y	the whole document ----- -/--	2,23,24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2014

Date of mailing of the international search report

06/03/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PETERSSON P ET AL: "The Eurocine(>R) L3 adjuvants with subunit influenza antigens induce protective immunity in mice after intranasal vaccination", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 39, 7 September 2010 (2010-09-07), pages 6491-6497, XP027267112, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-07-15] abstract table 1 page 6497, left-hand column, paragraph 2 page 6492, right-hand column	1,3,4, 7-22, 25-28
A,P	FALKEBORN TINA ET AL: "Endocine(TM), N30A and N30ASq; Three Mucosal Adjuvants That Enhance the Immune Response to Nasal Influenza Vaccination.", PLOS ONE 2013, vol. 8, no. 8, 2013, page e70527, XP009172690, ISSN: 1932-6203 the whole document	1-28
A	SUSANNA ESPOSITO ET AL: "Different influenza vaccine formulations and adjuvants for childhood influenza vaccination", VACCINE, vol. 29, no. 43, 4 August 2011 (2011-08-04), pages 7535-7541, XP028306518, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.08.012 [retrieved on 2011-08-02] the whole document	1-28
X	HAILE M ET AL: "Immunization with heat-killed Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine(TM) L3 adjuvant protects against tuberculosis", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 22, no. 11-12, 29 March 2004 (2004-03-29), pages 1498-1508, XP004500396, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2003.10.016 abstract page 1499, left-hand column, paragraph 2 page 1500, left-hand column, paragraph 2 page 1499, right-hand column, paragraph 4 page 1501, right-hand column, paragraph 5 page 1503, left-hand column, paragraph 3	1,3-6,8, 10-19, 27,28
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BUONAGURO ET AL: "DNA-VLP prime-boost intra-nasal immunization induces cellular and humoral anti-HIV-1 systemic and mucosal immunity with cross-clade neutralizing activity", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 32, 20 July 2007 (2007-07-20), pages 5968-5977, XP022162332, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.05.052 page 5969, right-hand column, paragraph 4</p> <p>-----</p>	1,3,4,8, 10-19, 26-28
A	<p>HINKULA J ET AL: "A novel DNA adjuvant, N3, enhances mucosal and systemic immune responses induced by HIV-1 DNA and peptide immunizations", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 24, no. 21, 22 May 2006 (2006-05-22), pages 4494-4497, XP028010738, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.08.015 [retrieved on 2006-05-22] page 4494, left-hand column, paragraph 2 page 4495, left-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>SCHRODER U ET AL: "Nasal and parenteral immunizations with diphtheria toxoid using monoglyceride/fatty acid lipid suspensions as adjuvants", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 17, no. 15-16, 9 April 1999 (1999-04-09), pages 2096-2103, XP004165061, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00408-3 abstract tables 4,5,6</p> <p>-----</p>	1,3,4,8, 10-19, 26-28
Y	<p>GLUECK T: "Vaccinate your immunocompromised patients!", RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 45, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 9-10, XP002460594, ISSN: 1462-0324, DOI: 10.1093/RHEUMATOLOGY/KEI237 the whole document</p> <p>-----</p>	2,23,24
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077007

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>ESPOSITO S ET AL: "Vaccinations in children with cancer", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 19, 26 April 2010 (2010-04-26), pages 3278-3284, XP026997103, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-03-10] page 3281, left-hand column, paragraph 6-8 page 3281, right-hand column, paragraph 3 -----</p>	2,23,24
Y	<p>HANA HAKIM ET AL: "Immunogenicity and safety of inactivated monovalent 2009 H1N1 influenza A vaccine in immunocompromised children and young adults", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 30, no. 5, 25 November 2011 (2011-11-25), pages 879-885, XP028436167, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.11.105 [retrieved on 2011-12-05] abstract page 884, left-hand column, paragraph 3 -----</p>	2,23,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/077007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012042003	A1	05-04-2012	
		AU 2011310090 A1	14-03-2013
		CA 2810597 A1	05-04-2012
		CN 103298484 A	11-09-2013
		EP 2621524 A1	07-08-2013
		JP 2013538841 A	17-10-2013
		KR 20130130711 A	02-12-2013
		US 2013243817 A1	19-09-2013
		WO 2012042003 A1	05-04-2012

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アルヴィドソン ハンス
スウェーデン王国 ストレンジネース トーンスティゲン 4

(72)発明者 マルタイス アンナ - カリン
スウェーデン王国 スパンガ インタグスグランド 5 1

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA55 DD01 EE01 EE06 FF12 GG10