

(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2010-539192  
(P2010-539192A)

(43) 公表日 平成22年12月16日(2010.12.16)

(51) Int.Cl.

**A61K 39/125 (2006.01)**  
**A61P 31/12 (2006.01)**  
**A61K 39/39 (2006.01)**

F 1

A 61 K 39/125  
A 61 P 31/12  
A 61 K 39/39

テーマコード(参考)

4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2010-525114 (P2010-525114)  
(86) (22) 出願日 平成20年9月18日 (2008.9.18)  
(85) 翻訳文提出日 平成22年5月11日 (2010.5.11)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2008/076763  
(87) 國際公開番号 WO2009/039229  
(87) 國際公開日 平成21年3月26日 (2009.3.26)  
(31) 優先権主張番号 60/973,389  
(32) 優先日 平成19年9月18日 (2007.9.18)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/986,826  
(32) 優先日 平成19年11月9日 (2007.11.9)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 507028479  
リゴサイト ファーマスティカルズ, インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国, モンタナ州 59718-6831, ポーズマン, アナリシス ドライブ 2155  
(74) 代理人 100079108  
弁理士 稲葉 良幸  
(74) 代理人 100109346  
弁理士 大貫 敏史  
(72) 発明者 リチャードソン, チャールズ  
アメリカ合衆国, モンタナ州 59718, ポーズマン, アナリシス ドライブ 2155, リゴサイト ファーマスティカルズ, インコーポレイテッド内  
最終頁に続く

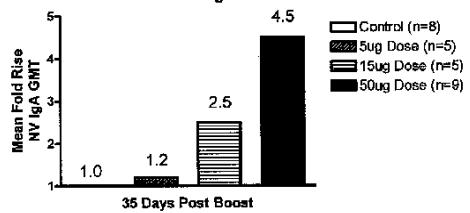
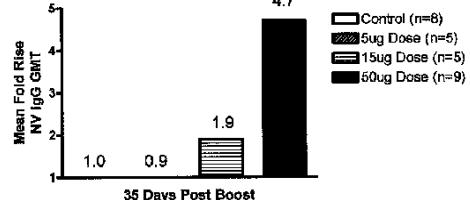
(54) 【発明の名称】ノロウイルスに対して防御免疫応答を付与する方法

## (57) 【要約】

【課題】ノロウイルス感染に対する防御免疫を誘導する方法を提供する。

【解決手段】本発明は、ノロウイルス抗原およびアジュバントを含むワクチン組成物、特に、一価VLPの混合物および多価VLPの混合物を含むワクチン組成物、ならびにヒト被験体においてノロウイルス感染に対する防御免疫を付与する方法に関する。

【選択図】図2

Figure 2  
A. Norovirus Vaccine Study LV01-101  
Serum NV IgAB. Norovirus Vaccine Study LV01-101  
Serum NV IgG

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ノロウイルスのウイルス様粒子（VLP）および少なくとも1つのアジュバントを含むワクチンをヒトに投与することを含む、ヒトにおいてノロウイルス感染に対する防御免疫を誘発する方法。

**【請求項 2】**

前記ノロウイルスVLPがノロウイルス遺伝子群Iおよび遺伝子群IIウイルス株からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ノロウイルスVLPが一価VLPである、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 4】**

前記ノロウイルスVLPが多価VLPである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記ワクチンが第2のタイプのノロウイルスVLPを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記第1および第2のノロウイルスVLPが、異なる遺伝子群由来の一価VLPである、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記第1のノロウイルスVLPがノーウォークウイルスVLPであり、前記第2のノロウイルスVLPがヒューストンウイルスVLPである、請求項6に記載の方法。

20

**【請求項 8】**

前記ワクチンが送達剤をさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記送達剤が生体付着剤である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記生体付着剤が粘膜付着剤である、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記粘膜付着剤が、デルマタン硫酸、コンドロイチン、ペクチン、ムチン、アルギン酸塩、ポリ（アクリル酸）の架橋誘導体、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、レクチン、線毛タンパク質、およびカルボキシメチルセルロースからなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

30

**【請求項 12】**

前記粘膜付着剤が多糖である、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記多糖が、キトサン、キトサン塩、またはキトサン塩基である、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記アジュバントが、toll様受容体（TLR）アゴニスト、モノホスホリル脂質A（MPL）、合成脂質A、脂質A擬似体または類似体、アルミニウム塩、サイトカイン、サボニン、ムラミルジペプチド（MDP）誘導体、CpGオリゴ、グラム陰性細菌のリボ多糖（LPS）、ポリホスファゼン、エマルジョン、ビロソーム、コキレート、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）（PLG）微小粒子、ポロキサマー粒子、微小粒子、およびリボソームからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

40

**【請求項 15】**

前記アジュバントがtoll様受容体（TLR）アゴニストである、請求項14に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記アジュバントがMPLである、請求項14に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記アジュバントが毒素アジュバントではない、請求項1に記載の方法。

50

**【請求項 18】**

前記ワクチンが粉末製剤である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記ワクチンが液体製剤である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記ワクチンが、粘膜、鼻腔内、筋肉内、静脈内、皮下、皮内、真皮下、および経皮投与経路からなる群から選択される経路によってヒトに投与される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記ワクチンが鼻腔内に投与される、請求項20に記載の方法。

10

**【請求項 22】**

前記ワクチンが、鼻通路の近くに保持される前記ワクチンを含む1つ以上のデバイスからの鼻道内における迅速な被着によって、鼻粘膜に投与される、請求項21に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記ワクチンが、一方または両方の鼻孔に投与される、請求項22に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記ノロウイルスVLPが、約0.01% (w/w) ~ 約80% (w/w) の濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 25】**

前記ノロウイルスVLPが、1用量あたり約1μg ~ 約100mgの量で存在する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記ノロウイルスVLPが、1用量あたり約1μg ~ 約100μgである、請求項25に記載の方法。

**【請求項 27】**

前記ワクチンが、ノロウイルス感染の1つ以上の症状に対して防御する、請求項1に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

30

**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2007年9月18日に出願された米国仮特許出願第60/973,389号および2007年11月9日に出願された米国仮特許出願第60/986,826号(それらの全体が参照により本明細書に援用される)の優先権の利益を主張する。

**【0002】****発明の分野**

本発明は、ワクチン、特に、ノロウイルスのワクチンの分野に属する。加えて、本発明は、ワクチン組成物を調製する方法および防御免疫応答を誘導する方法に関する。

**【0003】****政府支援についての陳述**

本発明は、契約番号W81XWH-05-C-0135において、US Army Medical Research and Material Commandの政府支援によって成された。政府は、本発明に対し一定の権利を有することができる。

40

**【背景技術】****【0004】****発明の背景**

ノロウイルスは、非細菌性胃腸炎の集団発生の最も重要な原因として出現する培養不可のヒトカリシウイルスである(Glass et al., 2000; Hardy et al, 1999)。高感度の分子診断アッセイが開発される以前は、ノロウイルスの臨床的意義が正しく評価されていな

50

かった。原型の遺伝子群 I ノーウォークウイルス (Norwalk virus) (N V) ゲノムのクローニングおよび組み換えバキュロウイルス発現システムからのウイルス様粒子 (V L P) の産生によって、広範な局面でのノロウイルスの感染を明らかにするアッセイが開発された (Jiang et al. 1990;1992)。

#### 【0005】

ノロウイルスは、非分節 R N A ゲノムを含有する一本鎖のプラスセンス R N A ウイルスである。ウイルスゲノムは、3つのオーブンリーディングフレームをコードし、後方の2つのフレームは、それぞれ、メジャーなカプシドタンパク質およびマイナーな構造タンパク質の産生を指令する (Glass et al. 2000)。真核細胞発現系において高レベルで発現させる場合、N V、および他の所定のノロウイルスのカプシドタンパク質が自己アセンブルして、天然のノロウイルスピリオンに構造的に類似する V L P を形成する。透過型電子顕微鏡で観察する場合、V L P は、ヒト糞便サンプルから単離される感染性ビリオンとは形態学的に区別できない。

10

#### 【0006】

ノロウイルスに対する免疫応答は複雑であり、防御に関して相關する事柄が、現在解明されつつある。天然のウイルスによって実施されたヒト志願者試験によって、粘膜から誘導されるメモリー免疫応答が感染に対して短期間の防御を提供することが実証され、ワクチンを仲介する防御が可能であることが示唆された (Lindesmith et al. 2003;Parrino et al. 1997;Wyatt et al. 1974)。

20

#### 【0007】

ノロウイルスをインビトロで培養することはできないが、V L P が入手可能であり、それらを多量に産生させることが可能であるため、ノロウイルスカプシドの抗原および構造としての仕組みの定義が、かなり進められた。V L P は、ウイルスカプシドタンパク質の真正の高次構造を保存する一方、感染性の遺伝子材料が欠如する。従って、V L P は、ウイルスと細胞受容体との機能的相互作用を模倣し、それによって、適切な宿主免疫応答を誘発する一方、複製または感染を引き起こす能力を欠く。N I Hとの共同で、Baylor College of Medicineでは、学術的な研究者主導型 (investigator-sponsored) の第 I 相臨床試験において、ヒト志願者の N V V L P に対する体液性、粘膜および細胞性免疫応答に関する試験が行われた。経口投与された V L P は、健常な成人において安全かつ免疫原性である (Ball et al. 1999;Tacket et al. 2003)。他の学術的な施設では、動物モデルの前臨床実験により、細菌外毒素アジュバントを鼻腔内に投与した場合、V L P に対する免疫応答が増強されることが実証された (Guerrero et al. 2001;Nicollier-Jamot et al. 2004;Periwal et al. 2003;Souza et al. (2007) Vaccine, doi:10.1016/j.vaccine.2007.09.040)。しかし、いずれの試験においても、何らかのノロウイルスワクチンを使用して、ノロウイルスに対する防御免疫を達成することが可能であることについては報告されていない。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明は、少なくとも 1 つのノロウイルス抗原を含むワクチンを投与することを含む、被験体、特に、ヒト被験体におけるノロウイルス感染に対する防御免疫を誘導する方法を提供する。一実施形態では、抗原はノロウイルスのウイルス様粒子 (V L P) である。本発明の方法において使用されるワクチンは、1 つ以上のアジュバントをさらに含んでもよい。ノロウイルス V L P は、遺伝子群 I もしくは遺伝子群 I I のウイルスまたはそれらの混合物から選択することができる。一実施形態では、ワクチンは、約 0 . 0 1 % ~ 約 8 0 重量 % の濃度でノロウイルス V L P を含む。別の実施形態では、ワクチンは、1 用量あたり約 1  $\mu$  g ~ 約 1 0 0 m g の用量のノロウイルス V L P を含む。

40

#### 【0009】

いくつかの実施形態では、ワクチンは、抗原取り込みを増強するか、デポー効果を提供するか、送達部位における抗原保持時間を増加するか、または送達部位における細胞タイトジャンクションの弛緩を介して免疫応答を増強するように機能する送達剤をさらに含む

50

。送達剤は、生体付着剤、好ましくは、デルマタン硫酸、コンドロイチン、ペクチン、ムチン、アルギン酸塩、ポリ(アクリル酸)の架橋誘導体、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、レクチン、線毛タンパク質、およびカルボキシメチルセルロースからなる群から選択される粘膜付着剤であり得る。好ましくは、粘膜付着剤は多糖である。より好ましくは、粘膜付着剤は、キトサン、またはキトサン塩もしくはキトサン塩基などのキトサンを含有する混合物である。

#### 【0010】

他の実施形態では、ワクチンはアジュバントを含む。前記アジュバントは、t o l l 様受容体 (TLR) アゴニスト、モノホスホリル脂質 A (MPL (登録商標))、合成脂質 A、脂質 A 擬似体または類似体、アルミニウム塩、サイトカイン、サポニン、ムラミルジペプチド (MDP) 誘導体、CpGオリゴ、グラム陰性細菌のリポ多糖 (LPS)、ポリホスファゼン、エマルジョン、ビロソーム (virosomes)、コキレート (cochleate)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド) (PLG) 微小粒子、ポロキサマー粒子、微小粒子、内毒素、例えば、細菌内毒素およびリボソームからなる群から選択されてもよい。好ましくは、アジュバントは t o l l 様受容体 (TLR) アゴニストである。より好ましくは、アジュバントは MPL (登録商標) である。

10

#### 【0011】

本発明の方法は、液体または乾燥粉末として処方されたノロウイルスワクチンを投与することを含む。乾燥粉末製剤は、直径約 10 ~ 約 500 マイクロメートルの粒度を含有してもよい。ワクチンを投与するための適切な経路は、粘膜、筋肉内、静脈内、皮下 (subcutaneous)、皮内、真皮下 (subdermal)、または経皮経路を含む。特に、投与経路は、筋肉内または粘膜経路であってもよく、好適な粘膜投与経路は、鼻腔内、経口、もしくは膣投与経路を含む。別の実施形態では、ワクチンは、点鼻スプレー、点鼻薬、または乾燥粉末として処方され、ここで、ワクチンは、鼻通路の近くに保持される前記ワクチンを含有するデバイスからの鼻道内における迅速な被着によって投与される。別の実施形態では、ワクチンは、一方または両方の鼻孔に投与される。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図 1】ノーウォークウイルス (Norwalk virus) (NV) - 特異的 IgG が、乾燥粉末 VLP で免疫したウサギにおいて誘発されることを示す。ウサギに、鼻腔内投与経路を介して 50 µg の NV - VLP および 50 µg の MPL を 3 回、1、22 および 43 日目 (矢印) に投与した。示された日に、ELISA によって、各ウサギ由来の血清を、NV - VLP - 特異的 IgG について試験した。VLP をワクチン接種したウサギにおいてのみ NV - VLP - 特異的 IgG が認められたが、非処置およびプラセボ処置群では、検出可能な抗原 - 特異的抗体が認められなかった (データ示さず)。応答の算術平均を示し、U / mL (1U 約 1 µg) で表す。棒は、平均の標準誤差を示す。

30

【図 2】対照 (アジュバント / 賦形剤)、または 3 種類の用量のノーウォークウイルス (Norwalk virus) VLP (5、15、もしくは 50 µg) のうちの 1 つを含有するワクチン製剤で免疫したヒト志願者由来の血清 IgA (パネル A) および IgG (パネル B) レベルを測定する ELISA アッセイの結果を示す。用量レベルのそれぞれについて、2 回目の免疫化の 35 日後 (56 日目) における抗 VLP 力価の增加倍率の幾何平均を示す。志願者には 0 および 21 日目に免疫化を行った。

40

【図 3】50 µg の用量のノーウォークウイルス (Norwalk virus) VLP または対照 (アジュバント / 賦形剤) を伴うワクチン製剤を投与されたヒト志願者における IgA (パネル A) および IgG (パネル B) 抗体分泌細胞 (ASC) のレベルを示す。10<sup>6</sup> 個の末梢血单核細胞 (PBMC)あたりの ASC の幾何平均 (GMN) を、試験日 (7 日目または 28 日目)、具体的には、免疫化の 7 日後に対してプロットする。志願者には 0 および 21 日目に免疫化を行った。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0013】

50

## 発明の詳細な説明

本発明は、被験体においてノロウイルス感染に対する防御免疫を誘発する方法に関する。特に、本発明は、ノロウイルスVLPおよび少なくとも1つのアジュvantを含むワクチンをヒトに投与する方法を提供し、ここで、ワクチンは、ノロウイルス感染の少なくとも1つの症状に対して防御する。それに加えて、またはその代わりに、ワクチンは、少なくとも1つの送達剤をさらに含んでもよい。

## 【0014】

## ノロウイルス抗原

本発明は、1つ以上のノロウイルス抗原を含む組成物を提供する。「ノロウイルス(Norovirus)」、「ノロウイルス(NOR)」、「ノロウイルス(norovirus)」および文法的均等物は、本明細書において、カリシウイルス(Caliciviridae)科のノロウイルス(Norovirus)属のメンバーである。いくつかの実施形態では、ノロウイルスは、関連するプラス-センス一本鎖RNA、ヒトまたは非ヒト哺乳動物種に対して感染性であり得る非エンベロープウイルスの群を含むことができる。いくつかの実施形態では、ノロウイルスは、ヒトにおいて急性胃腸炎を引き起こす。ノロウイルスはまた、電子顕微鏡で観察した場合、はっきりした表面構造または不規則な辺縁を有する小型球形ウイルス(SRSV)と称することができる。15の遺伝子クラスターを含む核酸およびアミノ酸配列によって定義される少なくとも4つの遺伝子群(GI~IV)もノロウイルス内に含まれる。主な遺伝子群はGIおよびGIIである。GIIIIおよびGIVが提唱されるが、一般的に受け入れられる。GIIIIの代表はウシのジェナ(Jena)株である。GIVは、この時点で、1つのウイルス、アルファトロン(Alphatron)を含有する。ノロウイルスのさらなる記載については、Vinje et al. J. Clin. Micro. 41:1423-1433 (2003)を参照のこと。「ノロウイルス」とは、本明細書において、組み換えノロウイルスウイルス様粒子(rNORVLP)をも意味する。

いくつかの実施形態では、細胞中における、少なくともORF2によってコードされるノロウイルスカプシドタンパク質の組み換え発現により(例えば、Sf9細胞中におけるバキュロウイルスベクター由来の)、カプシドタンパク質のVLPへの自発的自己アセンブルを生じさせることができる。いくつかの実施形態では、細胞中における、少なくともORF1およびORF2によってコードされるノロウイルスタンパク質の組み換え発現により(例えば、Sf9細胞中におけるバキュロウイルスベクター由来の)、カプシドタンパク質のVLPへの自発的自己アセンブルを生じさせることができる。VLPは、構造的にノロウイルスに類似するが、ウイルスRNAゲノムが欠如し、従って、感染性はない。従って、「ノロウイルス」は、欠損粒子を含む感染性または非感染性であり得るビリオンを含む。

## 【0015】

ノロウイルスの非限定的例として、ノーウォークウイルス(Norwalk virus)(NV, GenBank M87661, NP056821)、サウサンプトンウイルス(Southampton virus)(SHV, GenBank L07418)、デザートシールドウイルス(Desert Shield virus)(DSV, U04469)、ヘッセウイルス(Hesse virus)(HSV)、チバウイルス(Chiba virus)(CHV, GenBank AB042808)、ハワイウイルス(Hawaii virus)(HV, GenBank U07611)、スノーマウンテンウイルス(Snow Mountain virus)(SMV, GenBank U70059)、トロントウイルス(Toronto virus)(TV, Leite et al, Arch. Virol. 141:865-875)、ブリストルウイルス(Bristol virus)(BV)、ジェナウイルス(Jena virus)(JV, AJ01099)、メリーランドウイルス(Maryland virus)(MV, AY032605)、セトウイルス(Seto virus)(SV, GenBank AB031013)、キャンバーウェル(Camberwell)(CV, AF145896)、ローズデールウイルス(Lordsdale virus)(LV, GenBank X86557)、グリムズビーウイルス(Grimsby virus)(GrV, AJ004864)、メキシコウイルス(Mexico virus)(MXV, GenBank U22498)、ボクサー(Boxer)(AF538679)、C59(AF435807)、VA115(AY0350)

8598)、BUDS (AY660568)、ヒューストンウイルス (Houston virus) (HoV, AY502023)、MOH (AF397156)、パリス・アイランド (Parris Island) (PiV; AY652979)、VA387 (AY038600)、VA207 (AY038599)、およびオペレーション・イラク・フリーダム (Operation Iraqi Freedom) (OIF, AY675554) が挙げられる。それぞれの核酸および対応するアミノ酸配列はすべて、それらの全体が参照により援用される。いくつかの実施形態では、同定目的のための記号を使用することができ、系統化される：ウイルスが単離された宿主種／属の略号／種の略号／株の名称／発生年／由来する国。(Green et al., Human Caliciviruses, in Fields Virology Vol.1, 841-874 (Knipe and Howley, editors-in-chief, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001))。ノーウォークウイルス (Norwalk virus)、スノーマウンテンウイルス (Snow Mountain virus)、およびヒューストンウイルス (Houston virus) が、いくつかの実施形態において好適である。

10

## 【0016】

ノロウイルス抗原は、ペプチド、タンパク質、またはウイルス様粒子 (VLP) の形態であってもよい。好適な実施形態では、ノロウイルス抗原はVLPを含む。本明細書において使用する「ウイルス様粒子またはVLP」は、ノロウイルスのカプシドタンパク質コード配列から産生され、感染性ノロウイルス粒子の抗原特徴に類似の特徴を含むウイルス様粒子、フラグメント、凝集体、またはそれらの部分を指す。ノロウイルス抗原はまた、VLPのカプシド単量体、カプシド多量体、タンパク質もしくはペプチドフラグメント、またはそれらの凝集体もしくは混合物の形態であってもよい。ノロウイルス抗原タンパク質またはペプチドもまた、変性形態であってもよく、当該技術分野において公知の方法を使用して、產生されてもよい。

20

## 【0017】

本発明のVLPは、当該技術分野において標準的な方法を使用して、VP1および／またはVP2タンパク質などの全長ノロウイルスカプシドタンパク質あるいは所定のVP1誘導体もしくはVP2誘導体のいずれかから形成させることができる。あるいは、VLPを形成させるために使用されるカプシドタンパク質は、切断型カプシドタンパク質である。いくつかの実施形態では、例えば、VLPの少なくとも1つは、トランケート型VP1タンパク質を含む。他の実施形態では、すべてのVLPは、トランケート型VP1タンパク質を含む。トランケーションは、N末端トランケーションであっても、またはC末端トランケーションであってもよい。トランケート型カプシドタンパク質は、適切には、機能的カプシドタンパク質誘導体である。機能的カプシドタンパク質誘導体は、(必要であれば、適切にアジュvant化された場合に)全長カプシドタンパク質からなるVLPによって免疫応答が惹起されるのと同じ方法で、免疫応答を惹起することが可能である。

30

## 【0018】

VLPは、メジャーなVP1タンパク質および／またはマイナーなVP2タンパク質を含有し得る。好ましくは、各VLPは、一価VLPを生じる単一のノロウイルス遺伝子群由来のVP1および／またはVP2タンパク質を含有する。本明細書において使用する用語「一価の」は、抗原性タンパク質が、単一のノロウイルス遺伝子群に由来することを意味する。例えば、VLPは、遺伝子群Iのウイルス株由来のVP1および／またはVP2(例えば、ノーウォークウイルス (Norwalk virus) 由来のVP1およびVP2)を含有する。好ましくは、VLPは、優勢なVP1タンパク質を含む。本発明の一実施形態では、抗原は、一価VLPの混合物であって、ここで、組成物は、複数のウイルス株から採取された、異なるノロウイルス遺伝子群(例えば、ノーウォークウイルス (Norwalk virus) およびヒューストンウイルス (Houston virus) )由来のVP1およびVP2を含むVLPと混合された単一のノロウイルス遺伝子群由来のVP1およびVP2を含むVLPを含む。単なる例として、組成物は、ノロウイルス遺伝子群IIの1つ以上の株由来の一価VLPと共に、ノロウイルス遺伝子群Iの1つ以上の株由来の一価VLPを含有することができる。好ましくは、ノロウイルスVLP混合物は、ノーウォークおよびヒューストンノロウイルスの株からなる。

40

50

## 【0019】

しかし、本発明の代替実施形態では、VLPは、例えば、あるノロウイルス遺伝子群由来のVP1および/またはVP2タンパク質と第2のノロウイルス遺伝子群由来のVP1および/またはVP2タンパク質とを混合したものを含む多価VLPであってもよく、ここで、異なるVP1およびVP2タンパク質は、キメラのVP1およびVP2タンパク質ではないが、同じカプシド構造内で共に会合して、免疫原性VLPを形成する。本明細書において使用する用語「多価の」は、抗原性タンパク質が、2つ以上のノロウイルス遺伝子群または株に由来することを意味する。多価VLPは、2つ以上のウイルス株から採取されるVLP抗原を含有してもよい。単なる例として、組成物は、ノロウイルス遺伝子群IIの1つ以上の株（例えば、ヒューストンウイルス（Houston virus））由来のカプシド単量体または多量体と共にノロウイルス遺伝子群I（例えば、ノーウォークウイルス（Norwalk virus））の1つ以上の株由来のカプシド単量体または多量体からなる多価VLPを含有することができる。好ましくは、多価VLPは、ノーウォークおよびヒューストンノロウイルスの株由来のカプシドタンパク質を含有する。

10

## 【0020】

組成物内の一価または多価VLPの組み合わせは、好ましくは、各VLPタイプの免疫原性を減少しない。特に、本発明の組み合わされたVLP組成物が、ワクチンにおいて提示されるそれぞれのノロウイルス遺伝子型ごとに、感染に対する免疫を誘発することができるよう、本発明の組み合わせにおいてノロウイルスVLP間で干渉が生じないことが好ましい。適切には、組み合わせ中の所与のVLPタイプに対する免疫応答は、個々に測定する場合、同じVLPタイプの免疫応答の少なくとも50%、好ましくは、100%または実質的に100%である。免疫応答は、適切には、例えば、本明細書の実施例において例示するように、抗体応答によって、測定してもよい。

20

## 【0021】

個々のカプシドタンパク質を個別に発現させることによって多価VLPを産生させ、続いて、それらを組み合わせてVLPを形成させてもよい。あるいは、同じ細胞内において、1つ以上のDNA構築物から複数のカプシドタンパク質を発現させてもよい。例えば、複数のDNA構築物を宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトしてもよく、各ベクターは異なるカプシドタンパク質をコードする。あるいは、共有のプロモーターまたは複数の個々のプロモーターによって制御される複数のカプシド遺伝子を有する单一のベクターを使用してもよい。また、適切であれば、IRESエレメントをベクターに組み入れてもよい。そのような発現ストラテジーを使用して、共発現されたカプシドタンパク質は、以後のVLP形成のために共精製してもよく、または自発的に多価VLPを形成させ、次いで、精製することができるようにしてよい。

30

## 【0022】

多価VLP産生のための好適なプロセスは、異なるノロウイルス遺伝子型由来のVLPカプシドタンパク質または誘導体、例えば、VP1タンパク質を調製して、タンパク質を混合すること、およびタンパク質をアセンブルさせて、多価VLPを産生することを含む。VP1タンパク質は、粗抽出物の形態であってもよく、部分的に精製されていてもよく、または混合前に精製されていてもよい。異なる遺伝子群のアセンブルした一価VLPを、ディスアセンブルし、共に混合し、多価VLPに再アセンブルしてもよい。好ましくは、タンパク質またはVLPは、組み合わせる前に、少なくとも部分的に精製される。任意選択により、アセンブル後に、多価VLPをさらに精製してもよい。

40

## 【0023】

適切には、本発明のVLPは、均質かつ純粋なVLPを提供するために、VLPのディスアセンブリおよび再アセンブリによって作製される。一実施形態では、多価VLPは、2つ以上のVLPのディスアセンブリによって作製してもよく、続いて、再アセンブリ前の任意の適切なポイントにおいて、ディスアセンブリされたVLP成分が組み合わされる。例えば、いくつかの酵母株において生じるように、発現されたVP1タンパク質からVLPが自発的に形成する場合、このアプローチは適切である。VP1タンパク質の発現が

50

、自発的なVLP形成をもたらさない場合、VLPへのアセンブリの前に、VP1タンパク質またはカプソマーの製剤を組み合わせてもよい。

【0024】

多価VLPを使用する場合、好ましくは、VLPの成分は、最終的に混合されたVLPにおいてそれらが所望される割合で、混合される。例えば、ノーウォークウイルス(Norwalk virus)およびヒューストンウイルス(Houston virus)(または他のノロウイルス株)由来の同量の部分精製VP1タンパク質の混合により、ほぼ等量の各タンパク質を伴う多価VLPが提供される。

【0025】

多価VLPを含む組成物は、国際公開第98/44944号、国際公開第00/45841号(本明細書において参照により援用される)に記載のような当該技術分野において公知の溶液によって、安定化してもよい。

10

【0026】

本発明の組成物は、VP1およびVP2タンパク質または誘導体に加えて、他のタンパク質またはタンパク質フラグメントを含んでもよい。また、他のタンパク質またはペプチドを、本発明の組成物と共に同時投与してもよい。任意選択により、組成物はまた、非ノロウイルス抗原と共に処方もしく、または同時投与してもよい。適切には、これらの抗原は、他の疾患を防御することができる。

【0027】

VP1タンパク質または機能的タンパク質誘導体は、適切には、VLPを形成することが可能であり、VLP製剤は、例えば、電子顕微鏡および動的レーザ光散乱などの標準的な技術によって評価することができる。

20

【0028】

抗原の調製

本発明の抗原分子は、生物体内で天然に存在するものを単離および精製することによって調製されるか、または組み換え技術によって調製され得る。好ましくは、ノロウイルスVLP抗原は、Sf9またはH5細胞などの昆虫細胞から調製されるが、さらに、大腸菌(E. coli)、もしくは酵母細胞、例えば、S. cerevisiae(S. cerevisiae)、S. pombe(S. pombe)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などの任意の適切な細胞、または他のピキア(Pichia)発現系、CHOもしくはHEK系などの哺乳動物細胞発現を使用してもよい。組み換え方法または合成によって調製する場合、ペプチドを構成するアミノ酸の1つ以上の挿入、欠失、逆位または置換を行ってもよい。上記の抗原のそれぞれは、好ましくは、実質的に純粋な状態で使用される。

30

【0029】

昆虫細胞培養におけるノロウイルスVLPの產生手順については、米国特許第6,942,865号(本明細書においてその全体が参照により援用される)において先に公開されている。簡単に説明すると、ウイルスカプシド遺伝子(ORF2)とマイナーな構造遺伝子(ORF3)とを含有するゲノムの3'末端由来のcDNAをクローニングした。ウイルスカプシド遺伝子を担持する組み換えバキュロウイルスを、クローニングしたcDNAから構築した。ノロウイルスVLPは、Sf9またはH5昆虫細胞培養において產生させた。

40

【0030】

アジュバント

本発明は、ノロウイルス抗原と共に使用するためのアジュバントを含む組成物をさらに提供する。ほとんどのアジュバントは、水酸化アルミニウムまたは鉛油などの、迅速な異化作用から抗原を防御するように設計された物質、およびボルデテラ・パータシス(Bordetella pertussis)またはヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)に由来するタンパク質などの、免疫応答の刺激因子を含有する。適切なアジュバントは市販されており、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント(Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); Merckアジュバント65(Merck and Company, Inc., Rahway, N

50

.J.) ; 水酸化アルミニウムゲル (alum) またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ; カルシウム、鉄または亜鉛の塩 ; アシル化チロシンアシル化糖の不溶性懸濁液 ; カチオンまたはアニオン誘導体化多糖類 ; ポリホスファゼン ; 生分解性マイクロスフェア ; ならびに Quil A がある。

【0031】

また、適切なアジュバントとして、 toll 様受容体 (TLR) アゴニスト、モノホスホリル脂質 A (MPL) 、合成脂質 A 、脂質 A 擬似体または類似体、アルミニウム塩、サイトカイン、サポニン、ムラミルジペプチド (MDP) 誘導体、 CpG オリゴ、グラム陰性細菌のリボ多糖 (LPS) 、ポリホスファゼン、エマルジョン、ピロソーム、コキレート、ポリ (ラクチド - コ - グリコリド) (PLG) 微小粒子、ポロキサマー粒子、微小粒子、およびリポソームが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、アジュバントは、細菌に由来する外毒素である。また、 3D MPL または QS21 などの Th1 型応答を刺激するアジュバントも好適である。

【0032】

モノホスホリル脂質 A (MPL) 、サルモネラ (Salmonella) 由来の脂質 A の非毒性誘導体は、ワクチンアジュバントとして開発された強力な TLR-4 アゴニストである (Evans et al. 2003)。前臨床マウス試験では、鼻腔内 MPL が、分泌性、ならびに全身性、体液性応答を増強することが示されている (Baldridge et al. 2000; Yang et al. 2002)。それはまた、 120,000 例を超える患者の臨床試験において、ワクチンアジュバントとして安全かつ有効であることが証明されている (Baldrick et al., 2002; 2004)。MPL は、 TLR-4 受容体を介して自然免疫の誘導を刺激し、それ故、グラム陰性およびグラム陽性細菌の両方、ウイルス、および寄生虫を含む広範な感染性病原体に対して非特異的な免疫応答を誘発することが可能である (Baldrick et al. 2004; Persing et al. 2002)。鼻腔内製剤に MPL を封入することによって、自然応答が迅速に誘導されるべきであり、ウイルス暴露 (viral challenge) に対する非特異的免疫応答が誘発される一方、ワクチンの抗原成分によって生じる特異的応答が増強される。

【0033】

従って、一実施形態では、本発明は、獲得および自然免疫のエンハンサーとしてモノホスホリル脂質 A (MPL (登録商標)) または 3 脱 - O - アシル化モノホスホリル脂質 A (3D-MPL (登録商標)) を含む組成物を提供する。化学的に、3D-MPL (登録商標) は、 3 脱 - O - アシル化モノホスホリル脂質 A と 4,5 または 6 アシル化鎖との混合物である。3 脱 - O - アシル化モノホスホリル脂質 A の好適な形態が、欧州特許第 0689454 B1 号 (SmithKline Beecham Biologicals SA) (本明細書において参照により援用される) に開示されている。別の実施形態では、本発明は、合成脂質 A 、脂質 A の擬似体または類似体、例えば、BioMira 製 P E T 脂質 A 、もしくは TLR-4 アゴニストのように機能するように設計された合成誘導体を含む組成物を提供する。

【0034】

用語「有効アジュバント量」または「アジュバントの有効量」は、当業者によって良好に理解され、投与された抗原に対して免疫応答を刺激することが可能な 1 つ以上のアジュバントの量、即ち、投与された抗原組成物の免疫応答を増加する量を含み、それは、鼻洗浄液中の IgA レベル、血清 IgG もしくは IgM レベル、または B および T 細胞増殖について測定される。免疫グロブリンレベルにおける適切に有効な増加は、何もアジュバントを伴わない同じ抗原組成物と比較して、 5 % を超える、好ましくは、 25 % を超える、特に、 50 % を超える増加を含む。

【0035】

送達剤

本発明はまた、抗原取り込みを増強するか、デポー効果を提供するか、または送達部位における抗原保持時間を増加する (例えば、抗原の排除を遅延する) ように機能する送達剤を含む組成物を提供する。そのような送達剤は、生体付着性剤であってもよい。特に、生体付着剤は、キトサン、キトサン塩、またはキトサン塩基 (例えば、キトサングルタミ

10

20

30

40

50

ン酸)などの粘膜付着性剤であってもよい。

【0036】

甲殻類の外殻のキチンに由来する正に荷電した直鎖状多糖であるキトサンは、上皮細胞およびそれらの表面を覆う粘膜層のための生体付着剤である。キトサンを伴う抗原の製剤は、それらの鼻粘膜との接触時間を増加し、それ故、デポー効果による取り込みを増加する (Ilium et al. 2001; 2003; Davis et al. 1999; Bacon et al. 2000; van der Lubben et al. 2001; 2001; Lim et al. 2001)。キトサンは、動物モデルおよびヒトの両方においてインフルエンザ、百日咳およびジフテリアを含むいくつかのワクチンの鼻送達システムとして試験されている (Ilium et al. 2001; 2003; Bacon et al. 2000; Jabbal-Gill et al. 1998; Mills et al. 2003; McNeela et al. 2004)。これらの治験では、キトサンが、全身免疫応答を非経口ワクチン接種に等価なレベルまで増強することを示した。加えて、粘膜分泌液においてもまた、有意な抗原特異的 Ig A レベルが測定された。それ故、キトサンは、鼻ワクチンの有効性を顕著に増強することができる。さらに、その物理学的特長のため、キトサンは、粉末として処方される鼻腔内ワクチンに特に良好に適している (van der Lubben et al. 2001; Mikszta et al. 2005; Huang et al. 2004)。

【0037】

従って、一実施形態では、本発明は、鼻腔内投与に適応された抗原またはワクチン組成物を提供し、ここで、組成物は、抗原および有効量のアジュバントを含む。好適な実施形態では、本発明は、キトサンなどの少なくとも 1 つの送達剤および MPL (登録商標)、C PG、イミキモド、ガルジキモド、あるいは合成脂質 A または脂質 A 擬似体もしくは類似体などの少なくとも 1 つのアジュバントとの組み合わせで、ノロウイルス VLP などのノロウイルス抗原を含む抗原またはワクチン組成物を提供する。

【0038】

キトサンの分子量は、10 kDa ~ 800 kDa の間、好ましくは、100 kDa ~ 700 kDa の間、より好ましくは、200 kDa ~ 600 kDa の間であってもよい。組成物中のキトサンの濃度は、典型的に、約 80% (w/w) まで、例えば、5%、10%、30%、50%、70% または 80% である。キトサンは、好ましくは、少なくとも 75% 脱アシル化、例えば、80 ~ 90%、より好ましくは、82 ~ 88% 脱アシル化されているものであり、特定の例として、83%、84%、85%、86% および 87% 脱アシル化される。

【0039】

ワクチンおよび抗原製剤

本発明の組成物は、ワクチンまたは抗原製剤としての投与のために処方することができる。本明細書において使用する用語「ワクチン」は、脊椎動物に投与することが可能な形態であり、感染を防御および / または改善するため、ならびに / あるいは感染の少なくとも 1 つの症状を減少させるため、ならびに / あるいは別の用量の VLP もしくは抗原の効力を増強するために、免疫を誘導するのに十分な防御免疫応答を誘導する上記のような本発明のノロウイルス VLP または他のノロウイルス抗原を含有する製剤を指す。本明細書において使用する用語「抗原製剤」または「抗原組成物」は、脊椎動物に投与する場合、例えば、哺乳動物が免疫応答を誘導する製剤を指す。本明細書において使用する用語「免疫応答」は、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を指す。体液性免疫応答は、例えば、感染因子を中和する、感染因子の細胞への侵入を阻止する、前記感染因子の複製を阻止する、および / または感染および破壊から宿主細胞を防御する抗体の B リンパ球による産生を刺激することに関与する。細胞性免疫応答は、脊椎動物 (例えば、ヒト) に認められる感染因子に対する T - リンパ球および / またはマクロファージなどの他の細胞によって仲介される免疫応答を指し、感染を防御もしくは改善するか、またはその少なくとも 1 つの症状を減少する。特に、「防御免疫」または「防御免疫応答」は、脊椎動物 (例えば、ヒト) に認められる感染因子に対する免疫、または免疫応答を誘発することを指し、感染を防御もしくは改善するか、またはその少なくとも 1 つの症状を減少させる。具体的には、ワクチンの投与から防御免疫応答が誘導されることは、胃腸炎の 1 つ以上の症状が

10

20

30

40

50

解消または減少されること、あるいはそのような症状の期間または重症度が減少することから明白である。ノロウイルス由来の胃腸炎の臨床症状として、恶心、下痢、軟便、嘔吐、発熱、および全身の倦怠感が挙げられる。疾患症状を減少または解消する防御免疫応答は、ノロウイルスの集団発生の拡大を減少または停止させる。ワクチンの調製については、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newm an M. J.) (1995) Plenum Press New York) に概説されている。本発明の組成物は、例えば、口、消化器、および呼吸器（例えば、鼻）粘膜のうちの1つ以上への送達のために、処方することができる。

## 【0040】

組成物が、呼吸器（例えば、鼻）粘膜への送達を意図する場合、典型的に、エアゾルまたは点鼻薬として投与するための水溶液としてか、あるいは、例えば、鼻道内における迅速な被着のための乾燥粉末として、処方される。点鼻薬として投与するための組成物は、そのような組成物に通常含まれるタイプの1つ以上の賦形剤、例えば、保存剤、粘度調整剤、張度調整剤、緩衝剤などを含有してもよい。増粘剤は、微結晶セルロース、キトサン、澱粉、多糖類などであり得る。乾燥粉末として投与するための組成物もまた、そのような組成物に通常含まれる1つ以上の賦形剤、例えば、粘膜付着性剤、充填剤、ならびに適切な粉末流動およびサイズ特徴を送達するための剤を含有してもよい。充填剤ならびに粉末流動化およびサイズ剤として、マンニトール、スクロース、トレハロース、およびキシリトールを挙げることができる。

## 【0041】

一実施形態では、本発明のノロウイルスワクチンまたは抗原製剤は、免疫原として1つ以上のノロウイルス遺伝子群抗原、MPL（登録商標）などのアジュバント、粘膜表面への付着を促進するためのキトサンなどのバイオポリマー、ならびにマンニトールおよびスクロースなどの充填剤を含有する。例えば、ノロウイルスワクチンは、1つ以上のノロウイルス遺伝子群抗原（例えば、ノーウォークウイルス（Norwalk virus）、ヒューストンウイルス（Houston virus）、スノーマウンテンウイルス（Snow Mountain virus））、MPL（登録商標）アジュバント、キトサン粘膜付着剤、ならびに充填剤としておよび適切な流動特徴を提供するためのマンニトールおよびスクロースを含有する10mgの乾燥粉末として処方してもよい。製剤は、約7.0mg（25～90%w/wの範囲）のキトサン、約1.5mgのマンニトール（0～50%w/wの範囲）、約1.5mgのスクロース（0～50%w/wの範囲）、約25μgのMPL（登録商標）（0.1～5%w/wの範囲）、および約100μgのノロウイルス抗原（0.05～5%w/wの範囲）を含んでもよい。

## 【0042】

ノロウイルス抗原は、約0.01%（w/w）～約80%（w/w）の濃度で存在してもよい。一実施形態では、ノロウイルス抗原は、両鼻孔（1つの鼻孔あたり10mg）への投与について、10mgの乾燥粉末製剤あたり約5μg、約15μg、約25μg、約50μg、約100μg、約200μg、約500μg、および約1mg（0.05、0.15、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、および10.0%w/w）、または一方の鼻孔への投与について、20mgの乾燥粉末製剤あたり約10μg、約30μg、約50μg、約100μg、約200μg、約400μg、約1mg、および約2mg（0.1、0.3、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0および20.0%w/w）の用量で処方することができる。製剤は、それぞれの投与中一方の鼻孔に投与してもよく、または両方の鼻孔に投与してもよい。免疫応答を改善するために、1回目の投与の1～12週間後に追加投与を行ってもよい。ワクチンおよび抗原製剤中の各ノロウイルス抗原の含有量は、1μg～100mgの範囲、好ましくは、1～1000μgの範囲、より好ましくは、5～500μg、最も典型的には、10～200μgの範囲であり得る。各用量において投与される全ノロウイルス抗原は、約10μg、約30μg、約200μg、約250μg、約400μg、約500μg、または約1000μgのいずれかであり得る。ワクチン全用量を、一方の鼻孔に投与することができ、または両鼻孔への投与のた

10

20

30

40

50

めに、半分に分割することができる。乾燥粉末特徴は、直径 10  $\mu\text{m}$  未満の粒子が粒子の 10 % 未満であることである。平均粒度は、直径 10 ~ 500  $\mu\text{m}$  の範囲である。

【0043】

別の実施形態では、抗原およびワクチン組成物は、被験体へのその後の投与のために、液体として処方することができる。鼻腔内投与を意図する液体製剤は、ノロウイルス遺伝子群抗原、アジュバント、およびキトサンなどの送達剤を含む。筋肉内 (i.m.) 投与のための液体製剤は、ノロウイルス遺伝子群抗原、アジュバント、および緩衝液を含み、送達剤（例えば、キトサン）を伴わない。

【0044】

好ましくは、上記の抗原およびワクチン組成物は、それらを使用する準備ができ、その時点で、それらが希釈剤によって再構成されるまで、凍結乾燥され、貯蔵される。あるいは、組成物の異なる成分は、キット中に個別に貯蔵されてもよい（任意のまたはすべての成分が凍結乾燥される）。成分は、乾燥製剤のための凍結乾燥形態のままでもよく、または液体製剤のために再構成してもよく、使用前に混合されるか、または患者に個別に投与されるかのいずれかである。乾燥粉末投与のために、ワクチンまたは抗原製剤を、鼻腔内送達デバイスに予め充填し、使用するまで貯蔵してもよい。好ましくは、そのような鼻腔内送達デバイスは、その内容物の安定性を保護および確実にする。

10

【0045】

抗原製剤およびワクチンの凍結乾燥は当該技術分野において周知である。典型的に、液体の抗原は、凍結乾燥プロセス中の抗原を保護し、所望の粉末特徴を伴うケーキを産出するための剤の存在下で凍結乾燥される。スクロース、マンニトール、トレハロース、またはラクトースなどの糖（10 ~ 200 mg / mL の初期濃度で存在する）は、タンパク質抗原の凍結保護のために、および所望の粉末特徴を伴う凍結乾燥されたケーキを産出するために、一般的に使用される。組成物を凍結乾燥することは、理論的に、より安定な組成物をもたらす。ほとんどの処方プロセスの目的は、タンパク質の凝集および分解を最小限にすることであるが、本発明者らは、凝集した抗原の存在により、ノロウイルス VLP に対する免疫応答が増強されることを開示した（実施例 3 および 4 を参照のこと）。従って、本発明者らは、抗原の凝集の百分率を凍結乾燥プロセス中に制御して、凝集した抗原無傷（intact）の抗原の最適な比を求めて、最大の免疫応答を誘導することができる方法を開発した。

20

【0046】

それ故、本発明はまた、（a）ノロウイルス抗原、スクロース、およびキトサンを含む凍結乾燥前溶液を調製すること（ここで、スクロース対キトサンの比は約 0 : 1 ~ 約 10 : 1 である）と；（b）溶液を液体窒素で凍結することと；（c）周囲温度で 48 ~ 72 時間、凍結溶液を凍結乾燥すること（ここで、最終凍結乾燥生成物は、ある百分率の前記ノロウイルス抗原を凝集形態で含有する）とを含む、ノロウイルス抗原製剤を作製する方法を包含する。一実施形態では、凍結乾燥前溶液は、充填剤をさらに含む。別の実施形態では、前記充填剤はマンニトールである。

30

【0047】

所望される百分率の凝集を得るためにスクロースおよびキトサンの比は、以下の指針によって決定することができる。約 2.5 : 1 ~ 約 10 : 1 の範囲でスクロース対キトサンの重量比を含有する凍結乾燥前混合物は、凍結乾燥後に 95 % を超える無傷のノロウイルス抗原（即ち、5 % 未満の凝集した抗原；実施例 13 を参照のこと）を産出する。約 1 : 1 ~ 約 2.1 : 1 のスクロース対キトサン重量比の範囲が、約 50 % ~ 約 90 % の無傷のノロウイルス抗原（即ち、約 10 % ~ 約 50 % の凝集した抗原）を産出する。スクロース対キトサンの重量比が 0 : 1 であれば、30 % 未満の無傷のノロウイルス抗原が生じる。スクロースおよびキトサンが両方とも含まれていなければ、5 % 未満の無傷な抗原（即ち、95 % を超える凝集した抗原）を生じる。これらの指針を使用すれば、当業者は、凍結乾燥前混合物におけるスクロース対キトサン重量比を調整して、最適な免疫応答を生じさせるのに必要な所望される量の凝集体を得ることが可能である。

40

50

## 【0048】

加えて、スクロースおよびキトサンを凍結乾燥前溶液に封入することによって、無傷のノロウイルス抗原の経時的な安定性が促進される。製剤用量における凝集した抗原／無傷の抗原の比は、乾燥粉末として貯蔵する場合、約12箇月以上の期間、増加しない（実施例10を参照のこと）。それ故、この凍結乾燥手順は、凝集したノロウイルス抗原対無傷のノロウイルス抗原の予想可能かつ制御可能な比を伴う安定な製剤を確実にする。

## 【0049】

## 免疫応答を刺激する方法

各抗原またはワクチン製剤用量における抗原の量は、有意な有害な副作用を伴わずに、強い免疫応答を誘導する量として選択される。そのような量は、どのような特異的抗原が用いられるか、投与経路、および使用されるアジュバントに依存して、変動する。一般に、本発明に関して、患者に投与される用量は、患者において経時的に防御免疫応答を生じさせるか、または抗原特異的抗体の産生を誘導するのに十分であるべきである。それ故、組成物は、特異的抗原に対して免疫応答を誘発する、ならびに／あるいは疾患または感染由来の症状および／または合併症を予防、緩和、減少、もしくは治癒するのに十分な量で患者に投与され、ひいては、ノロウイルスの集団発生の拡大を減少または停止させる。これを達成するのに適切な量は、「治療有効用量」として定義される。

10

## 【0050】

ノロウイルス抗原の実質的に純粋な形態では、各用量は、製剤中の各ノロウイルス抗原について約1μg～10mg、好ましくは、約15～500μgを含むことが期待される。本発明の抗原製剤を用いる典型的な免疫化法では、製剤は、何回かに分けた用量（例えば、1～4回）（各用量は各抗原の1～1000μgを含有する）で投与してもよい。用量は、組成物が生じる免疫学的活性および患者の病態、ならびに処置しようとする患者の体重または体表面積によって決定される。用量のサイズはまた、特定の患者における特定の組成物の投与に伴い得る任意の有害な副作用の存在、性質、および程度によって決定される。

20

## 【0051】

本発明の抗原およびワクチン製剤は、非粘膜を介して投与してもよく、または粘膜経路を介して投与してもよい。これらの投与は、非経口的注入（例えば、静脈内、皮下、および筋肉内）、または他の従来の直接的経路、例えば、口腔／舌下、直腸、経口、鼻、局所（例えば、経皮および眼）、腔、肺、動脈内、腹腔内、眼内、もしくは鼻腔内経路を介するか、あるいは特定の組織へ直接的なインビオ投与を含んでもよい。あるいは、本発明のワクチンは、経口、局所、皮下、粘膜、静脈内、筋肉内、鼻腔内、舌下、経皮、真皮下、皮内および坐剤を介するような多様な経路のいずれかによって、投与してもよい。投与は、針、カテーテル、または関連するデバイスを、单一の時点もしくは複数の時点で使用する直接的投与によって、簡単に達成することができる。

30

## 【0052】

好適な実施形態では、本発明の抗原およびワクチン製剤は、鼻腔内経路によって投与される。粘膜表面を介する免疫化は、他の免疫化経路よりも多数の潜在的利点を付与する。最も明白な便益性は、1) 粘膜免疫化が、投与のための針、または高度に訓練された人員を必要としないこと、および2) 免疫応答が、病原体の進入部位において、ならびに全身的に惹起されることである（Isaka et al. 1999; Kozlowski et al. 1997; Mestecky et al. 1997; Wu et al. 1997）。

40

## 【0053】

さらなる態様では、本発明は、患者の粘膜表面（好ましくは、鼻腔内）に、1つ以上のノロウイルス抗原、少なくとも1つの有効なアジュバントおよび／または少なくとも1つの送達剤を含む抗原またはワクチン組成物を投与することによって、IgA粘膜免疫応答およびIgG全身性免疫応答を誘発する方法を提供する。

## 【0054】

本発明はまた、上記で定義したノロウイルス抗原、および上記で定義したような少なく

50

とも1つのアジュバントまたは少なくとも1つの送達剤の鼻腔内製剤を投薬するための手段を提供することも考慮している。投薬デバイスは、例えば、エアゾル送達システムの形をとってもよく、ただ1回の用量、または複数回の用量を投薬するように構成してもよい。そのようなデバイスは、計量された用量のワクチンまたは抗原製剤を鼻道に送達する。適切なデバイスの他の例として、ドロッパー、スワブ、エアロゾライザー、インサフレーター（例えば、Valois Monopowder Nasal Administration Device、単回用量のBespak UniDose DP乾燥粉末鼻腔内送達デバイス）、ネブライザー、および吸入器が挙げられるが、これらに限定されない。デバイスは、被験体が製剤を鼻腔に吸入することを必要とする受動的手段によって、抗原またはワクチン製剤を送達してもよい。あるいは、デバイスは、用量を鼻腔に圧送または噴霧することによって、製剤を能動的に送達してもよい。抗原製剤またはワクチンは、1つ以上のそのようなデバイスによって、一方または両方の鼻孔に送達してもよい。投与は、1例の被験体あたり2つのデバイス（1つの鼻孔あたり1つのデバイス）を含むことができる。有効成分（ノロウイルス抗原）の実際の用量は、約5～1000 μgであってもよい。好適な実施形態では、抗原またはワクチン製剤は、鼻通路の近くに保持される製剤を含有するデバイスからの鼻道内における迅速な被着によって、鼻粘膜に投与される。

10

#### 【0055】

本発明はまた、1つ以上のノロウイルス抗原に対する抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、上記のようなワクチンまたは抗原製剤の被験体への投与を含む。これらの抗体は、当該技術分野において日常的な方法によって単離および精製することができる。ノロウイルス抗原に特異的な単離された抗体は、診断用免疫学的アッセイの開発に使用することができる。これらのアッセイを用いて、臨床サンプル中のノロウイルスを検出し、感染を引き起こす特定のウイルス（例えば、ノーウォーク（Norwalk virus）、ヒューストン（Houston virus）、スノーマウンテン（Snow Mountain）など）を同定することができる。あるいは、単離された抗体を、ノロウイルス感染が疑われる被験体に投与して、受動免疫または短期免疫を付与することができる。

20

#### 【0056】

本発明は、ワクチンを被験体に投与することを含む、被験体において、ノロウイルス感染に対する防御免疫を誘発するための方法を提供し、ここで、前記ワクチンは、ノロウイルスVLPおよび少なくとも1つのアジュバントを含む。一実施形態では、被験体はヒトであり、ワクチンは、ノロウイルス感染の1つ以上の症状に対する防御を付与する。ノロウイルス抗原によって免疫応答を誘発する方法が他で報告されている（米国特許出願公開第2007/0207526号を参照のこと）が、ヒトにおける防御免疫応答の誘導を実証したものはない。ワクチンの有効性が血清抗体と相關する、米国において現在許諾されているいくらかのワクチンとは異なり、研究により、ノーウォークウイルス（Norwalk virus）に対する血清抗体の力値の増加などの免疫応答のマーカーは、ヒトの防御免疫に関連しないことが示されている（Johnson et al. (1990) J. Infectious Diseases 161:18-21）。さらに、ヒトにおけるノーウォーク（Norwalk）ウイルス暴露について調べた別の研究により、ノーウォーク（Norwalk）感染に対する感受性は、多機能的であり、分泌型の状態およびメモリー粘膜免疫応答などの因子を含むことが示された（Lindesmith et al (2003) Nature Medicine 9: 548-553）。ノロウイルスは、インビトロで培養することができないため、現在利用可能なウイルス中和アッセイは存在しない。中和アッセイの代わりとして役立つ機能アッセイは、血球凝集阻害（HAI）アッセイである。ノロウイルスVLPは赤血球抗原に結合するため、HAIは、ノロウイルスワクチンから誘導される抗体が、ノロウイルスVLPによる抗原被覆赤血球の凝集を阻害する能力を測定する。このアッセイでは、一定量のノロウイルスVLPを、免疫した被験体由来の一定量の赤血球および血清と混合する。血清サンプルが機能的抗体を含有する場合、抗体は、赤血球への結合についてVLPと競合し、それによって、赤血球の凝集を阻害する。

30

#### 【0057】

ロタウイルスなどの他のウイルスのワクチンでも、類似の所見が観察されている。ロタ

40

50

ウイルスワクチンについては、血清抗体が直接防御に関与するのか、または最近の感染を単に反映するものなのかについて論争されている (Jiang, 2002; Franco, 2006)。防御に関してそのような関連する事柄を定義することは、ロタウイルスまたはノロウイルスなどの下痢性疾患に関しては特に困難であり、ここで、防御について推論しようとする前臨床試験は、粘膜免疫 (例えば、腸 Ig A)、サイトカイン同化、および細胞性免疫による多面的寄与の影響を受け得る。臨床開発においてそのような免疫応答を測定することが困難であること、および血清抗体測定との相関が認められないことから、ヒト臨床暴露実験のみを介して、これらのタイプのウイルスのワクチンの有効性を実証し得ることが要求される。

## 【0058】

10

上記のように、本発明のワクチンの投与は、ノロウイルス感染の少なくとも 1 つの症状を予防および / または減少させる。ノロウイルス感染の症状は、当該技術分野において周知であり、悪心、嘔吐、下痢、および胃痙攣を含む。

## 【0059】

20

さらに、ノロウイルスに感染した患者は、低度の発熱、頭痛、悪寒、筋肉痛、および疲労を呈し得る。本発明はまた、被験体に本発明のワクチン製剤を投与して、ノロウイルス感染に関連する少なくとも 1 つの症状が緩和および / または減少されるようにすることによって、ノロウイルス感染を経験する被験体において、防御免疫応答を誘導する方法を包含する。症状の減少は、自覚的または他覚的、例えば、被験体の自己評価によって、臨床医の評価によって、あるいは例えば、生活の質の評価、ノロウイルス感染またはさらなる症状の進行の遅延、ノロウイルス症状の重症度の減少を含む適切なアッセイもしくは測定 (例えば、体温)、または適正なアッセイ (例えば、抗体価、RT - PCR 抗原検出、および / または B 細胞もしくは T 細胞活性化アッセイ) を行うことによって、決定してもよい。有効な応答はまた、糞便サンプル中のウイルス含有量を直接測定する (例えば、RT - PCR) ことによって決定してもよく、これは、腸から放出されたウイルスの量を反映する。他覚的評価は、動物およびヒトの評価の両方を含む。

## 【0060】

30

本明細書において開示するワクチンおよび抗原製剤の動物モデルにおける安定性および効力については、国際出願第 PCT / US07 / 79929 号 (その全体が参照により本明細書に援用される) に報告されている。

## 【実施例】

## 【0061】

40

## 実施例

これより、以下の実施例に記載の特定の実施形態を参考にして、より詳細に本発明を示す。実施例は、本発明の純粋な例示を意図するものであり、決してその範囲を限定することを意図しない。

## 【0062】

50

## 実施例 1. ウサギにおけるノロウイルスワクチン製剤の GLP 毒性試験

本試験の目的は、ウサギへの 3 回の鼻腔内投薬後、ノーウォークウイルス (Norwalk virus) - ウイルス様粒子 (NV - VLP) ワクチンの潜在的毒性を評価することであった。NV - VLP ワクチンは、(10 mg の乾燥粉末あたり) 25 µg の遺伝子群 I VLP、25 µg の MPL、7 mg のキトサングルタミン酸、1.475 mg のマンニトール、および 1.475 mg のスクロースを含有した。試験は、8 週間の期間、行った。4 週間の非処置回復間隔後、効果の持続性、可逆性、または発症の遅延を評価した。60 匹のニュージーランドホワイト (New Zealand White) 種ウサギ (30 匹 / 性別) を、無作為に 3 つの群 (10 匹のウサギ / 性別 / 群) に割り当てた。群 1 の動物には、投薬しなかつた (即ち、未処置)。群 2 の動物に、10 mg / 鼻孔 (合計で 20 mg) のプラセボ (即ち、アジュバント / 賦形剤: MPL、キトサン、スクロース、およびマンニトール) を投与した。群 3 の動物に、10 mg / 鼻孔 (合計で 20 mg) の NV - VLP ワクチン (1 つの鼻孔あたり 25 µg の抗原 (合計で 50 µg) を示す) を投与した。群 2 および 3 の

動物に対し、試験日（SD）1、22、および43日目に、Bespak Unidose鼻腔内乾燥粉末デバイスを使用する鼻腔内投与によって、投薬を行った。動物（5匹/群/性別）を、SD46および74日目に、全体的な肉眼的剖検に供した。試験中に評価したパラメータには、死亡率、臨床観察およびケージ観察、体重、体重変化、食物摂取、体温、眼科検査、臨床病理（臨床検査、血液検査、および尿検査）、肉眼的病理、器官重量データ、および組織病理が含まれる。試験の概要を表1にまとめて示す。試験の結果を表2にまとめて示す。

【0063】

【表1】

10

表1. ノーオークワクチン製剤のGLP毒性試験の試験パラメータ

種	耳タグIDを伴うSPFニュージーランドホワイト種ウサギ
動物数/性別/用量群	10匹の雄および10匹の雌/群
試験における動物の総数	60匹
群1	非処置対照
群2	アジュバント/賦形剤
群3	アジュバント/賦形剤中に1×最大ヒト用量VLP

【0064】

【表2】

20

表2. ノーオークワクチン製剤の安全および毒物学所見

観察	死亡率、臨床観察またはケージ観察に対する処置関連の影響なし
体重および体重変化	体重または体重変化に対する有害作用なし
食物摂取	食物摂取に対する処置関連の有害作用なし
体温	体温に対する処置関連の有害作用なし
眼科	試験中、いずれの動物においても眼病巣は認められなかった
臨床病理	NV-VLPワクチンまたはアジュバント/賦形剤を投与したウサギにおけるBリンパ球のポリクローナル活性化が、3～76日目に認められた。 NV-VLPワクチンまたはアジュバント/賦形剤を投与したウサギの絶対単球数が3～46日目に増加した。 選択された尿検査パラメータに対する処置の影響は認められなかった。
肉眼的病理	処置関連の観察なし
器官の重量	絶対的または相対的な器官の重量に対する有害作用なし
組織病理	NV-VLPワクチンあるいはアジュバント/賦形剤を投与したウサギの鼻甲介の粘膜固有層内か、もしくは鼻道内において離れて認められる様々な程度の炎症性浸潤、および／または鼻道内に認められる出血。 観察された病巣は、免疫反応において予想される病巣である。両群の病巣は、本質的に制限され、そしてSD74までに完全に消失した。

30

【0065】

ケージ観察では、有意な所見は認められなかった。血液検査の測定値（グロブリンおよび総タンパク質の増加）は、Bリンパ球ポリクローナル活性化の特徴を示したが、これは、アジュバントの影響が原因と考えられる。組織病理学的所見は、両方の群のウサギの鼻甲介の粘膜固有層内か、もしくは鼻道内において離れて認められる様々な程度の炎症性浸潤、および／または鼻道に認められる軽度の出血からなった。観察された病巣は、免疫反応において予想され得るものであった。両群の病巣は、本質的に制限され、試験日74日目に完全に消失した。

40

【0066】

ELISAによりNV-VLP特異的IgGについて分析した血清学的サンプルは、単回投薬の10日目に、免疫動物の30%において測定可能な抗NV-VLP力値を示した（図1を参照のこと）。22および43日目の追加処置により、抗体陽転した動物数およ

50

び産物特異的抗体のレベルの両方が増加し、73日目までに、免疫動物の90%が抗体陽転した。未処置またはマトリックス処置対照のうち、定量化可能なレベルのNV-VLP特異的抗体を有するものは認められなかった（データ示さず）。

#### 【0067】

1、15および29日目に同じ製剤で鼻腔内に免疫を行ったさらなる組のウサギのメモリーB細胞応答を評価することによって、免疫応答をさらに特徴付けた。国際出願第PCT/US07/79929号（その全体が参照により本明細書に援用される）に記載のように、メモリーB細胞応答を測定した。最後の追加処置の156日後に採取した組織では、末梢血液、脾臓、および最も顕著には、腸間膜リンパ節においてNV-VLP-特異的メモリーB細胞の存在が認められた。腸間膜リンパ節の抗原-特異的メモリーB細胞は、IgA陽性であった。さらに、NV-VLP-特異的抗体-分泌長寿命形質細胞が骨髄に存在した。

10

#### 【0068】

##### 実施例2.ヒトにおけるノーウォーク（Norwalk）ワクチン製剤の用量増加安全性試験

ノロウイルス遺伝子群1ワクチンの安全性および免疫原性に関する二重盲検比較用量増加第1相試験を行った。ワクチンは、鼻腔内投与のために設計された乾燥粉末マトリックス中の凍結乾燥されたノーウォーク（Norwalk）ウイルス様粒子（VLP）からなった。ワクチン被験体は、Hの1型抗原分泌型である健常成人志願者を含んだ。Hの1型抗原分泌型の登録の根拠は、Hの1型抗原分泌型がノーウォーク（Norwalk）ウイルス感染に感受性である一方、非分泌型は耐性であることである。対照として、それぞれの用量レベルの2例のさらなる志願者に、マトリックス単独を投与した。乾燥粉末マトリックスは、25μgのMPYL（登録商標）アジュバント、7mgのキトサン、1.5mgのマンニトール、および1.5mgのスクロースを含んだ。志願者に、0および21日目に投薬し、各投薬後の症状について、7日間の日誌を書くように要求した。血清学、抗体分泌細胞（ASC）のための血液、ならびに粘膜抗体評価のための糞便および唾液サンプルを採取した。

20

#### 【0069】

ノーウォーク（Norwalk）VLPワクチンの成分を表3に列挙する。ワクチンを鼻腔内送達デバイス内に包装する。単回投与のノーウォーク（Norwalk）VLPワクチンを、単回用量のBespak（Milton Keynes, UK）UniDose DP乾燥粉末鼻腔内送達デバイスに包装した。各デバイスは、10mgの乾燥粉末ワクチン製剤を送達した。ワクチンの各用量は、2つの送達デバイス（各鼻孔において1つ）よりなった。全ワクチン用量は、20mgの乾燥粉末であった。アジュバント/賦形剤の製剤は、製剤にノーウォーク（Norwalk）VLP抗原が含まれないことを除いて、ノーウォーク（Norwalk）VLPワクチンと同じである。アジュバント/賦形剤の製剤（乾燥粉末マトリックスとも称される）を、表4にまとめて示す。

30

#### 【0070】

#### 【表3】

表3. ノーウォークVLPワクチン組成物

40

成分	分子クラス	10mg乾燥粉末あたりの量	最終製剤の%
ノーウォークVLP	組み換えタンパク質	2.5、7.5、25、または50μg	0.025、0.075、0.25、または0.50%
モノホスホリル脂質A	リン脂質	25μg	0.25%
キトサン	多糖	7.0mg	70%
マンニトール	糖	1.5mg	15%
スクロース	糖	1.5mg	15%

#### 【0071】

50

## 【表4】

表4. アジュバント/賦形剤（乾燥粉末マトリックス）

成分	分子クラス	10mg乾燥粉末あたりの量	最終製剤の%
モノホスホリル脂質A	リン脂質	25 µg	0.25%
キトサン	多糖	7.0 mg	70%
マンニトール	糖	1.5 mg	15%
スクロース	糖	1.5 mg	15%

10

## 【0072】

具体的には、ワクチンの用量増加を、次のとおりに行った：健常者の適切なスクリーニング後、3例の志願者の群を無作為に分けて、鼻腔内経路により、5 µg のノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンおよび乾燥粉末マトリックス (n = 2) または乾燥粉末マトリックス単独 (n = 1) のいずれかを投与した。これらの3例の志願者を、21日間、安全性について追跡し、それらの安全性データを、独立した安全性監視者 (Independent Safety Monitor) (ISM) が検討した。ISMの承認を基に、21日目に、これらの個体に、前回投与したワクチンまたはマトリックスの2回目の投薬を行い、4例のさらなる志願者を無作為に分けて、鼻腔内により、5 µg のVLPタンパク質および乾燥粉末マトリックス (n = 3) またはマトリックス単独 (n = 1) のいずれかを投与した。ISMは、この第2の群由来の安全性データを再検討し、ISMの承認を基に、1回目の投薬の21日後に、2回目の鼻腔内投薬を行った。志願者は、各投薬後の症状について7日間の日誌を書いた。ISMが、次のより高い用量への増加が許容可能であることを決定した後、7例の志願者の別の群を無作為に分け、0日目および21日目に、鼻腔内経路により、15 µg のVLPタンパク質 (n = 5) または乾燥粉末マトリックス単独 (n = 2) を含有するいずれかのノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンを投与した。さらに、7日間の症状日誌に記録を付けさせ、21日目の2回目の投薬前に、ISMが再検討を行った。最後に、最初の2回の投薬コホート由来の安全性データの再検討後、ISMは、用量増加が許容可能であることを決定し、7例の志願者の最終群を無作為に分けて、0日目および21日目に、鼻腔内経路によって、50 µg のVLPタンパク質 (n = 5) または乾燥粉末マトリックス単独 (n = 2) を含有するいずれかのノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンを投与した。21日目の2回目の投薬前に、7日間の症状日誌および安全性データを、ISMが再度検討を行った。

20

## 【0073】

志願者は、ノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンまたは乾燥粉末マトリックス単独の投与後7日間、症状（局所的症状、例えば：鼻漏、鼻痛 / 不快感、鼻詰まり、鼻水、鼻部搔痒感、鼻出血、頭痛、ならびに全身症状、例えば：連日の口腔温、筋肉痛、恶心、嘔吐、腹部痙攣、下痢、および食欲不振を含む）に関する連日の日誌を書いた。暫定的な病歴を、各再診時 (7 ± 1、21 ± 2、28 ± 2、56 ± 2 および 180 ± 14日目) に入手した；志願者に、暫定的な病気、投薬、および医師の受診について質問した。志願者には、再診中に教唆しなかった事象を含むすべての深刻または重度の有害事象について報告するように依頼した。志願者は、CBCおよび血清クレアチニン、グルコース、AST、およびALTについて、7および28日目（各免疫化の7日後）に評価を受け、異常が認められた場合、異常な検査試験値を、試験値が正常になるか、または安定になるまで、追跡した。

30

## 【0074】

盲検データは、低用量 (n = 5) またはマトリックス (n = 2) を投与した志願者のデータを示し、7例中4例が、次のいくつかまたはすべてを報告した：ワクチン接種の最初の24時間後における鼻漏、鼻痛、鼻閉、搔痒感、くしゃみ、頭痛、および / または咽喉

40

50

炎。1例の志願者が、1および6日目のそれぞれに、若干の鼻出血を報告した。中用量( $n = 5$ )またはマトリックス( $n = 2$ )を投与した志願者のうち、7例中5例は、最初の24時間に、軽度の鼻漏、鼻閉、搔痒感、くしゃみ、および/または頭痛を報告した。症状は、最初の72時間で概ね消失したが、1例の志願者では、鼻閉が7日目まで持続した。非盲検データに対する所見の概要を、以下の表5(これはまた、高用量で報告された有害事象も含む)に示す。これらの所見は、鼻腔内ノロウイルスVLPワクチンが、VLP濃度に無関係であるように思われる局所的な、通常、軽度の一時的な症状に関連することを示す。有害事象、血液学、血液化学および/または身体検査の結果について、アジュバント/賦形剤(またはマトリックス)対照群とノーウォーク(Norwalk)VLPワクチン群との間で、差異は認められなかった。

10

【0075】

【表5】

【表5】

表5. ノーウォークVLPワクチンまたはアジュバント/賦形剤に対する有害事象を伴う志願者の数

報告された 有害事象	アジュバント/ 賦形剤 (N=6)	低用量 (N=5)	中用量 (N=5)	高用量 (N=5)*
<b>鼻部および咽喉部</b>				
鼻閉	4	2	3	1
鼻部搔痒感	3	3	2	2
鼻漏	3	3	4	3
鼻痛	-	2	1	2
くしゃみ	3	2	1	3
鼻出血	-	1	1	-
咽喉炎/URI	-	1	-	1
搔痒性の咽喉炎	-	1	-	-
鼻部/咽喉部に おける灼熱感	-	1	-	1
<b>胸部</b>				
咳	2	-	-	-
胸部不快感	-	-	-	1
<b>全身</b>				
頭痛	2	2	1	1
倦怠感	3	2	-	1
恶心	-	1	-	1
腹部痙攣	1	-	-	1
<b>検査値</b>				
ALT/AST	-	1	-	-
AST	1	-	-	-
ALT	-	-	-	1
Alk Phos	-	-	-	1
<b>消化器</b>				
下痢	-	1		1
食欲不振	1	-	1	-
<b>有害事象の報告なし</b>				
	-	-	1	2

\*コホート3の1例の被験体には、2回目の投与を行わなかった

20

30

40

【0076】

免疫化の前および $7 \pm 1$ 、 $21 \pm 2$ 、 $28 \pm 2$ 、 $56 \pm 2$ 、および $180 \pm 14$ 日目に血液を採取して、酵素免疫測定法(ELISA)により、ノーウォーク(Norwalk)VLP

50

Pワクチンに対する血清抗体を測定した。各用量のワクチンまたは乾燥粉末マトリックス単独の投与の前および投与後7日目に、末梢血リンパ球を採取して、ELISPOTアッセイにより抗体分泌細胞を検出した。ワクチン接種前およびワクチン接種後 $21 \pm 2$ 、 $56 \pm 2$ および $180 \pm 14$ 日目に、全血を入手して、ノーウォーク(Norwalk)VLP抗原に対する応答におけるサイトカイン産生およびリンパ球増殖を含む細胞性免疫の将来の研究のために、細胞を分離し、凍結した。抗ノーウォーク(Norwalk)VLP sIgAスクリーニングのために、免疫化前および $7 \pm 1$ 、 $21 \pm 2$ 、 $28 \pm 2$ 、 $56 \pm 2$ 日目、および $180 \pm 14$ 日目に、全糞便サンプルを採取した。免疫化前および $7 \pm 1$ 、 $21 \pm 2$ 、 $28 \pm 2$ 、 $56 \pm 2$ 日目に、市販のデバイス(Salivette, Sarstedt, Newton, NC)により、唾液を採取し、56日目に粘膜抗体について陽性であった場合、 $180 \pm 14$ 日目のサンプルを採取し、抗ノーウォーク(Norwalk)VLP sIgAについてスクリーニングした。最後に、最も高い用量のノーウォーク(Norwalk)VLP( $50 \mu\text{g}$ 、上記の第3のコホート)を投与した志願者由来の血液を、0、21、56および180日目に、メモリーB細胞についてスクリーニングした。

10

#### 【0077】

以下の方法を使用して、免疫した個体または乾燥粉末マトリックス単独を投与した個体から採取した血液、糞便、および唾液サンプルを分析した：

##### A. ELISAによる血清抗体測定

精製された組み換えノーウォーク(Norwalk)VLPを標的抗原として使用するELISAによるノーウォークウイルス(Norwalk virus)に対する抗体の測定のために、ワクチン接種前およびワクチン接種後の複数の時点において、 $20 \text{ mL}$ の血液を採取して、コード化された標本をスクリーニングした。簡単に説明すると、炭酸コーティング緩衝液pH 9.6中ノーウォーク(Norwalk)VLPを使用して、マイクロタイタープレートをコーティングした。コーティングしたプレートを洗浄し、プロッキングし、2倍連続希釈の試験血清と共にインキュベートし、続いて、洗浄およびヒトIgG、IgM、およびIgAに特異的な酵素-コンジュゲート第二抗体試薬とのインキュベーションを行った。適切な基質溶液を添加し、発色させ、プレートを読み取り、IgG、IgM、およびIgAのエンドポイント力値を、各抗体クラスの参照標準曲線と比較して、決定した。陽性の応答を、ワクチン接種後の力値の4倍上昇として定義した。ワクチン用量のそれぞれについての56日目(2回目の免疫化の35日後)の血清力値を、図2に示す。結果は、IgGおよびIgAについての血清力値の用量依存的増加を示す。IgGおよびIgAの両方について有意な血清力値を、 $50 \mu\text{g}$ のノロウイルス抗原を含有するワクチンを投与した志願者において観察した。

20

30

30

#### 【0078】

##### B. 抗体分泌細胞アッセイ

ASCアッセイのために、ヘパリン処理血液(コホート1および2について $30 \text{ mL}$ 、コホート3について $25 \text{ mL}$ )からPBMを採取して、ノーウォーク(Norwalk)VLPに対する抗体を分泌する細胞を検出した。ノーウォーク(Norwalk)VLPワクチンまたは乾燥粉末マトリックス単独の投与後0、 $7 \pm 1$ 、 $21 \pm 2$ 、および $28 \pm 2$ 日目に、これらのアッセイを実施した。各投薬の各時点における応答率および $10^6$ 個のPBMあたりのASCの平均数について記載した。陽性の応答を、すべての被験体についてのワクチン接種前の平均計数を超える少なくとも3標準偏差(SD)である $10^6$ 個のPBMあたりのワクチン接種後のASC計数(対数的測度(log metric))および少なくとも8つのASCスポットとして定義したが、これは、類似のアッセイで決定した培地により刺激された陰性対照のウェル(2つのスポット) + 3SDの平均に対応する。

40

#### 【0079】

$50 \mu\text{g}$ 用量のノーウォーク(Norwalk)VLPのASCアッセイの結果を、図3に示す。循環IgGおよびIgA抗体を分泌する細胞が、初回および追加ワクチン接種の7日後に観察されたが、これは、ワクチンが免疫原性であることを示唆する。

50

#### 【0080】

## C. 機能的抗体応答の測定

上記の段落Bに記載のように採取した機能的抗体応答血清の測定をさらに分析して、抗ノーウォークウイルス(Norwalk virus)抗体の機能的特性を決定した。2倍連続希釈の試験血清を、ノーウォーク(Norwalk)VL P(防御免疫応答を示す機能アッセイ)によって、赤血球の血球凝集を阻害するそれらの能力に関して、分析した。陽性の応答を、ワクチン接種後の力値の4倍上昇として定義した。50 µg用量のノーウォーク(Norwalk)VL Pワクチンを投与した5例の被験体について、56日目(追加処置の35日後)における血清IgG力値および血球凝集阻害力値を表6に示す。結果は、血清IgG力値によって測定され抗体陽転応答を示した個体の75パーセント(75%)がまた、血球凝集阻害によって測定されるとヒト赤血球上の結合性受容体を遮断することが可能な機能的抗体応答を呈したことを示す。

【0081】

【表6】

表6. 5例のヒト志願者についての追加0日目および35日目(35PB)における血清IgGおよび血球凝集阻害(HAI)(機能的)力値

血清IgG力値		
被験体参照	0日目	35PB日目
A	2,444.6	37,185.9
B	4,462.1	23,508.4
C	7,735.7	13,357.8
D	884.5	4,577.5
E	12,719.0	91,710.8
血球凝集阻害(HAI)力値		
被験体参照	0日目	35PB日目
A	8	256
B	8	256
C	512	512
D	<8	8
E	128	1024

【0082】

## D. ノーウォークウイルス(Norwalk virus) - 特異的メモリーB細胞の測定

コホート3からヘパリン処理血液を採取(0および21日目に30mL、56および180日目に50mL)して、インビトロ抗原刺激に続いて、ワクチン接種後0、21、56および180日目に、ELISPOTアッセイを使用してメモリーB細胞を測定した。類似のアッセイを首尾よく使用して、ウサギにおいてノーウォーク(Norwalk)VL P製剤により誘発されるメモリーB細胞の頻度を測定した(国際出願第PCT/US07/79929号(本明細書において参照により援用される)を参照のこと)。末梢血単核細胞( $5 \times 10^6$ 個の細胞/mL、24ウェルプレート中1mL/ウェル)を、4日間、ノーウォーク(Norwalk)VL P抗原(2~10 µg/mL)と共にインキュベートして、抗原-特異的メモリーB細胞のクローンを拡大させ、抗体分泌細胞へ分化させた。対照は、抗原の非存在下で同じ条件でインキュベートした細胞および/または無関連の抗原と共にインキュベートした細胞を含む。刺激後、細胞を洗浄し、計数し、ノーウォークウイルス(Norwalk virus)VL PでコーティングしたELISPOTプレートに移した。全IgG分泌Bリンパ球あたりのウイルス-特異的メモリーB細胞の頻度を決定するために、拡大されたB細胞もまた、抗ヒトIgGおよび抗ヒトIgA抗体でコーティングしたウェルに添加した。結合抗体は、HRP-標識抗ヒトIgGまたは抗ヒトIgA、それに続くTrue Blue基質によって表される。また、IgAおよびIgGサブクラス(IgA1、IgA2およびIgG1~4)に対するコンジュゲートを使用して、異なるエフェクター機構に

10

20

30

40

50

関連し得る抗原 - 特異的サブクラス応答および免疫プライミングの局在を決定してもよい。スポットを、E L I S p o t 読み取り装置により計数した。志願者ごとに拡大された細胞集団を、フローサイトメトリーによって調べて、それらのメモリーB細胞表現型、即ち、C D 1 9 +、C D 2 7 +、I g G +、I g M +、C D 3 8 +、I g D - を確認する。

#### 【0083】

##### E . 細胞性免疫応答

ヘパリン処理血液(50mLコホート1および2、25mLコホート3)を、コードされた標本として採取し、末梢血単核細胞(P B M C)を単離し、ノーウォーク(Norwalk) V L P抗原に対するC M I応答の将来可能な評価のために、液体窒素において凍結保存した。実施され得るアッセイは、ノーウォーク(Norwalk) V L P抗原に対して増殖性のP B M Cおよびサイトカイン応答を含み、確立された技術に従って、インターフェロン(I F N) - およびインターロイキン(I L) - 4レベルを測定することによって、決定することができる。

#### 【0084】

##### F . 抗ノーウォーク(Norwalk) V L P s I g A のための糞便および唾液の採取

糞便および唾液サンプル中の抗組み換えノーウォークウイルス(Norwalk virus) I g Aを測定する。唾液標本を、プロテアーゼ阻害剤(即ち、A E B S F、ロイペプチノ、ベスタチン、およびアプロチニン)(Sigma, St. Louis, MO)で処置し、-70で貯蔵し、先に記載のアッセイ(Mills et al. (2003) Infect. Immun. 71:726-732)の改変法を使用して、アッセイする。ワクチン接種後、複数の日に糞便を採取し、分析まで標本を-70で貯蔵する。標本を融解し、プロテアーゼ阻害剤緩衝液を添加して、10%w/v糞便懸濁液を調製する。以下に記載のように、糞便上清液を、組み換えノーウォークウイルス(Norwalk virus)(r N V) - 特異的粘膜I g Aについて、E L I S Aによって測定する。

#### 【0085】

約2~3mLの全唾液を、ワクチン接種前、およびワクチン接種後の複数の時点で採取した。唾液を、市販のデバイス(Salivette, Sarstedt, Newton, NC)(唾液が染み込むまでSalivetteスワブを咀嚼するか、または30~45秒間、舌の下側に置く)によって採取した。遠心分離によって、スワブから唾液を採取した。

#### 【0086】

##### G . 糞便および唾液中の抗ノーウォーク(Norwalk) V L P の測定

抗ヒトI g A抗体試薬または標的r N V V L P抗原コーティング剤のいずれかでコーティングされたプレートを利用して、E L I S Aを実施して、全I g Aを決定し、各標本について、特異的抗V L P I g A応答の力値を測定する。上記のように、全I g Aまたは特異的I g Aは、H R P - 標識抗ヒトI g Aによって表される。内部全I g A標準曲線を含めて、I g A含有量を定量する。応答は、特異的抗体の4倍上昇として定義される。

#### 【0087】

実施例3.ヒトにおける鼻腔内ノーウォーク(Norwalk) V L Pワクチンの2回投薬の安全性および免疫原性試験

健常者における無作為化二重盲検試験を行って、アジュバント/賦形剤を伴うノーウォーク(Norwalk)ウイルス様粒子(V L P)ワクチンとプラセボ対照(空のデバイス)との2回の投薬レベルの安全性および免疫原性を比較する。ワクチンは、実施例2に記載のように、鼻腔内投与のために設計された乾燥粉末マトリックス中のノーウォーク(Norwalk)ウイルス様粒子(V L P)からなる。ワクチン被験体は、Hの1型抗原分泌型である健常成人志願者を含む。ヒト志願者を、4つの群のうちの1つに無作為に割り当て、各群に、次の処置のうちの1つを投与する: 50 μgの用量のノーウォーク(Norwalk) V L Pワクチン、100 μgの用量のノーウォーク(Norwalk) V L Pワクチン、アジュバント/賦形剤、またはプラセボ。志願者に、0および21日目に投薬し、各投薬後の症状について、7日間の日誌を書くように要求する。血清学、抗体分泌細胞(A S C)のための血液、ならびに粘膜抗体評価のための糞便および唾液サンプルを採取する。

10

20

30

40

50

## 【0088】

ワクチンの成分を、実施例2の表3に列挙する。ワクチンを鼻腔内送達デバイス内に包装する。単回投与のノーウォーク(Norwalk)VL Pワクチンを、単回用量のBespak(Milton Keynes, UK)UniDose DP乾燥粉末鼻腔内送達デバイスに包装する。各デバイスは、10mgの乾燥粉末ワクチン製剤を送達する。ワクチンの各用量は、2つの送達デバイス(各鼻孔において1つ)からなる。全ワクチン用量は、20mgの乾燥粉末である。従って、50μgのワクチン用量は、それぞれ、10mgの乾燥粉末製剤を送達する2つのデバイスからなり、ここで、各10mgの乾燥粉末製剤は、25μgのノーウォーク(Norwalk)VL P、25μgのMPL(登録商標)アジュvant、7mgのキトサン、1.5mgのマンニトール、および1.5mgのスクロースからなる。同様に、100μgのワクチン用量は、それぞれ、10mgの乾燥粉末製剤を送達する2つのデバイスからなり、ここで、各10mgの乾燥粉末製剤は、50μgのノーウォーク(Norwalk)VL P、25μgのMPL(登録商標)アジュvant、7mgのキトサン、1.5mgのマンニトール、および1.5mgのスクロースからなる。アジュvant/賦形剤の製剤は、製剤にノーウォーク(Norwalk)VL P抗原が含まれないことを除いて、ノーウォーク(Norwalk)VL Pワクチンと同じである。アジュvant/賦形剤の製剤(乾燥粉末マトリックスとも称される)を、実施例2の表4にまとめて示す。プラセボ群には、2つの空デバイスを投与する。

## 【0089】

志願者は、ノーウォーク(Norwalk)VL Pワクチン、乾燥粉末マトリックス単独、またはプラセボのいずれかの2回の用量の投与後7日間、症状(局所的症状、例えば：鼻漏、鼻痛/不快感、鼻詰まり、鼻水、鼻部搔痒感、鼻出血、頭痛、ならびに全身症状、例えば：連日の口腔温、筋肉痛、恶心、嘔吐、腹部痙攣、下痢、および食欲不振を含む)に関する連日の日誌を書く。暫定的な病歴を、各再診時(7+1、21+2、28+2、56+2および180+14日目)に入手する；志願者に、暫定的な病気、投薬、および医師の受診について質問する。志願者には、再診中に教唆しなかった事象を含むすべての深刻または重度の有害事象について報告するように依頼する。志願者は、CBCおよび血清クレアチニン、グルコース、AST、およびALTについて、7および28日目(各免疫の7日後)に評価を受け、異常が認められた場合、異常な検査試験値を、試験値が正常になるか、または安定になるまで、追跡する。

## 【0090】

免疫化の前および7+1、21+2、28+2、56+2、および180+14日目に血液を採取して、酵素免疫測定法(ELISA)により、ノーウォーク(Norwalk)VL Pワクチンに対する血清抗体を測定する。各用量のワクチン、乾燥粉末マトリックス単独、またはプラセボの投与の前および7日目に、末梢血リンパ球を採取して、ELISPOTアッセイにより抗体分泌細胞を検出する。ワクチン接種前およびワクチン接種後21+2、56+2および180+14日目に、全血を入手して、ノーウォーク(Norwalk)VL P抗原に対する応答におけるサイトカイン産生およびリンパ球増殖を含む細胞性免疫の将来の研究のために、細胞を分離し、凍結する。抗ノーウォーク(Norwalk)VL P s Ig Aスクリーニングのために、免疫化前および7+1、21+2、28+2、56+2日目、および180+14日目に、全糞便サンプルを採取する。免疫化前および7+1、21+2、28+2、56+2日目に、市販のデバイス(Salivette, Sarstedt, Newton, NC)により、唾液を採取し、56日目に粘膜抗体について陽性であった場合、180+14日目のサンプルを採取し、抗ノーウォーク(Norwalk)VL P s Ig Aについてスクリーニングする。また、0、21、56および180日目に、メモリーB細胞について血液をスクリーニングする。

## 【0091】

免疫した個体、または乾燥粉末マトリックス単独もしくはプラセボを投与した個体から採取した血液、糞便、および唾液サンプルを分析するために使用される方法については、実施例2に詳述している。

10

20

30

40

50

## 【0092】

実施例4. ノーウォークウイルス (Norwalk virus) VLPワクチン製剤で免疫されたヒトにおけるノーウォークウイルス (Norwalk virus) 暴露試験

多施設、無作為化、二重盲検、プラセボ比較第1～2相暴露試験を、上記の実施例2に記載のノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンで免疫した80例のヒト志願者において行った。適格な被験体には、Hの1型オリゴ糖（陽性の唾液分泌型状態によって測定される）を発現し、血液型がB型でもAB型でもない健常な年齢18～50歳の者が含まれる。非Hの1型分泌型であるかまたはB型もしくはABの血液を有する被験体は、ノーウォークウイルス (Norwalk virus) による感染に対してより耐性であることが報告されており、試験から除外される。志願者の少なくとも80%は、これらの2つの基準に基づいて適格であることが予想される。

10

## 【0093】

スクリーニング後、すべての許容判定基準を満たす適格な志願者を、各コホートにおいて約40例の志願者を伴う2つの等しいサイズのコホートのうちの1つに無作為に(1:1)分ける。コホート1を、ノーウォーク (Norwalk) VLPで免疫し、コホート2にプラセボを投与する。志願者を、各鼻孔において10mgのノーウォーク (Norwalk) VLPワクチン(20mgの全乾燥粉末)またはプラセボで免疫する。ノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンの各10mgは、50μgのノーウォーク (Norwalk) VLP、7mgのキトサン、25μgのMPL(登録商標)、1.5mgのスクロースおよび約1.5mgのマンニトールを含有する。それ故、コホート1の各志願者には、全用量で100μgのノーウォーク (Norwalk) VLP抗原を、各免疫化において投与する。試験日0および21日目に、志願者に、ワクチンまたはプラセボを投与する。

20

## 【0094】

プラセボと比較したノーウォークウイルス (Norwalk virus) VLPワクチンの安全性を評価する。志願者は、ワクチンまたはプラセボによる各免疫化後の7日間、日誌を書き、有害事象の重症度および期間を記録する。深刻な有害事象 (SAE) および何らかの有意な新たな病状の発生について、ワクチンまたはプラセボの最後の投薬後の6箇月間、および感染性ウイルスによる暴露後の4箇月間、追跡する。

30

## 【0095】

ワクチンまたはプラセボの2回目の投薬の21～42日後の間(試験日42～56日目の間)、すべての志願者を感染性ノーウォークウイルス (Norwalk virus) に暴露する。各志願者に、50%のヒト感染用量 (HID50)、即ち、プラセボ群の少なくとも50%の志願者において疾患を引き起こすことが予想される感染性ウイルスの量を投与する。HID50は、ノーウォークウイルス (Norwalk virus) の約48～約480の間のウイルス等価物である。ノーウォークウイルス (Norwalk virus) を滅菌水と混合し、経口投与する。播種の前に、水中500mg重炭酸ナトリウムを摂取させ、胃酸およびペプシンによるウイルスの分解を防止する。感染性ウイルスの経口播種の5分後に、重炭酸ナトリウム溶液(水中500mgの重炭酸ナトリウム)の2回目の摂取を行う。志願者は、少なくとも4日間、および急性胃腸炎の症状/徴候(嘔吐、下痢、軟便、腹痛、恶心、および発熱)が認められなくなった後少なくとも18時間、暴露施設に留まる。

40

## 【0096】

いくらかの測度(metrics)が、ウイルス暴露によって誘導される急性胃腸炎の症状/徴候の予防または減少においてノーウォーク (Norwalk) VLPワクチンの効力を決定するためにモニターされる。すべての志願者は、急性胃腸炎の臨床症状を記録し、これらの症状は、試験施設の試験スタッフによって記録される。ワクチン投与したコホート1由來の疾患症状/徴候を、コホート2プラセボレシピエントと比較する。

## 【0097】

ワクチンまたはプラセボによる免疫化の前、および暴露後、すべての志願者から、血清および糞便サンプルを日常的に採取する。血清サンプルを、ELISAにより、IgAおよびIgG、ノーウォーク (Norwalk) VLPに対する力価について、分析する。糞便サ

50

ンブル中のノーウォーク (Norwalk) 抗原およびノーウォーク (Norwalk) RNAを、それぞれE L I S AおよびP C R (ウイルスの存在、腸から放出されるウイルスの量、およびウイルスの放出の期間を示す)によって、試験する。暴露後、病状を呈した被験体を、症状/徴候が消失するまで、血清化学、B U N、クレアチニン、および肝機能試験を含むさらなる検査試験に供する。

## 【0098】

ワクチン群 (コホート1) およびプラセボ群 (コホート2) の結果を比較して、ノロウイルス疾患全体に対するワクチンの防御効力 (一次エンドポイント) 、ならびに / あるいは症状/徴候 (病状の重症度および病状の日数) を改善するその効力、および / または放出しているウイルスの存在、量および / または期間の減少 (二次エンドポイント) を評価する。

10

## 【0099】

本発明は、本発明の個々の態様の単なる例示を意図する記載の特定の実施形態によって、範囲が限定されるべきはなく、機能的に等価な方法および成分は本発明の範囲内にある。実際、本明細書において示しかつ説明される改変の他にも、本発明の多様な改変が存在することは、通常の範囲を超えない実験を使用することにより、先の記載および添付の図面から当業者には明らかであろう。そのような改変および均等物は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

## 【0100】

本明細書において言及するすべての刊行物、特許および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が、具体的かつ個別に本明細書において参照により組み入れられて示されているが如く、同程度に、参照により、本明細書に援用される。

20

## 【0101】

本明細書に記載の参考文献の引用または説明は、それが本発明の先行技術であることを認めたものと解釈されるべきではない。

## 【0102】

## 参考文献

1. Glass, RI, JS Noel, T Ando, RL Fankhauser, G Belloit, A Mounts, UD Parasher, JS Bresee and SS Monroe. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Human: A Reassessment Using New Diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181 (Sup 2): S254-S261.
2. Hardy, ME. Norwalk and "Norwalk-like Viruses" in Epidemic Gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999; 19(3): 675-90.
3. Jiang, X, DY Graham, KN Wang, and MK Estes. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.
4. Jiang, X, M Want, DY Graham, and MK Estes. Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein. *J Virol* 1992; 66: 6527-6532.
5. Glass, P, LJ White, JM Ball, I Leparc-Goffart, ME Hardy, and MK Estes. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000; 74: 6581-6591.
6. Lindesmith, L, C Moe, S Marionneau, N Ruvoen, X Jiang, L Lindblad, P Stewart, J LePendu, and R Baric. Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection. *Nat Med* 2003; 9: 548-553.
7. Parrino, TA, DS Schreiber, JS Trier, AZ Kapikian, and NR Blacklow. Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N Engl J Med* 1977; 297: 86-89.
8. Wyatt, RG, R Dolin, NR Blacklow, HL DuPont, RF Buscho, TS Thornhill, AZ Kapikian, and RM Chanock. Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross-challenge in Volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129: 709.
9. Ball, JM, DY Graham, AR Opekum, MA Gilger, RA Guerrero, and MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Given Orally to Volunteers: Phase I Study. *Gas* 40
- 30
- 50

troenterology 1999; 117: 40-48.

10. Tacket, CO, MB Sztein, GA Losonky, SS Wasserman, and MK Estes. Humoral, Mucosal, and Cellular Immune Responses to Oral Norwalk Virus-like Particles in Volunteers. *Clin Immunol* 2003; 108: 241.

11. Guerrero, RA, JM Ball, SS Krater, SE Pacheco, JD Clements, and MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal (Fecal and Vaginal) Immune Responses. *J Virol* 2001; 75: 9713.

12. Nicollier-Jamot, B, A Ogier, L Piroth, P Pothier, and E Kohli. Recombinant Virus-like Particles of a Norovirus (Genogroup II Strain) Administered Intranasally and Orally with Mucosal Adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c Mice Induce Specific Humoral and Cellular Th1/Th2-like Immune Responses. *Vaccine* 2004; 22:1079-1086. 10

13. Periwal, SB, KR Kourie, N Ramachandaran, SJ Blakeney, S DeBruin, D Zhu, TJ Zamb, L Smith, S Udem, JH Eldridge, KE Shroff, and PA Reilly. A Modified Cholera Holotoxin CT-E29H Enhances Systemic and Mucosal Immune Responses to Recombinant Norwalk Virus-like Particle Vaccine. *Vaccine* 2003; 21:376-385.

14. Isaka, M, Y Yasuda, S Kozuka, T Taniguchi, K Matano, J Maeyama, T Komiya, K Ohkuma, N Goto, and K Tochikubo. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxin together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1999; 18: 743-751. 20

15. Kozlowski, PA, S Cu-Uvin, MR Neutra, and TP Flanigan. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 1997; 65: 1387-1394.

16. Mestecky, J, SM Michalek, Z Moldoveanu, and MW Russell. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt* 1997; 33-43.

17. Wu, HY, and MW Russell. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; 16:1 30 87-201.

18. Evans, JT, CW Cluff, DA Johnson, MJ Lacy, DH Persing, and JR Baldridge. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi 529. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 219-229.

19. Baldridge, JR, Y Yorgensen, JR Ward, and JT Ulrich. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration [In Process Citation]. *Vaccine* 2000; 18: 2416-2425.

20. Yang, QB, M Martin, SM Michalek, and J Katz. Mechanisms of monophosphoryl lipid A augmentation of host responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2002; 70: 3557-3565. 40

21. Baldrick, P, D Richardson, G Elliott, and AW Wheeler. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35: 398-413.

22. Baldridge, JR, P McGowan, JT Evans, C Cluff, S Mossman, D Johnson, and D Persing. Taking a toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1129-1138.

23. Persing, DH, RN Coler, MJ Lacy, DA Johnson, JR Baldridge, RM Hershberg, and SG Reed. Taking toll: Lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; 10: S32-37.

24. Illum, L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Cont* 50

rol Release 2003; 87: 187-198.

25. Illum, L, I Jabbal-Gill, M Hinchcliffe, AN Fisher, and SS Davis. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 51: 81-96.

26. Davis, SS. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2: 450-456.

27. Bacon, A, J Makin, P J Sizer, I Jabbal-Gill, M Hinchcliffe, L Illum, S Chatfield, and M Roberts. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 2000; 68: 5764-5770.

28. van der Lubben, IM, JC Verhoef, G Borchard, and HE Junginger. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 139-144. 10

29. van der Lubben, IM, JC Verhoef, G Borchard, and HE Junginger. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 201-207.

30. Lim, S T, B Forbes, GP Martin, and MB Brown. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm Sci Tech* 2001; 2: 20.

31. Jabbal-Gill, I, AN Fisher, R Rappuoli, SS Davis, and L Illum. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine* 1998; 16: 2039-2046. 20

32. Mills, KH, C Cosgrove, EA McNeela, A Sexton, R Giemza, I Jabbal-Gill, A Church, W Lin, L Illum, A Podda, R Rappuoli, M Pizza, GE Griffin, and DJ Lewis. Protective levels of diphtheria-neutralizing antibody induced in healthy volunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin. *A Infect Immun* 2003; 71: 726-732.

33. McNeela, EA., I Jabbal-Gill, L Illum, M Pizza, R Rappuoli, A Podda, DJ Lewis, and KH Mills. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. *Vaccine* 2004; 22: 909-914. 30

34. Mikszta, JA., VJ Sullivan, C Dean, AM Waterston, JB Alarcon, JP Dekker, 3rd, JM Brittingham, J Huang, CR Hwang, M Ferriter, G Jiang, K Mar, KU Saikh, BG Stiles, CJ Roy, RG Ulrich, and NG Harvey. Protective immunization against inhalational anthrax: a comparison of minimally invasive delivery platforms. *J Infect Dis* 2005; 191: 278-288.

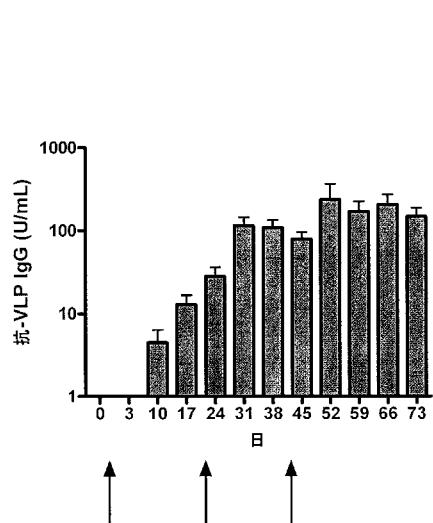
35. Huang, J, RJ Garmise, TM Crowder, K Mar, CR Hwang, AJ Hickey, JA Mikszta, and VJ Sullivan. A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. *Vaccine* 2004; 23: 794-801.

36. GSK Press Room. [www.gsk.com/media/archive.htm](http://www.gsk.com/media/archive.htm) 40

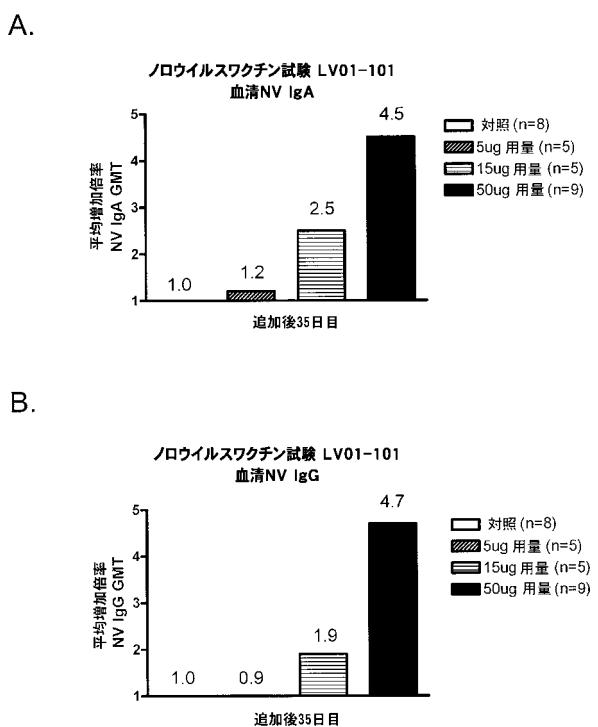
37. Corixa Press Room. [www.corixa.com/default.asp?pid=release\\_detail&id=248&year=2004](http://www.corixa.com/default.asp?pid=release_detail&id=248&year=2004)

38. BioMira Web Site. <http://www.biomira.com/business/outLicensing/>

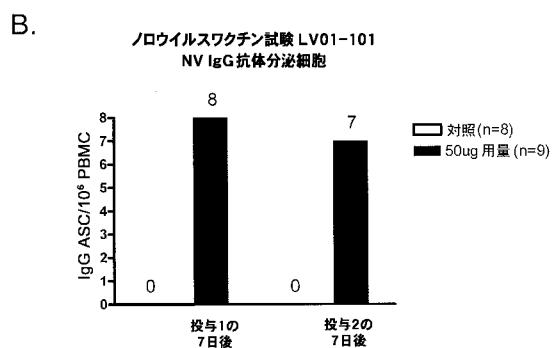
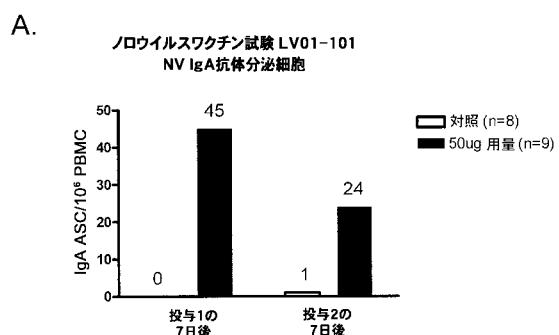
【図1】



【図2】



【図3】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2008/076763</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b><i>A61K 39/12(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i, A61K 39/42(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12P 19/34(2006.01)i</i></b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC as above		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) e-KIPASS(kipo internal), PubMed, STN(CAplus)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0207526 A1 (COIT, D. et al.) 6 Sep. 2007 see paragraphs [0200], [0410], [0419]-[0458] and claims	1-27
X	TACKET, C. O. et al., "Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers", Clinical immunology, 2003, Vol. 108, pp. 241-247 see abstract and page 242	1-27
X	LOBUE, A. D. et al., "Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains", Vaccine, 2006, Vol. 24, pp. 5220-5234 see abstract and page 5221	1-27
X	GUERRERO, R. A. et al., "Recombinant Norwalk Virus-Like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal (Fecal and Vaginal) Immune Responses", Journal of Virology, 2001, Vol. 75, No. 20, pp. 9713-9722 see abstract and page 9714	1-27
X	BALL, J. M. et al., "Oral Immunization with Recombinant Norwalk Virus-Like Particles Induces a Systemic and Mucosal Immune Response in Mice", Journal of Virology, 1998, Vol. 72, No. 2, pp. 1345-1353 see abstract	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  15 JULY 2009 (15.07.2009)	Date of mailing of the international search report  <b>15 JULY 2009 (15.07.2009)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer  Park, Jung Min Telephone No. 82-42-481-8291	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/076763

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICOLLIER-JAMOT, B. et al., "Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses", Vaccine, 2004, Vol. 22, pp. 1079-1086 see abstract	1-27
P,X	WO 2008/042789 A1(LIGOCYTE PHARMACEUTICALS INC.) 10 April 2008 see the whole document	1-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2008/076763**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0207526 A1	06.09.2007	None	
WO 2008-042789 A1	10.04.2008	US 2008-0299152 A1	04.12.2008

---

フロントページの続き

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

(72)発明者 ヴェドヴィック,トーマス,エス.

アメリカ合衆国,モンタナ州 59718,ボーズマン,アナリシス ドライブ 2155,リゴ  
サイト ファーマスティカルズ,インコーポレイテッド内

(72)発明者 フォーベルト,トーマス,アール.

アメリカ合衆国,モンタナ州 59718,ボーズマン,アナリシス ドライブ 2155,リゴ  
サイト ファーマスティカルズ,インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA52 CC08 EE01 EE06 FF11 GG02 GG03 GG04

GG05