

(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2007-509081

(P2007-509081A)

(43) 公表日 平成19年4月12日(2007.4.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	K 4 C O 8 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2006-535932 (P2006-535932)	(71) 出願人	304012895
(86) (22) 出願日	平成16年10月20日 (2004.10.20)		セントロ デ インジエニエリア ジエネ
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月16日 (2006.6.16)		テイカ イ バイオテクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/CU2004/000011		キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ
(87) 国際公開番号	W02005/037311		、プラヤ、キューバナキャン、アベニュー
(87) 国際公開日	平成17年4月28日 (2005.4.28)		3 1 エントレ 1 5 8 イ 1 9 0
(31) 優先権主張番号	2003-0240	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成15年10月20日 (2003.10.20)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	キューバ (CU)	(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用の医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、慢性疾患を生じる病原体に対する治療用のワクチンに関係する。特に、本発明は、*P i c h i a p a s t o r i s* から組換え法により生産されたB型肝炎表面抗原 (H B s A g) を、治療用の医薬組成物を得るための主成分として使用することに関係する。発明の組成物は、B型肝炎抗原及び他の併用投与される抗原を含むことができる。前記製剤は強力なリンパ球増殖反応及び細胞障害性Tリンパ球並びに著しく特異的な抗体反応を生じることができる。このようにして、該製剤はヒトの上記疾患の治療に対して非常に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カオトロピック剤を含有する溶解緩衝液中における細胞溶解；酸性 pH の条件における混入物の沈殿；B 型肝炎表面抗原に対する特異的モノクローナル抗体を使用する抗原の免疫親和性クロマトグラフィー；30℃から40℃までの温度範囲での溶出抗原の熱処理の少なくとも一つのステップを含む精製方法によりイーストから生産される B 型肝炎表面抗原を含有することを特徴とする治療用医薬組成物。

【請求項 2】

前記抗原生産に使用されるイーストが *Pichia pastoris* である請求項 1 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 3】

慢性的経過を生じるウイルスの治療としてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 及び 2 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 4】

B 型肝炎ウイルスによる慢性感染の治療としてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 から 3 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 5】

B 型肝炎ウイルス及び C 型肝炎ウイルスによる慢性同時感染（chronic coinfection）の治療としてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 から 3 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 6】

B 型肝炎ウイルス及びヒト免疫不全ウイルスによる慢性感染の治療としてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 から 3 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 7】

B 型肝炎ウイルス及び慢性感染疾患の群に含まれるほかの感染による慢性感染の治療としてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 から 3 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 8】

慢性疾患の治療に使用される 2 価ワクチンとしてそして同時に B 型肝炎ウイルスの予防ワクチンとしてそれらを使用することを特徴とする請求項 1 から 3 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 9】

B 型肝炎表面抗原が単独で又は適当なアジュバントと共に投与される請求項 1 から 8 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 10】

HBsAg によって治療作用に著しく重要なアジュバント効果を受けるいくつかの同種及び異種抗原と併用して B 型肝炎表面抗原が投与される請求項 1 から 9 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 11】

異種抗原が慢性疾患を発生させるウイルスのワクチン抗原である請求項 10 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 12】

非経口使用、粘膜使用又は両経路で使用するための請求項 1 から 11 に記載の治療用医薬組成物。

【請求項 13】

抗原が、カオトロピック剤を含有する溶解緩衝液中における細胞溶解；酸性 pH の条件における混入物の沈殿；B 型肝炎表面抗原に対する特異的モノクローナル抗体を使用する抗原の免疫親和性クロマトグラフィー；30℃から40℃までの温度範囲での溶出抗原の熱処理の少なくとも一つのステップを含む精製方法によりイーストにおいて生産される治療用医薬組成物における B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

抗原生産に使用されるイーストが *P i c h i a p a s t o r i s* である請求項 1 3 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 1 5】

慢性的経過をたどるウイルスによる感染症の治療のためのワクチンを得るための請求項 1 3 及び 1 4 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 1 6】

B 型肝炎ウイルスにより生じる慢性感染症の治療のためのワクチンを得るための請求項 1 3 から 1 5 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 1 7】

B 型肝炎ウイルス及び C 型肝炎ウイルスにより生じる慢性同時感染の治療のためのワクチンを得るための請求項 1 3 から 1 5 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。 10

【請求項 1 8】

B 型肝炎ウイルス及びヒト免疫不全ウイルス-1 により生じる慢性同時感染症の治療のためのワクチンを得るための請求項 1 3 から 1 5 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 1 9】

B 型肝炎ウイルス及び慢性的経過の疾患のグループに含まれるほかの感染により生じる慢性同時感染症の治療のためのワクチンを得るための請求項 1 3 から 1 5 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。

【請求項 2 0】

慢性経過をたどるウイルスによる慢性感染症の治療のためのそして同時に B 型肝炎ウイルスによる感染を予防する能力を持つ二価ワクチンを得るための請求項 1 3 から 1 5 に記載の B 型肝炎表面抗原の使用。 20

【請求項 2 1】

カオトロピック剤を含有する溶解緩衝液中における細胞溶解；酸性 p H の条件における混入物の沈殿；B 型肝炎表面抗原に対する特異的モノクローナル抗体を使用する抗原の免疫親和性クロマトグラフィー；3 0℃から 4 0℃までの温度範囲での溶出抗原の熱処理の少なくとも一つのステップを含む精製方法を使用してイーストにより生産される B 型肝炎表面抗原を使用することを特徴とする慢性的経過を生じるウイルスにより生じる感染症の治療方法。

【請求項 2 2】

H B s A g を生産するためにイースト菌 *P i c h i a p a s t o r i s* を使用することを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。 30

【請求項 2 3】

B 型肝炎ウイルスにより生じる慢性感染症を治療するための請求項 2 1 及び 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

B 型肝炎ウイルス及び C 型肝炎ウイルスにより生じる慢性同時感染症の治療のための請求項 2 1 及び 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

B 型肝炎ウイルス及びヒト免疫不全ウイルス-1 により生じる慢性同時感染を治療するための請求項 2 1 及び 2 2 に記載の方法。 40

【請求項 2 6】

B 型肝炎ウイルス及び慢性的経過の疾患のグループに含まれるほかの感染により生じる慢性同時感染症の治療のための請求項 2 1 及び 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

慢性経過をたどるウイルスによる慢性感染症の治療のためのそして同時に B 型肝炎ウイルスによる感染を予防する能力を持つ二価ワクチンを得るための請求項 2 1 及び 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性疾患の原因となる病原体に対する治療用ワクチンのためのバイオテクノロジーの分野に係る。特に、治療用の医薬組成物の主たる化合物として、*Pichia pastoris*において組換え技術により生産されたB型肝炎表面抗原(HBsAg)を使用することに関する。

【背景技術】

【0002】

約350百万人の人々が、B型肝炎ウイルス(HBV)に慢性的に感染している。HBVに慢性的に感染している患者の主なリスクは、肝硬変の発生であり、これは肝細胞癌或いは癌性でない肝硬変の合併症(門脈圧亢進症及び肝不全)に関連する死亡率の増加を生じる。 10

【0003】

HBV感染の症状は主として免疫により仲介されるので、これらのリスクはウイルス複製の制御により有意に減少する。

【0004】

今日、HBVにより生じる慢性肝炎の治療として広く認められ、そして臨床的な利益を示す主な療法は二つのみである： α -インターフェロンによる治療及びラミブジン(Lamivudine)のようなヌクレオシド/ヌクレオチドの同族体(analog)による治療。いずれの治療法も重大な限界がある。 α -インターフェロンによる治療法は γ IFNの抗ウイルス作用及び免疫刺激作用を併せて利用するため、患者の3分の1でしかウイルス複製の持続的抑制を生じない。 20

【0005】

ラミブジン治療は速やかなそしてほぼ確実にHBV複製の減少をもたらすが、短期間の治療はしばしば再発に至る。長期間の治療は再発を増加させ、年当たり15~20%の発生率となる。HBVに対する抗ウイルス療法の両者に限界があることから、新しい代替治療法を発見することの必要性が指摘され、その中には新しいヌクレオチド同族体および慢性的に感染した患者のT細胞の低下した応答を改善することを目的とした新しい特異的又は非特異的免疫療法が含まれる。

【0006】

特異免疫の受動転移、免疫調節薬(サイトカイン、チミン誘導体及び増殖因子)及びワクチン療法(現在の組換えワクチン、DNAに基づくワクチン及びT細胞ペプチドのような新しい方法)が最近の免疫治療法である。 30

【0007】

HBVは細胞変性ウイルスではなく、感染の間の肝臓障害は主に感染細胞に対する宿主の免疫応答に仲介されそして炎症性サイトカインの生産により生じる。細胞障害性及びヘルパー細胞のサブセットにおける強力なポリクロナール多選択性細胞応答(potent, polyclonal and multispecific cellular response)並びにHBVに対する強力なサイトカイン応答は、急性の自己限定(self-limited)B型肝炎感染患者の末梢血中に容易且つ迅速に検出することができる。逆に、慢性感染の患者においては、その同じ応答は弱く、抗原的に限定されているか又は検出できない。T細胞応答はHBV消失に対応することが示されている。急性B型肝炎の間、Th1サイトカイン(γ -インターフェロン、TNF- α)及びIL-2はウイルスの排除(clearance)に関連していた。 40

【0008】

いくつかの組換え抗B型肝炎ワクチンが免疫療法について検定された。肝臓でHBsAgを構成的に発現する形質転換マウスの免疫化(immunization)により、特異的免疫応答を誘発し、HBsAgに対する機能的耐性を獲得するためのこの方法の可能性が示された(Mancini M, et al., Induction of anti-hepatitis B surface antigen(HBsAg)antibodies in HBsAg transgenic mice: a possible 50

way of circumventing “nonresponse” to HBsAg. *J Med Virol*. 1993; 39:67-74.)。パイロット規模の最初の臨床試験により、特異的ワクチン療法は慢性的キャリアーの約50%においてHBVの複製を排除又は減少させることができることが示された (Pol S, et al. *Lancet* 1994; 342 (Letter), Wen Y-M, et al. *Lancet* 1995; 345:1575-1576 (Letter), Pol S, et al. *Acta Gastroenterologica Belgica* 1998; 61:228-33)。

【0009】

最終的に、マルチセンター比較試験により、慢性感染の治療における抗B型肝炎ワクチンの実際の能力が示された (Pol S, et al. *J Hepatol* 2001; 34:917-21)。プレ-S領域を含む又はS領域のみの抗原を含有する市販ワクチンが検定された。1年後及び5回の注射の後に非治療対照群と比較してウイルスDNAの陰性化のパーセンテージは差がなく、HBsAgの消失はなく、そして“e”抗原の陰性化も余りよくはなかったが、ワクチン群のほうが良かった。これらの全ての結果は、新しい免疫療法の必要性を示し、それと共に、もっと強力な候補物質による上記の免疫方法の強化が必要であると結論された。

【0010】

最近、CD14受容体に結合する能力の低い抗原は、HBsAgに対して高い応答を生じる人のPBMCにおいて高い増殖活性を誘発することができることが示された。この事実は、CD14に結合する能力と免疫抑制機構の間の相関を示している (Valandschoot P, et al. *J. Med Virol* 2003, 70:513-519)。

【0011】

細胞応答に関して優れた免疫原性を示し、同時に投与された同種及び異種抗原に対して活性の増強を示し、また一物理化学的性質の結果としてCD14受容体に結合する能力が有意に低下した変異体を選択する過程から造られた新しいHBsAgは、新規抗原であり、そしてB型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス治療に単独で又は慢性感染若しくは同時感染の治療のための多抗原製剤の一部として使用することができると考えられる。

【0012】

発明の詳細な説明

本発明において、治療用の新しい医薬組成物を得るために、本出願に記述された方法により *Pichia pastoris* において生産されたB型肝炎ウイルス表面抗原の新しい使用方法が記述された。これを達成するために、われわれの条件において生産されたHBsAgの新しい性質が他のB型肝炎抗原と比較して検討された。

【0013】

本発明において、特許EP 0480525 B1「B型肝炎ウイルスの組換え表面抗原を得る方法」に記述されている方法が、得られた抗原に新しい性質をもたらすことをわれわれは発見した。次のステップ：カオトロピック剤を含有する溶解緩衝液中における細胞溶解；酸性条件（低いpH値）における混入物の沈殿；B型肝炎表面抗原に対する特異的モノクロナール抗体を使用する抗原の免疫親和性クロマトグラフィー；溶出抗原の30～40℃の範囲の温度による熱処理、を含む精製工程を使用して *Pichia pastoris* において生産されたHBsAgは、文献に記述されているほかのHBsAgと異なる新しい抗原を生じ、この抗原を治療に使用する裏づけとなっている。

【0014】

HBsAg抗原の間の相違は、他の宿主において生産されそして異なる精製法を使用した抗原と比較して、本発明の主題である抗原の高い免疫原性に基づいている。その他の相違は、われわれのHBsAgの増強作用の結果として、治療用ワクチンに含まれ同時に投与される潜在的抗原として考えられる同種及び異種の抗原に対する増強作用である。さらに、免疫系の前線におけるその行動に著しく影響するわれわれの条件下において生産され

たHBsAgの構造及び化学的組成の面で相違がある。

【0015】

本発明のHBsAgは、異種抗原に対する細胞の応答、増殖及び機能の増強を促進する抗原の能力の故に、B型肝炎の慢性感染を治療するためにそして他のウイルスとの慢性同時感染の治療の場合にもワクチン製剤に使用することができる。

【0016】

本発明のHBsAgと共に同時投与される抗原の中には、慢性感染を生じることができ
るほかのウイルスの抗原、例えば、C型肝炎及びHIVの抗原がある。本発明の実施例に
記述された結果は、C型肝炎ウイルスのヌクレオキャプシド及び該病原体に対するヒトの
細胞応答に関係する抗原決定基を含むVH-1のキメラタンパク質を使用して得られた

10

【0017】

われわれの実験室において得たエビデンスによれば、この性質は、この方法により得ら
れるHBsAgと同一目的で同時に投与することができる全ての同種又は異種タンパ
ク質に拡張することができる。われわれの製剤に使用することができそして製剤の最終効
果に重要な同種タンパク質は、B型肝炎ウイルスのヌクレオキャプシド又はHBcAgの
タンパク質である。このタンパク質は、本発明のHBsAgと共に同時に投与された場合
に、その細胞応答において免疫増強効果を受けることができる。

【0018】

同時に、B型肝炎以外の疾患の慢性期にある人に、得られた多価製剤を使用することは
、当該慢性疾患に対して治療上有益であり、そして同時にHBV感染に対して予防的免疫
応答を誘発する可能性があることは本発明から明らかである。

20

【0019】

また、本発明の主題は、*Pichia pastoris*において得られたHBsAg
を使用し、溶液で並びに簡便にミョウバン塩又はこの目的で選択されたほかのアジュバン
トに添加して、慢性B型肝炎治療のために記述された方法を使用する医薬組成物である。
そのアジュバンは、ミョウバン塩又は治療用のわれわれのワクチンの投与に有用なその
他のアジュバンであるが、それに限定されない。

【0020】

記述された方法により*Pichia pastoris*において得られたB型肝炎表面
抗原が、その治療作用に対する重要なアジュバン効果を受ける同種及び異種抗原と併用
して投与される治療用の医薬組成物もまた本発明の主題である。同種抗原はB型肝炎ウイ
ルスの抗原、好ましくは該ウイルスのヌクレオキャプシド抗原を含む。本発明の主題の製
剤に含めることができるその他の抗原は、ヒトにおいて慢性疾患を発生させるもの、例え
ばC型肝炎ウイルス及びHIV-1であるが、これに限定されないし、そのような性質を
持つほかのウイルスの抗原を使用することもできる。

30

【0021】

本発明の医薬組成物は、必要とする治療上の応答の種類を増強する目的で粘膜、非経口
又は両経路の組み合わせにより使用することができることを指摘するのは重要である。本
発明の医薬組成物中の抗原の量は、製剤中に含まれる抗原によるが、HBsAgの場合に
は；抗原は投与当たり5～300マイクログラムの範囲である。併用投与される抗原の残
余に対する比率は5：1から1：5の間であり、考慮された特別な治療による。

40

【実施例】

【0022】

実施例1：種々の宿主から生産された種々のB型肝炎ワクチンの体液性及び細胞性免疫応
答に関する免疫原性。

種々の市販の抗B型肝炎ワクチンにより生じる体液性及び細胞性免疫応答を試験する目
的で、免疫スケジュールがBalb/Cマウスにおいて行われた。8～12週齢のマウス
各10匹の5群を、0、15、30及び90日目に2μg（マイクログラム）の用量のH
BsAgで筋肉内に免疫した。体液性応答を評価するために各投与の10日後に採血を行

50

い、3回目と4回目の投与の後に試験のタイプによる免疫応答を試験するために群当たり3から4匹のマウスを屠殺した。

【0023】

この試験において、マウス当たり2 μ gのHBsAg用量は、非常に類似する製品間の相違の検出を可能にするのに十分に低い量であるので選択された（検定されたワクチンは全て同様の量のHBsAg及び水酸化ミョウバンを含有する）。

【0024】

免疫スケジュールの群は、1) *Pichia pastoris*において生産されたHBsAgを含有するHeberbiovac HBワクチン、2) *Pichia pastoris*において生産されたが他の精製法を使用したShanvac Bワクチン、3) Hepavax Gene及び4) Euvac Bワクチン（これらはそれぞれ*Saccharomyces cerevisiae*及び*Hansenula polymorpha*において生産された）であった。第5群は同様の量の水酸化ミョウバンのみを投与されたマウスからなるプラセボ対照であった。 10

【0025】

体液性免疫応答、並びに力価の持続は、血清検体中の総IgGをELISAにより測定して評価した。血清IgG力価は、第2、第3及び第4回目の投与の2週間後及び第4回目の投与の前に試験した。抗体応答の結果を図1Aに示した。

【0026】

分析期間の間、Heberbiovac HB及びShanvac Bワクチンで免疫された群の間に有意な相違は認められなかった。両ワクチン共に類似の力価を生じ、第2及び第3回目投与の後は検定したワクチンの中のほかのワクチン（Euvac B及びHepavax Gene）より優れていた。 20

【0027】

第4回目投与の10日後、群当たり4匹のマウスを屠殺し、個々のマウスにつきリンパ球増殖反応を測定する細胞免疫の試験を実施した。低い抗原投与量におけるわれわれの実験条件においては、Heberbiovac HBのみがブースター投与の後に明らかに検出するリンパ球増殖反応を誘発することができた。試験した他のワクチンには陽性反応はなかった（図1B）。 30

【0028】

リンパ球増殖検定の結果は、特別の細胞サブセットを選択せずに増殖する脾臓細胞の能力を示しているが、検定の時期としては記憶T CD4+が刺激に反応する主な細胞集団であることが知られている。抗原刺激に対して特異的に増殖するこのT CD4+リンパ球は、それぞれ体液性及び細胞障害性応答の発生を補助するB細胞及びCD8⁺T細胞と相互作用することができる。

【0029】

第3回目投与の10日後、群当たり3匹のマウスを屠殺し、ELISPOT検定を行った。結果を図1Cに示す。

【0030】

ELISPOT検定において得られた結果は、ミョウバン中のHBsAgが、HBsAgに由来するS₂₈₋₃₉ペプチドによる再刺激後に γ INF分泌リンパ球の強い反応を誘発することができることを示した。直接ELISPOT検定の結果は、再刺激後の結果に比較して低い反応を示した（データは示さず）。図1Cに示された結果は、Heberbiovac HBが、評価したほかのワクチンに比較して、免疫された動物の脾臓細胞中に γ INF分泌細胞を高頻度に誘発する能力を有することを示した。 γ INFの分泌は、HBV複製の制御に極めて重要であるTh1細胞の発生を示している。 40

【0031】

総合して、得られた結果は、*Pichia pastoris*において生産されそして本発明に説明されている条件で精製されたHBsAgの細胞応答が、他の宿主並びに同じ宿主で異なる条件において得られた抗原よりも優れていることを示している。この実験に 50

において評価された反応（リンパ球増殖及び γ I F N分泌）とB型肝炎ウイルス感染の制御の間の関係は広く認められているので、この結果は治療用ワクチン接種の分野においては注目すべきことである。

【0032】

実施例2：記述された方法により生産されたHBsAgによる細胞免疫応答に対する増強効果。

他の宿主において得られたHBsAgに対する*Pichia pastoris*から得たHBsAgの能力を評価するために、同種抗原HBcAg（B型肝炎ヌクレオキャプシド抗原）に対する両抗原の同時投与により誘導される免疫応答を評価するための実験が計画された。

【0033】

この目的で、ヌクレオキャプシド抗原による脾臓細胞の刺激後の γ I F N分泌細胞の頻度がELISPOT検定により評価された。

【0034】

Heberbiovac HBのHBsAgを使用して免疫された群と上等生物体（CHO）から生産されたHBsAgを使用して免疫された群において測定が行われ、いずれの場合もヌクレオキャプシド抗原と同時投与された。さらに、対応するプラセボ対照が評価され（データは示さず）、同様にヌクレオキャプシド抗原のみを含有する対照も評価された（群C、図2）。

【0035】

この結果は、CHO細胞において生産されたHBsAgを使用して免疫された群（群B、図2）に対して、*Pichia pastoris*から生産されたHBsAgにより免疫された群（群A）において γ I F Nを分泌する細胞の頻度が増加していることを示した。したがって、われわれは、他の抗原：この場合には同種又は他の実験に示すように異種の抗原を含有する治療用製剤の設計に、*Pichia*から生産されたHBsAgの使用を提案することができる。

【0036】

実施例3：HBV抗原及びHIV-1のHIV-1由来タンパク質CR3を併用した治療用ワクチン製剤におけるHBsAgの使用。

抗原としてそして同時に治療用ワクチン製剤中の異種抗原に対する細胞の特異的反応の免疫増強のためのアジュバントとして、鼻内免疫にHBsAgを使用することを評価するために、6～8週齢のBalb/cマウス雌の6群を0, 7, 14, 35及び63のスケジュールで接種した。動物は以下のような種々の群において鼻内経路により免疫された：1. PBS, 2. HBcAg+HBsAg, 3. CR3, 4. HBcAg+CR3, 5. HBsAg+CR3, 6. HBcAg+HBsAg+CR3。CR3抗原は組換え技術により得られ、ヒトT細胞に特異的なHIV-1のいくつかの配列を含んでいる、多重抗原決定基を持つポリペプチドに相当した。抗原をPBSに溶解し、50 μ l（鼻孔当たり25 μ l）で投与した。HBsAg（CIGB, Cuba）、HBcAg（CIGB, Cuba）及びCR3（CIGB, Cuba）のそれぞれについて、マウス当たり5, 5及び10 μ gの投与量を使用した。最後の接種の10日後に、CD8+細胞並びに総脾臓細胞を使用して特異的に抗-CR3 γ I F Nを分泌する免疫応答をELISPOT検定により測定した。

【0037】

細胞性応答の試験は、ELISPOT検定により γ I F Nを分泌する脾臓細胞の頻度を測定することにより行った。このAPCはCR3タンパク質を構成的に生産し、このタンパク質は細胞内でプロセスされ、HLAクラス1において呈示される。肥満細胞腫P815はその表面にMHC-I I分子を発現しないために、P815CR3は特異的にCD8+T細胞を活性化するであろう。HBsAg+CR3及びHBcAg+HBsAg+CR3により免疫された群のみが陽性に反応し（図3A）、CR3タンパク質上のHBsAgにより刺激された抗CR3細胞性応答に対する増強作用を示すことが示された。タンパク

10

20

30

40

50

質 C R 3 が総脾臓細胞を使用した培養に加えられると、それは細胞内に取り込まれ、プロセスされ、主にマクロファージ及び樹状細胞のような専門化した A P C の M H C クラス I I において呈示される。

【0038】

われわれの結果は、C D 8 + T リンパ球に対して陽性反応を示す同じ群のみが（総脾臓細胞を使用する）上記検定に対しても陽性であったことを示し、その場合に主として応答したのは C D 4 + 細胞であった：H B s A g + C R 3 及び H B c A g + H B s A g + C R 3（図 3 B）。一般的に、C R 3 タンパク質により呈示される抗原決定基に対する反応を増強した結果として、H B s A g が H I V - 1 に対する細胞応答を増強したと結論することができる。この結果により、抗原並びに同時に H I V - 1 及び H B V に対する治療的免疫を行うためのアジュバントとして H B s A g を使用することが正当化される。

【0039】

実施例 4：非経口経路による H I V - 1 の免疫原と併用される治療ワクチン中における H B s A g の使用。

H B V - H I V 混合免疫の分野における細胞応答の抗原並びにアジュバントとして、非経口免疫において H B s A g の使用を評価するために、種々の製剤を評価した。6～8 週齢の雌 B a l b / c マウス（C E N P A L A B, C u b a）の 8 から 10 匹の群を 0, 14, 35 日目に免疫した。以下のようにそれぞれの群のマウスを皮下投与により免疫した：1) H B s A g, 2) C R 3, 3) H B s A g + C R 3, 4) H B s A g + H B c A g + C R 3。免疫原は全て 1 m g / m L でリン酸ミョウバンに加えた。次の H B s A g 及び H B c A g 投与量を使用した：マウス当たり 100 μ l 中 2, 4 及び 10 μ g。両抗原は C I G B, C u b a で生産された。 γ I F N 分泌細胞の抗 C R 3 特異的細胞性免疫応答は、実施例 3 に記述されているように C R 3 を発現する P 8 1 5 を使用する E L I S P O T により測定した（図 4 A）。

【0040】

陽性反応は、リン酸ミョウバン中の H B s A g + C R 3 及び H B c A g + H B s A g + C R 3 で免疫した群の場合にのみ検出された（図 4 A）ことから、同時投与した抗原の免疫原性に対する H B s A g の作用が示された。

【0041】

γ I F N 分泌細胞の抗 C R 3 特異的細胞性免疫応答の分析は、P 8 1 5 のような A P C のない培養に C R 3 タンパク質を直接加えた場合についても行われた。この実験では、C D 8 + 応答の場合に陽性を生じたのと同じ群においてのみ、陽性の E L I S P O T 応答を生じた。それらは、リン酸ミョウバン中の H B s A g + C R 3 及び H B c A g + H B s A g + C R 3 であり（図 4 B）、これらの群は C R 3 に対する H B s A g の細胞性増強作用を再度示した。

【0042】

実施例 5：H B s A g 及び H C V 抗原の併用試験。

発生した免疫応答に対する H C V キャプシドの短縮タンパク質（C o . 1 2 0）、（L o r e n z o L J, e t a l . B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n 2 0 0 1 ; 2 8 1 (4) : 9 6 2 - 9 6 5）と H B s A g の併用の発生した免疫応答に対する影響を、H C V の構造領域の抗原と比較して評価する目的で、B A L B / c マウスにおいて筋肉内投与スケジュールが行われた。各群 10 匹の 8 週齢の雌マウスを使用した。投与スケジュールは 0, 3, 6 及び 9 週目の 4 回の接種であった。免疫原は全てアジュバントとして水酸化ミョウバンを使用した。群 1 は陰性対照として使用され、水酸化ミョウバンのみを投与された。群 2 はタンパク質 C o . 1 2 0 の 5 μ g を接種された。群 3 は各タンパク質の 5 μ g の混合物を接種され、そして群 4 は 5 μ g の H B s A g で免疫された。動物は、2 週間後に、組換え技術により挿入された H C V キャプシド抗原を持つ組換えワクシニアウイルスの 10⁶ プラーク形成単位の腹腔内経路の投与によりチャレンジした。

【0043】

チャレンジの5日後に動物を屠殺し、卵巣を取り出し、処理した。系統希釈の後、クリスタルバイオレット染色を使用してウイルス力価を測定するために、2日間BSC-40細胞に感染させた。

【0044】

図5は各群の卵巣におけるウイルス力価を示す。統計解析にはStudentのT検定を使用し、各群と対照群の結果を比較し、 $p < 0.05$ を有意差とした。図5において、Co.120タンパク質及びHBsAgの混合物で免疫した動物は他の群と比較して有意に低い($p < 0.05$)ウイルス力価を示すことが示され、C型肝炎ウイルスのキャプシドに対してインビボにおいて強力にして有効な細胞応答を誘発することが示された。この群は、陰性対照群(水酸化ミョウバンで免疫されたマウス)に対して有意にウイルス力価を低下させることができた唯一の群であった。したがって、機能的抗ウイルス能力の直接的インビボ検定のこのシステムにおいて、ウイルス力価減少に関してHBsAgの増強作用が示された。

10

【0045】

実施例6：いくつかの病気に関係するそれぞれの抗原に対するこの出願に記述されたHBsAgの増強効果の試験。

抗原としてそして同時に慢性疾患に関係するウイルスの分野における特異的細胞性免疫応答の免疫増強物質として非経口免疫にHBsAgを使用することを評価する目的で、同じ製剤中にHBsAg及び同時投与される別の抗原を含有する製剤を使用して種々の実験が行われた。同時投与された抗原には、HIV(HIV-1ウイルスの抗原、ペプチドおよび多重抗原決定基を持つペプチドを含む弱毒化したウイルス)：HPV(われわれはHPV16, 18及び33のウイルス様粒子を使用した)；HCV(ヌクレオキャプシドの配列、表面抗原のペプチド及びタンパク質並びに非構造配列のセグメントを含む抗原)のようなヒトの病気の抗原；同様に、癌のような慢性疾患を発生するほかの病気の抗原(肺、肝臓、乳房及び前立腺の腫瘍に関係する及び腫瘍特異的な抗原)が含まれた。全ての場合に、その抗原単独の投与に対して γ IFN分泌活性の増加が評価され、治療用製剤として投与されたわれわれの出願に記述されたHBsAgの能力が示された。

20

【0046】

実施例7：記述した製造方法を使用してPichia pastorisから得たHBsAgの種々のバッチを使用した場合と他の宿主において得られた抗原とを比較した場合のCD14受容体に結合するHBsAgの能力の試験。

30

本発明に記述された精製方法を使用した組換えタンパク質として得られたHBsAgの分析結果は、マクロファージに認められそして免疫学的耐性過程の発生に関係するCD14受容体に対して結合するHBsAgの能力として、細胞性部分の高い免疫原性に影響する相違があることが示された。

【0047】

免疫細胞分析により、この出願に記述された条件により生産されたイースト菌Pichia pastorisにおいて生産された抗原のCD14受容体へ結合する能力は、Saccharomyces cerevisiaeにおいて生産された抗原に比較して著しく低下していることが証明された(図6)。この事実は、本発明において検定された抗原の異なる行動に関するわれわれの所見を支持している。

40

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】1A)種々の市販ワクチンを使用して、0, 15, 30及び90日目に免疫したマウスの血清中の抗HBsAg IgG免疫応答の動態を示すグラフ。ワクチンの一つはHeberbiovac-HBであり、これはPichia pastorisにおいて生産されたHBsAg及び他の宿主中でまた異なる方法で生産されたほかのワクチンを含む。1B)90日目のブースター投与後に種々のワクチンにより生じたリンパ球増殖反応。1C)ペプチドS₂₈₋₃₉で瞬間標識したマウス肥満細胞腫p815の細胞で刺激した後の γ IFN分泌細胞の反応。

50

【図 2】他の同時に投与された抗原に対する細胞性応答増強能力に関する、*P i c h i a p a s t o r i s*により生産された抗原及び高等生物の細胞（C H O）において生産された抗原の比較試験。この場合に、抗原モデルとしてB型肝炎コア抗原が使用された。

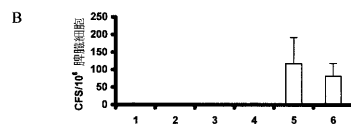
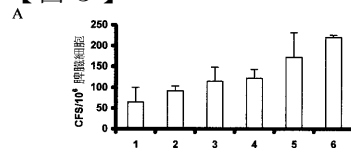
【図 3】H B s A g, H B c A g 及びH I V - 1 の配列を含む多重抗原決定基タンパク質を含む治療用の混合製剤により誘発された免疫応答の試験。鼻免疫スケジュール：3 A) 挿入されたC R 3 の配列を持つ遺伝子導入p 8 1 5 による脾臓細胞の刺激後の γ I F N を分泌する抗C R 3 C D 8 + リンパ球。3 B) C R 3 による脾臓細胞の直接刺激後の γ I F N 分泌リンパ球。

【図 4】H B s A g, H B c A g 及びH I V - 1 のC R 3 タンパク質の混合製剤により誘発された免疫応答の試験。非経口投与免疫スケジュール。4 A) 挿入されたC R 3 の配列を持つ遺伝子導入p 8 1 5 による脾臓細胞の刺激後の γ I F N を分泌する抗C R 3 C D 8 + リンパ球。4 B) C R 3 による脾臓細胞の直接刺激後の γ I F N 分泌リンパ球。

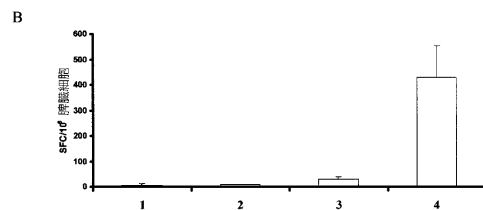
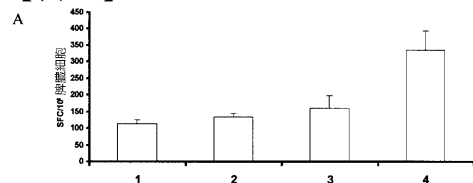
【図 5】各群の動物の卵巣のウイルス力価。

【図 6】C D 1 4 結合能力。群 1) *S c c h a r o m y c e s* において生産されたH B s A g, 群 2 - 9) 記述された条件において*P i c h i a*において生産されたH B s A g。

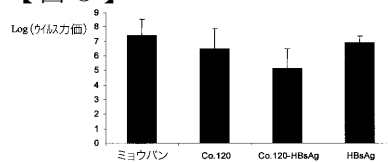
【図 3】



【図 4】

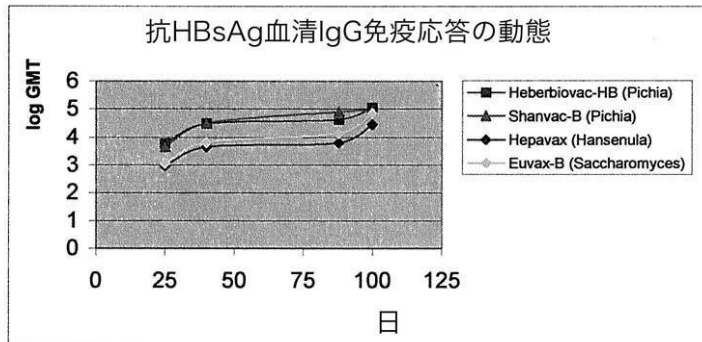


【図 5】

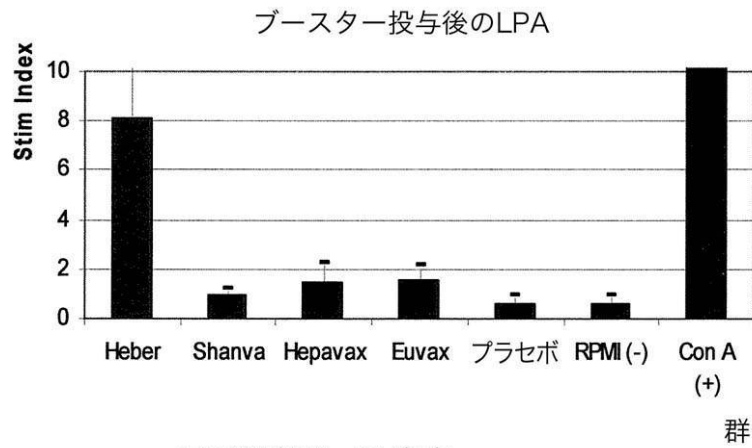


【図 1】

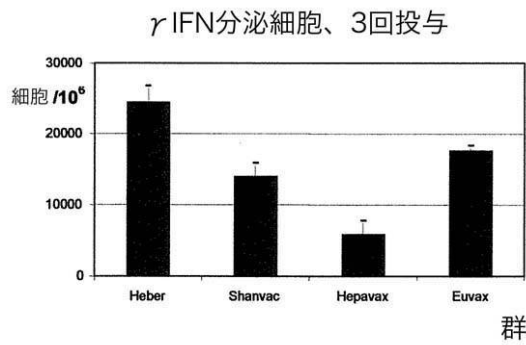
A



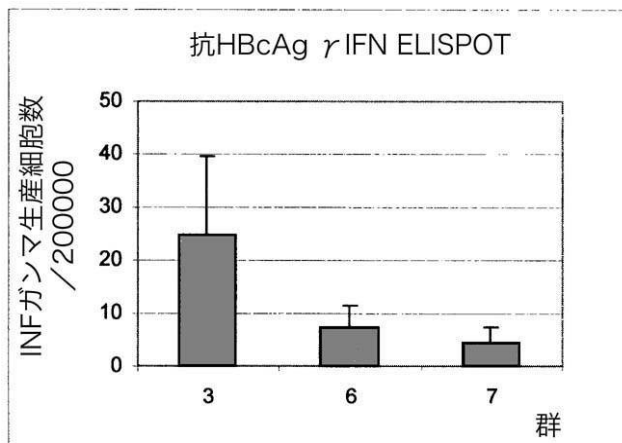
B



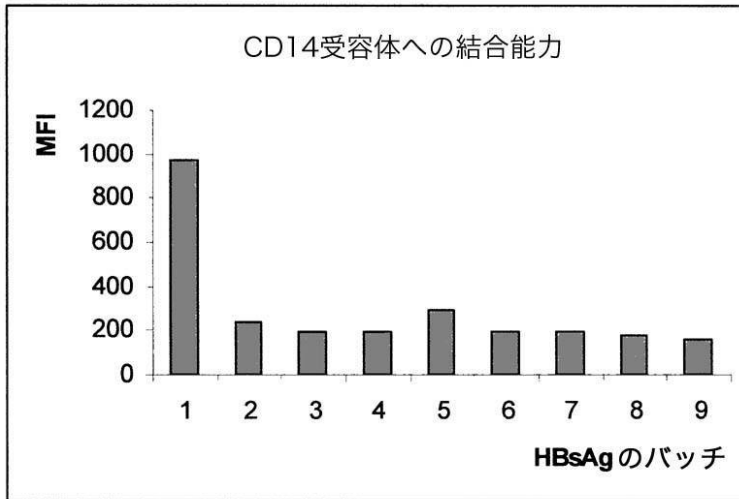
C



【図 2】



【図 6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CU2004/000011
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39 A61K39/295 A61K39/29 A61K39/21		
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) IPC 7 A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 480 525 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 15 April 1992 (1992-04-15) cited in the application claims 1,20-22	1-9, 12-15, 21,22
X	WO 03/061692 A2 (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA; AGUILAR RUBIDO, JULIO,) 31 July 2003 (2003-07-31) "Grupo 12"; figure 5; example 4	1-9, 12-16, 21-23
E	-& EP 1 493 447 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 5 January 2005 (2005-01-05) Group 12 in Example 1; figure 5; example 4	1-9, 12-16, 21-23
X	WO 02/43756 A2 (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA; AGUILAR RUBIDO, JULIO,) 6 June 2002 (2002-06-06) examples 3,4,6,9 -/--	1-16, 21-23
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 February 2005		Date of mailing of the international search report 21/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lonnoy, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU2004/000011

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& EP 1 346 727 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 24 September 2003 (2003-09-24) examples 3,4,6,9	1-16, 21-23
A	EP 1 136 077 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 26 September 2001 (2001-09-26)	
A	VANLANDSCHOOT PETER ET AL: "Saccharomyces cerevisiae-derived HBsAg preparations differ in their attachment to monocytes, immune-suppressive potential, and T-cell immunogenicity." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 70, no. 4, August 2003 (2003-08), pages 513-519, XP002316328 ISSN: 0146-6615 cited in the application	
A	HARDY E ET AL: "Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from Pichia pastoris" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 77, no. 2-3, February 2000 (2000-02), pages 157-167, XP004185816 ISSN: 0168-1656	
A	MICHEL M-L: "Towards immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, 19 December 2002 (2002-12-19), pages A83-A88, XP004397477 ISSN: 0264-410X	
A	WO 99/39736 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW; REIMANN, JORG; BARE) 12 August 1999 (1999-08-12)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2004/000011

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 21-27 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CU2004 /000011

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 21-27 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Present claim 10 relates to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to "antigens that will receive an adjuvant effect from the HBsAg of remarkable importance for their therapeutic activity". The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to HBcAg, HIV antigens, HCV antigens, HPV antigens, tumor-associated antigens, and antigens from a virus which elicits a chronic disease.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU2004/000011

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0480525	A	15-04-1992	CU 22290 B1	06-09-1994
			AT 175445 T	15-01-1999
			AU 649482 B2	26-05-1994
			AU 8557491 A	30-04-1992
			DE 69130724 D1	18-02-1999
			DE 69130724 T2	17-06-1999
			DK 480525 T3	30-08-1999
			EP 0480525 A2	15-04-1992
			EP 0864649 A2	16-09-1998
			GR 3029582 T3	30-06-1999
			JP 3189212 B2	16-07-2001
			JP 5076370 A	30-03-1993
			JP 3242640 B2	25-12-2001
			JP 2001231582 A	28-08-2001
WO 03061692	A2	31-07-2003	CA 2471727 A1	31-07-2003
			EP 1493447 A2	05-01-2005
EP 1493447	A	05-01-2005	CA 2471727 A1	31-07-2003
			EP 1493447 A2	05-01-2005
			WO 03061692 A2	31-07-2003
WO 0243756	A2	06-06-2002	AU 2151802 A	11-06-2002
			BR 0115859 A	30-12-2003
			CA 2429543 A1	20-05-2003
			CN 1477972 T	25-02-2004
			EP 1346727 A2	24-09-2003
			JP 2004529861 T	30-09-2004
			US 2004202676 A1	14-10-2004
			ZA 200303948 A	30-03-2004
EP 1346727	A	24-09-2003	AU 2151802 A	11-06-2002
			BR 0115859 A	30-12-2003
			CA 2429543 A1	20-05-2003
			EP 1346727 A2	24-09-2003
			JP 2004529861 T	30-09-2004
			US 2004202676 A1	14-10-2004
			CN 1477972 T	25-02-2004
			WO 0243756 A2	06-06-2002
			ZA 200303948 A	30-03-2004
EP 1136077	A	26-09-2001	BR 9915946 A	21-08-2001
			CA 2352777 A1	08-06-2000
			EP 1136077 A1	26-09-2001
			CN 1332637 T	23-01-2002
			WO 0032229 A1	08-06-2000
WO 9939736	A	12-08-1999	AU 755957 B2	02-01-2003
			AU 2297399 A	23-08-1999
			CA 2319599 A1	12-08-1999
			EP 1053018 A2	22-11-2000
			WO 9939736 A2	12-08-1999
			JP 2002502828 T	29-01-2002

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000011

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN		
CIP 7 A61K39/39 A61K39/295 A61K39/29 A61K39/21		
Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA		
Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)		
CIP 7 A61K		
Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)		
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	EP 0 480 525 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 15 de Abril de 1992 (1992-04-15) cited in the application reivindicaciones 1, 20-22	1-9, 12-15, 21, 22
X	WO 03/061692 A2 (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA; AGUILAR RUBIDO, JULIO,) 31 de Julio de 2003 (2003-07-31) "Grupo 12"; figura 5; ejemplo 4	1-9, 12-16, 21-23
E	-& EP 1 493 447 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 5 de Enero de 2005 (2005-01-05) Grupo 12 en ejemplo 1; figura 5; ejemplo 4	1-9, 12-16, 21-23
X	WO 02/43756 A2 (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA; AGUILAR RUBIDO, JULIO,) 6 de Junio de 2002 (2002-06-06) ejemplos 3, 4, 6, 9	1-16, 21-23
-/-		
☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales. ☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente "B" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada) "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes		
Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 3 de Febrero de 2005		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 21 de Febrero de 2005
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Lonnoy, O Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000011

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	-& EP 1 346 727 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 24 de Septiembre de 2003 (2003-09-24) ejemplos 3,4,6,9	1-16, 21-23
A	EP 1 136 077 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA) 26 de Septiembre de 2001 (2001-09-26)	
A	VANLANDSCHOOT PETER ET AL: "Saccharomyces cerevisiae-derived HBsAg preparations differ in their attachment to monocytes, immune-suppressive potential, and T-cell immunogenicity." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 70, no. 4, Agosto de 2003 (2003-08), paginas 513-519, XP002316328 ISSN: 0146-6615 cited in the application	
A	HARDY E ET AL: "Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from Pichia pastoris" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 77, no. 2-3, Febrero de 2000 (2000-02), paginas 157-167, XP004185816 ISSN: 0168-1656	
A	MICHEL M-L: "Towards immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, 19 de Diciembre de 2002 (2002-12-19), paginas A83-A88, XP004397477 ISSN: 0264-410X	
A	WO 99/39736 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW; REIMANN, JORG; BARE) 12 de Agosto de 1999 (1999-08-12)	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000011

Recuadro II Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:

Although claims 21-27 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. ☐ Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. ☐ Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
3. ☐ Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

Observación sobre protesta ☐ Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.
☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CU2004/000011

Continuation of Box II.1

Although claims 21-27 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Present claim 10 relates to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to "antigens that will receive an adjuvant effect from the HBsAg of remarkable importance for their therapeutic activity". The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to HBcAg, HIV antigens, HCV antigens, HPV antigens, tumor-associated antigens, and antigens from a virus which elicits a chronic disease.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU2004/000011

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0480525	A	15-04-1992	CU 22290 B1	06-09-1994
			AT 175445 T	15-01-1999
			AU 649482 B2	26-05-1994
			AU 8557491 A	30-04-1992
			DE 69130724 D1	18-02-1999
			DE 69130724 T2	17-06-1999
			DK 480525 T3	30-08-1999
			EP 0480525 A2	15-04-1992
			EP 0864649 A2	16-09-1998
			GR 3029582 T3	30-06-1999
			JP 3189212 B2	16-07-2001
			JP 5076370 A	30-03-1993
			JP 3242640 B2	25-12-2001
			JP 2001231582 A	28-08-2001
WO 03061692	A2	31-07-2003	CA 2471727 A1	31-07-2003
			EP 1493447 A2	05-01-2005
EP 1493447	A	05-01-2005	CA 2471727 A1	31-07-2003
			EP 1493447 A2	05-01-2005
			WO 03061692 A2	31-07-2003
WO 0243756	A2	06-06-2002	AU 2151802 A	11-06-2002
			BR 0115859 A	30-12-2003
			CA 2429543 A1	20-05-2003
			CN 1477972 T	25-02-2004
			EP 1346727 A2	24-09-2003
			JP 2004529861 T	30-09-2004
			US 2004202676 A1	14-10-2004
			ZA 200303948 A	30-03-2004
EP 1346727	A	24-09-2003	AU 2151802 A	11-06-2002
			BR 0115859 A	30-12-2003
			CA 2429543 A1	20-05-2003
			EP 1346727 A2	24-09-2003
			JP 2004529861 T	30-09-2004
			US 2004202676 A1	14-10-2004
			CN 1477972 T	25-02-2004
			WO 0243756 A2	06-06-2002
			ZA 200303948 A	30-03-2004
EP 1136077	A	26-09-2001	BR 9915946 A	21-08-2001
			CA 2352777 A1	08-06-2000
			EP 1136077 A1	26-09-2001
			CN 1332637 T	23-01-2002
			WO 0032229 A1	08-06-2000
WO 9939736	A	12-08-1999	AU 755957 B2	02-01-2003
			AU 2297399 A	23-08-1999
			CA 2319599 A1	12-08-1999
			EP 1053018 A2	22-11-2000
			WO 9939736 A2	12-08-1999
			JP 2002502828 T	29-01-2002

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

(72)発明者 アギラール ルビド、ジュリオ、セザール
キューバ国、ラ ハバナ、グアナジャイ、 アベニダ 61、ヌメロ 7008、エントレ 70
イ 72

(72)発明者 イグレスias ペレス、エンリケ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、ハバナ デル エステ、 エディフィシオ 25 ア
パルトメント 103、リパルトミエント ”カミロ シエンフエゴス”

(72)発明者 ロバイナ マト、ヤディラ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、セロ、パルマー 12813、 エントレ インデペ
ンデンシア イ ボジェロス、リパルトミエント マルティ

(72)発明者 ガルシア ゴンザレス、デイミール
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、ラ リサ、 サン アグスティン、アベニダ 35、
エントレ 234 イ 236、 エディフィシオ 112、アパルトメント 2

(72)発明者 ムツィオ ゴンザレス、ヴェレーナ、ルシーラ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラザ、ヌエボ ベダド、 カレ 39 ヌメロ 8
71 エントレ 24 イ 26

(72)発明者 ギリエン ニエト、ヘラルド、エンリケ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラザ、ベダド、 リネア ヌメロ 6 エントレ
エネ イ オ ピソ 4

(72)発明者 アコスタ リヴェロ、ネルソン
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、10 デ オクトゥブレ、 サントス スアレス、ジ
ェネラル リー、ヌメロ 201 アルトス、 エントレ デ' ストラムペス イ フィゲロア

(72)発明者 ウビエタ ゴメス、ライムンド
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラヤ、キューバナキャン、 カレ 184、ヌメロ
3112、エントレ 31 イ 33

(72)発明者 アルヴァレス オブレゴン、ジュリオ、セザール
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラザ、ベダド、 カレ 17、ヌメロ 609、エ
ントレ ベ イ セ、

(72)発明者 ドゥエニャス カレラ、サンティアゴ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、 プラザ デ ラ レボルシオン、カレ：サン ラ
ファエル 1219、 エントレ マソン イ ロンダ

(72)発明者 ドゥアーテ カノ、カルロス
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラヤ、ラ シエラ、 カレ 21 ヌメロ 301
0、エントレ 30 イ 34

(72)発明者 ファンランドショット、ペーター
ベルギー国、ゲント、レンテシュトラート 22

(72)発明者 ヘレーラ マルティネス、ルイス、サトゥルニーノ
キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラヤ、 カレ 96、ヌメロ 303 アパルトメ
ント 3、 エントレ 3 イ 3ア

Fターム(参考) 4C085 AA02 BA49 BA51 CC40 DD08 DD32 DD86 EE01 EE03 EE06
GG01 GG10