

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6851983号
(P6851983)

(45) 発行日 令和3年3月31日(2021.3.31)

(24) 登録日 令和3年3月12日(2021.3.12)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 ZMDG
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675

請求項の数 43 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-556902 (P2017-556902)	(73) 特許権者	517237539
(86) (22) 出願日	平成28年4月27日 (2016.4.27)		イミューノヴァクシーン テクノロジーズ
(65) 公表番号	特表2018-514565 (P2018-514565A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成30年6月7日 (2018.6.7)		IMMUNOVACCINE TECHN
(86) 国際出願番号	PCT/CA2016/050487		OLOGIES INC.
(87) 国際公開番号	W02016/176761		カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー
(87) 国際公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		3 ビー2 シー4, ダートマス, アイリ
審査請求日	平成31年4月11日 (2019.4.11)		ーン スタブス アベニュー 130,
(31) 優先権主張番号	62/155,677		スイート 19
(32) 優先日	平成27年5月1日 (2015.5.1)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 池田 成人
		(74) 代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎
		(74) 代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デポー形成及びデポー非形成ワクチンを使用して免疫応答を強化する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デポー非形成ワクチンと組み合わせて使用する、抗原に対する免疫応答を強化するためのデポー形成ワクチンであって、

前記デポー形成ワクチンは、1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含み、

前記デポー形成ワクチンの前記疎水性担体は、油又は油の混合物であり、

前記デポー非形成ワクチンは、1つ又は複数の抗原を含み、

対象に少なくとも1回の用量の前記デポー形成ワクチンを、少なくとも1回の用量の前記デポー非形成ワクチンを投与する前に投与する、デポー形成ワクチン。

【請求項 2】

前記少なくとも1回の用量の前記デポー形成ワクチンのそれぞれが、前記1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を誘導することができるプライム用量であり、前記少なくとも1回の用量の前記デポー非形成ワクチンのそれぞれが、前記1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を維持及び/又はブーストすることができる維持又はブースト用量である、請求項1に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 3】

前記デポー非形成ワクチンの初回の維持又はブースト用量を、前記デポー形成ワクチンの最終プライム用量の約1日、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、又は10週間以内に投与することを含む、請求項2に記載のデポー形成ワクチン。

10

20

【請求項 4】

前記少なくとも 1 回の用量の前記デポー形成ワクチンが 1、2、3、4、又は 5 回の用量である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 回の用量の前記デポー非形成ワクチンが 1、2、3、4、又は 5 回の用量である、又は前記少なくとも 1 回の用量の前記デポー非形成ワクチンが、1 日 1 回、週に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、又は月に 1 回の連続的な反復投薬である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 6】

初回用量の前記デポー形成ワクチンの後、前記デポー形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与する、及び / 又は初回用量の前記デポー非形成ワクチンの後、前記デポー非形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 7】

前記デポー形成ワクチン及び前記デポー非形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 3 週間又は約 4 週間以内に投与する、請求項 6 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 8】

1 回又は 2 回の用量の前記デポー形成ワクチンを、前記デポー非形成ワクチンを投与する前に投与することを含む、請求項 6 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 9】

前記デポー形成ワクチンを 0 日目及び 21 日目に投与すること、及び前記デポー非形成ワクチンを 42 日目に投与することを含む、請求項 8 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 10】

前記デポー形成ワクチンを 0 日目に投与すること、及び前記デポー非形成ワクチンを 21 日目及び 42 日目に投与することを含む、請求項 8 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 11】

DNA 複製を妨げる薬剤及び / 又は免疫応答チェックポイント阻害剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 12】

DNA 複製を妨げる薬剤を投与することを含み、前記 DNA 複製を妨げる薬剤がシクロホスファミドである、請求項 11 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 13】

1 サイクルの低用量の規則的なシクロホスファミドを含み、前記サイクルが、前記シクロホスファミドを、1 日 1 回、2 週間毎に開始する 7 日間の連続した日数の期間の間、前記対象に投与することを含む、請求項 12 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 14】

前記シクロホスファミドを前記デポー形成ワクチンの初回投与の 7 日前に最初に投与する、請求項 13 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 15】

前記疎水性担体が、鉱物油である、又は鉱物油溶液中のオレイン酸マンニドである、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 16】

前記デポー形成ワクチンが水を含まない、又は水を実質的に含まない、請求項 1～15 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 17】

前記 1 つ又は複数の抗原が前記油中に混和性であるように、前記 1 つ又は複数の抗原が十分に疎水性である、又は十分に疎水性にする、請求項 15 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 18】

前記 1 つ又は複数の抗原が天然に疎水性である、又は前記デポー形成ワクチン中の両親媒性物質の存在によって十分に疎水性になる、請求項 1 7 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 1 9】

前記両親媒性物質が前記 1 つ又は複数の抗原と密に会合して、前記 1 つ又は複数の抗原が前記疎水性担体中で混和性になる、及び / 又は前記両親媒性物質がシート又は小胞構造を形成し、前記 1 つ又は複数の抗原を部分的に又は完全に取り囲む、請求項 1 8 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 0】

前記両親媒性物質が脂質である、請求項 1 8 又は 1 9 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 1】

前記脂質が前記 1 つ又は複数の抗原の周りに閉じた小胞構造を形成する、請求項 2 0 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 2】

前記閉じた小胞構造が逆転ミセルである、請求項 2 1 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 3】

前記デポー非形成ワクチンが水性担体を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 4】

前記デポー形成ワクチン及び / 又は前記デポー非形成ワクチンがアジュバント及び / 又はヘルパー T エピトープをさらに含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 5】

前記アジュバントがポリ I : C ポリヌクレオチドであり、前記ヘルパー T エピトープがアミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 6 1) 又は F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E (配列番号 6 3) を含む、請求項 2 4 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 6】

前記 1 つ又は複数の抗原が、(i) ウイルス、細菌、若しくは原虫に由来する、(i i) 膜表面結合癌抗原である、又は (i i i) 毒素である、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 7】

前記抗原が、エボラウイルス、ヒトパピローマウイルス (H P V)、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、百日咳菌、炭疽菌、又は四日熱マラリア原虫に由来する、請求項 2 6 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 8】

前記抗原がサバイピン抗原である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 2 9】

前記サバイピン抗原が、サバイピンタンパク質からのアミノ酸配列 (配列番号 5 3) を含むペプチド抗原若しくはその変異体、又は前記ペプチド抗原をコードしている核酸分子である、請求項 2 8 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 3 0】

前記 1 つ又は複数の抗原が、F E E L T L G E F (配列番号 5 4)、F T E L T L G E F (配列番号 5 5)、L T L G E F L K L (配列番号 5 6)、L M L G E F L K L (配列番号 2)、R I S T F K N W P F (配列番号 5 7)、R I S T F K N W P K (配列番号 5 8)、S T F K N W P F L (配列番号 5 9)、及び L P P A W Q P F L (配列番号 6 0) からなる群より選択されるアミノ酸配列、若しくはその任意の組合せを含む 1 つ又は複数のペプチド抗原、又は前記 1 つ又は複数のペプチド抗原をコードしている 1 つ又は複数の核酸分子を含む、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

前記 1 つ又は複数の抗原が、アミノ酸配列 F T E L T L G E F (配列番号 55) を含む第 1 のペプチド抗原、アミノ酸配列 L M L G E F L K L (配列番号 2) を含む第 2 のペプチド抗原、アミノ酸配列 R I S T F K N W P K (配列番号 58) を含む第 3 のペプチド抗原、アミノ酸配列 S T F K N W P F L (配列番号 59) を含む第 4 のペプチド抗原、及びアミノ酸配列 L P P A W Q P F L (配列番号 60) を含む第 5 のペプチド抗原を含む 5 つのペプチド抗原の混合物を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 32】

前記抗原がヒトパピローマウイルス (HPV) に由来するペプチド抗原又は前記ペプチド抗原をコードしている核酸分子である、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

10

【請求項 33】

前記 HPV に由来するペプチド抗原が、アミノ酸配列 Y M L D L Q P E T T (配列番号 44)、Y M L D L Q P E T (配列番号 45)、L L M G T L G I V (配列番号 46)、又は T L G I V C P I (配列番号 47) を含む、請求項 32 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 34】

前記抗原が自己抗原、癌関連抗原及び / 又は免疫原性の弱い抗原である、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

20

【請求項 35】

前記デポー形成ワクチンが、

(i) アミノ酸配列 F T E L T L G E F (配列番号 55) を含む第 1 のペプチド抗原、アミノ酸配列 L M L G E F L K L (配列番号 2) を含む第 2 のペプチド抗原、アミノ酸配列 R I S T F K N W P K (配列番号 58) を含む第 3 のペプチド抗原、アミノ酸配列 S T F K N W P F L (配列番号 59) を含む第 4 のペプチド抗原、及びアミノ酸配列 L P P A W Q P F L (配列番号 60) を含む第 5 のペプチド抗原を含む 5 つのサバイビンペプチド抗原、

(ii) アミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 61) を含むヘルパー T エピトープ、

(iii) ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント、

30

(iv) 1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに

(v) 疎水性担体モンタニド (登録商標) I S A 51 V G

を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 36】

前記デポー非形成ワクチンが、同じ構成成分 (i)、(ii)、(iii)、及び (iv)、並びに水担体を含む、請求項 35 に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 37】

前記デポー形成ワクチンが、

(i) ヒトパピローマウイルス (HPV) に由来するペプチド抗原、

40

(ii) アミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 61) を含むヘルパー T エピトープ、

(iii) ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント、

(iv) 1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、及び

(v) 疎水性担体モンタニド (登録商標) I S A 51 V G

を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 38】

前記デポー非形成ワクチンが、同じ構成成分 (i)、(ii)、(iii)、及び (iv)、並びに水担体を含む、請求項 37 に記載のデポー形成ワクチン。

50

【請求項 39】

前記対象において細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答及び／又は抗体免疫応答を強化するためのものである、請求項 1 ～ 38 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 40】

前記対象が前記抗原に対して事前の免疫応答を有していない、請求項 1 ～ 39 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 41】

癌、感染性疾患、又は嗜癬疾患を治療又は予防するためのものである、請求項 39 又は 40 に記載のデポー形成ワクチン。

10

【請求項 42】

前記デポー非形成ワクチンが、前記デポー形成ワクチンよりも素早く注射部位からクリアランスされる、請求項 1 ～ 41 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【請求項 43】

前記免疫応答の強化が注射部位反応の発生率の低下を含む、請求項 1 ～ 42 のいずれか一項に記載のデポー形成ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

[0001]本出願は、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている、2015年5月1日に本願の米国仮出願第62/155,677号の利益及び優先権を主張するものである。

20

【分野】

【0002】

[0002]本発明は、一般に、免疫応答を強化する方法、特に、デポー形成ワクチン及びデポー非形成ワクチンを使用したプライム - ブースト戦略を含む方法に関する。

【背景】

【0003】

[0003]免疫療法、特に癌の免疫療法では、ワクチン抗原に対して十分に強力な免疫応答を生じさせることが大きな障害である。癌ワクチン抗原に対する免疫応答は、多くの場合、腫瘍内で免疫回避の機構として源を発する免疫寛容機構によって妨げられている（Kimら、Immunology、2007）。

30

【0004】

[0004]ペプチドなどの、高度に精製された及び合成の抗原は、多くの場合は免疫原性が乏しく、したがって、頑強な免疫応答を促進するためにアジュバントなどの免疫刺激剤を必要とする（Irvine、Nat Mater、2013）。この要件は、水性緩衝液、又はモンタニド（Montanide）ISA51 VG油を用いた水中油乳濁液、又はモンタニドISA51 VG油及びTLR作用剤アジュバントを用いた水中油乳濁液のいずれか中で調製したNY-ESO-1（81-100）ペプチドで免疫化した卵巢癌患者において実施した臨床試験において実証された（Tsujira、Cancer Immunol Res、2013、Sabbatiniら、Clin Can Res、2012）。この試験では、水性緩衝液中のこのペプチドを用いてワクチン接種した患者は、抗原特異的な抗体産生又は抗原特異的なCD8+若しくはCD4+T細胞によって検出されるように、抗原特異的な免疫応答を発生しなかった（ELISA、ELISPOT、細胞内染色、及び四量体染色によってアッセイ）。しかし、TLR作用剤アジュバントを用いて又は用いずにモンタニドISA51 VG油乳濁液で免疫化した患者は、抗原に対して強力なB細胞及びT細胞免疫応答を発生した。モンタニドISA51油中水乳濁液は抗原のデポー効果をもたらし、その乳濁液がin vivoで分解されるにつれて、in vivo安定性を増加させて抗原を免疫系へとゆっくり放出した。免疫応答の維持及び検出は、モンタニドISA51油中水乳濁液ワクチンを用いた免疫化の反復を必要とした。

40

50

【 0 0 0 5 】

[0005]他のモンタニド油ベースの配合物 (K a r k a d a ら、J I m m u n o t h e r、2 0 1 0) は、単一の免疫化で、癌ワクチン抗原に対する迅速、強力、及び持続性のある抗原特異的免疫応答を誘導することができる。

【 0 0 0 6 】

[0006]免疫応答の維持、たとえば腫瘍に誘導される免疫抑制の状況下におけるものは、多くの場合、複数回のブースト免疫化を必要とする。油ベースの配合物をブースター免疫化に使用することができるが、そのようなワクチン配合物を用いた免疫系の再刺激は、強力な全身性免疫応答と持続性の抗原デポの組合せが原因で、ワクチン部位で増加した問題ある反応をもたらし場合がある。これはそのようなワクチンを使用した臨床試験における一般的な観察結果であり、文書化されている (S t i l l s、I L A R、2 0 0 5、S a b b a t i n i ら、C l i n C a n R e s、2 0 1 2)。

10

【 0 0 0 7 】

[0007]本開示では、本発明者らは、1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を強化する新規方法、及び記載した方法において使用することができるワクチン組成物を報告する。

【 概要 】

【 0 0 0 8 】

[0008]一実施形態では、本開示は、対象において抗原に対する免疫応答を強化する方法であって、

(i) 少なくとも1回の用量の、疎水性担体中に1つ又は複数の抗原を含むデポ形成ワクチンを対象に投与するステップと、

20

(i i) 続いて、少なくとも1回の用量の、1つ又は複数の抗原を含むデポ非形成ワクチンを対象に投与するステップとを含む、方法に関する。

【 0 0 0 9 】

[0009]別の実施形態では、本開示は、抗原に対する免疫応答を強化するための、デポ非形成ワクチンと組み合わせたデポ形成ワクチンの使用であって、少なくとも1回の用量の、抗原及び疎水性担体を含むデポ形成ワクチンが、抗原を含むデポ非形成ワクチンの前に投与するためのものである、使用に関する。

【 0 0 1 0 】

30

[0010]別の実施形態では、本開示は、1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含むデポ形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器と、1つ又は複数の抗原を含むデポ非形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器とを含むキットに関する。

【 0 0 1 1 】

[0011]別の実施形態では、本開示は、それぞれが1つ又は複数の抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質を含む少なくとも2つの容器と、疎水性担体を含む少なくとも1つの容器と、水性担体を含む少なくとも1つの容器とを含み、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、疎水性担体を用いて再溶解してデポ形成ワクチンを調製するためのものであり、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、水性担体を用いて再溶解してデポ非形成ワクチンを調製するためのものであるキットに関する。

40

【 0 0 1 2 】

[0012]別の実施形態では、本開示は、本明細書中に記載の方法において使用するための、1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含むデポ形成ワクチンと、1つ又は複数の抗原を含むデポ非形成ワクチンとの組合せに関する。

【 0 0 1 3 】

[0013]他の態様では、本発明の実施形態及び特長は、以下の説明を添付の特許請求の範囲及び図面と併せて参照することによって当業者に明らかとなるであろう。

【 0 0 1 4 】

[0014]以下の図は、本発明の実施形態を例としてのみ例示する。

50

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】油ベースの（第1群）又は水性ベースの（第2群）の配合物のいずれか中に含有される抗原をワクチン接種したHHD-DR1マウスのIFN-ガンマELISPOT応答を例示する図である。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOTプレート中で、ペプチドなし（バックグラウンド）、又は無関係のHLA-A2制限ペプチド（ALMEQQHYV、配列番号1）若しくはサバイピンHLA-A2制限ペプチド（SurA2.M、LMLGEFLKL、配列番号2）をローディングした同系の樹状細胞でリンパ節細胞を刺激することによって、ワクチン接種の8日後に測定した。統計分析は二元ANOVAによって行い、ボンフェローニ事後検定でSurA2.Mペプチドに対する応答を無関係のペプチドに対する応答と比較した。*** $p < 0.001$ 、NS（有意でない） $p > 0.05$ 。

10

【図2】油ベースのワクチン中で配合したサバイピンペプチドでプライミングし、その後、油ベースのワクチン（第1群）又は水性ベースのワクチン（第2群）のどちらか中のサバイピンペプチドでブーストした、HHD-DR1マウスのIFN-ガンマELISPOT応答を例示する図である。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOTプレート上で、培地（バックグラウンド）、又はHLA-A2制限サバイピンペプチド（SurA2.M、LMLGEFLKL、配列番号2）若しくは無関係のHLA-A2制限ペプチド（ALMEQQHYV、配列番号1）で脾細胞を刺激することによって、ブースト免疫化の8日後に測定した。統計分析は二元ANOVAによって行い、ボンフェローニ事後検定でSurA2.Mペプチドに対する応答を無関係のペプチドに対する応答と比較した。* $p < 0.05$ 、**** $p < 0.0001$ 。

20

【図3】油ベースのワクチンでプライミングし、油ベースのワクチン又は水性ワクチンでブーストし、同時に規則的なシクロホスファミド治療を行ったマウスのIFN-ガンマ応答を例示する図である。すべてのマウスを規則的なシクロホスファミド（20ミリグラム/キログラム/日）で1週間オン、1週間オフ処理し、0、21、及び42日目にワクチン接種した。第1群のマウスには、油ベースのワクチンを3回ワクチン接種した。第2群のマウスには、油ベースのワクチンを2回、及び水性ワクチンを1回ワクチン接種した。第3群のマウスには、油ベースのワクチンを1回、水性ワクチンを2回ワクチン接種した。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOTプレート上で、培地（バックグラウンド）、又はHPV16E7₄₉₋₅₇ペプチド（R9F、RAHYNIVTF、配列番号3）若しくは無関係のペプチド（RMFPNAPYL、配列番号4）で脾細胞を刺激することによって、最後の免疫化の8日後（50日目）に測定した。結果は平均応答 \pm SEMとして示す。統計分析は一元ANOVAによって行い、チューキー事後検定で群の応答をR9Fペプチドと比較した。

30

【図4】マウスモデルにおける癌の治療のための、油ベースのワクチン、水性ワクチン、及び規則的なシクロホスファミドを用いた治療の有効性を例示する図である。研究0日目にマウスにC3腫瘍を移植した。第1群のマウスは治療しないままであった。第2～4群のマウスは、研究5日目から開始して、1週間オン及び1週間オフを交互に、規則的なシクロホスファミド（20mg/kg/日）で治療した。また、これらの群は、研究の12、33、及び54日目にもワクチン接種した。第2群のマウスには、油ベースのワクチンを3回ワクチン接種し、第3群のマウスには、油ベースのワクチンを2回、及び水性ワクチンを1回ワクチン接種し、第4群のマウスには、油ベースのワクチンを1回、水性ワクチンを2回ワクチン接種した。図4Aは平均腫瘍体積/群 \pm SEMを示す。図4Bはパーセント生存を示す。

40

【図5】油ベースのワクチンによって誘導された免疫応答を維持する又は増加させるためにブースト免疫化が必要であることを示す図である。マウスに、SurA2.Mペプチド（LMLGEFLKL、配列番号2）を含有する油ベースのワクチンを1回（第1群）又は2回（第2群）をワクチン接種した。免疫応答は、最後の免疫化の8日後にIFN-ガンマELISPOTによって検出した。第3群のマウスには、SurA2.Mペプチドを

50

含有する油ベースのワクチン2回ワクチン接種し、免疫応答を最後の免疫化の27日後にIFN-ガンマELISPOTによって検出した。無関係のHLA-A2制限ペプチド(ALMEQQHYV、配列番号1)又は培地のみ(バックグラウンド)が陰性対照として役割を果たした。統計分析は一元ANOVAによって行い、チューキー事後検定でそれぞれの群のSurA2-M刺激に対する応答を比較した。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 。

【図6】免疫応答をプライミングするためのDPX-Survivac(油)、次いで免疫応答をブースト及び維持するためのDPX-Survivac(水性)の安全性及び免疫原性を評価するための、第Ib相臨床試験の設計を示す図である。DPX-Survivac(油)を研究の0及び28日目に投与した(0.25ミリリットル用量)。DPX-Survivac(水性)を研究の56、84、及び112日目に投与した(0.50ミリリットル用量)。低用量シクロホスファミド(50ミリグラム用量、1日2回、Baxter)は、経口投与によって14日毎に7日間の連続した日の間与え、最初のワクチン接種の7日前(研究の-7日目)に開始し、19週間後に完了する。血液試料を最初のワクチン接種(ベースライン)の前、その後、研究の0、28、42、56、84、及び112日目に採取して、末梢血単核球(PBMC)を単離及び凍結保存した。また、のちの可能な時点でも血液試料を採取した。PBMCは、ELISPOT及び多量体フローサイトメトリーを含めた免疫学的アッセイに使用した。

【図7】免疫応答が研究0~112日目に、DPX-Survivac(油)をワクチン接種し、DPX-Survivac(水性)でブーストした対象03~28において検出されたことを示す図である。図6に概要を示すように、対象を低用量シクロホスファミド、DPX-Survivac(油)(黒矢印)、及びDPX-Survivac(水性)(白抜き矢印)で治療した。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOT(A)、並びに研究の0、28、42、56、84、及び112日目に採取した血液から単離したPBMCを使用したSurA2-Mに特異的なT細胞(B)の多量体染色によって測定した。

【図8】免疫応答が研究0~112日目に、DPX-Survivac(油)をワクチン接種し、DPX-Survivac(水性)でブーストした対象03~30において検出されたことを示す図である。図6に概要を示すように、対象を低用量シクロホスファミド、DPX-Survivac(油)(黒矢印)、及びDPX-Survivac(水性)(白抜き矢印)で治療した。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOT(A)、並びに研究の0、28、42、56、84、及び112日目に採取した血液から単離したPBMCを使用したSurA1-Tに特異的なT細胞(B)の多量体染色によって測定した。

【詳細な説明】

【0016】

[0023]強力且つ延長された免疫応答の発生は、特に癌の免疫療法及び/又は強力な細胞性免疫応答の発生のために、多くの場合はワクチンの反復投与を必要とする。免疫学者の大きな課題は、顕著な有害作用なしに免疫応答を強化し免疫寛容機構を回避するワクチン及び投与方法の開発であった。多少の成功はあったものの、本明細書中に記載の「免疫原性の弱い抗原」などの特定の抗原が、現在のワクチン接種手法に問題を引き起こすことが明らかとなった。また、たとえば癌などの特定の種類の疾患は、多くの場合、慣習的なワクチン及び従来の投与戦略によって特徴的に生じる細胞性及び液性の免疫に抵抗することができる。

【0017】

[0024]免疫応答の維持、たとえば腫瘍に誘導される免疫抑制の状況下におけるものは、多くの場合、複数回の免疫化を必要とする。しかし、油ベースの配合物を用いた免疫系の再刺激は、強力な全身性免疫応答と持続性の抗原デポの組合せが原因で、ワクチン注射部位で増加した問題ある反応をもたらす場合がある。そのようなワクチンを使用した臨床試験における一般的な観察結果であり、文書化されている(Stillis、ILAR、2005、Sabbatiniら、Clin Can Res、2012)。

【0018】

[0025]また、本発明者らは、卵巣癌の第Ⅰ相研究において、サバイピン抗原を含有するモンタニドISA51ベースのワクチンの反復注射の後に、免疫化部位で有害事象も観察した。本発明者らは、注射部位反応は、ワクチンを置いた部位でのT細胞及び他の免疫細胞の持続性の浸潤によって媒介されることを見出した。これらの注射部位の免疫反応は、臨床的に有用なワクチン及びワクチン投与戦略の開発において困難をもたらす。

【0019】

[0026]本開示は、対象において抗原に対する免疫応答を強化するための方法及びワクチンを提供する。開示する方法はワクチン接種の改変された戦略を含み、これには、デポー形成ワクチンでプライミングすることで、頑強な抗原特異的免疫応答を誘導し、さらには注射部位反応を低下させ（デポー形成ワクチンの疎水性の構成成分、たとえば油によって主に媒介される）、同じ抗原を含有するデポー非形成ワクチン配合物を用いた免疫応答を維持及び／又はブーストすることが含まれる。デポー非形成（たとえば水性）ワクチンは免疫応答をプライミングすることができなかった一方で、本発明者らは驚くべきことに、事前にデポー形成（たとえば油ベースの）ワクチンでプライミングした対象において免疫応答を維持する、さらにはブーストすることが可能であることを見出した。これらの結果は、マウス及びヒトの臨床試験のどちらの前臨床研究においても実証されている。

【0020】

[0027]一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、（i）少なくとも1回の用量の、疎水性担体中に1つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンを対象に投与するステップと、（ii）続いて、少なくとも1回の用量の、1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンを対象に投与するステップとを含む。一実施形態では、対象はワクチン中の抗原に対して事前の免疫応答は有さない。

【0021】

[0028]本明細書中で使用する「強化する」又は「強化すること」とは、抗原に対する免疫応答がより有効となる、又は有害事象の強度及び／又は期間が回避される、無効となる、若しくは軽減されることを意味する。「より有効」とは、免疫応答が、対象の事前の免疫応答状態と比較して、対象に有利となるように、増強、上昇、改善、強化、又は延長されていることを意味する。

【0022】

[0029]一部の実施形態では、「強化する」とは、抗原に対する免疫応答の誘導、誘発、又は発生において改善された有効性が存在することを意味する。本明細書中で使用する「改善された有効性」、「有効性を改善させる」などとは、疾患又は障害の治療においてワクチンをより有効にすることができる、対象の免疫応答における任意の変化又は変更をいう。一部の実施形態では、このことは、免疫応答の見かけを加速させること、及び／又は免疫応答の持続性若しくは強度を改善させることを含み得る。

【0023】

[0030]一部の実施形態では、「強化する」とは、デポー形成ワクチンを用いた免疫化によって事前にプライミングした対象において、抗原特異的なリコール応答を誘導、強化、又は延長させる能力をいう。抗原への最初の曝露の際に起こるプライミングした免疫応答に対して、リコール免疫応答とは、抗原に対する2回目及び／又は続く曝露の際に起こる免疫応答であり、プライム免疫化によって事前に生じさせた免疫応答を再確立させるものである。

【0024】

[0031]一部の実施形態では、「強化する」とは、デポー形成ワクチンを用いた免疫化によって事前にプライミングした対象において、抗原特異的免疫応答を維持及び／又はブーストする能力をいう。「維持及び／又はブーストする」とは、事前に誘導した免疫応答が、対象に有利となるように、増強、上昇、改善、強化、又は延長されていることを意味する。

【0025】

[0032]一部の実施形態では、「強化する」とは、有害事象の発生率を低下させる能力を

いう。たとえば、一実施形態では、免疫応答の強化は、デポー形成ワクチンの単一又は反復投与によって引き起こされる注射部位反応の発生率の低下を含み得る。本実施形態では、免疫応答は、デポー形成ワクチンを用いて免疫応答をプライミングすること、並びにデポー非形成ワクチンを用いて免疫応答を維持及び／又はブーストすることによって強化し得る。

【0026】

[0033]本明細書中に開示する方法において使用することができるデポー形成及びデポー非形成ワクチンを以下に記載する。特に適切な実施形態では、デポー形成ワクチンは、水を含まない又は実質的に水を含まない、油ベースのワクチンであり、デポー非形成ワクチンは水性ワクチンである。

【0027】

[0034]デポー形成ワクチンの少なくとも1又は2回のプライム用量の投与が、デポー非形成ワクチンによって維持及び／又はブーストすることができる免疫応答を生じるために十分であることが、驚くべき且つ予想外に見いだされた。水性ベースのワクチン（すなわちデポー非形成ワクチン）は多くの場合、特に癌の分野において、又は免疫原性の弱い抗原の投与において、免疫応答を生じるように作用しないことが知られているため、このことは驚くべきである。このことは、水性ベースのワクチンは抗原特異的免疫応答を生じることができなかった（第2群）一方で、同じ抗原を有する油ベースのワクチン（すなわちデポー形成ワクチン）は抗原特異的免疫応答を誘導することができた（第1群）ことが観察された、本明細書中の実施例1及び図1によって強調されている。

【0028】

[0035]しかし、1又は2回のプライム用量の油ベースのデポー形成ワクチンを、同じ油ベースのワクチン又は水性ベースのワクチンのどちらかでブーストする前に投与する実施例2及び3では、水性ベースのワクチンが免疫応答を維持及び／又はブーストするために十分な配合物であったことが見いだされた（図2及び3を参照）。実際、図3では、油ベースのワクチンを用いた1つのみのプライム用量の後、2回のブースト用量の水性ベースのワクチンが、すべてのワクチン接種を油ベースのワクチンを使用して行った治療群と同等の免疫応答を生じたことが示されている（それぞれ第3群及び第1群を比較）。

【0029】

[0036]これらの驚くべき且つ予想外の結果は、腫瘍成長からの保護において有効な治療上の利点につながるが見いだされた。実施例4は、油ベースのワクチンを用いたプライミング、その後、同じ抗原を含有する水性ベースのワクチンを用いたブーストが、すべてのワクチン接種が油ベースのワクチンである治療と比較して、同等又はより良好な腫瘍成長からの保護をもたらすことを実証している（それぞれ第4群及び第2群を比較、図4A及び4B）。

【0030】

[0037]反復ブースター免疫化を投与することの重要性は、ワクチンによって誘導された抗原特異的免疫応答は、ブーストなしでは時間と共に減退することを実証している実施例5によってさらに強調されている。図5に示すように、免疫応答は、ブースターワクチン接種の投与後、27日間以内に顕著に降下した。このことは、免疫応答を維持及び／又はブーストするために、さらなるブースター免疫化が重要であることを確立している。

【0031】

[0038]また、本発明者らは、ヒト臨床試験によって、本明細書中に開示する方法が、驚くべきことに、HLA-A1及びHLA-A2陽性対象における抗原特異的免疫応答の誘導及び維持／ブーストにおいて有効であることを実証した。実施例6～8では、例示的なデポー形成ワクチン（DPX-Survivac（油））が、HLA-A1+及びHLA-A2+ヒト対象のどちらにおいても、ワクチン抗原に対する事前の免疫応答なしで、免疫応答をプライミングすることができた。続く例示的なデポー非形成ワクチン（DPX-Survivac（水性））を用いたブースト免疫化は、これらの免疫応答を上昇したレベルでも維持することができた（図6～8）。

【 0 0 3 2 】

[0039]デポー形成ワクチンを用いてプライミングすること、続いてデポー非形成ワクチンを用いて免疫応答を維持及び／又はブーストすることによって、デポー形成ワクチンに対する注射部位反応の発生率も低下するはずである。デポー非形成ワクチン（たとえば水性ベースのワクチン）はデポー形成ワクチン（たとえば油ベースのワクチン）よりも素早く注射部位からクリアランスされ、それによって注射部位反応を潜在的に軽減させる。さらに、脂質両親媒性物質がデポー形成及びデポー非形成ワクチンの両方で使用されている本開示の実施形態では、デポー非形成ワクチン中に存在する脂質が抗原提示細胞の誘引物質として作用し得る。

【 0 0 3 3 】

10

[0040]プライム用量のデポー形成ワクチン後にデポー非形成ワクチンを受けた、例中に概要を示した患者では、実際に、すべての注射部位反応は穏やかであり（グレード1）、紅班、そう痒症、硬結、及び疼痛からなっていたことが観察された。また、これらの部位反応の大多数は、特に注射部位が水性配合物を受けた場合は2～3カ月後に完全に回復していた。

【 0 0 3 4 】

[0041]免疫応答を強化する方法

【 0 0 3 5 】

[0042]対象において免疫応答を強化する本発明の方法は、少なくとも1回の用量の、疎水性担体中に1つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンと、続いて、少なくとも1回の用量の、1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンとの組み合わせた投与を含む。

20

【 0 0 3 6 】

[0043]デポー形成ワクチンを本明細書中以下に記載する。デポー形成ワクチンの特に適切な実施形態は、水を含まない又は実質的に水を含まない、油ベースのワクチンである。

【 0 0 3 7 】

[0044]一般的には、少なくとも1回の用量のデポー形成ワクチンのそれぞれは、1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を誘導することができるプライム用量である。本明細書中で使用する「プライム用量」とは、ワクチンが1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を開始する能力をいう。これは、抗原に対する既存の免疫応答を維持及び／又はブーストするリコール免疫応答と対照的である。本明細書中で使用する用語「プライム用量」は、デポー形成ワクチンを使用した抗原の初回投与（たとえば1回目の曝露）を包含するだけでなく、やはり抗原に対する免疫応答を開始させるために使用する1つ又は複数の続く投与も、これらの投与がデポー非形成ワクチンの初回投与の前である限りは包含し得ることを理解されたい。

30

【 0 0 3 8 】

[0045]抗原に対する免疫応答を誘導するためにデポー形成ワクチンのプライム用量の投与の回数、期間、及び間隔を決定することは、当業者の能力範囲内にある。これらの特長は、たとえば、使用する抗原、免疫応答（液性若しくは細胞性）、及び／又は治療する疾患若しくは障害に依存し得る。

40

【 0 0 3 9 】

[0046]一部の実施形態では、少なくとも1回の用量のデポー形成ワクチンは1、2、3、4、又は5回の用量である。より詳細な実施形態では、少なくとも1回の用量のデポー形成ワクチンは1又は2回の用量であり、さらなる実施形態では1回の用量のみである。用量の数は、抗原に対する免疫応答を誘導するために十分であるべきである。

【 0 0 4 0 】

[0047]デポー形成ワクチンの投与の間隔は、免疫応答の誘導の顕著な減退が起こらないよう、十分に近いべきである。一部の実施形態では、初回用量のデポー形成ワクチンの後、デポー形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約1日、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、又は10週間以内に投与す

50

る。より詳細な実施形態では、デポー形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約1日、1週間、2週間、3週間、又は4週間以内に投与し、さらなる実施形態では、直前の用量の約3又は4週間後に投与する。

【0041】

[0048]初回用量から最終用量までの、デポー形成ワクチンを投与し得る期間は、抗原に対する免疫応答を開始させるために十分であるが、デポー形成ワクチンに対する注射部位反応などの有害作用に遭遇するほど長くないべきである。一部の実施形態では、デポー形成ワクチンのプライム用量の初回から最終用量までの期間は、0日間（すなわち単回投与）、1週間、2週間、3週間、4週間（1カ月間）、2カ月間、又は3カ月間である。より詳細な実施形態では、期間は3又は4週間である。

10

【0042】

[0049]一部の実施形態では、デポー形成ワクチンのプライム用量と併せて、デポー形成ワクチンは、プライム用量として使用されない別の時点で対象に追加で投与し得る。たとえば、デポー形成ワクチンは、デポー非形成ワクチンを用いた治療過程の間、又はその後投与し得る。これらの実施形態では、デポー形成ワクチンは維持又はブースト用量として使用される。これらの追加の用量のデポー形成ワクチンの投与の回数、期間、及び間隔を決定することは、当業者の能力範囲内にある。一部の実施形態では、回数、期間、及び間隔は、用量の数が抗原に対する免疫応答を開始又は誘導する能力に基づかないことを除いて、デポー形成ワクチンのプライム用量について上述したものと同じであり得る。

【0043】

20

[0050]本明細書中に開示する方法では、デポー非形成ワクチンは少なくとも1回の用量のデポー形成ワクチンに続けて投与する。「続いて投与する」又は「～に続けて投与する」とは、デポー非形成ワクチンを、少なくとも1回の用量のデポー形成ワクチンの後のある時点に投与することを意味する。一部の実施形態では、「続いて投与する」とは、デポー非形成ワクチンは、少なくとも何らかの測定可能又は検出可能なレベルの抗原に対する免疫応答が検出できるまでは投与しないことを意味する。

【0044】

[0051]一般的には、少なくとも1回の用量のデポー非形成ワクチンのそれぞれは、1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を維持及び/又はブーストすることができる維持又はブースト用量である。本明細書中で使用する「維持又はブースト用量」とは、1つ又は複数の抗原に対する免疫応答を維持、延長、及び/又は増強する、ワクチンの能力をいう。免疫応答が以前に観察又は測定されたものと同じレベルで維持される必要はない。本明細書中で使用する、免疫応答を「維持及び/又はブーストする」ことには、免疫応答が、対象に治療上の利点をもたらすために十分なレベルで維持される実施形態が包含される。ワクチン投与の間に免疫応答の強度が、場合によっては検出不可能又は測定不可能なレベルにまで減少する期間が存在し得ることを理解されたい。そのような場合、免疫応答を「維持及び/又はブーストする」こととは、抗原に対する既存の免疫応答からリコール応答を有効に誘導する、デポー非形成ワクチンの能力をいう。

30

【0045】

[0052]抗原に対する免疫応答を維持及び/又はブーストするためにデポー非形成ワクチンの維持又はブースト用量の投与の回数、期間、及び間隔を決定することは、当業者の能力範囲内にある。これらの特長は、たとえば、使用する抗原、免疫応答（液性若しくは細胞性）、及び/又は治療する疾患若しくは障害に依存し得る。

40

【0046】

[0053]一部の実施形態では、少なくとも1回の用量のデポー非形成ワクチンは1、2、3、4、又は5回の用量である。別の実施形態では、少なくとも1回の用量のデポー非形成ワクチンは連続的な反復投薬である。「連続的な反復投薬」とは、治療を中断する判断が下されるまで、デポー非形成ワクチンの投与が任意の回数の投与の間続くことを意味する。連続的な反復投薬の期間中、デポー非形成ワクチンの投与の頻度（間隔）を変化させ得る。一実施形態では、少なくとも1回の用量のデポー非形成ワクチンは、1日1回、週

50

に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、又は月に 1 回の連続的な反復投薬である。

【 0 0 4 7 】

[0054]デポー非形成ワクチンの投与は、抗原に対するリコール応答を誘導することが可能に保たれるように、十分に近い間隔であるべきである。一部の実施形態では、初回用量のデポー非形成ワクチンの後、デポー非形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、又は 10 週間以内に投与する。より詳細な実施形態では、デポー形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与し、さらなる実施形態では、直前の用量の約 3 又は 4 週間後に投与する。

【 0 0 4 8 】

[0055]初回用量のデポー非形成ワクチンは少なくとも 1 回の用量のデポー形成ワクチンに続けて投与する。デポー形成ワクチンの少なくとも 1 回の投与が初回用量のデポー非形成ワクチンの前に起こる限りは、デポー形成ワクチンのプライム用量及び維持又はブースト用量のデポー非形成ワクチンの投与が重複していてもよい。

【 0 0 4 9 】

[0056]最終プライム用量のデポー形成ワクチン及び初回用量のデポー非形成ワクチンは、抗原に対するリコール応答を誘導することが可能に保たれるように、十分に近い間隔であるべきである。一部の実施形態では、本明細書中の方法は、デポー非形成ワクチンの初回の維持又はブースト用量を、デポー形成ワクチンの最終プライム用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、又は 10 週間以内に投与することを含む。より詳細な実施形態では、デポー非形成ワクチンの初回の維持又はブースト用量は、デポー形成ワクチンの最終プライム用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内、さらなる実施形態では約 3 週間以内に投与する。

【 0 0 5 0 】

[0057]初回用量から最終用量までの、デポー非形成ワクチンを投与し得る期間には、特定の疾患又は障害の治療のためなどに対象がそれを必要している任意の期間が含まれ得る。一部の実施形態では、デポー形成ワクチンの初回から最終用量までの期間は、0 日間（すなわち単回投与）、1 週間、2 週間、3 週間、1 カ月間、2 カ月間、3 カ月間、6 カ月間、9 カ月間、12 カ月間、2 年間、3 年間、4 年間、5 年間、又はそれより長い。

【 0 0 5 1 】

[0058]一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、2 回の用量のデポー形成ワクチンを、デポー非形成ワクチンを投与する前に投与することを含む。実施例 2 に示すように、2 回のプライム用量（0 及び 21 日目）のデポー形成ワクチンは、デポー形成ワクチン又はデポー非形成ワクチンのどちらかによって後にブーストすることができる（84 日目）抗原特異的免疫応答を誘導するために十分である。実施例 6～8（図 6）に示すように、2 回のプライム用量（0 及び 28 日目）のデポー形成ワクチンは、デポー非形成ワクチンによって後に維持/ブーストすることができる（56、84、及び 112 日目）抗原特異的免疫応答を誘導するために十分である。

【 0 0 5 2 】

[0059]一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、1 回のみの用量のデポー形成ワクチンを、デポー非形成ワクチンを投与する前に投与することを含む。実施例 1（第 1 群）及び実施例 3（第 3 群）に示すように、1 回のプライム用量のデポー形成ワクチンは、デポー非形成ワクチンによって後にブーストすることができる抗原特異的免疫応答を誘導するために十分である（実施例 3）。

【 0 0 5 3 】

[0060]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチンを 0 日目及び 21 日目に投与する。別の実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチンを 0 日目及び 28 日目に投与する。

【 0 0 5 4 】

[0061]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチ

10

20

30

40

50

ンを0日目及び21日目に投与し、デポー非形成ワクチンを少なくとも42日目に投与する。本実施形態では、デポー非形成ワクチンの投与は、42日目の後は3週間に1回継続してもよい。

【0055】

[0062]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチンを0日目及び28日目に投与し、デポー非形成ワクチンを少なくとも56日目に投与する。本実施形態では、デポー非形成ワクチンの投与は、56日目の後は4週間1回続けてもよい。

【0056】

[0063]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチンを0日目のみに投与する。

10

【0057】

[0064]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、プライム用量のデポー形成ワクチンを0日目のみに投与し、デポー非形成ワクチンを少なくとも42日目に投与する。本実施形態では、デポー非形成ワクチンの投与は、42日目の後は3週間に1回続けてもよい。

【0058】

[0065]DNA複製を妨げる薬剤

【0059】

[0066]また、本明細書中に開示する方法は、DNA複製を妨げる薬剤を投与することも含み得る。特定の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は、本明細書中に開示する方法を癌の治療又は予防において使用する場合に投与する。

20

【0060】

[0067]そのような薬剤及びその使用方法の例示的な実施形態は、たとえば国際公開第2014/153636号に記載されている。

【0061】

[0068]本明細書中で使用する表現「DNA複製を妨げる」には、細胞のDNAをコピーする(すなわち複製する)生物学的プロセスを防止、阻害、又は遅延させる任意の作用が包含されることを意図する。当業者は、DNA複製を防止、阻害、又は遅延させるための様々な機構、たとえば、DNA架橋結合、DNAのメチル化、塩基置換などが存在することを理解されよう。本発明による方法には、当分野で知られている任意の手段による、DNA複製を妨げる任意の薬剤の使用が包含される。例示的な一実施形態では、それだけに限定されないが、DNA複製を妨げる薬剤は薬物である。

30

【0062】

[0069]一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤とは、非化学療法的である用量で使用した場合に、免疫系を変調してワクチン応答を増強させる意図で、免疫系の細胞においてDNA複製に選択的に影響を与えることができるものである。「非化学療法的」とは、薬剤の用量が、悪性又は癌性の細胞及び組織を直接且つ選択的に破壊するために使用されるものよりも低い用量であることを意味する。

【0063】

40

[0070]DNA複製を妨げる薬剤の他の実施形態には、免疫系の迅速に分裂中の細胞を選択的に標的化する能力を有しており、DNA複製を妨害してプログラム細胞死を引き起こす薬剤が含まれる。そのような薬剤の目的は、免疫系の細胞を変調してワクチン応答を増強させることである。そのような薬剤は、典型的には、化学療法的であると予想されず、ヒトにおける使用に許容されると考えられる用量で使用する。免疫細胞を選択的に標的化することの目的は、DNA複製を標的とする薬物が除去された際に迅速な増殖を誘導する目的で、免疫抑制細胞の数を低下させること、及び/又は免疫応答の媒介に関与している有用な免疫細胞を枯渇させることであり得る。

【0064】

[0071]細胞死をもたらすDNA複製の妨害は、それだけに限定されないが、DNA架

50

橋結合の形成（たとえば、アルキル化剤、白金化合物などによる）、DNAのメチル化（すなわちメチル化剤による）、塩基置換（すなわちヌクレオシド類似体による）を含めた数々の機構によって引き越し得る。例示的な薬剤及びその機構は、Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice (Cabner B. A., 第5版、Lippincott Williams & Wilkins、米国ペンシルベニア州、2011)に記載されている。

【0065】

[0072]一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤はアルキル化剤である。アルキル化剤には、それだけには限定されないが、シクロホスファミド、テモゾロミド、イホスファミド、マフォスファミド、メルファラン、ブスルファン、ベンダムスチン、ウラムスチン、カルムスチン、又はビス-クロロエチルニトロソ尿素 (BCNU)、クロラムブシル、マイトマイシンC、及びその誘導体、活性代謝物、又は代謝中間体が含まれる。適切な誘導体は、たとえば、それだけには限定されないが、パリホスファミド（たとえばイホスファミドの誘導体）であり得る。

10

【0066】

[0073]別の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は白金化合物である。白金化合物には、それだけには限定されないが、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、及びその誘導体が含まれる。

【0067】

[0074]別の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤はメチル化剤である。メチル化剤には、それだけには限定されないが、テムゾロミド (temozolomide)、プロカルバジン、及びダカルバジン、並びにその誘導体が含まれる。

20

【0068】

[0075]別の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤はヌクレオシド類似体である。ヌクレオシド類似体の非限定的な例には、ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド (Ara-C)、及びその誘導体が含まれる。

【0069】

[0076]別の実施形態では、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII、又はDNAポリメラーゼなどのDNA複製に重大な酵素を阻害することによってDNA複製を間接的に阻害する任意の薬物も使用し得る。そのような薬物には、たとえば、それだけには限定されないが、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ミトキサントロン、エトポシド、テニポシド、トポテカン、カンプトテシン、イリノテカン、アシクロビル、及びガンシクロビルが含まれる。

30

【0070】

[0077]DNA複製を妨害し、本発明の方法において使用し得る例示的な薬剤には、それだけには限定されないが、以下の表1に列挙するものが含まれる。当業者には理解されるように、これらは使用し得る薬剤の例である。さらなる薬剤には、たとえば、同様の機構によってDNA複製を妨げる及び/又は同様の官能基を有する、任意の薬物又は化合物が含まれる。

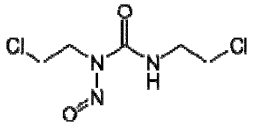
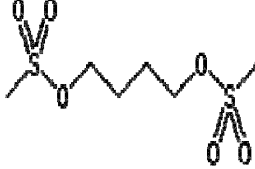
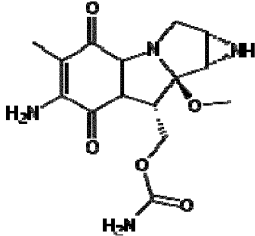
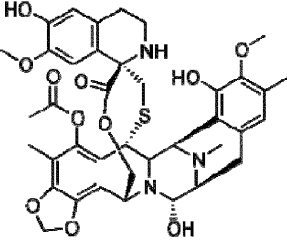
【0071】

40

[0078]

【表 1】

表 1:

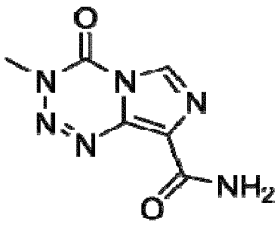
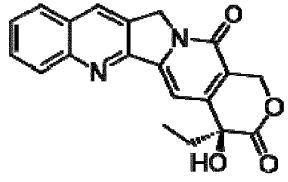
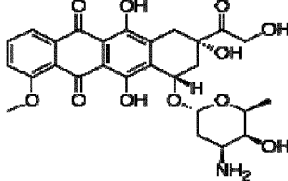
DNA複製阻害剤	官能基	説明	例示的な薬剤
アルキル化剤	ナイトロジェンマスタード(ビスクロロエチルアミン) $RN(CH_2CH_2Cl)_2$	DNAをアルキル化する	シクロホスファミド イホスファミド マフォスファミド メルファラン ペンダムスチン ウラムスチン パリホスファミド クロラムブシル 4-ヒドロキシシクロホスファミド
アルキル化剤	ニトロソ尿素	DNAをアルキル化する	ビス-クロロエチルニトロソ尿素(BCNU) 
アルキル化剤	スルホン酸アルキル	DNAをアルキル化する	ブスルファン 
抗腫瘍抗生物質	アジリジン又はエチレンイミン	DNAをアルキル化し、DNAを挿入する	マイトマイシンC  ヨンデリス(Yondelis) 

10

20

30

40

メチル化剤	反応性N-メチル基	DNAをメチル化する	プロカルバジン ダカルバジン テモゾロミド 
白金化合物	Pt(II)	DNAと共有結合する	シスプラチン カルボプラチン オキサリプラチン
ヌクレオシド類似体	プリン又はピリミジン塩基に似ている	複製中にDNA内に取り込まれる	アシクロビル ゲムシタビン 5-フルオロウラシル シトシンアラビノシド ガンシクロビル
カンプトテシン誘導体	キノリンアルカロイド	トポイソメラーゼIの活性を阻害する	カンプトテシン  トポテカン イリノテカン
アントラサイクリン誘導体	アントラサイクリン抗生物質	トポイソメラーゼIIの活性を阻害する	ドキソルビシン  ダウノルビシン エピルビシン イダルビシン
エポドフィロトキシン誘導体	エポドフィロトキシン	トポイソメラーゼIIの活性を阻害する	エトポシド テニポシド
アントラセンジオン誘導体	アントラセンジオン	DNAを挿入する	ミトキサントロン ピクサントロン

10

20

30

40

【 0 0 7 2 】

[0079] 特定の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤、又はその任意の中間代謝物若しくは活性代謝物である。ナイトロジェンマスタードは非特異的なDNAアルキル化剤である。ナイトロジェンマスタードは、アミン窒素によるクロライドの分子内置換によって環状アミニウムイオン（アジリジニウム環）を形成する。その後、このアジリジニウム（aziridinium）基は、グアニン塩基上のN-7求核性中心を攻撃することによってDNAをアルキル化することができる。第2の塩素の置換の際、第2のアルキル化ステップが起こり、その結果、鎖間架橋結合（ICL）

50

の形成がもたらされる。これらの病変はDNAの複製及び転写などの基礎的な代謝プロセスを遮断するため、これらは細胞毒性が高い。

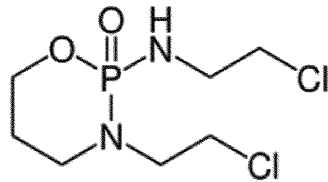
【0073】

[0080]本発明の方法には、任意のそのような非特異的なナイトロジェンマスタードDNAアルキル化剤の使用が包含される。特に適切なナイトロジェンマスタードアルキル化剤には、たとえば、それだけには限定されないが、シクロホスファミド、パリホスファミド、ベンダムスチン、及びイホスファミドが含まれ得る。

【0074】

[0081]イホスファミドはナイトロジェンマスタードアルキル化剤である。イホスファミドのIUPAC名はN - 3 - ビス (2 - クロロエチル) - 1 , 3 , 2 - オキサザホスフィナン - 2 - アミド - 2 - オキシドである。イホスファミドは一般的にイフェックス (I f e e x) (登録商標) として知られる。イホスファミドの化学構造は以下の通りである。

【化1】



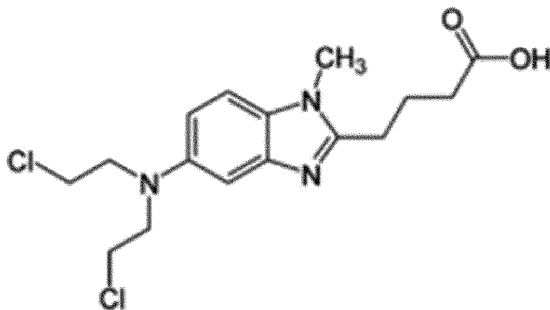
【0075】

[0082]パリホスファミドは、安定性のためにアミノ酸リシンと共有結合している、イホスファミドの活性代謝物である。パリホスファミドは、GC塩基対を介してDNAを不可逆的にアルキル化及び架橋結合し、修復不可能な7原子の鎖間架橋結合、DNA複製の阻害、及び/又は細胞死をもたらす。パリホスファミドはジマフォス (Z y m a f o s) (登録商標) としても知られる。

【0076】

[0083]ベンダムスチンは別のナイトロジェンマスタードアルキル化剤である。ベンダムスチンのIUPAC名は4 - [5 - [ビス (2 - クロロエチル) アミノ] - 1 - メチルベンズイミダゾール - 2 - イル] ブタン酸であり、一般的にトレアキシン (T r e a k i s y m) (登録商標) 、リボムスチン (R i b o m u s t i n) (登録商標) 、レヴァクト (L e v a c t) (登録商標) 、及びトレアンダ (T r e a n d a) (登録商標) と呼ばれる。ベンダムスチンの化学構造は以下の通りである。

【化2】



【0077】

[0084]また、本発明の方法には、DNAアルキル化剤の中間代謝物及び/又は活性代謝物、詳細には本明細書中に記載のナイトロジェンマスタードDNAアルキル化剤の中間代謝物及び/又は活性代謝物の使用も包含される。そのような代謝物には、それだけには限定されないが、アルドホスファミド、4 - ヒドロキシシクロホスファミド、4 - ヒドロキシイホスファミド、クロルアセトアルデヒド、及びホスファミドマスタードが含まれる。

【0078】

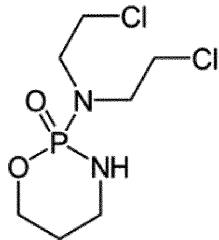
[0085]さらなる実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は、本明細書中に記載のアルキ

ル化剤、白金化合物、メチル化剤、又はヌクレオシド類似体の任意の適切な薬学的に許容される塩、エステル、互変異性体、立体異性体、ラセミ混合物、溶媒和物、水和物、又はプロドラッグであり得る。

【0079】

[0086]特定の実施形態では、本発明の方法において使用するためのDNA複製を妨げる薬剤はシクロホスファミドである。シトホスファンとしても知られるシクロホスファミド(N, N - ビス(2 - クロロエチル) - 1, 3, 2 - オキサザホスフィナン - 2 - アミン 2 - オキシド)はナイトロジェンマスタードアルキル化剤である。シクロホスファミドの化学構造は以下の通りである。

【化3】



【0080】

[0087]また、シクロホスファミドは、エンドキサン(Endoxan)(登録商標)、シトキサン(Cytosan)(登録商標)、ネオサル(Neosar)(登録商標)、プロシトックス(Procytox)(登録商標)、及びレヴィミューン(Revimmune)(登録商標)の登録商標でも知られており、そのように呼ばれている。シクロホスファミドと同じクラスの他のナイトロジェンマスタードアルキル化剤には、それだけには限定されないが、パリホスファミド、ベンダムスチン、及びイホスファミドが含まれる。

【0081】

[0088]シクロホスファミド(CPA)は典型的には静脈輸液を介して投与するプロドラッグであるが、非経口及び経口投与することもでき(de Jonge, Huitemaら、2005)、その生体利用度の違いはわずかである(Juma, Rogersら、1979)。CPAは、肝臓中のP450酵素による酸化によって、その活性代謝物である4 - ヒドロキシ - CPA及びアルドホスファミドへと変換される(Emmenegger, Shakedら、2007、2011)。CPAの活性代謝物は脂質可溶性であり、受動拡散によって細胞内に入る。細胞内4 - OH - CPAはホスホルアミドマスタードへと自発的に分解し、これが最終活性代謝物である。ホスホルアミドマスタードは、DNA複製を阻害して細胞死をもたらす鎖内及び鎖間のDNA架橋結合並びにDNA - タンパク質の架橋結合を触媒する(de Jonge, Huitemaら、2005)。ホスホルアミドマスタードは、細胞質のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)によるカルボキシホスファミド(carboxyphosphamide)への酵素的変換によって排除される(Emmenegger, Shakedら、2007、2011)。

【0082】

[0089]低いレベルのALDHを有する細胞はCPA代謝物を蓄積し、その効果に対してより感受性がある傾向にあり、実際、ALDHの腫瘍上方制御はCPA耐性の1つの機構である(Zhang, Tianら、2005)。ALDH以外に、低い細胞内ATPレベルは特定の細胞種に対するCPA選択性にも関連づけられている(Zhao, Caoら、2010)。高用量、典型的には1 ~ 5 g / m²の範囲では、CPAの効果は、細胞種にかかわらず迅速に分裂中の細胞に対して最も細胞毒性があり、ほとんどの造血細胞は迅速に分裂しているため、CPAは骨髄抑制性である(Bruce, Meekerら、1966、Smith及びSladek、1985)。

【0083】

[0090]CPA及びその代謝物の全身クリアランスは5 ~ 9時間で変動し、親のピーク血

10

20

30

40

50

漿レベルも患者間で相当に変動し(3~11時間)、これは個人間の代謝の遺伝的な相違を反映している(Cohen, Jaoら、1971、Mouridsen, Faberら、1974)。CPAの反復投与は、代謝に関与している酵素の活性を増加させることによって排出半減期を短縮させることが報告されているが(D'Incalci, Bolisら、1979)、これが活性代謝物の代謝の活性をもたらしかどうかは分かっておらず(de Jonge, Huitemaら、2005)、特に低用量においてそうである(Emmenegger, Shakedら、2007)。

【0084】

[0091]ヒトからネズミの研究への用量の変換は、以下の方程式を使用して計算する。

$$\frac{\text{ヒト用量 (mg/kg)}}{\text{動物Km}} = \text{動物Km}$$

$$\text{動物用量 (mg/kg)} = \text{ヒトKm}$$

【0085】

[0092]式中、定数のマウスKm値は3であり、ヒトKm値は37である(Reagan-Shaw, Nihalら、2008)。

【0086】

[0093]過去20年間の間、低用量CPAは、その免疫変調及び抗血管形成の効果について評価を受けてきた。高用量CPAとは対照的に、低用量のCPA、典型的には100~300mg/m²は幅広い細胞毒性活性を欠くが、免疫系の細胞を選択的に変調することによって、及び腫瘍微小環境内の血管形成も低下させることによって、免疫媒介性の腫瘍排除を増強させると考えられている。低用量CPAの作用機構及び使用は、たとえば国際公開第2014/153636号にさらに記載されている。

【0087】

[0094]一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、DNA複製を妨げる薬剤を投与することを含む。

【0088】

[0095]DNA複製を妨げる薬剤は、典型的には免疫変調効果をもたらすために十分な量で投与する。本明細書中で使用する表現「免疫変調効果」とは、免疫系及び/又は免疫系の細胞の1つ又は複数の側面を変更する(変調する)、DNA複製を妨げる薬剤の能力をいう。一実施形態では、「免疫変調効果をもたらすために十分な量」とは、免疫系の細胞においてDNA複製に選択的に影響を与えることができる、薬剤の量である。たとえば、薬剤の量は、免疫系の迅速に分裂中の細胞を選択的に標的化してプログラム細胞死を引き起こすために十分な量であり得る。

【0089】

[0096]「免疫変調効果をもたらすために十分な量」とは、本明細書中で「低用量」の量と互換性があるように言及し得る。DNA複製を妨げる薬剤がアルキル化剤シクロホスファミドである本発明の特定の実施形態に関して、表現「低用量」とは、典型的には、300mg/m²以下、たとえば25~300mg/m²、より詳細には100~300mg/m²などであるシクロホスファミドの用量をいう。一実施形態では、低用量の量のシクロホスファミドは、10、25、50、75、又は100mg B I D(1日2回)である。特定の実施形態では、低用量の量のシクロホスファミドは50mg B I Dである。本明細書中に包含される、「低用量」の量のDNA複製を妨害する他の薬剤は、当業者に知られている、又はルーチン的な技術によって決定することができる。

【0090】

[0097]特定の実施形態では、本明細書中に開示する方法は、1サイクルの低用量の規則的なシクロホスファミドを含む。本開示の目的のために、「規則的な」とは、通常用量の量より低い、DNA複製を妨げる薬剤(たとえばシクロホスファミド)の頻繁な投与をいうことを意味する。本明細書中で使用する用語「通常用量の量」とは、たとえば、それだけには限定されないが、(i)従来の投薬スケジュールを介した、確立された最大耐量(MTD)若しくは標準の用量、又は(ii)低用量の単一ボーラス量がDNA複製を妨げる特定の薬剤について確立されている場合は、その低用量の量のいずれかをいい得る。

【 0 0 9 1 】

[0098]規則的な投薬では、従来の投薬スケジュールを介して投与するであろう量と同じ、より低い、又はより高い、一定期間にわたる累積用量を、最終的に投与し得る。特に適切な実施形態では、これは、通常用量の量と比較して投与する量を減少する一方で、投薬を実施するタイムフレームを延長する及び/又は投与の頻度を増加することによって達成する。たとえば、 300 mg/m^2 のDNA複製を妨げる薬剤のという低用量の量を典型的に投与する場合(たとえば単一ボラス注射による)、規則的なレジメンは、頻繁な低用量を投与することによって、数日間の期間にわたって同じ量を投与することを含み得る。

【 0 0 9 2 】

10

[0099]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤(たとえばシクロホスファミド)を用いた規則的な治療には、たとえば、2、3、4、5、6、若しくは7日間、又はそれより長い連続的な日数の期間などの一定期間にわたる、薬剤の毎日の低用量投与が包含されることを意図する。これらの規則的な投薬の日数の間、DNA複製を妨げる薬剤は、頻繁な定期的な間隔又は変動する間隔で提供し得る。たとえば、一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤の用量を1、2、3、4、6、8、12、又は24時間毎に投与し得る。別の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤の用量を2、3、又は4日毎に1回投与し得る。特定の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤の用量を1日2回投与し得る。

【 0 0 9 3 】

20

[00100]一部の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤を用いた規則的な治療の期間中に中断又は空白が存在し得る。このように、規則的な治療は、オン及びオフの投与期間を交互に行う周期的な様式で起こり得る。詳細には、DNA複製を妨げる薬剤を、1日1回、交互する1週間間隔で対象に投与する間隔が適切である。たとえば、1週間の期間のDNA複製を妨げる薬剤の投与の後に1週間の治療の一時停止が続き、このサイクルが繰り返される。

【 0 0 9 4 】

[00101]したがって、一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、DNA複製を妨げる薬剤を、1日1回、2週間毎に開始する7日間の連続した日数の期間の間、対象に投与することを含む。本実施形態の特定の態様では、DNA複製を妨げる薬剤の投与をデポー形成ワクチンの初回投与の約7日前に開始する。本実施形態のさらなる一態様では、DNA複製を妨げる薬剤を、それぞれの投与日に 50 mg BID (1日2回)の用量で投与し得る。

30

【 0 0 9 5 】

[00102]本明細書中に開示する方法の一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は、デポー形成ワクチン及び/又はデポー非形成ワクチンのそれぞれの投与の間の一時中断期間中にプライム剤として投与し得る。

【 0 0 9 6 】

[00103]当業者には理解されるように、DNA複製を妨げる薬剤、並びにデポー形成及びデポー非形成ワクチンの投与の頻度及び期間は、上述したパラメータ内で、任意の所定の対象について所望に応じて調節し得る。考慮し得る要因には、たとえば、ワクチン中の1つ又は複数の抗原の性質、疾患又は障害の種類、対象の年齢、体調、体重、性別、及び食習慣、並びに他の要因が含まれる。

40

【 0 0 9 7 】

[00104]DNA複製を妨げる薬剤は、任意の適切な送達手段及び任意の適切な投与経路によって投与し得る。一実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤は、丸薬、錠剤、又はカプセルの形態などで、経口投与する。一代替実施形態では、薬剤を注射(たとえば静脈内)によって投与する。本明細書中に開示する方法の特定の実施形態では、薬剤はシクロホスファミドであり、経口投与する。

【 0 0 9 8 】

50

[00105]本明細書中に開示する方法の特定の実施形態では、DNA複製を妨げる薬剤はシクロホスファミドである。

【0099】

[00106]チェックポイント阻害剤

【0100】

[00107]また、本明細書中に開示する方法は、免疫応答チェックポイント阻害剤を投与することとも含み得る。

【0101】

[00108]本明細書中で使用する「免疫応答チェックポイント阻害剤」とは、1つ又は複数のチェックポイントタンパク質を完全に又は部分的に低下、阻害、妨害、又は変調する任意の化合物又は分子をいう。チェックポイントタンパク質はT細胞の活性化又は機能を調節する。たとえば、CTLA-4並びにそのリガンドCD80及びCD86、PD-1並びにそのリガンドPD-L1及びPD-L2などの、数々のチェックポイントタンパク質が知られている。チェックポイントタンパク質は、T細胞応答の共刺激性又は阻害性の相互作用を司っている。チェックポイントタンパク質は、自己寛容並びに生理的免疫応答の期間及び大きさを調節及び維持する。本明細書中、用語「免疫応答チェックポイント阻害剤」は「チェックポイント阻害剤」と互換性があるように使用され得る。

【0102】

[00109]一部の実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤は、プログラム死-リガンド1(PD-L1であり、B7-H1、CD274としても知られる)、プログラム死1(PD-1、CD279)、CTLA-4(CD154)、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3(CD223)、TIM3(HAVCR2、CD366)、41BB(CD137)、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(誘導性T細胞共刺激分子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(コラーゲン様構造を有するマクロファージ受容体)、PS(ホスファチジルセリン)、OX-40、SLAM、TIGIT、VISTA、VTCN1、又はその任意の組合せの阻害剤である。

【0103】

[00110]一部の実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤は、PD-L1、PD-1、CTLA-4、又はその任意の組合せの阻害剤である。

【0104】

[00111]一部の実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤はPD-L1又はPD-1の阻害剤である。一実施形態では、PD-L1又はPD-1の阻害剤は、抗PD1又は抗PD-L1抗体、たとえば、それだけには限定されないが、国際公開第2015/103602号に記載のものなどであり得る。たとえば、一実施形態では、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、BMS-936559(ClinicalTrials.gov、識別番号NCT02028403を参照)、MPDL3280A(Roche、ClinicalTrials.gov、識別番号NCT02008227を参照)、MDX1105-01(Bristol Myers Squibb、ClinicalTrials.gov、識別番号NCT00729664を参照)、MED14736(MedImmune、ClinicalTrials.gov、識別番号NCT01693562を参照)、及びMK-3475(Merck、ClinicalTrials.gov、識別番号NCT02129556を参照)から選択され得る。一実施形態では、抗PD-1抗体は、RMP1-4若しくはJ43(BioXcell)、又はそのヒト若しくはヒト化対応物であり得る。

【0105】

[00112]一部の実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤はCTLA-4の阻害剤である。一実施形態では、CTLA-4の阻害剤は、たとえば、それだけには限定され

10

20

30

40

50

ないが、イピリムマブ (Bristol-Myers Squibb) 又は BN13 (BioXCell) などの抗体であり得る。別の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、UC10-4F10-11、9D9、若しくは9H10 (BioXCell)、又はそのヒト若しくはヒト化対応物であり得る。

【0106】

[00113] 1つ又は複数の免疫応答チェックポイント阻害剤は任意の適切な経路によって投与し得る。一部の実施形態では、1つ又は複数の免疫応答チェックポイント阻害剤の投与経路は、非経口、粘膜の、経口、舌下、経皮、局所、吸入、鼻腔内、エアロゾル、腹腔内、腫瘍内、眼内、気管内、直腸内、胃内、経腔、遺伝子銃によるもの、真皮パッチ、又は点眼剤若しくは洗口液の形態である。一実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤を皮下注射によって投与し得る。

10

【0107】

[00114] 当業者には理解されるように、免疫応答チェックポイント阻害剤の投与の頻度及び期間は、任意の所定の対象について所望に応じて調節し得る。考慮し得る要因には、たとえば、特定のチェックポイント阻害剤の性質及び種類、ワクチン中の1つ又は複数の抗原の性質、疾患又は障害の種類、対象の年齢、体調、体重、性別、及び食習慣、並びに他の要因が含まれる。

【0108】

[00115] 一部の実施形態では、1つ又は複数の免疫応答チェックポイント阻害剤は、デポー形成ワクチン及び/又はデポー非形成ワクチンの前、後、又はそれと同時に投与し得る。一実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤は、初回投与に続く時点で、デポー形成ワクチンと共に投与し得る。本実施形態の態様では、免疫応答チェックポイント阻害剤は、デポー非形成ワクチンの初回投与の前又は後の時点で投与し得る。

20

【0109】

[00116] 一実施形態では、免疫応答チェックポイント阻害剤の投与をデポー形成ワクチンの初回投与と同じ日に開始してもよく、それ以降は所望のスケジュールで投与し得る。一実施形態では、所望のスケジュールは、1、2、3、4、6、8、12、若しくは18時間毎、1、2、3、4、5、若しくは6日毎、又は1、2、3、若しくは4週間毎の免疫応答チェックポイント阻害剤の投与であり得る。一実施形態では、所望のスケジュールは3日毎に1回であり得る。

30

【0110】

[00117] 免疫応答チェックポイント阻害剤の投与期間中に中断又は空白が存在し得る。このように、投与は、オン及びオフの投与期間を交互に行う周期的な様式で起こり得る。

【0111】

[00118] ワクチン組成物

【0112】

[00119] 本明細書中で使用する用語「ワクチン」、「ワクチン組成物」、又は「組成物」は、内容に応じて互換性があるように使用され得る。

【0113】

[00120] 本発明によるワクチン組成物は、治療上有効な量で対象に投与し得る。本明細書中で使用する、本明細書中に開示するデポー形成又はデポー非形成ワクチンのどちらかに適用される「治療上有効な量」とは、対象において免疫応答を刺激、誘導、維持、ブースト、又は増強するために有効な、ワクチン又は活性成分（たとえば1つ又は複数の抗原）の量を意味する。一部の実施形態では、治療上有効な量のワクチンは、特定の疾患又は障害の治療において、対象において臨床反応を誘導することができる量である。ワクチンの治療上有効な量の決定は、特に本明細書中に提供する開示に鑑みて、当業者の能力範囲内に十分ある。治療上有効な量は、対象の状態、重量、性別、及び年齢などの様々な要因に応じて変動し得る。

40

【0114】

[00121] 本明細書中に記載の方法及びキットにおいて使用する本発明のワクチン組成物

50

は2つの異なる種類のものである。1つ目の種類は「デポー形成ワクチン」であり、2つ目の種類は「デポー非形成ワクチン」である。

【0115】

[00122] (i) デポー形成ワクチン

【0116】

[00123]「デポー形成ワクチン」とは、対象に投与した際、ワクチン及びその構成成分（たとえば、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバントなど）が一定期間の間ワクチン注射部位に局在して留まり、対象の身体全体にわたって迅速に分散されないことを意味する。このことは、本明細書中で「デポー効果」と呼び、注射部位からの、抗原、又は抗原及び1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の実質的な放出が長期間起こらない。抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分が注射部位に留まる期間は、デポー効果がどのように達成されるかに依存し得る。本明細書中で使用する用語「デポー形成ワクチン」とは、概して、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の実質的な割合が、抗原及び他の構成成分をデポー非形成ワクチン中で投与した場合よりも長い期間、注射部位に保たれることを意味する。デポー非形成ワクチンは本明細書中以下に記載されている。

10

【0117】

[00124]一実施形態では、用語「デポー形成ワクチン」とは、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の実質的な割合（たとえば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%）が、少なくとも約36時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間、168時間、又は192時間の間、注射部位に局在して留まることを意味する。一実施形態では、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の1%未満、2%、3%、4%、又は5%が、デポー形成ワクチンの投与の24時間以内に注射部位から放出される。一実施形態では、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の少なくとも80%が、投与後の少なくとも約48時間の間、注射部位に局在して留まる。一実施形態では、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の少なくとも60%が、投与後の少なくとも約72時間の間、注射部位に局在して留まる。

20

【0118】

[00125]ワクチン組成物の放出動力学は、当分野で知られている様々な手段によって決定することができる。一例として、生理的条件を模倣するために、ワクチン組成物の試料（たとえば500 µl）をリン酸緩衝液（たとえば、1 ml、10 mM、pH 7.4）のバイアルに添加することができる。バイアルは、37 °Cに保ち、水性層のアリコートと取り出し、水性環境中でのワクチン構成成分の存在を分析すること（たとえばHPLCによる）によって、適切な間隔で試験することができる。

30

【0119】

[00126]デポー形成ワクチンは、ワクチン構成成分をたとえば油などの疎水性担体中で配合することによって調製し得る。そのような担体（たとえば油）の連続的な疎水性相はワクチン接種した対象の水性環境と非混和性となり、注射部位でデポー効果をもたらすであろう。ワクチン構成成分をどのように疎水性担体中で配合し得るかの実施形態を以下に記載する。抗原をどのように疎水性担体中で混和性にし得るかの説明は、たとえば、ヘルパーTエпитープ、アジュバントなどの他のワクチン構成成分にも適用及び使用し得ることが理解されよう。

40

【0120】

[00127] (ii) 疎水性担体中でのワクチン構成成分の配合

【0121】

[00128]抗原及び他のワクチン構成成分を、水を排除した油などの疎水性担体を有する配合物中に可溶化する能力には、慣用の水性系及び抗原を親水性相中に懸濁させる他の系を超えるいくつかの利点がある。

50

【 0 1 2 2 】

[00129] 抗原を無水環境中で配合することは、加水分解、熱変性、及び光感受性に関してその安定性を増加させる。ワクチン開発に関して、抗原を疎水性担体中に保つことは、注射部位で素早く分散するその傾向を減少させ、免疫系がワクチン構成成分を能動的に取り込むことを強要し、したがってその免疫原性を促進する。典型的な条件下では、親水性抗原は疎水性担体に溶解せず、これは、2つの間に存在する高い表面張力に基づく。しかし、抗原の、油配合物などの完全に疎水性の環境内への取り込みを促進する方法はいくつか存在する。

【 0 1 2 3 】

[00130] したがって、一実施形態では、本明細書中に開示するデポー形成ワクチンの1つ又は複数の抗原は、1つ又は複数の抗原が疎水性担体中で混和性であるように十分に疎水性である、又は十分に疎水性にする。

【 0 1 2 4 】

[00131] 本明細書中で使用する「十分に疎水性」とは、抗原が疎水性担体と適合性を有することを意味する。適合性は様々な手段によって決定し得るが、一般的に、抗原は、疎水性担体中で混和性である場合に疎水性担体と適合性を有する。本明細書中の内容において「混和性」とは、抗原が疎水性担体中に再懸濁、溶解、又は他の様式で分配されることができることを意味する。典型的には均一な溶液が生じるが、本開示の目的のためには、抗原が疎水性担体内に再懸濁、溶解、又は他の様式で分配される限りは、均一な溶液が形成されることは必要ではない。また、本開示のため、及び抗原/疎水性担体の組合せ次第で、抗原のうちのわずか（たとえば、1%未満、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、又は10%）が再懸濁又は溶解し得ない可能性もあるが、それでも抗原は混和性であると考え得る。

【 0 1 2 5 】

[00132] 混和性を決定することができる様々な手段が当分野で知られている。一般的には、混和性は光学的に決定する。抗原が疎水性担体中で混和性である場合、生じる液体は透明である。透明度は裸眼又は器具の使用によって測定することができる。裸眼で見える曇り又は粒子が存在しない場合、抗原は疎水性担体中で混和性であると考えられる。当業者には理解されるように、混和性は抗原の濃度に伴って変動する場合があります、抗原の濃度が高ければ高いほど、曇り又は目に見える粒子の存在の可能性が高くなる。したがって、一部の実施形態では、本明細書中で使用する用語「混和性」とは、抗原の治療上有効な量又は濃度が、疎水性担体中に再懸濁、溶解、又は他の様式で分配されることができることを意味する。

【 0 1 2 6 】

[00133] 第1の実施形態では、目的の抗原は天然に疎水性であり、油などの疎水性担体への直接の溶解を可能にし得る。それだけには限定されないが、この特徴を示す最も一般的な抗原の一部は、特定の分子結合部位及びポケットを構築するもの、又はタンパク質の膜貫通ドメインを構成するものである。シグナルペプチド及び膜貫通ドメインは、その疎水性性質及び配列が原因で複数のMHC対立遺伝子と結合する能力を有する、疎水性CD8+T細胞エピトープに富んでいることが見いだされている（Kovjazinら、Mol Immunol、2011、48（8）：1009）。高い割合の疎水性アミノ酸残基を含有する抗原は、標準の水性ワクチン配合物中でのその配合の問題が原因で、一般的にはワクチン設計において過小評価されている。本明細書中に開示するワクチン配合物は、天然に疎水性である1つ又は複数の抗原を含み得る。

【 0 1 2 7 】

[00134] 第2の実施形態では、抗原の疎水性は、抗原自体への修飾によって増加させ得る。それだけには限定されないが、そのような修飾の一例は、リポペプチド類をもたらすタンパク質脂質化である。タンパク質脂質化の方法には、それだけには限定されないが、N末端のミリストイル化（Reshら、Biochim Biophys Acta、1999、1451：1）、C末端へのコレステロールの付着（Karpenら、J Bi

ol Chem、2001、276:19503)、C末端又はその付近のシステイン残基のS-プレニル化(Zhangら、Annu Rev Biochem、1996、65:241)、及びタンパク質全体にわたるシステインのS-パルミトイル化(Smotryśら、Annu Rev Biochem、2004、73:559)が含まれる。これらのタンパク質は、多くの場合、脂質部分の増加した疎水性を引き受ける。より最近では、Pam2Cys/Pam3Cys(Moylēr、Current Medicinal Chemistry、2008、15(5):506)、パルミチン酸(Robinsonら、Immunology、1992、76(4):593)、及び他のリポアミノ酸(Haymanら、Immunol Cell Biology、2002、80:178)などの、アジュバント活性を有する脂質を付着させる選択肢が調査されている。本明細書中に開示するワクチン配合物は、脂質化によって修飾された1つ又は複数の抗原を含み得る。

10

【0128】

[00135]また、疎水性担体中の抗原の混和性を増加させるために、疎水性イオン対合を使用して抗原を疎水性分子、化合物、又は複合体と非共有結合で複合体化することもできる。手短に述べると、疎水性イオン対合とは、抗原の対イオンを荷電有機担体分子で置き換えることによって疎水性担体中の抗原の溶解度を増加させる方法である。欧州特許第1150710号では、正荷電の抗原とサポニン又はサポニン複合体などの負荷電の有機担体分子との間の静電的会合を介して免疫原性複合体を形成した。この手法は、その単純性及び材料の要求の低さが理由で、疎水性分子と共有結合させることよりも好まれる場合がある。これは、ナノ粒子の疎水性区画内のタンパク質のローディング及び安定性を増強させるために使用する場合がある(Yooら、Journal of Pharmaceutical Science、2001、90(2):194)。本明細書中に開示するワクチン配合物は、疎水性分子、化合物、又は複合体と非共有結合又は共有結合で複合体化した1つ又は複数の抗原を含み得る。

20

【0129】

[00136]上記技法は、抗原の疎水性を増加させるための使用が成功しているが、これらの種類の抗原が水を排除した油などの疎水性担体中に直接溶解している例は非常にわずかしか存在しない。抗原及び疎水性担体(たとえば油)を含有する典型的な配合物も、親水性相から成っている。たとえば、抗原を水性相中に懸濁させ、油で乳化させる、油中水及び水中油の乳濁液の例が多数存在する。しかし、乳濁液は、in vivoで注射した後に不安定になり、組成物の水性相及び油性相の分離を引き起こし得る。これは、抗原及び他の構成成分の未熟な又は加速された放出をもたらす。他の場合では、水性区画又は水中油乳濁液中の抗原の存在は、比較的素早く、典型的には48時間未満で注射部位から消散すると予想される。また、水中油乳濁液の微視的な油滴内に含有され得る抗原も注射部位から取り除かれる場合があり、持続しない。

30

【0130】

[00137]リボソームは、抗原をカプセル封入するための小胞として、及び配合物を安定化するための乳化剤として、乳濁液中で使用されてきた。親水性抗原は、典型的には水性の内部に捕捉されている一方で、疎水性抗原は、脂質二重層中に挿入する、又は油相中に分散させることができる。他の乳濁液と同様、乳濁液を含有するリボソームは調製が厄介な場合があり、in vivoで水性相と油相に分離する場合がある。

40

【0131】

[00138]第3の実施形態では、両親媒性物質を使用することによって抗原を十分に疎水性にし得る。特に適切な実施形態では、抗原は、親水性相の非存在下で、疎水性担体中の1つ又は複数の両親媒性物質を用いて可溶化し得る。

【0132】

[00139]「両親媒性物質」とは、親水性及び疎水性(親油性)の部分又は特徴をどちらも有する化合物である。用語「両親媒性物質(amphiphile)」は、「両親媒性(amphiphilic)」及び「両親媒性(amphipathic)」と互換性が

50

あるように使用され得る。一部の実施形態では、適切な両親媒性物質には、本明細書中以下に記載のものなどの乳化剤も含まれる。本明細書中、用語「両親媒性物質」によって包含される乳化剤の例示的な実施形態には、それだけには限定されないが、ポリソルベート（たとえばモノオレイン酸ソルピタン）、オレイン酸マンニド（アルラセル（Arlacel）（商標）A）、レシチン、ツイーン（Tween）（商標）80、並びにスパン（Span）（商標）20、80、83、及び85が含まれる。両親媒性物質は、親水性の親和性を有するワクチン構成成分の、油などの疎水性担体内への取り込みを促進することができる。ワクチン構成成分には、それだけには限定されないが、抗原及び／又はアジュバント及び／又は免疫応答の生成を促進することができる他の成分（たとえばヘルパーTエпитープ）が含まれることができる。

10

【0133】

[00140]それだけには限定されないが、両親媒性物質の疎水性部分は、典型的には、 $C_{H_3}(CH_2)_n$ （式中 $n > 4$ ）の形の長鎖などの大きな炭化水素部分である。両親媒性物質の親水性部分は、通常は荷電基又は極性の非荷電基のいずれかである。荷電基には陰イオン基及び陽イオン基が含まれる。陰イオン性荷電基の例には以下のものが含まれる（分子の疎水性部分を「R」によって表す）：カルボン酸イオン： RCO_2^- 、硫酸イオン： RSO_4^- 、スルホン酸イオン： RSO_3^- 、及びリン酸イオン（リン脂質中の荷電官能基）。陽イオン性荷電基には、たとえば、アミン： RNH_3^+ （ここでも「R」は分子の疎水性部分を表す）が含まれる。非荷電の極性基には、たとえば、ジアシルグリセロール（DAG）などの大きなR基を有するアルコールが含まれる。両親媒性物質は、疎水性部分を数個、親水性部分を数個、又は両方を数個ずつ有し得る。タンパク質及び一部のブロックコポリマーが例である。また、ステロイド、コレステロール、脂肪酸、胆汁酸、及びサポニンも両親媒性物質である。

20

【0134】

[00141]使用し得る数々の両親媒性物質が存在し、本明細書中に開示するワクチン配合物は、単一種類の両親媒性物質又は異なる種類の両親媒性物質の混合物を含有し得る。

【0135】

[00142]一実施形態では、両親媒性物質は脂質である。任意の両親媒性脂質を使用し得るが、特に適切な脂質には、少なくとも4個の炭素、典型的には約4～28個の炭素の長さを含む少なくとも1つの脂肪酸鎖を有するものが含まれ得る。脂肪酸鎖は任意の数の飽和及び／又は不飽和結合を含むし得る。脂質は天然脂質又は合成脂質であり得る。両親媒性脂質の非限定的な例には、リン脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、セロブロシド（cerobroside）、ガングリオシド、エーテル脂質、ステロール、カルジオリピン、カチオン性脂質、並びにポリ（エチレングリコール）及び他のポリマーで修飾された脂質が含まれ得る。合成脂質には、それだけには限定されないが、以下の脂肪酸構成要素が含まれ得る：ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、アラキドイル、オレオイル、リノレオイル、エルコイル、又はこれらの脂肪酸の組合せ。

30

【0136】

[00143]一実施形態では、両親媒性物質はリン脂質又はリン脂質混合物である。広く定義すると、「リン脂質」とは、加水分解の際にリン酸、アルコール、脂肪酸、及び窒素塩基を与える脂質化合物群のメンバーである。

40

【0137】

[00144]リボソームの調製において使用し得るリン脂質には、たとえば、それだけには限定されないが、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリン（たとえばDOPC、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、及びホスホイノシトールからなる群から選択される少なくとも1つの頭部基を有するものが含まれる。一部の実施形態では、DOPC及び非エステル化コレステロールの混合物を使用し得る。非エステル化コレステロールを使用する場合、コレステロールは、リン脂質の重量の約10%と同等の量（たとえば、10:1w/wのDOPC:コレステロール比）で使用し得る。たとえば、単一用量の本明細書中に記載の組成物中のDOPCの量

50

が120mg/ml、コレステロールの量が12mg/mlであり得る。特定の実施形態では、DOPCの量が約30mg/単位用量の組成物、コレステロールの量が約3mg/単位用量であり得る。コレステロールは、リン脂質小胞の形成を安定化させるために使用する。コレステロール以外の化合物を使用する場合、当業者は必要な量を容易に決定できるであろう。

【0138】

[00145]別の一般的なリン脂質はスフィンゴミエリンである。スフィンゴミエリンは、長い不飽和炭化水素鎖を有するアミノアルコールであるスフィンゴシンを含有する。脂肪酸アシル側鎖がアミド結合によってスフィンゴシンのアミノ基に連結されてセラミドを形成する。スフィンゴシンのヒドロキシル基はホスホコリンへとエステル化されている。ホスホグリセリドと同様、スフィンゴミエリンは両親媒性である。

10

【0139】

[00146]やはり使用し得るレシチンは、典型的には鶏卵又は羊毛に由来するリン脂質の天然混合物である。

【0140】

[00147]これらのすべて及び他のリン脂質を本発明の実施において使用し得る。リン脂質は、たとえばAvanti lipids (米国アラバマ州Alabaster) 及びlipoid LLC (米国ニュージャージー州Newark) から購入することができる。

【0141】

20

[00148]抗原は、1つ又は複数の両親媒性物質の存在によって、疎水性担体中で混和性であるように十分に疎水性にし得る。抗原、両親媒性物質、及び疎水性担体を含むワクチン及び免疫原性組成物の調製の例示的な開示は、たとえば、国際公開第1996/014871号及び国際公開第2009/043165号が含まれる。

【0142】

[00149]一実施形態では、両親媒性物質は疎水性担体中に実質的に均質に分散されていてもよく、ここで、両親媒性物質の単独での存在が、抗原を疎水性担体中で混和性にするために十分である。

【0143】

[00150]別の実施形態では、両親媒性物質は、抗原を疎水性担体中で混和性にするために、抗原と密に会合していてもよい。「密に会合している」とは、抗原が疎水性担体中で混和性である形態で提示されるほど、両親媒性物質が抗原の近傍にあることを意味する。密な会合は、抗原と両親媒性物質の間の物理的相互作用を伴っていても、伴ってなくてもよい。典型的には、両親媒性物質の親水性部分は、抗原上の親水性部分に向けられている。両親媒性物質は互いに実質的に分離して保たれていてもよく、又は様々な異なる種類の構造、アセンブリ、若しくはアレイを形成していてもよい。

30

【0144】

[00151]両親媒性物質が形成し得る構造、アセンブリ、又はアレイの種類の例示的な実施形態には、それだけには限定されないが、単層シート、二重層シート、多層シート、単層小胞構造(たとえばミセル)、二重層小胞構造(たとえば単層若しくは多重膜小胞)、又はその様々な組合せが含まれる。「単層」とは、両親媒性物質が二重層を形成せず、むしろ、疎水性部分が片側に向けられ、親水性部分が逆側に向けられている層であることを意味する。「二重層」とは、両親媒性物質が2層のシートを形成し、典型的には、それぞれの層の疎水性部分が二重層の中心に向かって内部に向けられており、親水性部分が外部に向けられていることを意味する。しかし、逆の立体配置も可能である。用語「多層」には、単層及び二重層構造の任意の組合せが包含されることを意味する。採用する形態は、使用する特定の抗原、特定の両親媒性物質、及び/又は特定の疎水性担体に依存し得る。

40

【0145】

[00152]一実施形態では、両親媒性物質によって形成される構造、アセンブリ、又はアレイは、抗原を部分的に又は完全に囲み得る。一例として、両親媒性物質は抗原の周

50

りに閉じた小胞構造を形成し得る。

【0146】

[00153]一実施形態では、小胞構造は単層小胞構造である。そのような構造の一例はミセルである。典型的な水溶液中のミセルは、周囲の水溶液と接触している親水性部分と凝集体を形成し、疎水性部分をミセル中心に隔離する。対照的に、疎水性担体中では、反転／逆転ミセルが周囲の水溶液と接触している疎水性部分と形成され、親水性部分をミセル中心に隔離する。球状逆転ミセルは、親水性の親和性を有する抗原をその核内にパッケージングすることができる。

【0147】

[00154]一実施形態では、小胞構造はミセル又は反転／逆転ミセルである。それだけに
10 は限定されないが、ミセル又は反転／逆転ミセルの大きさは、直径2 nm (20 Å) ~ 200 nm (200 Å) の範囲である。特定の実施形態では、ミセル又は反転／逆転ミセルの大きさは直径約10 nmである。

【0148】

[00155]別の実施形態では、小胞構造はたとえばリポソームなどの二重層小胞構造である。リポソームは、捕捉された水性体積を含有する、完全に閉じた脂質二重層膜である。リポソームは単層膜ベシクル（単一の二重層膜を保有）又は多重膜二重層によって特徴づけられた多重膜小胞であってもよく、それぞれの二重層は、水性層によって次の層と分離されていても、されていなくてもよい。リポソームの一般的な記述は、Gregoriadis G., Immunol. Today, 11: 89 ~ 97, 1990及びFrezard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32: 181 ~ 189, 1999
20 99に見つけることができる。リポソームは、事実上任意の種類の細胞上に吸着し、そのあと、取り込んだ薬剤（たとえば抗原）を放出することができる。或いは、リポソームは、標的細胞と融合し、そこでリポソームの内容物が標的細胞内に出されることもできる。或いは、リポソームは食作用を有する細胞によってエンドサイトーシスを受け得る。

【0149】

[00156]リポソームは、抗原をカプセル封入するための小胞として、及び配合物を安定化するための乳化剤として、疎水性担体を含む組成物の調製において使用されてきた（たとえば、国際公開第2002/038175号、国際公開第2007/041832号、国際公開第2009/039628号、国際公開第2009/146523号及び国際公開第2013/049941号を参照。親水性抗原は、典型的には水性内部に捕捉されている一方で、疎水性抗原は、脂質二重層中に挿入する、又は油相中に分散させることができる。
30

【0150】

[00157]二重層及び多層小胞構造の他の実施形態には、それだけには限定されないが、ニオソーム、トランスファーソーム、ピロソーム、多重膜小胞 (MLV)、オリゴ層状小胞 (OLV)、単層膜ベシクル (UV)、小単層膜ベシクル (SUV)、中単層膜ベシクル (MUV)、大単層膜ベシクル (LUV)、巨大単層膜ベシクル (GUV)、多胞体小胞 (MVV)、逆相蒸発方法によって作製された単層又はオリゴ層状小胞 (REV)、逆相蒸発方法によって作製された多重膜小胞 (MLV-REV)、安定多層状小胞 (SPLV)、凍結解凍MLV (FATMLV)、押し出し成形方法によって調製された小胞 (VET)、フレンチプレスによって調製された小胞 (FPV)、融合によって調製された小胞 (FUV)、脱水再水和小胞 (DRV)、及びバブルソーム (BSV) が含まれる。当業者には、これらの小胞構造を調製するための技法は当分野で周知であることが理解されよう（たとえばKreuter, J. 編、Colloidal Drug Delivery Systems、第66巻、Marcel Dekker, Inc., 1994を参照）。
40

【0151】

[00158]上述した手法及びワクチン組成物は、ワクチン構成成分をどのように疎水性担体中で配合し得るかの例示的な非限定的な実施形態である。ここでも、抗原をどのように
50

疎水性担体中で混和性にし得るかの上記説明は、たとえば、ヘルパーTエピトープ、アジュバントなどの他のワクチン構成成分にも適用及び使用し得ることが理解されよう。

【0152】

[00159]本明細書中に記載のデポー形成ワクチンの用量あたりの体積は、は、対象の特徴（たとえば、大きさ、重量、年齢、性別など）、使用する疎水性担体の種類、及び他の要因に応じて変動し得る。当業者は、必要以上の実験を行わずに適切な体積を決定できるであろう。一実施形態では、用量体積は約0.01～1ml/用量となる。特定の実施形態では、用量体積は約50μlであり得る。たとえばヒト対象のためなどの特定の実施形態では、用量体積は約250μlであり得る。そのような実施形態では、疎水性担体は、たとえばモンタニドISA51 VGであり得る。

10

【0153】

[00160] (i i i) デポー非形成ワクチン

【0154】

[00161]「デポー非形成ワクチン」とは、対象に投与した際、ワクチン及びその構成成分（たとえば、抗原、ヘルパーTエピトープ、アジュバントなど）が対象の身体内で迅速に分散され、「デポー効果」が得られない又は持続されないことを意味する。デポー非形成ワクチンでは、抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分は、デポー形成ワクチンの対応する構成成分よりも実質的に素早く、注射部位からクリアランスされる。したがって、デポー非形成ワクチンは、事前にプライミングした免疫系を抗原及び他のワクチン構成成分に迅速に再曝露させ、その後、その部位で有害な反応が生じることができ、前に注射部位から消散する。一実施形態では、デポー非形成ワクチンの抗原又は抗原と1つ若しくは複数の他のワクチン構成成分の50%より多く、60%、70%、80%、90%、又は100%が、約3時間、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、又は48時間で注射部位からクリアランスされている。

20

【0155】

[00162]デポー非形成ワクチンは、デポー形成ワクチンと同じ抗原決定基（すなわち抗原又はエピトープ）を共有し、注射部位でデポー効果をもたらさない、任意のワクチン組成物であり得る。この観点から、ワクチン構成成分は、任意の数の既知の薬学的に許容される担体中で配合し得る。一般的には、担体は、ワクチン接種した対象の水性環境（たとえば、体液、組織など）と混和性である。

30

【0156】

[00163]本明細書中で使用する用語「薬学的に許容される担体」とは、組成物の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに対して有害（たとえば毒性）でないという意味で「許容される」担体をいう。典型的には、薬学的に許容される担体は、活性成分の免疫調節活性と干渉しない媒体である。

【0157】

[00164]デポー非形成ワクチンにおいて使用し得る薬学的に許容される担体の一部の例には、決してそれだけには限定されないが、たとえば、水、水中油乳濁液、リン酸緩衝生理食塩水、グリセロール、エタノール、リンゲル液、デキストロース溶液、血清含有溶液、ハanks液、及び他の水性の生理的にバランスのとれた溶液が含まれる。たとえばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 2000, Gennaro, A R編、ペンシルベニア州Eaton, Mack Publishing Co.を参照されたい。

40

【0158】

[00165]一実施形態では、デポー非形成ワクチンは、ワクチン構成成分を水又はPBSなどの水性担体中で配合することによって調製し得る。デポー非形成ワクチンが対象（水性環境）内に導入された際、水性担体中に懸濁させた抗原粒子及び他のワクチン構成成分は、対象の身体内で迅速に分散される。これは、ワクチンの水性担体が対象の身体内の水性環境（たとえば、体液、組織など）と混和性であるためである。このことは、ワクチン構成要素（たとえば抗原）の、流入領域リンパ節への素早い輸送及び迅速な蓄積を可能に

50

する。

【 0 1 5 9 】

[00166]一実施形態では、デポー非形成ワクチンの担体は水である。

【 0 1 6 0 】

[00167]本明細書中に記載のデポー非形成ワクチンの用量あたりの体積は、対象の特徴（たとえば、大きさ、重量、年齢、性別など）、使用する担体の種類、及び他の要因に応じて変動し得る。当業者は、必要以上の実験を行わずに適切な体積を決定できるであろう。一実施形態では、用量体積は約 0 . 0 1 ~ 1 m l / 用量となる。特定の実施形態では、用量体積は約 5 0 μ l であり得る。たとえばヒト対象のためなどの特定の実施形態では、用量体積は約 5 0 0 μ l であり得る。そのような実施形態では、担体は滅菌水であり得る。

10

【 0 1 6 1 】

[00168]本明細書中に記載のワクチン組成物（デポー及びデポー非形成）は、当分野で知られている任意の手段によって投与し得る。一実施形態では、ワクチン組成物を皮下注射によって投与する。

【 0 1 6 2 】

[00169]抗原

【 0 1 6 3 】

[00170]デポー形成及びデポー非形成ワクチンをどちらも含めた本明細書中に開示するワクチン組成物は、1つ又は複数の抗原を含み得る。

20

【 0 1 6 4 】

[00171]本明細書中で使用する用語「抗原」とは、免疫系の構成成分と特異的に結合することができる任意の物質又は分子をいう。一部の実施形態では、本明細書中の組成物の適切な抗原は、対象において免疫応答を誘導する又は生じることができるものである。免疫応答を誘導することができる抗原は免疫原性であると言われ、免疫原とも呼ばれ得る。したがって、本明細書中で使用する用語「抗原」には免疫原が含まれ、これらの用語は、別段に具体的に記述した場合以外は互換性があるように使用され得る。また、本明細書中で使用する用語抗原にはハプテンも含まれる。当分野で理解されるように、ハプテンとは、抗原性である（たとえば、免疫系の構成成分によって結合されることができる）が、免疫原性を供給する何かしらの担体分子と付着していたい限りは免疫原性でない、小分子である。

30

【 0 1 6 5 】

[00172]本発明の組成物において有用であり得る抗原には、たとえば、それだけに限定されないが、ポリペプチド、炭水化物、微生物又はその一部、たとえば、生きた、弱毒化した、不活性化した、若しくは死滅した細菌、ウイルス、若しくは原虫、又はその一部が含まれる。抗原は、たとえば、病原性生物剤、毒素、アレルゲン、ペプチド、適切なネイティブ、非ネイティブ、組換え、若しくは変性タンパク質若しくはポリペプチド、又はその断片、或いは対象において免疫応答を誘導又は強化することができるエピトープであり得る。一部の実施形態では、抗原は、たとえばヒト（ヒト抗原）などの動物（動物抗原）に由来するもの、又はそれに実質的に関連している抗原であり得る。

40

【 0 1 6 6 】

[00173]本明細書中で使用する用語「由来する」には、それだけに限定されないが、元の供給源（たとえば対象）から単離された若しくは直接得られた抗原、元の供給源からの抗原と同一である若しくはそれに実質的に関連する、合成若しくは組換えにより生成した抗原、又は元の供給源の抗原若しくはその断片から作製した抗原が包含される。この文脈として用語「実質的に関連する」とは、抗原は化学的、物理的、又は他の手段（たとえば配列修飾）によって改変されていてもよいが、生じる産物は依然として元の抗原又は元の抗原に関連する疾患若しくは障害に対して免疫応答を生じることができることを意味する。

【 0 1 6 7 】

50

[00174]また、本明細書中で使用する用語「抗原」には、抗原として機能するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドも含まれる。核酸に基づくワクチン接種戦略が知られており、ここではポリヌクレオチドを含有するワクチン組成物を対象に投与する。ワクチン組成物自体がポリペプチドを含有していたかのように、抗原ポリペプチドが最終的に対象内に存在するように、ポリヌクレオチドによってコードされている抗原ポリペプチドが対象内で発現される。本開示の目的のために、内容が指定する場合、用語「抗原」には、抗原として機能するポリペプチドをコードしている、そのようなポリヌクレオチドが含まれる。

【0168】

[00175]一部の実施形態では、抗原は、以下に定義する少なくとも1つのB細胞エпитープ又はCTLエпитープを含んでおり、対象に適切に投与した場合に、疾患に対して保護的である液性及び/又は細胞性免疫応答を誘導又は強化する分子である。

【0169】

[00176]一部の実施形態では、抗原は、癌、感染性疾患、又は嗜癬疾患に関連するものであり得る。

【0170】

[00177]本明細書中の組成物において抗原として有用であり得るウイルス又はその一部には、たとえば、それだけに限定されないが、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、偽牛痘ウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス2、サイトメガロウイルス、ヒトアデノウイルスA～F、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルス(HPV)、パルボウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、オルトレオウイルス、ロタウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス(たとえば、H5N1インフルエンザウイルス、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス)、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューモウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ハンタンウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、フラビウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルス及び水痘が含まれる。

【0171】

[00178]一実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象においてインフルエンザウイルス感染症を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。インフルエンザはオルトミクスウイルス科(Orthomyxoviridae)の一本鎖RNAウイルスであり、多くの場合、ウイルス粒子の外側の2つ大きな糖タンパク質、赤血球凝集素(HA)、及びノイラミニダーゼ(NA)に基づいて特徴づけられる。インフルエンザA型の数々のHA亜型が同定されている(Kawaokaら、Virology(1990)、179:759~767、Websterら、「Antigenic variation among type A influenza viruses」、ページ127~168、P. Palese及びD.W. Kinggsbury(編)、Genetics of influenza viruses、Springer-Verlag、New York)。一部の実施形態では、抗原はHA又はNA糖タンパク質に由来し得る。

【0172】

[00179]別の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象においてエボラウイルス感染症を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。

【0173】

[00180]別の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象においてヒトパピローマウイルス(HPV)感染症を治療及び/又は予防するために潜

10

20

30

40

50

的に有用であり得る抗原を含む。より詳細な実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、HPV関連子宮頸癌又はHPV関連頭頸部癌を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は配列RAHYNIVTFを含むペプチドである(HPV16E7(H-2Db)ペプチド49-57、R9F、配列番号3)。

【0174】

[00181]別の実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象において呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染症を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。より詳細な実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、RSV感染症に関連する肺疾患を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は、たとえば国際公開第2012/065997号に開示されているように、小さな疎水性タンパク質の外部ドメインに由来する。

10

【0175】

[00182]本明細書中の組成物において抗原として有用であり得る細菌又はその一部には、たとえば、それだけに限定されないが、炭疽菌(バチルス・アントラシス(*Bacillus anthracis*))、ブルセラ属(*Brucella*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、カンジダ属(*Candida*)、肺炎クラミジア(*Chlamydia pneumoniae*)、オウム病クラミジア(*Chlamydia psittaci*)、コレラ、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、クリプトコッカス属(*Cryptococcus*)、ジフテリア、大腸菌(*Escherichia coli*) O157:H7、腸管出血性大腸菌、腸内毒素原性大腸菌、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)、レジオネラ属(*Legionella*)、レプトスピラ属(*Leptospira*)、リステリア属(*Listeria*)、髄膜炎菌、肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコバクテリウム属(*Mycobacterium*)、百日咳、肺炎、サルモネラ属(*Salmonella*)、シゲラ属(*Shigella*)、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、及びエンテロコリチカ菌(*Yersinia enterocolitica*)が含まれる。

20

30

【0176】

[00183]一実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象においてバチルス・アントラシス感染症(すなわち炭疽病)を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。それだけに限定されないが、ワクチンに含有される抗原は、たとえば、炭疽菌組換え保護抗原(rPA)(List Biological Laboratories, Inc.、カリフォルニア州Campbell)又は炭疽菌突然変異体組換え保護抗原(mrPA)(PfeneX, Inc.、カリフォルニア州San Diego)であり得る。

【0177】

[00184]本明細書中の組成物において抗原として有用であり得る原虫又はその一部には、たとえば、それだけに限定されないが、マラリアを引き起こすプラスモジウム属(*Plasmodium*) (熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)、四日熱マラリア原虫(*Plasmodium malariae*)、三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形マラリア原虫(*Plasmodium ovale*)、又は二日熱マラリア原虫(*Plasmodium knowlesi*))が含まれる。

40

【0178】

[00185]一実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、それを必要としている対象において四日熱マラリア原虫感染症(すなわちマラリア)を治療及び/又は予防するために潜在的に有用であり得る抗原を含む。

50

【 0 1 7 9 】

[00186]或いは、抗原は、天然に存在する又は合成の毒素又はアレルゲンであり得る。本明細書中で使用する「毒素」とは、疾患若しくは病気を引き起こすことができる、生細胞若しくは生物（たとえば、植物、動物、微生物など）によって産生された任意の物質、又は感染性物質、又は有害作用が可能な組換え若しくは合成分子をいう。毒素は、たとえば、小分子、ペプチド、又はタンパク質であり得る。毒素には、たとえばコカインなどの薬物が含まれる。毒素は抗体によって中和されることができ得る。そのような実施形態では、抗原は、（たとえば血液中で）循環中の毒素と結合してそれを捕捉する抗体の産生を誘発し、それによって、体内の別の領域（たとえば脳）へのその送達を潜在的に防止し得る。

10

【 0 1 8 0 】

[00187]本明細書中で使用する「アレルゲン」とは、アレルギーを引き起こすことができる任意の物質をいう。アレルゲンは、それだけに限定されないが、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖、複合多糖、多糖及び他の分子のペプチド及び非ペプチド模倣体、小分子、脂質、糖脂質、並びに、植物、動物、真菌、昆虫、食品、薬物、粉塵、及びダニの炭水化物に由来し得る。アレルゲンには、それだけに限定されないが、環境的空中アレルゲン、植物花粉（たとえばブタクサノ枯草熱）、雑草花粉アレルゲン、草花粉アレルゲン、セイバンモロコシ、樹木花粉アレルゲン、ライグラス、クモ類アレルゲン（たとえばハウスダストダニアレルゲン）、貯蔵庫ダニアレルゲン、スギ花粉ノ枯草熱、カビノ真菌胞子アレルゲン、動物アレルゲン（たとえば、イヌ、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ラット、マウスなどのアレルゲン）、食物アレルゲン（たとえば、甲殻類、ナッツ、柑橘果実、小麦粉、コーヒー）、昆虫アレルゲン（たとえば、ノミ、ゴキブリ）、毒液（ハチ目（Hymenoptera）、スズメバチ（yellow jacket）、ミツバチ、ワスプ（wasp）、ホーネット（hornet）、フシアリ（fire ant））、細菌アレルゲン（たとえば、連鎖球菌抗原、回虫族（Ascariis）抗原などの寄生生物アレルゲン）、ウイルス抗原、薬物アレルゲン（たとえばペニシリン）、ホルモン（たとえばインスリン）、酵素（たとえばストレプトキナーゼ）、並びに不完全抗原又はハプテンとして作用することができる薬物又は化学薬品（たとえば、酸無水物及びイソシアネート類）が含まれる。

20

【 0 1 8 1 】

[00188]ハプテンを本発明の組成物中で使用する場合、これをたとえばタンパク質などの担体と付着させて、ハプテン-担体付加物を形成させ得る。ハプテン-担体付加物は免疫応答を誘発することが可能である一方で、ハプテン自体は典型的には応答を誘発しない。ハプテンの非限定的な例は、アニリン、ウルシオール（ツタウルシの毒素）、ヒドララジン、フルオレセイン、ピオチン、ジゴキシゲニン、及びジニトロフェノールである。

30

【 0 1 8 2 】

[00189]別の実施形態では、たとえばアミロイドタンパク質などの循環中の抗原を捕捉することが望ましい場合（たとえばアルツハイマー病）、抗原は疾患に関連する抗原であり得る。したがって、一部の実施形態では、本発明の組成物は、神経変性疾患が抗原の発現に関連している場合、それを必要としている対象において神経変性疾患の治療及び／又は予防において潜在的に有用であり得る抗原を含む。

40

【 0 1 8 3 】

[00190]別の実施形態では、抗原は、たとえば国際公開第2007/041832号の頁17～19の表1に開示されているペプチド抗原などの、国際公開第2007/041832号に開示されている抗原の任意の1つ又は複数であり得る。

【 0 1 8 4 】

[00191]たとえば、それだけに限定されないが、本明細書中の組成物において抗原として有用であり得るポリペプチド又はその断片には、コレラトキソイド、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、B型肝炎表面抗原、赤血球凝集素（たとえばH5N1組換え赤血球凝集素タンパク質）、炭疽菌組換え保護抗原（List Biological L

50

aboratories, Inc.、カリフォルニア州Campbell)、炭疽菌突然変異体組換え保護抗原(Pfenex, Inc.、カリフォルニア州San Diego)、ノイラミニダーゼ、インフルエンザMタンパク質、PfHRP2、pLDH、アルドラーゼ、MSP1、MSP2、AMA1、Der-p-1、Der-f-1、アディポフィリン、AFP、AIM-2、ART-4、BAGE、 α -フェトプロテイン、BCL-2、Bcr-Ab1、BING-4、CEA、CPSF、CT、サイクリンD1Ep-CAM、EphA2、EphA3、ELF-2、FGF-5、G250、ゴナドトロピン放出ホルモン(GNRH)、HER-2、腸管カルボキシルエステラーゼ(iCE)、IL13R2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MART-1、MART-2、M-CSF、MDM-2、MMP-2、MUC-1、NY-EOS-1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、百日咳トキソイドタンパク質、p53、PBF、PRAME、PSA、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU1、RU2AS、SART-1、SART-2、SART-3、SAGE-1、SCRN1、SOX2、SOX10、STEAP1、サバイピン、テロメラゼ、TGFRII、TRAG-3、TRP-1、TRP-2、TERT、及びWT1に由来するものが含まれる。

【0185】

[00192]用語「ポリペプチド」には、長さ(たとえば、少なくとも6、8、10、12、14、16、18、若しくは20個のアミノ酸)又は翻訳後修飾(たとえば、グリコシル化若しくはリン酸化)にかかわらず、任意のアミノ酸の鎖が含まれ、たとえば、天然タンパク質、合成又は組換えのポリペプチド及びペプチド、エピトープ、ハイブリッド分子、変異体、相同体、類似体、ペプチド、ペプチド模倣体などが含まれる。したがって、変異体又は誘導体には、切断及び断片を含めた欠失、挿入及び付加、たとえば保存的置換、部位特異的突然変異体及び対立遺伝子変異体、並びに、1つ又は複数の非アミノアシル基(たとえば、糖、脂質など)がペプチドと共有結合したペプチド及び翻訳後修飾を含めた修飾体が含まれる。本明細書中で使用する用語「保存的アミノ酸置換」又は「保存的置換」とは、関連する機能の実質的な損失なしに置換を行うことができる、ペプチドの所定の位置における1つのアミノ酸による別のアミノ酸の置換をいう。そのような変化を行う場合、同様のアミノ酸残基の置換は、側鎖置換基の相対的類似度、たとえば、その大きさ、荷電、疎水性、親水性などに基づいて行うことができ、そのような置換は、ルーチン的な試験によってペプチドの機能に対するその効果についてアッセイし得る。保存的置換の具体的且つ非限定的な例には以下の例が含まれる。

【表2】

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Val	Ile, Leu

【0186】

[00193] 抗原配列に対して実質的な同一性を有するポリペプチド又はペプチドを使用し得る。2つの配列は、最適にアラインメントした際に(ギャップを許容)、それらが少なくとも約50%の配列同一性を共有する場合、又は配列が定義された機能的モチーフを共有する場合に、実質的な同一性を有すると考えられる。代替実施形態では、最適にアラインメントした配列は、それらが指定した領域にわたって少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を共有する場合に、実質的に同一である(すなわち実質的な同一性を有する)と考えられる。用語「同一性」とは、2つのポリペプチド分子間の配列類似度をいう。同一性は、アラインメントした配列中のそれぞれの位置を比較することによって決定することができる。アミノ酸配列間の同一性の度合は、たとえば指定した領域にわたって、配列によって共有される位置での同一又は一致するアミノ酸の数の関数である。同一性を比較するための配列の最適なアラインメントは、<http://clustalw.genome.ad.jp>で利用可能なClustalWプログラム、Smith及びWaterman、1981、Adv. Appl. Math.、2:482の局所的相同性アルゴリズム、Needleman及びWunsch、1970、J. Mol. Biol.、48:443の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson及びLipman、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:2444の類似度検索方法、並びにこれらのアルゴリズムのコンピュータ実施(Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ、Genetics Computer Group、米国ウィスコンシン州MadisonのGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTAなど)を含めた、当分野で知られている様々なアルゴリズムを使用して実施し得る。また、配列同一性は、Altschulら、1990、J. Mol. Biol.、215:403~10に記載のBLASTアルゴリズムを使用しても決定し得る(公開されている初期設定を使用)。たとえば、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)から利用可能な「BLAST2配列」ツール(インターネットより<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>)を、「blastp」プログラムを以下の初期設定で選択して使用し得る: 予想閾値10、ワードサイズ3、マトリックスBLOSUM62、ギャップコスト存在11、伸長1。別の実施形態では、当業者は、任意の所定の配列を容易且つ正しくアラインメントし、単なる目視検査で配列同一性及び/又は相同性を推定することができる。

【0187】

[00194] 本発明を実施するために使用するポリペプチド及びペプチドは、天然源から単離する、合成である、又は組換え生成したポリペプチドであることができる。ペプチド及びタンパク質は、*in vitro*又は*in vivo*で組換えによって発現させることができる。本発明を実施するために使用するペプチド及びポリペプチドは、当分野で知られている任意の方法を使用して作製及び単離することができる。また、本発明を実施するために使用するポリペプチド及びペプチドは、当分野で周知の化学方法を使用して全体的に又は部分的に合成することもできる。たとえば、Caruthers(1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser.、215~223、Hom(1980)、Nucleic Acids Res. Symp. Ser.、225~232、Banga, A. K. Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems(1995)、Technomic Publishing Co.、ペンシルベニア州Lancasterを参照されたい。たとえば、ペプチド合成は様々な固相技法を使用して行うことができ(たとえばRoberge(1995)、Science、269:202、Merrifield(1997)、Methods Enzymol.、289:3~13を参照)、自動合成は、たとえば、ABI431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を使用して、製造者によって提供される指示に従って達成し得る。

【 0 1 8 8 】

[00195] 一部の実施形態では、抗原は、精製した抗原、たとえば、約 25% ~ 50% 純粋、約 50% ~ 約 75% 純粋、約 75% ~ 約 85% 純粋、約 85% ~ 約 90% 純粋、約 90% ~ 約 95% 純粋、約 95% ~ 約 98% 純粋、約 98% ~ 約 99% 純粋、又は 99% より高く純粋であり得る。

【 0 1 8 9 】

[00196] 上述のように、用語「抗原」には、抗原として機能するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドも含まれる。本明細書中で使用する用語「ポリヌクレオチド」には、任意の長さ（たとえば、9、12、18、24、30、60、150、300、600、1500個、若しくはそれより多くのヌクレオチド）又は鎖の数（たとえば一本鎖若しくは二本鎖）のヌクレオチドの鎖が包含される。ポリヌクレオチドは、DNA（たとえば、ゲノムDNA若しくはcDNA）又はRNA（たとえばmRNA）或いはその組合せであり得る。これらは天然に存在する又は合成（たとえば化学合成）であり得る。ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド鎖中の1つ若しくは複数の窒素塩基、五炭糖、又はリン酸基の修飾を含有し得ることが企図される。そのような修飾は当分野で周知であり、たとえば、ポリヌクレオチドの安定性を改善する目的のものであり得る。

【 0 1 9 0 】

[00197] ポリヌクレオチドは様々な形態で送達し得る。一部の実施形態では、裸のポリヌクレオチドを、直線形態で、又は発現プラスミドなどのプラスミド内に挿入して使用し得る。他の実施形態では、ウイルス又は細菌ベクターなどの生きたベクターを使用し得る。

【 0 1 9 1 】

[00198] DNAのRNAへの転写及び/又はRNAのポリペプチドへの翻訳を助ける1つ又は複数の調節配列が存在し得る。一部の例、たとえば、メッセンジャーRNA（mRNA）分子であるポリヌクレオチドの場合では、転写プロセスに関連する調節配列（たとえばプロモーター）は必要なく、タンパク質発現はプロモーターの非存在下で達成され得る。当業者は、状況の必要性に応じて適切な調節配列を含めることができる。

【 0 1 9 2 】

[00199] 一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは発現カセット中に存在し、発現カセット中で、ポリヌクレオチドは、本発明の組成物を投与する対象内でポリヌクレオチドが発現されることを許可する調節配列と作動可能に連結している。発現カセットの選択は、組成物を投与する対象及び発現されたポリペプチドに望ましい特長に依存する。

【 0 1 9 3 】

[00200] 典型的には、発現カセットには、対象内で機能的であり、構成的又は誘導性であることができるプロモーターと、リボソーム結合部位と、必要な場合は開始コドン（ATG）と、目的のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドと、ストップコドンと、任意選択で3'末端領域（翻訳及び/又は転写ターミネーター）とが含まれる。シグナルペプチドをコードしている領域などの付加配列が含まれ得る。目的のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、発現カセット中の他の調節配列のいずれかと相同的又は非相同的であり得る。シグナルペプチドをコードしている領域などの、目的のポリペプチドと一緒に発現させる配列は、典型的には発現させるタンパク質をコードしているポリヌクレオチドに隣接した位置にあり、正しい読み枠で配置されている。発現させるタンパク質単独、又は発現させる任意の他の配列（たとえばシグナルペプチド）と一緒にコードしているポリヌクレオチドによって構成されるオープンリーディングフレームは、転写及び翻訳が組成物を投与する対象において起こるように、プロモーターの制御下に置かれる。

【 0 1 9 4 】

[00201] 一部の実施形態では、本明細書中に開示するワクチン組成物は免疫原性の弱い抗原を含む。本明細書中で使用する「免疫原性の弱い」とは、慣用のワクチン（たとえば水性ワクチン）中では、又は慣習的な方法で投与した場合、抗原が免疫応答を誘導、維持

及び／又はブーストする能力がわずかである又は能力がないことを意味する。

【0195】

[00202]たとえば、一実施形態では、免疫原性の弱い抗原とは、水性ワクチンなどのデポー非形成ワクチン中で配合した場合に、免疫応答を十分にプライミングできないものである。これは、同じ抗原を本明細書中に開示の匹敵するデポー形成ワクチン中で配合した場合（すなわち、疎水性担体中で配合する以外は同じ構成成分を有する場合）と対照的であり、その場合、抗原は、今度は免疫応答を十分にプライミングすることができる。先行の文脈中、「免疫応答を十分にプライミングする」とは、抗原が必要な程度まで免疫応答を誘導することができ、続いてデポー非形成ワクチンによって維持及び／又はブーストすることができることを意味する。

10

【0196】

[00203]一実施形態では、免疫原性の弱い抗原とは、デポー非形成ワクチン中での1回目の対象への曝露の際、免疫応答を誘導しない、又は、酵素結合イムノスポット（ImmunoSpot）アッセイ（ELISPOT）によって評価して、デポー形成ワクチン中での1回目の対象への曝露の際に誘導される免疫応答と比較して、有効性が少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、若しくは50倍少ない免疫応答を誘導するものである。一実施形態では、デポー非形成ワクチンによって誘導された免疫応答は、ELISPOTによって評価して、デポー形成ワクチンによって誘導されたものよりも有効性が少なくとも10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、又は50倍低い。

20

【0197】

[00204]一実施形態では、免疫原性の弱い抗原とは、デポー形成ワクチン中の同じ抗原を用いた事前のプライミングなしで、デポー非形成ワクチン中で投与した場合に、対象に測定可能な治療上の利点をもたらすことができないものであるが、測定可能な治療上の利点は、抗原を本明細書中に記載の方法に従って投与した場合に達成することができる。一実施形態では、測定可能な治療上の利点は、たとえば、腫瘍の大きさの縮小又は癌生存予後診断の増加であり得る。一実施形態では、測定可能な治療上の利点は、少なくとも25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%の腫瘍の大きさの縮小である。

【0198】

[00205]それだけには限定されないが、免疫原性の弱い抗原には、たとえば、精製及び合成抗原（たとえばペプチド）、自己抗原、並びに／又は癌関連抗原が含まれ得る。

30

【0199】

[00206]当分野で周知のように、自己抗原とは、対象の身体内に由来する抗原である。免疫系は、たとえば胸腺中のT細胞の陰性選択が原因で、通常は、正常な恒常性条件下では自己抗原に対して非反応性である。したがって、これらの種類の抗原は、標的化免疫療法の開発において困難をもたらす。同様に、弱い抗原性が、免疫系が典型的には腫瘍成長の制御に失敗することの根本的原因であることが推論されている。多くの癌抗原は弱い、したがって遅い免疫応答しか刺激せず、これにより、腫瘍細胞が免疫回避機構を発生し、最終的には優位となるための機会及び時間が与えられる。

40

【0200】

[00207]これらの理由のため、とりわけ、免疫原性の弱い抗原が、抗原に対する免疫応答を強化する能力を有する本明細書中に開示する方法において使用するための特に適切な種類の抗原を表し得る。本明細書中に開示のデポー形成ワクチン（たとえば水を含まない、油ベースのワクチン）を用いてこれらの抗原に対する免疫応答をプライミングすることによって、続いてこれらの抗原をデポー非形成ワクチン（たとえば水性ワクチン）中で投与することが、その抗原に対する免疫応答の維持及び／又はブーストにおいてより有効となり得る。

【0201】

[00208]実施形態では、本明細書中に開示するワクチン組成物は自己抗原である抗原を

50

含む。実施形態では、本明細書中に開示するワクチン組成物は癌関連抗原である抗原を含む。一部の実施形態では、これらの抗原は免疫原性の弱い抗原である。

【0202】

[00209]本明細書中に記載の組成物を用いた単一治療において使用する抗原の量は、抗原の種類及び対象の特徴（たとえば、大きさ、重量、年齢、性別など）に応じて変動し得る。当業者は、必要以上の実験を行わずに、特定の応用において使用するための抗原の有効量を決定できるであろう。本明細書中で使用する用語「有効量」とは、必要な用量及び期間で所望の結果を達成するために有効な量を意味する。

【0203】

[00210]一実施形態では、単一用量の本明細書中に記載の組成物中で使用する抗原の量は0.001~5mg/単位用量の組成物であり得る。特定の実施形態では、抗原の量は約0.250mg/単位用量の組成物となる。特定の実施形態では、抗原の量は約1mg/mLの組成物となる。

10

【0204】

[00211]癌関連抗原

【0205】

[00212]一部の実施形態では、抗原は、癌若しくは腫瘍関連タンパク質又はその断片であり得る。たとえば、それだけには限定されないが、国際公開第2007/041832号に開示されているものなど、多くの癌又は腫瘍関連タンパク質が当分野で知られている。

20

【0206】

[00213]一部の実施形態では、癌はウイルスなどの病原体によって引き起こされ得る。癌の発生に関連づけられているウイルスは当業者に知られており、それだけに限定されないが、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ジョン・カニンガムウイルス（JCV）、ヒトヘルペスウイルス8、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、メルケル細胞ポリオマウイルス、C型肝炎ウイルス、及びヒトT細胞白血病ウイルス-1が含まれる。したがって、一実施形態では、本明細書中に開示する組成物は、癌の発生に関連づけられているウイルスに関連する抗原を含み得る。

【0207】

[00214]一部の実施形態では、抗原は、標的化された腫瘍細胞上の特異的コンホメーションを有効に認識し、その破壊を引き起こすことができる特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）免疫応答を誘導することができる、任意の1つであり得る。

30

【0208】

[00215]さらなる実施形態では、抗原は以下の表から選択されるペプチド配列を含み得る。

【0209】

[00216]

【表 3】

表 2:

抗原	配列	HLA	特許
Mart-1/ Melan-A	AAGIGILTV (配列番号5)	A2	米国特許第 5,844,075号
	EAAGIGILTV (配列番号6)	A2	米国特許第 5,844,075号
	ILTVILGVL (配列番号7)	A2	米国特許第 5,844,075号
	AEEAAGIGIL (配列番号8)	B45	米国特許第 7,037,509号
	AEEAAGIGILT (配列番号9)	B45	不明
MCIR	TILLGIFFL (配列番号10)	A2	不明
	FLALIICNA (配列番号11)	A2	不明
Gp100	KTWGQYWQV (配列番号12)	A2	米国特許第 5,844,075号
	AMLGHTTMEV (配列番号13)	A2	不明
	MLGHTTMEV (配列番号14)	A2	不明
	SLADTNSLAV (配列番号15)	A2	米国特許第 5,844,075号
	ITDQVPFSV (配列番号16)	A2	米国特許第 5,844,075号
	LLDGTATLRL (配列番号17)	A2	米国特許第 5,844,075号
	YLEPGPVTA (配列番号18)	A2	米国特許第 5,844,075号
	VLYRYGSFSV (配列番号19)	A2	米国特許第 5,844,075号
	RLPRIFCSC (配列番号20)	A2	不明
	LIYRRRLMK (配列番号21)	A3	不明
	ALNFPQSQK (配列番号22)	A3	不明
	SLIYRRRLMK (配列番号23)	A3	不明
	ALLAVGATK (配列番号24)	A3	米国特許第 6,558,671号
	ALLAVGATK (配列番号25)	A3	米国特許第 6,977,074号
	VYFFLPDHL (配列番号26)	A24	不明
	SNDGPTLI (配列番号27)	Cw8	不明

10

20

30

40

PSA	VSHSFPHPHY (配列番号28)	A1	米国特許第 6,037,135号
	FLTPKKLQCV (配列番号29)	A2	米国特許第 6,881,405号
	VISNDVCAQV (配列番号30)	A2	不明
PSM	HSTNGVTRIY (配列番号31)	A1	不明
チロシナーゼ	KCDICTDEY (配列番号32)	A1	米国特許第 7,019,112号
	SSDYVIPIGTY (配列番号33)	A1	不明
	YMDGTMSQV (配列番号34)	A2	米国特許第 6,096,313号
	MLLAVLYCL (配列番号35)	A2	米国特許第 6,291,430号
	AFLPWHRLF (配列番号36)	A24	米国特許第 6,291,430号
	SEIWRDIDF (配列番号37)	B44	米国特許第 6,291,430号
	MSLQRQFLR (配列番号38)	A31	米国特許第 5,831,016号
TRP1	SVYDFFVWL (配列番号39)	A2	米国特許第 7,067,120号
TRP2	TLDSQVMSL (配列番号40)	A2	不明
	LLGPGRPYR (配列番号41)	A31	米国特許第 5,831,016号
p53	ANDPIFVVL (配列番号42)	Cw8	不明

10

20

30

【0210】

[00217] 特定の実施形態では、本発明のワクチン組成物はHPVに由来する抗原を含み得る。一実施形態では、抗原はHPVのE6、E7、L1、又はL2タンパク質に由来し得る。

40

【0211】

[00218] 一実施形態では、HPVのE6タンパク質の抗原は、ペプチド配列T I H D I I L E C V (T10V、配列番号43)を含む。別の実施形態では、HPVのE7タンパク質の抗原は、R A H Y N I V T F (R9F、配列番号3)、Y M L D L Q P E T T (Y10T、配列番号44)、Y M L D L Q P E T (Y9T、配列番号45、L L M G T L G I V (L9V、配列番号46)、又はT L G I V C P I (T8I、配列番号47)のペプチド配列を含む。

【0212】

[00219] 他の実施形態では、HPVに由来する抗原は、国際公開第1993/022338号、国際公開第2002/070006号、国際公開第2006/115413号、

50

国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 7 1 8 7 号、国際公開第 2 0 0 9 / 0 0 2 1 5 9 号、又は国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 3 3 6 5 号に開示されている H P V 抗原のうちの 1 つ又は複数であり得る。

【 0 2 1 3 】

[00220]別の実施形態では、抗原は、たとえば黒色腫関連タンパク質などの腫瘍関連タンパク質に由来し得る。さらなる実施形態では、黒色腫関連タンパク質はチロシン関連タンパク質 - 2 (T R P - 2) 又は p 5 3 である。一実施形態では、T R P - 2 タンパク質に由来する抗原はペプチド配列 S V Y D F F V W L (S 9 L、配列番号 3 9) を含む。別の実施形態では、T R P - 2 タンパク質に由来する抗原はペプチド配列 V Y D F F V W L (V 8 L、配列番号 4 8) を含む。別の実施形態では、p 5 3 タンパク質に由来する抗原は、K Y M C N S S C M (K 9 M、野生型 p 5 3、配列番号 4 9)、K Y I C N S S C M (m K 9 M、改変 p 5 3、配列番号 5 0)、及び A K X V A A W T L K A A A K Y I C N S S C M (m K 9 M、配列番号 5 1) から選択されるペプチド配列を含み、式中、X はシクロヘキシルアラニルであり得る。

10

【 0 2 1 4 】

[00221]一実施形態では、ワクチン組成物中に含有される抗原は、本明細書中に記載の抗原のうちの 1 つ又は複数の混合物を含んでいてもよく、これらは、抗原間にスパーサー配列を有する又は有さない融合タンパク質として任意選択で一緒に融合されている。

【 0 2 1 5 】

[00222]他の実施形態では、それだけには限定されないが、抗原は膜表面結合癌関連タンパク質からのものであり得る。表面結合癌関連タンパク質 (又はその抗原) は、抗体によって認識されることができる。

20

【 0 2 1 6 】

[00223]特定の実施形態では、本発明のワクチン組成物は、1 つ又は複数のサバイピン抗原を含み得る。

【 0 2 1 7 】

[00224]アポトーシス反復含有 5 のバキュロウイルス阻害剤 (B I R C 5) とも呼ばれるサバイピンは、アポトーシスの負の調節に関与しているタンパク質である。これは、アポトーシスタンパク質阻害剤 (I A P) のファミリーのメンバーとして分類されている。サバイピンは、単一の B I R モチーフと R I N G フィンガーの代わりに高い荷電のカルボキシ末端コイル領域とを含有する、1 6 . 5 k D a の細胞質タンパク質である。サバイピンをコードしている遺伝子は、エフェクター細胞プロテアーゼ受容体 - 1 (E P R - 1) の配列とほぼ同一であるが、反対方向に配向されている。サバイピンのコード配列 (ヒト (h o m o s a p i e n s)) の長さは、ストップコドンを含めて 4 2 9 個のヌクレオチドである。

30

```
atgggtgcc cgacgttgcc ccctgcctgg cagccctttctcaaggacca ccgcatctct 60
acattcaaga actggccctt ctggaggggc tgcgcctgcaccccgagcg gatggccgag 120
gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagacttggcccagtg tttcttctgc 180
ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgaccccatagaggaaca taaaaagcat 240
tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttgaagaattaac ctttggtgaa 300
tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattgcaaaggaaac caacaataag 360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcgaagaaa gtgcgccgtgccatcgagca gctggctgcc 420
atggattga 429
```

40

配列番号 52

【 0 2 1 8 】

[00225]コードされているタンパク質サバイピン (ヒト) の長さは 1 4 2 個のアミノ酸である。

```
Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp GlnPro Phe Leu Lys Asp
1           5           10          15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro PheLeu Glu Gly Cys Ala
```

50

20 25 30
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85 90 95
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115 120 125
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130 135 140

配列番号53

【0219】

[00226] サバイピンタンパク質はカスパーゼ活性化を阻害するように機能し、それによ
 ってアポトーシス又はプログラム細胞死の負の調節がもたらされることが想定されている
 。この機能と一貫して、サバイピンは、多くの種類の癌において決まって上方調節されて
 いるが、正常組織中ではされていないトップクラスの遺伝子の1つとして同定されている
 (たとえば、Altieriら、Lab Invest、79:1327~1333、1
 999及び米国特許第6,245,523号を参照)。したがって、この事実により癌細胞
 が標的とされる一方で正常細胞は標的とされないため、サバイピンが癌治療の理想的な
 標的となる。実際、サバイピンはヒト癌の大部分を含めた多くの腫瘍の種類で高度に発現
 されており、予後的価値が報告されている。

【0220】

[00227] 一部の実施形態では、本発明のワクチンは1つ又は複数のサバイピン抗原を含
 み得る。本明細書中で使用する用語「サバイピン抗原」には、サバイピンタンパク質又は
 その断片に由来する任意のペプチド、ポリペプチド、又はその変異体(たとえばサバイピ
 ンペプチド変異体)が包含される。また、用語「サバイピン抗原」には、本明細書中に記
 載のサバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等
 価物をコードしているポリヌクレオチドも包含される。ポリヌクレオチドは、DNA(た
 とえば、ゲノムDNA若しくはcDNA)又はRNA(たとえばmRNA)或いはその組
 合せであり得る。これらは天然に存在する又は合成(たとえば化学合成)であり得る。ポ
 リヌクレオチドは、ヌクレオチド鎖中の1つ若しくは複数の窒素塩基、五炭糖、又はリン
 酸基の修飾を含有し得ることが企図される。そのような修飾は当分野で周知であり、た
 とえば、ポリヌクレオチドの安定性を改善する目的のものであり得る。

【0221】

[00228] 一実施形態では、サバイピン抗原は、完全長サバイピンポリペプチド又は完全
 長サバイピンポリペプチドをコードしている核酸を含み得る。或いは、サバイピン抗原は
 、サバイピンタンパク質の任意の長さの断片を含むサバイピンペプチドであり得る。例示
 的な実施形態には、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、1
 5、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸残基を含むサバイピンペプチドが含
 まれる。具体的な実施形態では、サバイピンペプチドは、サバイピンタンパク質(たと
 えば配列番号53)のそれぞれ7、8、9、10、11個の連続するアミノ酸残基からなる
 、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、又はウンデカペプ
 チドからなる。サバイピン抗原の特定の実施形態には、約9又は10個のアミノ酸のサバ
 イピンペプチドが含まれる。

【0222】

10

20

30

40

50

[00229]また、本発明のサバイビン抗原には、サバイビンペプチドの変異体及び機能的等価物も包含される。サバイビンペプチドの変異体又は機能的等価物には、1つ若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、若しくは付加、又はその任意の組合せなどの、サバイビントタンパク質の特定の配列と比較して相違を有するアミノ酸配列を示すペプチドが包含される。相違は、サバイビントタンパク質配列とサバイビンペプチド変異体又はサバイビンペプチド機能的等価物との間の同一性の低下として測定し得る。

【0223】

[00230]アミノ酸配列間の同一性は当分野で周知のアルゴリズムを使用して計算し得る。サバイビンペプチド変異体又は機能的等価物は、その全長にわたって、サバイビントタンパク質のペプチド配列と少なくとも70%同一、たとえば、サバイビントタンパク質のペプチド配列と少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、又は少なくとも95%同一(96%、97%、98%、又は99%同一が含まれる)である場合に、本発明の「サバイビン抗原」の意味の範囲内にあると考えられる。特定の実施形態では、サバイビンペプチド変異体は、配列番号53の連続するアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である配列を有する。

【0224】

[00231]サバイビン抗原が由来することができるサバイビントタンパク質は、タンパク質が発現される任意の動物種からのサバイビントタンパク質である。特定の実施形態はヒトからのサバイビントタンパク質である(配列番号53)。選択されたサバイビントタンパク質の配列に基づいて、サバイビン抗原は、サバイビントタンパク質又はコード核酸の任意の適切な化学処理又は酵素処理によって誘導し得る。或いは、サバイビン抗原は、当業者が精通している任意の慣用のペプチド又は核酸合成手順によって合成し得る。

【0225】

[00232]サバイビン抗原(ペプチド又は核酸)は、サバイビンのネイティブ配列である配列を有し得る。或いは、サバイビン抗原は、たとえば本明細書中に記載のサバイビンペプチド変異体又は機能的等価物などのように、1つ又は複数の置換、欠失、又は付加によって改変されたペプチド又は核酸配列であり得る。ペプチドの免疫原性を増加させる、サバイビンペプチドの例示的な手順及び改変には、たとえば、HLAクラスI分子とのペプチド結合を増加させる、アンカー位置に導入されたアミノ酸置換を含む、国際公開第2004/067023号に記載のものが含まれる。

【0226】

[00233]一実施形態では、サバイビン抗原は、MHCクラスI HLA分子と結合することができる、サバイビントタンパク質に由来する任意のペプチド又はその任意のサバイビンペプチド変異体である。これに沿って、サバイビン抗原は、対象において免疫応答を誘導又は強化することができる任意のサバイビンペプチド又はそのサバイビンペプチド変異体であり得る。

【0227】

[00234]一実施形態では、サバイビン抗原は、対象において細胞毒性Tリンパ球(CTL)応答を誘発することができるサバイビントタンパク質(たとえば配列番号53)からのアミノ酸配列を含むペプチド抗原、又は上記ペプチドをコードしている核酸分子である。

【0228】

[00235]一実施形態では、ワクチンは、配列番号53に記載のアミノ酸配列などのサバイビントタンパク質のアミノ酸配列に基づいて、1つ又は複数の合成サバイビンペプチド又はその変異体を含む。

【0229】

[00236]サバイビンペプチド、サバイビンペプチド変異体、及びサバイビン機能的等価物、並びにその診断目的及び治療目的、特に癌における使用は、たとえば、国際公開第2004/067023号及び国際公開第2006/081826号に記載されている。これらの出版物中に開示されている新規ペプチドは、癌患者において細胞毒性Tリンパ球(

CTL) 応答を誘発できることが見いだされている。特に、国際公開第2004/067023号では、MHCクラスI HLA分子と結合することによって、広範囲の癌疾患を患っている患者においてex vivo及びin situのCTL免疫応答をどちらも誘発することができるMHCクラスI制限ペプチドは、サバイピンタンパク質に由来することができることが見いだされている。

【0230】

[00237]一実施形態では、本発明のワクチン組成物には、国際公開第2004/067023号及び国際公開第2006/081826号中に開示されているサバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等価物の任意の1つ又は複数が含まれ得る。

10

【0231】

[00238]別の実施形態では、本発明のワクチン組成物には、HLA-A、HLA-B、又はHLA-C分子から選択されるMHCクラスI分子のいずれかと結合することができる、サバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等価物の1つ又は複数が含まれ得る。

【0232】

[00239]サバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等価物が結合し得る例示的なMHCクラスI HLA-A分子には、それだけに限定されないが、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-A19、HLA-A23、HLA-A24、HLA-A25、HLA-A26、HLA-A28、HLA-A29、HLA-A30、HLA-A31、HLA-A32、HLA-A33、HLA-A34、HLA-A36、HLA-A43、HLA-A66、HLA-A68、及びHLA-A69が含まれる。

20

【0233】

[00240]サバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等価物が結合し得る例示的なMHCクラスI HLA-B分子には、それだけに限定されないが、HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-B22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-B41、HLA-B42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-B46及びHLA-B47が含まれる。

30

【0234】

[00241]サバイピンペプチド、サバイピンペプチド変異体、又はサバイピンペプチド機能的等価物が結合し得る例示的なMHCクラスI HLA-C分子には、それだけに限定されないが、HLA-C1、HLA-C2、HLA-C3、HLA-C4、HLA-C5、HLA-C6、HLA-C7、及びHLA-C16が含まれる。

【0235】

[00242]特定の実施形態では、本発明のワクチン組成物は、以下から選択されるサバイピンペプチド抗原の1つ又は複数を含み得る。

40

- | | | |
|-------|------------------------------|-------------------|
| i) | F E E L T L G E F (配列番号54) | [H L A - A 1] |
| ii) | F T E L T L G E F (配列番号55) | [H L A - A 1] |
| iii) | L T L G E F L K L (配列番号56) | [H L A - A 2] |
| iv) | L M L G E F L K L (配列番号2) | [H L A - A 2] |
| v) | R I S T F K N W P F (配列番号57) | [H L A - A 3] |
| vi) | R I S T F K N W P K (配列番号58) | [H L A - A 3] |
| vii) | S T F K N W P F L (配列番号59) | [H L A - A 2 4] |
| viii) | L P P A W Q P F L (配列番号60) | [H L A - B 7] |

【0236】

[00243]上に列挙したサバイピンペプチドは、それだけに限定されないが、本発明によ

50

って包含される例示的なMHCクラスI制限ペプチドを表す。サバイピンペプチドのそれぞれが結合すると考えられている特定のMHCクラスI HLA分子を、右側の角括弧内に示す。本発明のワクチンは、これらのバイピンペプチドの1つ又は複数を任意の適切な組合せで含み得る。

【0237】

[00244]さらなる実施形態では、本発明のワクチン組成物は、以下に列挙する5つのサバイピンペプチドの任意の1つ又は複数を任意の適切な組合せで含み得る。

- | | | |
|------|------------------------------|-------------------|
| i) | F T E L T L G E F (配列番号55) | [H L A - A 1] |
| ii) | L M L G E F L K L (配列番号2) | [H L A - A 2] |
| iii) | R I S T F K N W P K (配列番号58) | [H L A - A 3] |
| iv) | S T F K N W P F L (配列番号59) | [H L A - A 2 4] |
| v) | L P P A W Q P F L (配列番号60) | [H L A - B 7] |

10

【0238】

[00245]特定の実施形態では、本発明の組成物は、上に列挙した5つすべてのサバイピンペプチド抗原を含む。

【0239】

[00246]一部の実施形態では、少なくとも1つのサバイピン抗原に加えて、本発明のワクチン組成物は、1つ又は複数の追加の抗原、たとえば本明細書中に記載したものなどを含み得る。

【0240】

20

[00247]CTLエピトープ及びB細胞エピトープ

【0241】

[00248]上述したように、一部の実施形態では、抗原は、少なくとも1つのB細胞エピトープ又はCTLエピトープを含む分子である。

【0242】

[00249]エピトープは、それだけに限定されないが、ペプチド、炭水化物、脂質、糖ペプチド、及び糖脂質を含めた、任意の化学性質のものであり得る。特定の実施形態では、エピトープは、本明細書中に記載の抗原のいずれかに由来するペプチドである。エピトープは、天然に存在するエピトープと同一であり得るか、天然に存在するエピトープの修飾体であり得る。

30

【0243】

[00250]B細胞エピトープとは、B細胞及び抗体によって認識されるエピトープである。B細胞ペプチドエピトープの長さは、典型的には少なくとも5個のアミノ酸、より多くの場合は少なくとも6個のアミノ酸、さらにより多くの場合は少なくとも7又は8個のアミノ酸の長さであり、連続的(「直鎖状」)又は不連続(「コンホメーション」)であってよく、後者は、たとえば、タンパク質の折り畳みにより一次アミノ酸配列の非連続的な部分を物理的に近接させることによって形成される。また、B細胞エピトープは炭水化物エピトープであってもよい。

【0244】

[00251]一実施形態では、本明細書中に記載した組成物の抗原は、液性免疫応答を誘導することができるB細胞エピトープであり得るか、それを含み得る。

40

【0245】

[00252]一部の実施形態では、本明細書中に記載した組成物の抗原は、感染性疾患に関連するB細胞エピトープであり得るか、それを含み得る。たとえば、抗原は、ウイルス、たとえばインフルエンザウイルス又は呼吸器合胞体ウイルスなどに由来するB細胞エピトープであり得るか、それを含み得る。別の実施形態では、B細胞エピトープは、H5N1インフルエンザウイルスの赤血球凝集素糖タンパク質に由来するエピトープであり得る。

【0246】

[00253]別の実施形態では、本明細書中に記載した組成物の抗原は、細菌、たとえば百日咳菌又はバチルス・アントラシスなどに由来するB細胞エピトープであり得るか、それ

50

を含み得る。特定の実施形態では、B細胞エピトープは、百日咳菌によって産生される百日咳トキソイドタンパク質のエピトープであり得る。別の特定の実施形態では、B細胞エピトープは、炭疽菌組換え保護抗原(rPA)又は炭疽菌突然変異体組換え保護抗原(mrPA)のエピトープであり得る。

【0247】

[00254]別の実施形態では、本明細書中に記載した組成物の抗原は、プラスモジウム属のものなどの原虫に由来するB細胞エピトープであり得るか、それを含み得る。

【0248】

[00255]さらなる実施形態では、組成物は、液性免疫応答を誘導するための抗原としてB細胞エピトープの混合物を含み得る。B細胞エピトープを連結させて単一のポリペプチドを形成し得る。

【0249】

[00256]CTLエピトープとは、細胞毒性Tリンパ球によって認識される分子である。CTLエピトープは、典型的には、抗原提示細胞の表面上にMHC分子と複合体化して提示される。本明細書中で使用する用語「CTLエピトープ」とは、抗原(ハプテンが含まれる)の天然CTLエピトープと実質的に同じである分子(たとえばペプチド)をいう。CTLエピトープは、その天然の対応物と比較して、1個又は2個のアミノ酸などが改変されていてもよい。別段に記述しない限りは、本明細書中におけるCTLエピトープへの言及は、細胞によって取り込まれ、抗原提示細胞の表面上に提示されることができ、未結合の分子をさす。

【0250】

[00257]CTLエピトープは、典型的には、細胞性免疫応答が起こることができるように、T細胞受容体による認識を受け入れやすいものであるべきである。ペプチドでは、CTLエピトープはクラスI又はクラスII MHC分子と相互作用し得る。MHCクラスI分子によって提示されるCTLエピトープは、典型的には8~15個のアミノ酸の長さ、より多くの場合は9~11個のアミノ酸の長さのペプチドである。MHCクラスII分子によって提示されるCTLエピトープは、典型的には5~24個のアミノ酸の長さ、より多くの場合は13~17個のアミノ酸の長さのペプチドである。抗原がこれらのサイズよりも大きい場合、それは免疫系によって、MHCクラスI又はII分子との相互作用により適したサイズの断片へと処理される。したがって、CTLエピトープは、上述したものよりも大きなペプチドの一部であってもよい。

【0251】

[00258]多くのCTLエピトープが知られている。さらなるCTLエピトープを同定するためのいくつかの技法が当分野で認識されている。一般に、それらは、CTLエピトープを潜在的に提供する分子を調製し、その分子に対する免疫応答を特徴づけることを含む。

【0252】

[00259]一実施形態では、本明細書中に記載した組成物の抗原は、CTL応答を誘導することができるCTLエピトープであり得るか、それを含み得る。たとえば、抗原は、HPVなどのウイルスに由来するCTLエピトープであり得る。

【0253】

[00260]別の実施形態では、抗原は、HPVのE6又はE7タンパク質に由来するCTLエピトープであり得るか、それを含み得る。たとえば、それだけに限定されないが、HPVのE6タンパク質のCTLエピトープはペプチド配列T I H D I I L E C V (T10V、配列番号43)を含んでいてもよく、HPVのE7タンパク質のCTLエピトープは、ペプチド配列R A H Y N I V T F (R9F、配列番号3)、Y M L D L Q P E T T (Y10T、配列番号44)、Y M L D L Q P E T (Y9T、配列番号45) L L M G T L G I V (L9V、配列番号46)、及びT L G I V C P I (T81、配列番号47)を含んでいてもよい。

【0254】

10

20

30

40

50

[00261]別の実施形態では、CTLエピトープは、たとえば本明細書中に記載したサバイピンペプチドの1つ若しくは複数又は黒色腫関連タンパク質などの腫瘍関連タンパク質のエピトープであり得る。一実施形態では、黒色腫関連タンパク質は、組換え技術又は化学合成を含めた様々な方法によって得ることができるチロシン関連タンパク質 - 2 (TRP - 2) 又はp53であり得る。

【0255】

[00262]たとえば、それだけに限定されないが、TRP - 2由来のタンパク質のCTLエピトープは、ペプチド配列SVYDF F VWL (S9L、配列番号39) 又はVYDF F VWL (V8L、配列番号48) を含み得る。p53に由来するタンパク質のCTLエピトープは、たとえば、ペプチド配列KYMCNSSCM (K9M、野生型p53、配列番号49)、KYICNSSCM (mK9M、改変p53、配列番号50)、又はAKXVAAWTLKAAAKYICNSSCM (mK9M、配列番号51) を含んでいてもよく、式中、Xはシクロヘキシルアラニルであり得る。

【0256】

[00263]さらなる実施形態では、組成物は、CTL応答を誘導するための抗原としてCTLエピトープの混合物を含み得る。CTLエピトープを連結させて単一のポリペプチドを形成し得る。

【0257】

[00264]一部の実施形態では、B細胞及びCTLエピトープは疾患関連及び/又は疾患特異的エピトープである。そのような疾患には、それだけに限定されないが、本明細書中に既に記載したもののいずれかが含まれる。たとえば、それだけに限定されないが、疾患は、癌(たとえば、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膠芽細胞腫、若しくはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫など)、感染性疾患(たとえば、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染症、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染症、インフルエンザウイルス感染症、エボラウイルス感染症、バチルス・アントラシス感染症、若しくは四日熱マラリア原虫感染症によって引き起こされる若しくはそれに関連する疾患など)、又は嗜癮疾患(たとえばコカインに対する嗜癮など)であり得る。

【0258】

[00265]ヘルパーTエピトープ

【0259】

[00266]一部の実施形態では、デポー形成及びデポー非形成ワクチンをどちらも含めた本発明のワクチン組成物は、少なくとも1つのヘルパーTエピトープ又はヘルパーT抗原も含み得る。

【0260】

[00267]ヘルパーTエピトープとは、ヘルパーT活性を有するアミノ酸(天然又は非天然のアミノ酸)の配列である。ヘルパーTエピトープはヘルパーTリンパ球によって認識され、これは、免疫系の能力を確立及び最大化することにおいて重要な役割を果たしており、また、たとえば細胞毒性Tリンパ球などの他の免疫細胞の活性化及び指示に関与している。

【0261】

[00268]ヘルパーTエピトープは連続的又は不連続のエピトープからなることができる。それゆえ、ヘルパーTのすべてのアミノ酸が必ずしもエピトープの必要な部分ではない。したがって、ヘルパーTエピトープの類似体及びセグメントを含めたヘルパーTエピトープは、免疫応答を増強又は刺激することができる。免疫優性ヘルパーTエピトープは幅広く多岐にわたるMHC型を有しており、動物及びヒト集団において広範に反応性がある(Cellisら(1988)、J. Immunol.、140:1808~1815、Demotzら(1989)、J. Immunol.、142:394~402、Chongら(1992)、Infect. Immun.、60:4640~4647)。対象ペプチドのヘルパーTドメインは、約10~約50個のアミノ酸、より詳細には約10~約30個のアミノ酸を有し得る。複数のヘルパーTエピトープが存在する場合、それぞれの

ヘルパーＴエピトープは独立して作用する。

【 0 2 6 2 】

[00269] 一部の実施形態では、ヘルパーＴエピトープは、本明細書中に記載の抗原の一部を形成し得る。特に、抗原が十分な大きさのものである場合、これはヘルパーＴエピトープとして機能するエピトープを含有し得る。他の実施形態では、ヘルパーＴエピトープは抗原とは別個の分子である。

【 0 2 6 3 】

[00270] 別の実施形態では、ヘルパーＴエピトープ類似体には、ヘルパーＴエピトープ中に１個～約１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、及び挿入が含まれ得る。ヘルパーＴセグメントは、免疫応答を増強又は刺激するために十分な、ヘルパーＴエピトープの連続的な部分である。ヘルパーＴセグメントの一例は、単一のより長いペプチドに由来する一連の重複ペプチドである。

【 0 2 6 4 】

[00271] 特定の実施形態では、本発明の組成物は、ヘルパーＴエピトープ又は抗原として、安定性を増強するためにアラニン残基がそのアミノ末端に付加された改変破傷風毒素ペプチド A 1 6 L (8 3 0 ~ 8 4 4 、 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 6 1) を含み得る (S l i n g l u f f ら、C l i n C a n c e r R e s .、7 : 3 0 1 2 ~ 3 0 2 4 、2 0 0 1) 。

【 0 2 6 5 】

[00272] 本組成物において使用し得るヘルパーＴエピトープの他の供給源には、たとえば、Ｂ型肝炎表面抗原ヘルパーＴ細胞エピトープ、百日咳毒素ヘルパーＴ細胞エピトープ、麻疹ウイルスＦタンパク質ヘルパーＴ細胞エピトープ、クラミジア・トラコミチス (C h l a m y d i a t r a c h o m i t i s) 主要外膜タンパク質ヘルパーＴ細胞エピトープ、ジフテリア毒素ヘルパーＴ細胞エピトープ、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲ヘルパーＴ細胞エピトープ、マンソン住血吸虫 (S c h i s t o s o m a m a n s o n i) トリオースリン酸イソメラーゼヘルパーＴ細胞エピトープ、大腸菌 T r a T ヘルパーＴ細胞エピトープ、並びにこれらのヘルパーＴエピトープのいずれかの免疫増強性の類似体及びセグメントが含まれる。

【 0 2 6 6 】

[00273] 一部の実施形態では、ヘルパーＴエピトープは普遍的ヘルパーＴエピトープであり得る。本明細書中で使用する普遍的ヘルパーＴエピトープとは、クラス II (C D 4 + T 細胞) 制限様式でＴ細胞の機能を活性化する様式で多数の M H C クラス II 分子と結合する、ペプチド若しくは他の免疫原性分子又はその断片をいう。普遍的ヘルパーＴエピトープの一例は、ペプチド配列 A K X V A A W T L K A A A (配列番号 6 2) (式中、X はシクロヘキシルアラニルであり得る) を含む P A D R E (p a n - D R エピトープ) である。P A D R E は特異的に C D 4 + ヘルパーＴエピトープを有している、すなわち、これは P A D R E に特異的な C D 4 + ヘルパーＴ応答の誘導を刺激する。

【 0 2 6 7 】

[00274] 既に言及した改変破傷風毒素ペプチド A 1 6 L に加えて、破傷風トキソイドは、P A D R E と同様の様式で作用する他のヘルパーＴエピトープを有する。破傷風及びジフテリア毒素はヒト C D 4 + 細胞に対する普遍的エピトープを有する (D i e t h e l m - O k i t a , B . M . ら、J . I n f e c t . D i s e a s e s、1 8 1 : 1 0 0 1 ~ 1 0 0 9、2 0 0 0) 。別の実施形態では、ヘルパーＴエピトープは、ペプチド配列 F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E (アミノ酸 9 4 7 ~ 9 6 7) (配列番号 6 3) を含む F 2 1 E などの破傷風トキソイドペプチドであり得る。

【 0 2 6 8 】

[00275] 特定の実施形態では、ヘルパーＴエピトープは、本発明のワクチン中の１つ又は複数の抗原の少なくとも１つと融合している (たとえば融合ペプチド)。

【 0 2 6 9 】

[00276] 本明細書中に記載の組成物を用いた単一治療において使用するヘルパーＴエピ

10

20

30

40

50

トープの量は、ヘルパーTエプトープの種類及び対象の特徴（たとえば、大きさ、重量、年齢、性別など）に応じて変動し得る。当業者は、必要以上の実験を行わずに、特定の応用において使用するための適切な量のヘルパーTエプトープを決定できるであろう。

【0270】

[00277]一実施形態では、単一用量の本明細書中に記載の組成物中で使用するヘルパーTエプトープの量は0.001～5mg/単位用量の組成物であり得る。特定の実施形態では、抗原の量は約0.125mg/単位用量の組成物となる。特定の実施形態では、抗原の量約500μg/mLの組成物となる。

【0271】

[00278]アジュバント

10

【0272】

[00279]一部の実施形態では、デポー形成及びデポー非形成ワクチンをどちらも含めた本明細書中に開示するワクチン組成物は、1つ又は複数のアジュバントを含み得る。

【0273】

[00280]多数のアジュバントが記載されており、当業者に知られている。たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company、米国ペンシルベニア州Easton、1985)及び米国薬局方：国民医薬品集(USP 24 NF19)、1999年出版を参照されたい。

【0274】

20

[00281]例示的なアジュバントには、それだけに限定されないが、ミョウバン、アルミニウムの他の化合物、バチルスカルメット・ゲラン(BCG)、タイターマックス(TiterMax)(商標)、リビ(Ribi)(商標)、フロイント完全アジュバント(FCA)、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)、リボペプチド類、及びポリI:Cポリヌクレオチドが含まれる。例示的なCpG ODNは5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'(配列番号64)である。当業者は、標的の種及び有効性に基づいて他の適切なCpG ODNを容易に選択することができる。例示的なリボペプチドには、それだけに限定されないが、Pam3Cys-SKKK(EMC Microcollections、ドイツ)、又はその変異体、相同体、及び類似体が含まれる。Pam2リボペプチドファミリーは、Pam3リボペプチドファミリーの有効な代替物であることが示されている。

30

【0275】

[00282]一部の実施形態では、医薬組成物又はワクチン組成物は、アジュバントとして、たとえばそれだけに限定されないが26量体のデオキシイノシン/シトシン合成ポリヌクレオチドなどのポリI:Cポリヌクレオチドを含み得る。

【0276】

[00283]本明細書中で使用する「ポリI:C」又は「ポリI:Cポリヌクレオチド」とは、それぞれの鎖が少なくとも6個の連続的なイノシン酸若しくはシチジル酸残基、又は任意の順序でイノシン酸及びシチジル酸から選択される少なくとも6個の連続的な残基(たとえば、IICIIIC、ICIIIC、若しくはIIICCC)を含有しており、哺乳動物対象においてインターフェロンなどの少なくとも1つの炎症性サイトカインの産生を誘導又は増強することができる、二本鎖ポリヌクレオチド分子(RNA若しくはDNA又はDNA及びRNAの組合せ)である。ポリI:Cポリヌクレオチドは、典型的には、約8、10、12、14、16、18、20、22、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、500、1000個、又はそれより多くの残基の長さを有する。上限は重要でないと考えられている。ポリI:Cポリヌクレオチドは、多くの場合、最短で約6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、又は30個のヌクレオチドの長さ、及び最大で約1000、500、300、200、100、90、80、70、60、50、45、又は40個のヌクレオチドの長さを有する。

40

50

【 0 2 7 7 】

[00284]ポリ I : C ポリヌクレオチドのそれぞれの鎖はイノシン酸若しくはシチジル酸残基のホモポリマーであり得るか、又は、それぞれの鎖はイノシン酸及びシチジル酸残基をどちらも含有するヘテロポリマーであり得る。どちらも場合でも、少なくとも 1 つの上述の 6 個の I、6 個の C、又は 6 個の I / C 残基の連続的な領域が存在する限りは、ポリマーは 1 つ又は複数の非イノシン酸又は非シチジル酸残基（たとえばウリジン）によって中断され得る。典型的には、ポリ I : C ポリヌクレオチドのそれぞれの鎖は、6 個の I / C 残基あたり 1 個以下の非 I / C 残基、より詳細には 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、又は 30 個の I / C 残基あたり 1 個以下の非 I / C 残基しか含有しない。

10

【 0 2 7 8 】

[00285]ポリ I : C ポリヌクレオチド中のイノシン酸若しくはシチジル酸（又は他の）残基は、インターフェロンなどの炎症性サイトカインの産生を促進するポリ I : C ポリヌクレオチドの能力が保持されている限り、当分野で知られているように誘導体化又は修飾し得る。誘導体又は修飾体の非限定的な例には、たとえば、アジド修飾、フルオロ修飾、又は *in vivo* 安定性を増加させるための、天然のリン酸ジエステル結合の代わりにチオエステル（若しくは類似の）結合の使用が含まれる。また、ポリ I : C ポリヌクレオチドは、たとえば、分子を正荷電ポリリシンとカルボキシメチルセルロース又は正荷電合成ペプチドと複合体化することによって、たとえば *in vivo* 分解に対するその耐性を増強させるためにも修飾し得る。

20

【 0 2 7 9 】

[00286]存在する場合、ポリ I : C ポリヌクレオチドは、典型的には、組成物中に、約 0.001 mg ~ 1 mg / 組成物単位用量の量で含まれる。特定の実施形態では、ポリ I : C ポリヌクレオチドの量は約 0.1 mg / 単位用量の組成物である。特定の実施形態では、ポリ I : C ポリヌクレオチドの量は約 400 µg / mL の組成物である。

【 0 2 8 0 】

[00287]本明細書中に開示する組成物の他の適切なアジュバントは、TLR2 を活性化する又はその活性を増加させるものである。本明細書中で使用する、TLR2 を「活性化する」又はその「活性を増加させる」アジュバントには任意のアジュバントが含まれ、一部の実施形態では、TLR2 作用剤として作用する脂質に基づくアジュバントが含まれる。さらに、TLR2 の活性化又はその活性の増加には、任意の単量体、ホモ二量体、又はヘテロ二量体の形態でのその活性化が包含され、TLR1 又は TLR6 とのヘテロ二量体としての TLR2（すなわち TLR1 / 2 又は TLR2 / 6）の活性化が特に含まれる。TLR2 を活性化させる又はその活性を増加させるアジュバントの例示的な実施形態には、国際公開第 2013 / 049941 号に記載のものなどの脂質に基づくアジュバントが含まれる。

30

【 0 2 8 1 】

[00288]別の実施形態では、本発明の組成物は、たとえば、国際出願 PCT / CA2015 / 051309 号及びそれ中に引用されている参考文献中に開示されているものなどの、脂質 A 模倣体又は類似体アジュバントを含み得る。特定の実施形態では、アジュバントは、国際出願 PCT / CA2015 / 051309 号に開示のように JL - 265 又は JL - 266 であり得る。

40

【 0 2 8 2 】

[00289]使用し得るアジュバントのさらなる例には、それだけに限定されないが、ケモカイン、コロニー刺激因子、サイトカイン、1018 ISS、アルミニウム塩、アンブリボックス (Amplivax)、AS04、AS15、ABM2、アジュマー (Adjuvamer)、アルガムリン (Algamulin)、AS01B、AS02 (SBAS A)、AS02A、BCG、カルシトリオール、キトサン、コレラ毒素、CP - 870, 893、CpG、ポリ I : C、Cy a A、デトックス (DETOX) (Ribbi Immunochemicals)、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA)、フ

50

タル酸ジブチル (DBP)、dSLIM、ガンマイヌリン、GM-CSF、GM DP、グリセロール、IC30、IC31、イミキモド、イムファクト (ImuFact) IMP321、ISパッチ (IS Patch)、イスコム (ISCOM)、イスコムマトリックス (ISCOMATRIX)、ジュヴィムューン (Juvenile Immune)、リポバック (LipoVac)、LPS、脂質コアタンパク質、MF59、モノホスホリルリピドA及びその類似体又は模倣体、モンタニド (登録商標) IMS1312、モンタニド (登録商標) に基づくアジュバント (たとえば、モンタニドISA-51、-50、及び-70)、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、オンタック (ONTAK)、ペプテル (Peptel) ベクター系、他のパルミトイルに基づく分子、PLG微粒子、レシキモド、スクアレノ、SLR172、YF-17 DBCG、QS21、QuilA、P1005、ポロキサマー、サポニン、合成ポリヌクレオチド、ザイモサン、百日咳毒素が含まれる。

10

【0283】

[00290]したがって、本明細書中の組成物は、1つ又は複数の薬学的に許容されるアジュバントを含み得る。一部の実施形態では、抗原の少なくとも1つはアジュバントの少なくとも1つとカップリングされていてよい。

【0284】

[00291]使用するアジュバントの量は抗原の量及びアジュバントの種類に依存する。当業者は、特定の応用において必要なアジュバントの量を経験的な試験によって容易に決定できるであろう。

20

【0285】

[00292]疎水性担体

【0286】

[00293]本発明のデポー形成ワクチン組成物は、たとえば液体の疎水性物質などの疎水性担体を含む。

【0287】

[00294]疎水性担体は、本質的に純粋な疎水性物質又は疎水性物質の混合物であり得る。疎水性担体は、疎水性物質中の水の乳濁液又は疎水性物質混合物中の水の乳濁液 (すなわち油中水乳濁液) であり得ることが可能であるが、水の排除が、本明細書中に開示するデポー形成ワクチンを配合するための好ましい実施形態を表し得る。

30

【0288】

[00295]したがって、特定の実施形態では、本明細書中に開示するデポー形成ワクチンは水を含まない場合がある。「水を含まない」とは、デポー形成ワクチンが水を全く含有しないことを意味する。別の実施形態では、本明細書中に開示するデポー形成ワクチンは、水を実質的に含まない場合がある。用語「水を実質的に含まない」には、水が担体の不連続相中に存在する限りは、疎水性担体が少量の水を含有したままであり得る実施形態が包含されることを意図する。たとえば、組成物の個々の構成成分は、凍結乾燥又は蒸発などの処理によって完全に除去され得ない結合水を有する場合があり、特定の疎水性担体はそれ中に溶解した少量の水を含有する場合がある。一般に、「水を実質的に含まない」本発明の組成物は、たとえば、重量/重量に基づいて、組成物の担体構成成分の全重量の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、又は0.01%未満の水を含有する。

40

【0289】

[00296]本明細書中に記載した組成物において有用な疎水性物質は、薬学的及び/又は免疫学的に許容されるものである。担体は典型的には液体であるが、大気温で液体でない特定の疎水性物質を、たとえば温めることによって液化してもよく、これらも有用であり得る。

【0290】

[00297]油又は油の混合物は、本明細書中に開示するデポー形成ワクチン組成物において使用するために特に適した担体である。油は薬学的及び/又は免疫学的に許容されるは

50

ずである。適切な油には、たとえば、鉱物油（特に、ドラケオール（Drake oil）（登録商標）6 V Rなどの軽い若しくは低粘度の鉱物油）、植物油（たとえばダイズ油）、堅果油（たとえばピーナッツ油）、又はその混合物が含まれる。したがって、一実施形態では、疎水性担体は、植物油、堅果油、又は鉱物油などの疎水性物質である。動物性脂肪及び人工疎水性ポリマー材料、特に大気温で液体であるもの又は比較的容易に液化できるものも使用し得る。

【0291】

[00298] 一部の実施形態では、疎水性担体は、鉱物油ベースのモデル疎水性担体である不完全フロイントアジュバント（IFA）である又は鉱物油ベースのモデル疎水性担体である不完全フロイントアジュバント（IFA）を含み得る。

10

【0292】

[00299] 別の実施形態では、疎水性担体は、モンタニド（Montanide）（登録商標）ISA51（SEPPIC、フランス）として市販されているものなどの、鉱物油溶液中のオレイン酸マンニドである又はモンタニド（Montanide）（登録商標）ISA51（SEPPIC、フランス）として市販されているものなどの、鉱物油溶液中のオレイン酸マンニドを含み得る。

【0293】

[00300] ワクチンの免疫原性を増強させるために、Immunovaccine Inc. は、ペプチド又はポリヌクレオチド抗原に対する強力且つ頑強な免疫応答を促進するために設計されたアジュバント化ワクチンプラットフォームを開発している。デポヴァックス（商標）（DPX）は、細胞性免疫応答（Karkadaら、J Immunother、33（3）：250～261、2010）及び/又は液性免疫応答を誘導又は強力にするために、任意の抗原又は抗原の混合物を用いて配合することができる油中脂質の配合物である。DPXは免疫化の部位で強力なデポーを形成し、これにより免疫系に対する抗原の曝露が延長される。

20

【0294】

[00301] DPX中におけるペプチド又はポリヌクレオチド抗原を用いた単一のワクチン接種は、第一世代の乳濁液に基づくワクチンプラットフォームであったワクチンマックスと同様、モンタニドISA51 VG乳濁液などの他の慣用の配合物中における同じ抗原を用いた複数回のワクチン接種と同等又はそれよりも良好な免疫応答をもたらすことが示されている（Daftarianら、J Transl Med、5：26、2007、Mansourら、J Transl Med、5：20、2007）。DPX-0907と呼ばれる、デポヴァックス（商標）に基づくペプチド-ワクチンは乳房、卵巣、及び前立腺癌の患者において第I相臨床試験が完了しており、これらの進行性の患者において安全性及び免疫原性が実証されている（Berinsteinら、J Transl Med、10（1）：156、2012）。

30

【0295】

[00302] 抗原及びアジュバントを含有する水滴を捕捉する油に依存する、油中水乳濁液に基づくワクチンとは異なり、デポヴァックス（商標）に基づく配合物は、乳化を必要とせずに、抗原及びアジュバントの油内への直接の取り込みを促進するために脂質に依存する。この手法の利点には、（1）そうでなければ通常は水性希釈剤中で最大の溶解度を有する親水性の抗原/アジュバントの、油状希釈剤中での溶解度が増強されること、及び（2）ワクチン投与の厄介な乳化手順が排除されることが含まれる。

40

【0296】

[00303] 一部の実施形態では、本明細書中に開示するデポー形成ワクチン組成物の疎水性担体は、Immunovaccine, Inc.のアジュバント系、デポヴァックス（商標）であり得る。

【0297】

[00304] 乳化剤

【0298】

50

[00305] 一部の実施形態では、本明細書中に開示するワクチン組成物は1つ又は複数の乳化剤を含み得る。乳化剤は純粋な乳化剤又は乳化剤の混合物であり得る。乳化剤（複数可）は、薬学的に及び/又は免疫学的に許容されるものであるべきである。

【0299】

[00306] 乳化剤の使用は、本明細書中に開示するデポー形成ワクチンにおいて特に関連性があり得る。たとえば、一部の実施形態では、乳化剤は、両親媒性物質又は混合物を疎水性担体内に再懸濁させる際に、両親媒性物質、両親媒性物質と抗原の混合物、又は両親媒性物質と抗原と他のワクチン構成成分（たとえば、アジュバント、ヘルパーTエпитープなど）の混合物の安定化を補助するために使用し得る。乳化剤の使用は、たとえば、疎水性担体中での両親媒性物質又は混合物のより均一な分布を促進し得る。

10

【0300】

[00307] 乳化剤は両親媒性であってもよく、したがって、乳化剤には広範囲の化合物が含まれ得る。一部の実施形態では、乳化剤は、たとえば非イオン性界面活性剤などの界面活性剤であり得る。使用し得る乳化剤の例には、ポリエチレングリコリル化ソルビタール（polyethylene glycolyated sorbital）に由来する油性の液体であるポリソルベート、及びソルビタンエステルが含まれる。ポリソルベートにはたとえばモノオレイン酸ソルビタンが含まれ得る。典型的な乳化剤は当分野で周知であり、それだけには限定されないが、オレイン酸マンニド（アルラセル（商標）A）、レシチン、ツイーン（商標）80、スパン（商標）20、80、83、及び85が含まれる。一実施形態では、ワクチン組成物において使用するため乳化剤はオレイン酸マンニドである。

20

【0301】

[00308] 乳化剤は、一般的には疎水性担体と事前に混合する。一部の実施形態では、乳化剤を既に含有する疎水性担体を使用し得る。たとえば、モンタニド（商標）ISA-51などの疎水性担体は、乳化剤オレイン酸マンニドを既に含有する。他の実施形態では、疎水性担体は、両親媒性物質、両親媒性物質と抗原の混合物、又は両親媒性物質と抗原と他のワクチン構成成分（たとえばアジュバント、ヘルパーTエпитープなど）の混合物と合わせる前に乳化剤と混合し得る。

【0302】

[00309] 乳化剤は、疎水性担体中での両親媒性物質の均一な分布を促進する、及び/又は本明細書中に記載の構造、アセンブリ、若しくはアレイの形成の補助するために有効な量で使用する。典型的には、疎水性担体対乳化剤の体積比（v/v）は、約5：1～約15：1の範囲、より詳細には10：1である。

30

【0303】

[00310] 一実施形態では、デポー形成ワクチンは、以下を含む又はそれからなる：（i）アミノ酸配列FTELTLEGF（配列番号55）、LMLEGLK（配列番号2）、RISTFKNWPK（配列番号58）、STFKNWPF（配列番号59）、及びLP PAWQPFL（配列番号60）を含む5つのサブイピンペプチド抗原、（ii）アミノ酸配列AQYIKANSKF IGITEL（配列番号61）を含む破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパーTエпитープ、（iii）ポリI：Cポリヌクレオチドアジュバント、（iv）1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに（v）疎水性担体モンタニド（登録商標）ISA-51 VG。

40

【0304】

[00311] 一実施形態では、デポー形成及びデポー非形成ワクチン（DPX-Surviva）は、以下を含む又はそれからなる：5つのヒト白血球抗原（HLA）制限エпитープ（HLA-A1：FTELTLEGF（配列番号55）、HLA-A2：LMLEGLK（配列番号2）、HLA-A3：RISTFKNWPK（配列番号58）、HLA-A24：STFKNWPF（配列番号59）、及びHLA-B7：LP PAWQPFL（配列番号60））、破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパーTエпитープ（

50

AQYIKANSKF I G I T E L、配列番号61)、ポリI:Cポリヌクレオチドアジュバント、並びにDOPC及びコレステロールからなるリポソーム。これらの構成成分をリン酸緩衝液中で配合し、バイアルに満たし、凍結乾燥させて乾燥ケーキにする。デポー形成ワクチンには、ケーキを1×体積の疎水性担体モンタニドISA51 VG (SEPPIC、フランス)に再懸濁させる。デポー非形成ワクチンには、疎水性担体の代わりに2×体積の滅菌水を使用して乾燥ケーキを再懸濁させる。例示的な最終ワクチン配合物中の用量体積及び送達物を表3に示す。

【0305】

[00312]

【表4】

表3:それぞれの用量の油ベースのDPX-Survivac ワクチン及び水性ベースのDPX-Survivac ワクチンの構成成分。

構成成分	DPX-Survivac(油)	DPX-Survivac(水性)
希釈剤	モンタニドISA51 VG	滅菌水
用量体積	0.250ミリリットル	0.500ミリリットル
抗原	0.250ミリグラム	0.250ミリグラム
ヘルパーT	0.125ミリグラム	0.125ミリグラム
アジュバント	0.1ミリグラム	0.1ミリグラム
DOPC	30ミリグラム	30ミリグラム
コレステロール	3ミリグラム	3ミリグラム

【0306】

[00313]別の実施形態では、デポー形成ワクチンは、以下を含む又はそれからなる：(i) ヒトパピローマウイルス (HPV) に由来するペプチド抗原、(ii) アミノ酸配列AQYIKANSKF I G I T E L (配列番号61)を含む破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパーTエピトープ、(iii) ポリI:Cポリヌクレオチドアジュバント、(iv) 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに(v) 疎水性担体モンタニド(登録商標)ISA51 VG。

【0307】

[00314]一実施形態では、デポー非形成ワクチンは、(i) アミノ酸配列FTELT L G E F (配列番号55)、LM L G E F L K L (配列番号2)、R I S T F K N W P K (配列番号58)、S T F K N W P F L (配列番号59)、及びL P P A W Q P F L (配列番号60)を含む5つのサバイピンペプチド抗原、(ii) アミノ酸配列AQYIKANSKF I G I T E L (配列番号61)を含む破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパーTエピトープ、(iii) ポリI:Cポリヌクレオチドアジュバント、(iv) 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに(v) 水担体を含む。

【0308】

10

20

30

40

50

[00315]別の実施形態では、デポー非形成ワクチンは、(i)ヒトパピローマウイルス (HPV) に由来するペプチド抗原、(ii)アミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 61) を含む破傷風トキシイドからのユニバーサルヘルパー T エピトープ、(iii)ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント、(iv) 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに(v)水担体を含む。

【0309】

[00316]ワクチン組成物を調製する方法

【0310】

[00317]デポー形成及びデポー非形成ワクチン組成物は、実施例中に記載の非限定的な方法を含めて、本開示を考慮した当分野の既知の方法によって調製し得る。デポー形成ワクチンを調製するためには、たとえば、抗原、両親媒性物質、及び疎水性担体を含むワクチン及び免疫原性組成物の調製の例示的な開示として、国際公開第 1996/014871 号及び国際公開第 2009/043165 号を詳細に参照し得る。デポー非形成ワクチン(たとえば水性ベースのワクチン)を調製するための方法は当分野で周知であり、これらの方法のうちの任意のものをを用い得る。

【0311】

[00318]それだけには限定されないが、本明細書中に開示するワクチン組成物を調製するための例示的な実施形態を以下に記載する。

【0312】

[00319]本セクションで使用する用語「抗原」とは、抗原を本発明のワクチン組成物中で配合し得ることを記載するために一般的に使用する。用語「抗原」には、単数形「抗原 (antigen)」及び複数形「複数の抗原 (antigens)」がどちらも含まれる。すべての抗原がワクチン組成物内に同じ方法で導入されている必要はない。

【0313】

[00320]ワクチンを調製するための一実施形態では、抗原と任意選択で他のワクチン構成成分(たとえば、ヘルパー T エピトープ及びアジュバント)を、両親媒性物質と一緒に適切な溶媒中で再溶解する。その後、ワクチン構成成分を乾燥させて乾燥ケーキを形成し、乾燥ケーキを疎水性担体中に再懸濁させてデポー形成ワクチンを調製するか、又は水性担体中に再懸濁させてデポー非形成ワクチンを調製する。乾燥ステップは、フリーズドライ、凍結乾燥、回転蒸発、加圧下蒸発などの、当分野で知られている様々な手段によって行い得る。また、構成成分の完全性を損なわない低温乾燥も使用することができる。また、熱は、抗原/両親媒性物質の混合物の再懸濁の補助にも使用することができる。

【0314】

[00321]「適切な溶媒」とは、抗原及び/又は両親媒性物質を可溶化するために適切なものであり、当業者によって決定することができる。一実施形態では、アルコール(たとえば、tert - ブタノール、n - ブタノール、イソプロパノール、n - プロパノール、エタノール、若しくはメタノール)、水、酢酸緩衝液、ギ酸、又はクロロホルムなどの極性プロトン性溶媒を使用することができる。一部の場合では、両親媒性物質及び抗原をどちらも可溶化するために同じ溶媒を使用することができ、その後、可溶化した抗原及び可溶化した両親媒性物質を混合する。或いは、抗原及び両親媒性物質を可溶化の前に混合し、その後、一緒に可溶化してもよい。さらなる代替実施形態では、両親媒性物質又は抗原のうちの1つのみを可溶化し、可溶化していない構成成分を添加する。

【0315】

[00322]特定の実施形態では、ワクチンを調製するために、抗原及びアジュバントを、DOPC 及びコレステロール (Lipoid、ドイツ) を含む酢酸緩衝液 (0.1 M、pH 9.5) 中で再溶解する。その後、これらのワクチン構成成分を凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成する。注射の直前に、乾燥ケーキを ISA51 VG 油 (SEPPIC、フランス) 中に再懸濁させて油ベースのデポー形成ワクチンを調製するか、又は水中に再懸濁させて水性ベースのデポー非形成ワクチンを調製する。

【 0 3 1 6 】

[00323]別の実施形態では、ワクチンを調製するために、抗原を、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d、ドイツ) を含む 3 0 % の t e r t - ブタノール中で再溶解する。この抗原 - 脂質混合物にアジュバントを添加し、凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成する。注射の直前に、乾燥ケーキを I S A 5 1 V G 油 (S E P P I C、フランス) 中に再懸濁させて油ベースのデポー形成ワクチンを調製するか、又は水中に再懸濁させて水性ベースのデポー非形成ワクチンを調製する。

【 0 3 1 7 】

[00324]上記実施形態では、溶媒の除去 (乾燥) により、抗原を含めたワクチン構成成分が、両親媒性物質分子のアレイ中に、その親水性頭部基がワクチン構成成分に向けられて残る。ワクチン構成成分及び両親媒性物質は本明細書中に記載のように十分に疎水性となっているため、その後、これらを油などの疎水性担体中に懸濁させることができる。

10

【 0 3 1 8 】

[00325]別の実施形態では、ワクチンを調製するために、抗原 (複数可) と任意選択でヘルパー T エピトープ及び / 又はアジュバントを、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d、ドイツ) を含むリン酸緩衝液中で配合し得る。その後、これらのワクチン構成成分を凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成する。注射の直前に、乾燥ケーキをモンタニド I S A 5 1 V G 油 (S E P P I C、フランス) 中に再懸濁させて油ベースのデポー形成ワクチンを調製するか、又は水中に再懸濁させて水性ベースのデポー非形成ワクチンを調製する。

20

【 0 3 1 9 】

[00326]ヘルパー T エピトープ及びアジュバントなどの、本明細書中に記載の追加の構成成分は、配合プロセスの任意の段階で添加し得る。たとえば、1 つ又は複数のそのような追加の構成成分は、可溶化の前若しくは後のどちらかに抗原又は両親媒性物質と合わせるか、又は可溶化した混合物に添加してもよい。別の実施形態では、その代わりに、追加の構成成分を、抗原及び両親媒性物質の乾燥混合物に添加する若しくはそれと合わせるか、又は、抗原及び両親媒性物質の乾燥混合物を疎水性担体中に再懸濁させる前若しくは後のどちらかに、疎水性若しくは水性の担体と合わせてもよい。一実施形態では、ヘルパー T エピトープは、抗原と同じ方法でワクチン組成物に添加する。一実施形態では、抗原及びヘルパー T エピトープは融合ペプチドである。

30

【 0 3 2 0 】

[00327]一部の実施形態では、乾燥ケーキのワクチン構成成分を疎水性担体中に再懸濁させる際にそれらの安定化を補助するために、乳化剤を疎水性担体中に含めることが適切であり得る。乳化剤は、抗原及び両親媒性物質の乾燥混合物を疎水性担体中に再懸濁させ、疎水性担体中で抗原及び両親媒性物質を懸濁状態に維持するために十分な量で提供する。たとえば、乳化剤は、疎水性担体の約 5 % ~ 約 1 5 % の重量 / 重量又は重量 / 体積で存在し得る。

【 0 3 2 1 】

[00328]デポー非形成ワクチンに両親媒性物質を含めることは、典型的には必要ないことが理解されよう。したがって、一部の実施形態では、デポー非形成ワクチンは、両親媒性物質を用いずに調製し得る。

40

【 0 3 2 2 】

[00329]ワクチン構成成分のうちの任意のものの貯蔵寿命を延長させるために生物活性を維持する又は化学安定性を改善させる、糖、抗酸化剤、又は保存料などの安定化剤を、そのような組成物に添加し得る。

【 0 3 2 3 】

[00330]免疫応答及び治療の効能

【 0 3 2 4 】

[00331]本開示は、対象において抗原に対する免疫応答を強化する方法、対応する使用、並びにそのような方法において使用し得るワクチン及びキットに関する。

50

【 0 3 2 5 】

[00332]本明細書中で言及する「免疫応答」は、細胞媒介性免疫応答又は液性免疫応答のどちらかであり得る。

【 0 3 2 6 】

[00333]特定の実施形態では、本明細書中に開示する方法は、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答を強化するために使用し得る。

【 0 3 2 7 】

[00334]本明細書中で使用する用語「細胞媒介性免疫応答」、「細胞性免疫」、又は「細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答」（本明細書中で互換性があるように使用される）とは、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞の活性化、抗原特異的な細胞傷害性Ｔリンパ球の産生、並びに／又は抗原に应答した様々なサイトカインの放出によって特徴づけられた免疫応答をいう。細胞毒性Ｔリンパ球は、感染した体性又は腫瘍細胞の死滅を誘導することができるＴリンパ球の部分群（白血球の一種）であり、これらは、ウイルス（若しくは他の病原体）に感染した細胞、又は他の様式で損傷若しくは機能不全となった細胞を死滅させる。

10

【 0 3 2 8 】

[00335]ほとんどの細胞毒性Ｔ細胞は、クラスⅠ ＭＨＣ分子と結合した特異的なペプチド抗原を認識することができるＴ細胞受容体を発現する。典型的には、細胞毒性Ｔ細胞はＣＤ８（すなわちＣＤ８＋Ｔ細胞）も発現し、これはクラスⅠ ＭＨＣ分子の一部に誘引される。この親和性により、抗原特異的活性化中に細胞毒性Ｔ細胞及び標的細胞が密に一緒に結合されて保たれる。

20

【 0 3 2 9 】

[00336]細胞性免疫は、たとえば、ウイルス感染細胞、細胞内細菌を有する細胞、及び腫瘍抗原を表示している癌細胞などの、その表面上に外来抗原のエピトープを表示している体細胞を溶解すること、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を活性化して、それらが細胞内病原体を破壊することを可能にすること、並びに、細胞を刺激して、適応免疫応答及び自然免疫応答に関与している他の細胞機能に影響を与える様々なサイトカインを分泌させることができる、抗原特異的細胞毒性Ｔリンパ球（たとえば抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞）を活性化することによって、身体を保護する。

【 0 3 3 0 】

30

[00337]細胞性免疫は、適応免疫応答、続いて、樹状細胞、Ｂリンパ球、及びより低い程度でマクロファージなどの抗原提示細胞とのその相互作用を介した、細胞による抗原の認識の重要な構成成分であり、たとえば以下の様々な機構によって身体を保護する：

１．ウイルス感染細胞、細胞内細菌を有する細胞、及び腫瘍抗原を表示している癌細胞などの、その表面上に外来抗原のエピトープを表示する体細胞においてアポトーシスを誘導することができる抗原特異的細胞毒性Ｔリンパ球を活性化すること、

２．マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を活性化して、それらが細胞内病原体を破壊することを可能にすること、並びに

３．適応免疫応答及び自然免疫応答に関与している他の細胞機能に影響を与える様々なサイトカインを分泌する細胞を刺激すること。

40

【 0 3 3 1 】

[00338]細胞性免疫は、ウイルス感染細胞を除去するために最も有効であるが、真菌、原虫、癌、及び細胞内細菌に対する防御にも関与している。これは移植片拒絶においても主要な役割を果たす。

【 0 3 3 2 】

[00339]細胞性免疫は様々な細胞種の関与を含み、様々な機構によって媒介されるため、ワクチン接種後の免疫の誘導を実証するために、いくつかの方法を使用することができる。これらは、i) 特異的抗原提示細胞の検出、ii) 特異的エフェクター細胞及びその機能の検出、並びにiii) サイトカインなどの可溶性媒介因子の放出の検出へと広く分類することができる。

50

【 0 3 3 3 】

[00340] i) 抗原提示細胞：樹状細胞及びB細胞（及びより低い程度でマクロファージ）は、T細胞の増強された活性化を可能にする特殊な免疫賦活性受容体を備えており、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）と呼ばれる。これらの免疫賦活性分子（共刺激分子とも呼ばれる）は、感染症又はワクチン接種後、CD4及びCD8細胞毒性T細胞などのエフェクター細胞への抗原提示プロセス中に、これらの細胞上で上方調節される。そのような共刺激分子（CD40、CD80、CD86、MHCクラスI、又はMHCクラスIIなど）は、たとえば、これらの分子に向けられた、蛍光色素とコンジュゲートした抗体を、APCを特異的に同定する抗体（樹状細胞用のCD11cなど）と共に用いたフローサイトメトリーを使用して、検出することができる。

10

【 0 3 3 4 】

[00341] ii) 細胞毒性T細胞：（Tc、キラーT細胞、又は細胞毒性Tリンパ球（CTL）としても知られる）は、ウイルス（及び他の病原体）に感染した細胞、又は腫瘍抗原を発現する細胞の死滅を誘導するT細胞の部分群である。これらのCTLは、特定の外来又は異常分子をその表面上に保有する他の細胞を直接攻撃する。そのような細胞毒性の能力は、*in vitro*細胞溶解性アッセイ（クロム放出アッセイ）を使用して検出することができる。したがって、適応細胞性免疫の誘導は、そのような細胞毒性T細胞の存在によって実証することができ、ここで、抗原がロードされた標的細胞は、ワクチン接種又は感染症後に*in vivo*で産生される特異的CTLによって溶解される。

【 0 3 3 5 】

20

[00342] ナイーブ細胞毒性T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）が、ペプチド結合したMHCクラスI分子と強力に相互作用した際に活性化される。この親和性は、抗原/MHC複合体の種類及び配向に依存し、これにより、CTLと感染細胞と一緒に結合して保たれる。活性化された後、CTLはクローン増殖と呼ばれるプロセスを受け、ここでこれは機能性を獲得し、迅速に分裂して、「武装」エフェクター細胞の軍隊が生成される。その後、活性化されたCTLは、そのユニークなMHCクラスI+ペプチドを保有する細胞を探索して身体全体を移動する。このことは、ペプチド-MHCクラスI四量体をフローサイトメトリーアッセイにおいて使用することによって、そのようなCTLを*in vitro*で同定するために使用することができる。

【 0 3 3 6 】

30

[00343] これらの感染した又は機能不全の体細胞に曝露された際、エフェクターCTLは、標的細胞の形質膜に孔を形成し、イオン及び水を感染細胞内に流入させ、それが破裂又は溶解することを引き起こす細胞毒素である、パーフォリン及びグラニュリシンを放出する。CTLは、孔を介して細胞に入ってアポトーシス（細胞死）を誘導するセリンプロテアーゼである、グランザイムを放出する。CTLからのこれらの分子の放出は、ワクチン接種後の細胞性免疫応答の誘導の成功の測度として使用することができる。これは、CTLを定量的に測定することができる、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）又は酵素結合免疫スポットアッセイ（ELISPOT）によって行うことができる。CTLはIFN- γ などの重要なサイトカインを産生することもできるため、IFN- γ 産生CD8細胞の定量的測定は、ELISPOTによって、及びこれらの細胞中の細胞内IFN- γ のフローサイトメトリー測定によって達成することができる。

40

【 0 3 3 7 】

[00344] CD4+「ヘルパー」T細胞：CD4+リンパ球、又はヘルパーT細胞は、免疫応答媒介因子であり、適応免疫応答の能力を確立及び最大化することにおいて重要な役割を果たす。これらの細胞は細胞毒性又は食作用活性を有さず、感染細胞を死滅させたり病原体を除去したりすることはできないが、他の細胞がこれらの任務を行うように指示することによって、実質的に免疫応答を「管理する」。それぞれ異なる種類の病原体を排除するように設計されている、Th1及びTh2と命名されている2種類のエフェクターCD4+ヘルパーT細胞応答を、プロフェッショナルAPCによって誘導することができる。

50

【 0 3 3 8 】

[00345]ヘルパーT細胞は、クラスII MHC分子と結合した抗原を認識するT細胞受容体(TCR)を発現する。ナープヘルパーT細胞の活性化によりサイトカインの放出が引き起こされ、これは、それを活性化させたAPCを含めた多くの細胞種の活性に影響を与える。ヘルパーT細胞は、細胞毒性T細胞よりもはるかに穏やかな活性化刺激を必要とする。ヘルパーT細胞は、細胞毒性細胞の活性化を「助ける」追加のシグナルを提供することができる。それぞれ異なる種類の病原体を排除するように設計されている、Th1及びTh2と命名されている2種類のエフェクターCD4+ヘルパーT細胞応答を、プロフェッショナルAPCによって誘導することができる。2つのTh細胞集団は、産生されるエフェクタータンパク質(サイトカイン)のパターンが異なる。一般に、Th1細胞は、マクロファージ及び細胞毒性T細胞の活性化によって細胞性免疫応答を支援する一方で、Th2細胞は、形質細胞への変換のためのB細胞の刺激によって、及び抗体の形成によって、液性免疫応答を促進する。たとえば、Th1細胞によって調節された応答は、マウスではIgG2a及びIgG2b(ヒトではIgG1及びIgG3)を誘導し、抗原に対する細胞媒介性免疫応答を優先し得る。抗原に対するIgG応答がTh2型細胞によって調節される場合、これは圧倒的にマウスではIgG1(ヒトではIgG2)の産生を増強し得る。Th1又はTh2応答に関連するサイトカインの測定は、ワクチン接種の成功の測度を与えるであろう。これは、とりわけ、IFN-、IL-2、IL-12、TNF-などのTh1-サイトカイン、又はIL-4、IL-5、IL10などのTh2-サイトカインのために設計された特異的ELISAによって達成することができる。

10

20

【 0 3 3 9 】

[00346]i i i) サイトカインの測定：所属リンパ節からの放出は、免疫化の成功の良好な指標を与える。抗原提示並びにAPCの成熟並びにCD4及びCD8T細胞などの免疫エフェクター細胞の結果、いくつかのサイトカインがリンパ節細胞によって放出される。これらのLNCを*in vitro*で抗原の存在下で培養することで、IFN-、IL-2、IL-12、TNF-、及びGM-CSFなどの特定の重要なサイトカインの放出を測定することによって、抗原特異的免疫応答を検出することができる。これは、培養上清及び組換えサイトカインを標準として使用したELISAによって行うことができる。

【 0 3 4 0 】

30

[00347]免疫化の成功は、それだけに限定されないが、機能的抗体を検出するための血球凝集阻害(AIJ)及び血清中和阻害アッセイ、ワクチン接種の有効性を決定するためにワクチン接種した対象に関連する病原体で攻撃する攻撃研究、及び、たとえば活性化された又は記憶リンパ球の同定において特異的細胞表面マーカーを発現する細胞集団を決定するための、蛍光活性化細胞分取(FACS)の使用を含めた、当業者に知られているいくつかの方法で決定し得る。また、当業者は、他の既知の方法を使用しても、本発明の組成物を用いた免疫化が抗体及び/又は細胞媒介性免疫応答を誘発したかどうかを決定し得る。たとえばCurrent Protocols in Immunology、Coliganら編(Wiley Interscience、2007)を参照されたい。

40

【 0 3 4 1 】

[00348]一実施形態では、本明細書中に開示する方法は、抗体免疫応答を強化するために使用し得る。

【 0 3 4 2 】

[00349]細胞媒介性免疫に対して、「抗体免疫応答」又は「液性免疫応答」(本明細書中で互換性があるように使用される)は、Bリンパ球系統の細胞(B細胞)によって産生される分泌抗体によって媒介される。そのような分泌抗体は、たとえば、外来物質、病原体(たとえば、ウイルス、細菌など)、及び/又は癌細胞の表面上にあるものなどの抗原と結合し、破壊のためにそれらに旗を立てる。

【 0 3 4 3 】

50

[00350] 本明細書中で使用する「液性免疫応答」とは、抗体産生をいい、それに加えて又はその代わりに、たとえば、ヘルパーT2 (Th2) 又はヘルパーT17 (Th17) 細胞の産生及び/又は活性化、サイトカインの産生、アイソタイプスイッチ、親和性成熟、並びに記憶細胞の活性化などの、それに伴う付随プロセスも含まれ得る。また、「液性免疫応答」には、たとえば、毒素の中和、古典的補体活性化、並びに貪食の促進及び病原体の排除などの、抗体のエフェクター機能も含まれ得る。液性免疫応答は多くの場合CD4 + Th2細胞によって助けられ、したがって、この細胞種の活性化又は産生も液性免疫応答の指標であり得る。用語「液性免疫応答」は本明細書中で「抗体応答」又は「抗体免疫応答」と互換性があるように使用される。

【0344】

10

[00351] 「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的に又は部分的にコードされている1つ又は複数のポリペプチドを含むタンパク質である。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 α 、 β 、 γ 、 δ 、及び μ 定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は 又は のどちらかに分類される。重鎖は μ 、 γ 、 δ 、又は ϵ として分類され、立ち代ってこれは、免疫グロブリンクラスであるIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEをそれぞれ定義する。典型的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は、4つのポリペプチドを含むタンパク質を含む。それぞれの抗体の構造単位は、それぞれ1本の「軽」鎖及び1本の「重」鎖を有する、2つの同一のポリペプチド鎖対からなる。それぞれの鎖のN末端は、抗原認識を主に司っている可変領域を定義する。抗体の構造単位(たとえばIgA及びIgMクラスのものは、互い及び追加のポリペプチド鎖と共に、たとえばJ鎖ポリペプチドと会合したIgM五量体として、オリゴマー体へとアセンブルされ得る。

20

【0345】

[00352] 抗体は、Bリンパ球(B細胞)と呼ばれる白血球の部分群の、抗原特異的な糖タンパク質産物である。抗原とB細胞の表面上に発現された抗体との結合は、B細胞が活性化され、有糸分裂を受け、最終的には形質細胞へと分化するようにB細胞を刺激することを含む抗体応答を誘導することができ、抗原特異的抗体の合成及び分泌に特殊化されている。

【0346】

[00353] B細胞は免疫応答中の唯一の抗体産生者であり、したがって、有効な液性免疫への主要な要素である。大量の抗体の産生に加え、B細胞は抗原提示細胞としても作用し、抗原をヘルパーT CD4又は細胞毒性CD8 + T細胞などのT細胞に提示することができ、したがって免疫応答を伝播させる。B細胞及びT細胞は適応免疫応答の一部である。たとえばワクチン接種又は天然感染症のいずれかによって誘導された活性免疫応答中、抗原特異的なB細胞が活性化され、クローンが拡大される。拡大中、B細胞はエピトープに対してより高い親和性を有するように進化する。B細胞の増殖は、活性化ヘルパーT細胞によって間接的に誘導することができ、TLRなどの受容体の刺激によって直接誘導することができる。

30

【0347】

[00354] 樹状細胞及びB細胞などの抗原提示細胞はワクチン接種部位へと引き寄せられ、ワクチン組成物に含有される抗原及びアジュバントと相互作用することができる。典型的には、アジュバントは、細胞が活性化されるようにそれを刺激し、抗原は標的の青写真を提供する。様々な種類のアジュバントが様々な刺激シグナルを細胞に提供し得る。たとえば、ポリI:C (TLR3作用剤)は樹状細胞を活性化することができるが、B細胞を活性化することはできない。Pam3Cys、Pam2Cys、及びFSL-1などのアジュバントは、B細胞の増殖を活性化及び開始することに特に熟達しており、これは抗体応答の生成を容易にすると予想されている(Moyleら、Curr Med Chem、2008、So.、J Immunol、2012)。

40

【0348】

[00355] 液性免疫応答は、有効な感染性疾患ワクチン(たとえばウイルス又は細菌侵入

50

物に対して保護するため)の一般的な機構の1つである。しかし、液性免疫応答も癌と闘うために有用な場合がある。癌ワクチンは、癌細胞を認識して破壊することができる細胞性免疫応答を生じるように典型的に設計されている一方で、B細胞媒介性応答は、一部の例では最大の利点のために細胞毒性T細胞と協同し得る、他の機構を介して癌細胞を標的とし得る。B細胞媒介性(たとえば液性免疫応答媒介性)の抗腫瘍応答の例には、それだけに限定されないが、以下のものが含まれる。1)腫瘍細胞又は腫瘍化に影響を与える他の細胞上に見つかる表面抗原と結合するB細胞によって産生される抗体であって、たとえば、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)又は補体結合を介した標的細胞の死滅を誘導し、免疫系によって認識されることが出来る追加の抗原の放出を潜在的にもたすことができる抗体、2)腫瘍細胞上の受容体と結合してその刺激を遮断し、その効果を事実上中和する抗体、3)腫瘍又は腫瘍関連細胞によって放出される又はそれに関連する因子と結合して、癌を支持するシグナル伝達又は細胞経路を調節する抗体、及び4)現在は未知である機構によって、細胞内標的と結合して抗腫瘍活性を媒介する抗体が含まれる。

10

【0349】

[00356]抗体応答を評価する一方法は、特定の抗原と反応性のある抗体の力価を測定することである。これは、動物から得られた抗体含有物質の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などの、当分野で知られている様々な方法を使用して行い得る。たとえば、特定の抗原と結合する血清抗体の力価は、抗原への曝露の前及び後の両方で、対象において決定し得る。抗原への曝露後の、抗原特異的抗体の力価の統計的に有意な増加は、対象が抗原に対する抗体応答を開始したことを示すであろう。

20

【0350】

[00357]それだけに限定されないが、抗原特異的抗体の存在を検出するために使用し得る他のアッセイには、免疫学的アッセイ(たとえばラジオイムノアッセイ(RIA))、免疫沈降アッセイ、及びタンパク質プロット(たとえばウエスタンブロット)アッセイ、並びに中和アッセイ(たとえば、*in vitro*又は*in vivo*アッセイにおけるウイルス感染力の中和)が含まれる。

【0351】

[00358]本明細書中に記載の方法及びワクチン組成物は、細胞媒介性免疫応答又は液性免疫応答によって寛解される疾患及び/又は障害を治療又は予防するために有用であり得る。本方法及びワクチンは、細胞媒介性免疫応答又は液性免疫応答を誘導するために抗原を対象に投与することが望まれる任意の場合において応用が見つかる。

30

【0352】

[00359]本明細書中で使用する「治療すること」若しくは「~の治療」、又は「予防すること」若しくは「~の予防」とは、臨床結果を含めた有益又は所望の結果を得るための手法をいう。有益又は所望の結果には、それだけに限定されないが、1つ又は複数の症状又は状態の軽減又は寛解、疾患の程度の減退、疾患の状態の安定化、疾患の発生の予防、疾患の拡大の予防、疾患の進行の遅延又は減速(たとえば抑制)、疾患の発症の遅延又は減速、疾患原因因子に対する保護免疫の付与、及び症状の寛解又は緩和が含まれることができる。また、「治療すること」又は「予防すること」は、治療の非存在下において予測されるものを超えて患者の生存を延長させることも意味することができ、また、対象において感染症を予防することなどによって、疾患の進行を一時的に阻害すること又は疾患の発生を予防することも意味することができる。また、「治療すること」又は「予防すること」は、腫瘍塊の大きさの縮小、腫瘍の侵襲性の低下などにも言及し得る。

40

【0353】

[00360]一実施形態では、本明細書中に開示する方法及び組成物は、それを必要としている対象において癌を治療及び/又は予防するために使用し得る。対象は癌を有し得る、又は癌を発生する危険性にあり得る。

【0354】

[00361]本明細書中で使用する用語「癌」、「癌細胞」、「腫瘍」、及び「腫瘍細胞」(互換性があるように使用される)とは、細胞増殖の制御の有意な損失を特徴とする、異

50

常な成長を示す細胞、又は不死化された細胞をいう。用語「癌」又は「腫瘍」には、転移性及び非転移性の癌又は腫瘍が含まれる。癌は、悪性腫瘍の存在を含めた、当分野において一般的に受け入れられている基準を使用して診断し得る。

【0355】

[00362]それだけに限定されないが、本発明の組成物の使用又は投与によって治療及び/又は予防することができ得る癌には、癌腫、腺癌、リンパ腫、白血病、肉腫、芽細胞腫、骨髓腫、及び生殖細胞腫瘍が含まれる。それだけに限定されないが、特に適切な実施形態には、膠芽細胞腫、多発性骨髓腫、卵巣癌、乳癌、輸卵管癌、前立腺癌、又は腹膜癌が含まれ得る。一実施形態では、癌はウイルスなどの病原体によって引き起こされ得る。癌の発生に関連づけられているウイルスは当業者に知られており、それだけに限定されないが、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ジョン・カニンガムウイルス（JCV）、ヒトヘルペスウイルス8、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、メルケル細胞ポリオーマウイルス、C型肝炎ウイルス、及びヒトT細胞白血病ウイルス-1が含まれる。別の実施形態では、癌は1つ又は複数の癌特異的抗原（たとえばサバイピン）を発現するものであり得る。

10

【0356】

[00363]特定の実施形態では、癌は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、輸卵管癌、腹膜癌、膠芽細胞腫、又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。

【0357】

[00364]本明細書中に開示する方法及び組成物は、癌の治療又は予防のどちらか、たとえば、癌の重篤度の低下（たとえば腫瘍の大きさ、攻撃性、及び/若しくは侵襲性、悪性度など）、又は癌の再発の予防に有用であり得る。

20

【0358】

[00365]別の実施形態では、本明細書中に開示する方法及び組成物は、それを必要としている対象において、ウイルス感染症によって引き起こされたものなどの感染性疾患を治療及び/又は予防するために使用し得る。対象はウイルスに感染している場合がある、又はウイルス感染症を発生する危険性にあり得る。本発明の組成物の使用又は投与によって治療及び/又は予防し得るウイルス感染症には、それだけに限定されないが、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、偽牛痘ウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス2、サイトメガロウイルス、ヒトアデノウイルスA～F、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、パルボウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、オルトレオウイルス、ロタウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューモウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ハンタンウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、フラビウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、及び水痘が含まれる。特定の実施形態では、ウイルス感染症は、ヒトパピローマウイルス、エボラウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、又はインフルエンザウイルスである。

30

40

【0359】

[00366]別の実施形態では、本明細書中に開示する方法又は組成物は、それを必要としている対象において、非ウイルス病原体（細菌又は原虫など）によって引き起こされたものなどの感染性疾患を治療及び/又は予防するために使用し得る。対象は病原体に感染している場合がある、又は病原体による感染症を発生する危険性にあり得る。それだけに限定されないが、例示的な細菌病原体には、炭疽菌（バチルス・アントラシス）、ブルセラ属、百日咳菌、カンジダ属、肺炎クラミジア、オウム病クラミジア、コレラ、ボツリヌス菌、コクシジオイデス・イミチス、クリプトコッカス属、ジフテリア、大腸菌O157:H7、腸管出血性大腸菌、腸内毒素原性大腸菌、インフルエンザ菌、ピロリ菌、レジオネラ属、レプトスピラ属、リステリア属、髄膜炎菌、肺炎マイコプラズマ、マイコバクテリ

50

ウム属、百日咳、肺炎、サルモネラ属、シゲラ属、ブドウ球菌属、肺炎連鎖球菌、及びエンテロコリチカ菌が含まれ得る。特定の実施形態では、細菌感染症は炭疽菌である。それだけに限定されないが、例示的な原虫病原体には、マラリアを引き起こすプラスモジウム属のもの（熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、又は二日熱マラリア原虫）が含まれ得る。

【0360】

[00367]別の実施形態では、本明細書中に開示する方法又は組成物は、神経変性疾患が抗原の発現に関連している場合、それを必要としている対象において神経変性疾患を治療及び／又は予防するために使用し得る。対象は神経変性疾患を有し得る、又は神経変性疾患を発生する危険性にあり得る。本明細書中に開示する方法又は組成物によって治療及び／又は予防し得る神経変性疾患には、それだけに限定されないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）が含まれる。

10

【0361】

[00368]別の実施形態では、本明細書中に開示する方法又は組成物は、嗜癲疾患（たとえばコカインに対する嗜癲など）を治療及び／又は予防するために使用し得る。

【0362】

[00369]キット、組合せ、及び試薬

【0363】

[00370]本発明の方法を実施するために、本明細書中に記載の組成物は、使用者に任意選択でキットとして提供し得る。たとえば、本発明のキットは、本発明のワクチン組成物の1つ又は複数の構成成分を含有する。キットは、1つ又は複数の追加の試薬、梱包材料、キットの構成成分を保持する容器、及びキット構成成分を使用するための好ましい方法を詳述する指示一式又は使用者マニュアルをさらに含むことができる。一実施形態では、容器はバイアルである。

20

【0364】

[00371]一実施形態では、キットは、別々の容器中にすぐに使用できる様式で事前に配合した、デポー形成及びデポー非形成ワクチンをどちらも含有する。一例として、一実施形態では、キットは、1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含むデポー形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器と、1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器と、水性担体とを含む。

30

【0365】

[00372]一代替実施形態では、キットは、容器中にすぐに使用できる様式で事前に配合した、デポー形成ワクチン又はデポー非形成ワクチンのどちらかのうちの1つのみを含有する。他のワクチンは、担体以外のすべての構成成分を、1つの容器（たとえば乾燥ケーキ）中に、適切な担体（たとえば疎水性担体又は水性担体）中ですぐに再溶解できるように、又は、適切な担体（たとえば疎水性担体又は水性担体）中で配合及び再溶解するための別々の容器中の個々の構成成分として、提供し得る。特定の実施形態では、デポー非形成ワクチンは事前に配合したすぐに使用できる様式で提供する一方で、デポー形成ワクチンの構成成分は疎水性担体中での再溶解又は配合及び再溶解を必要とする形態で提供する。

40

【0366】

[00373]上記キットの実施形態の様々な態様では、抗原及び担体に加えて、デポー形成ワクチン及び／又はデポー非形成ワクチンは、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質、及び乳化剤のうちの1つ又は複数を任意選択でさらに含み得る。これらの構成成分は、個々に別々の容器で提供し得るか、又はその任意の組合せで容器中に一緒に提供し得る。

【0367】

[00374]さらなる代替実施形態では、キットは、適切な担体以外のワクチン構成成分を含む少なくとも1つの容器を含有する。本実施形態では、キットは、追加の別々の容器中に、ワクチン構成成分を再溶解するための疎水性担体及び水性担体のうち的一方又は両方

50

を含むことができる。これらの実施形態では、ワクチン構成成分は、適切な担体中ですぐに再懸濁させることができる乾燥ケーキの形態であり得る。

【0368】

[00375]一実施形態では、キットは、1つ又は複数の抗原並びに任意選択でヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質、及び乳化剤のうちの1つ又は複数を含む1つの容器と、疎水性担体を含む少なくとも1つの容器と、水性担体を含む少なくとも1つの容器とを含み、1つ又は複数の抗原並びに任意選択でヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質のうちの1つ又は複数を含む容器は、疎水性担体又は水性担体を用いた再溶解によってデポー形成ワクチン及びデポー非形成ワクチンの両方を調製するために十分な量のそれぞれの構成成分を含む。

10

【0369】

[00376]別の実施形態では、キットは少なくとも2つの容器を含み、それぞれの容器は、1つ又は複数の抗原並びに任意選択でヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質、及び乳化剤のうちの1つ又は複数と、疎水性担体を含む少なくとも1つの容器と、水性担体を含む少なくとも1つの容器とを含み、抗原並びに任意選択でヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質、及び乳化剤の少なくとも1つの容器は、疎水性担体を用いて再溶解してデポー形成ワクチンを調製するためのものであり、抗原並びに任意選択でヘルパーTエпитープ、アジュバント、両親媒性物質、及び乳化剤の少なくとも1つの容器は、水性担体を用いて再溶解してデポー非形成ワクチンを調製するためのものである。

20

【0370】

[00377]特定の実施形態では、キットは、それぞれが1つ又は複数の抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質を含む少なくとも2つの容器と、疎水性担体を含む少なくとも1つの容器と、水性担体を含む少なくとも1つの容器とを含み、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、疎水性担体を用いて再溶解してデポー形成ワクチンを調製するためのものであり、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、水性担体を用いて再溶解してデポー非形成ワクチンを調製するためのものである。

【0371】

[00378]他の実施形態では、デポー形成及びデポー非形成ワクチンを別々のキット中で提供し得る。一実施形態では、それぞれの対応するキット中、デポー形成又はデポー非形成ワクチンは単一のすぐに使用できるバイアルとして提供する。別の実施形態では、それぞれの対応するキット中、デポー形成又はデポー非形成ワクチンの任意の数の構成成分を、個々に、又は構成成分の任意の組合せとして、適切な担体中で配合及び再溶解する別々の容器中で提供する。

30

【0372】

[00379]キットの一実施形態では、ヘルパーTエпитープはアミノ酸配列FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(配列番号63)を含むペプチドである。

【0373】

[00380]キットの一実施形態では、アジュバントはポリI:Cポリヌクレオチドである。

40

【0374】

[00381]キットの一実施形態では、両親媒性物質は、リン脂質などの1つ又は複数の脂質である。一実施形態では、脂質は1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)及びコレステロールである。

【0375】

[00382]キットの一実施形態では、1つ又は複数の抗原は本明細書中に記載の1つ又は複数のサバイピン抗原を含む。キットの特定の実施形態では、1つ又は複数の抗原は、アミノ酸配列FTELTLEGF(配列番号55)、LMLEGLKL(配列番号2)、RISTFKNWPK(配列番号58)、STFKNWPFL(配列番号59)、又はL

50

P P A W Q P F L (配列番号 6 0) を含む 5 つのペプチド抗原の混合物を含む。

【 0 3 7 6 】

[00383]キットの一実施形態では、抗原は、ヒトパピローマウイルス (H P V) に由来するペプチド抗原である。

【 0 3 7 7 】

[00384]一実施形態では、キットは、D N A 複製を妨げる薬剤をさらに含有し得る。D N A 複製を妨げる薬剤は、別の容器を用いてキット中に含め得るか、又は薬剤を他の構成成分と共に含め得る。特定の実施形態では、キット中に含めるD N A 複製を妨げる薬剤は、たとえばシクロホスファミドなどのアルキル化剤である。

【 0 3 7 8 】

[00385]当業者には、キットの別のアレンジが可能であり、本明細書中の開示によって包含されることを理解されよう。

【 0 3 7 9 】

[00386]本明細書中に開示のキットは、本明細書中に開示する方法の実施において使用し得る。一実施形態では、キットは、デポー形成ワクチンを用いて免疫応答をプライミングし、デポー非形成ワクチンを用いて免疫応答を維持及び/又はブーストすることによって、対象における免疫応答の強化において使用するためのものである。特に適切であり得る一実施形態では、デポー形成ワクチンは水を含まない又は水を実質的に含まない。

【 0 3 8 0 】

[00387]また、本開示は、本明細書中に開示する方法を実施するための組合せにも関する。一実施形態では、本発明は、本明細書中に開示の方法において使用するための、疎水性担体中に 1 つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンと同じ 1 つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンとの組合せに関する。デポー形成及びデポー非形成ワクチンは、本明細書中に開示する実施形態のうちの任意の 1 つであり得る。

【 0 3 8 1 】

[00388]より詳細には、一実施形態では、本開示は、対象に少なくとも 1 回の用量のデポー形成ワクチンを投与し、続いて対象に少なくとも 1 回の用量のデポー非形成ワクチンを投与する、対象において抗原に対する免疫応答を強化する方法で使用するための、疎水性担体中に 1 つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンと 1 つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンとの組合せに関する。上述のように、デポー形成及びデポー非形成ワクチンは本明細書中に開示する実施形態のうちの任意の 1 つであり得る。

【 0 3 8 2 】

[00389]実施形態

【 0 3 8 3 】

[00390]本開示の特定の実施形態には、それだけには限定されないが、以下のものが含まれる。

【 0 3 8 4 】

[00391] (1) 対象において抗原に対する免疫応答を強化する方法であって、 (i) 少なくとも 1 回の用量の、疎水性担体中に 1 つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンを前記対象に投与するステップと、 (i i) 続いて、少なくとも 1 回の用量の、上記 1 つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンを強化する方法であって、対象に投与するステップとを含む、方法。

【 0 3 8 5 】

[00392] (2) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー形成ワクチンのそれぞれが、上記 1 つ又は複数の抗原に対する免疫応答を誘導することができるプライム用量である、段落 (1) に記載の方法。

【 0 3 8 6 】

[00393] (3) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー非形成ワクチンのそれぞれが、上記 1 つ又は複数の抗原に対する免疫応答を維持及び/又はブーストすることができる維持又はブースト用量である、段落 (1) 又は (2) に記載の方法。

【 0 3 8 7 】

[00394] (4) 上記デポー非形成ワクチンの初回の維持又はブースト用量を、上記デポー形成ワクチンの最終プライム用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、又は 1 0 週間以内に投与することを含む、段落 (3) に記載の方法。

【 0 3 8 8 】

[00395] (5) 上記デポー非形成ワクチンの初回の維持又はブースト用量を、上記デポー形成ワクチンの最終プライム用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与することを含む、段落 (3) に記載の方法。

【 0 3 8 9 】

[00396] (6) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー形成ワクチンが 1、2、3、4、又は 5 回の用量である、段落 (1) ~ (5) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 0 】

[00397] (7) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー形成ワクチンが 1 又は 2 回の用量である、段落 (1) ~ (6) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 1 】

[00398] (8) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー非形成ワクチンが 1、2、3、4、又は 5 回の用量である、段落 (1) ~ (7) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 2 】

[00399] (9) 上記少なくとも 1 回の用量の上記デポー非形成ワクチンが、1 日 1 回、週に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、又は月に 1 回の連続的な反復投薬である、段落 (1) ~ (7) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 3 】

[00400] (1 0) 初回用量の上記デポー非形成ワクチンの後、上記デポー非形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与する、段落 (1) ~ (9) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 4 】

[00401] (1 1) 初回用量の上記デポー形成ワクチンの後、上記デポー形成ワクチンのそれぞれの後続用量を、直前の用量の約 1 日、1 週間、2 週間、3 週間、又は 4 週間以内に投与する、段落 (1) ~ (1 0) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 5 】

[00402] (1 2) 2 回の用量の上記デポー形成ワクチンを、上記デポー非形成ワクチンを投与する前に投与することを含む、段落 (1) ~ (1 1) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 6 】

[00403] (1 3) 1 回の用量の上記デポー形成ワクチンを、上記デポー非形成ワクチンを投与する前に投与することを含む、段落 (1) ~ (1 0) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 9 7 】

[00404] (1 4) 上記デポー形成ワクチンを 0 日目及び 2 1 日目に投与することを含む、段落 (1 2) に記載の方法。

【 0 3 9 8 】

[00405] (1 5) 上記デポー形成ワクチンを 0 日目及び 2 1 日目に投与すること、及び上記デポー非形成ワクチンを 4 2 日目に投与することを含む、段落 (1 2) に記載の方法。

【 0 3 9 9 】

[00406] (1 6) 上記デポー形成ワクチンを 0 日目に投与すること、及び上記デポー非形成ワクチンを 2 1 日目及び 4 2 日目に投与することを含む、段落 (1 3) に記載の方法。

【 0 4 0 0 】

10

20

30

40

50

[00407] (1 7) 上記デポー非形成ワクチンの投与が、4 2 日目の後は3 週間に1 回続けられる、段落 (1 4) ~ (1 6) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 0 1 】

[00408] (1 8) D N A 複製を妨げる薬剤を対象に投与することをさらに含む、段落 (1) ~ (1 7) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 0 2 】

[00409] (1 9) 上記 D N A 複製を妨げる薬剤がシクロホスファミドである、段落 (1 8) に記載の方法。

【 0 4 0 3 】

[00410] (2 0) 1 サイクルの低用量の規則的なシクロホスファミドを含む、段落 (1 9) に記載の方法。

10

【 0 4 0 4 】

[00411] (2 1) 上記サイクルが、上記シクロホスファミドを、1 日 1 回、2 週間毎に開始する7 日間の連続した日数の期間の間、上記対象に投与することを含む、段落 (2 0) に記載の方法。

【 0 4 0 5 】

[00412] (2 2) 上記シクロホスファミドを上記デポー形成ワクチンの上記初回投与の7 日前に最初に投与する、段落 (2 1) に記載の方法。

【 0 4 0 6 】

[00413] (2 3) 免疫応答チェックポイント阻害剤を対象に投与することをさらに含む、段落 (1) ~ (2 2) のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 4 0 7 】

[00414] (2 4) 上記免疫応答チェックポイント阻害剤が、プログラム死 - リガンド 1 (P D - L 1)、プログラム死 1 (P D - 1)、C T L A - 4、P D - L 2、L A G 3、T I M 3、4 1 B B、2 B 4、A 2 a R、B 7 H 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B T L A、C D 2、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 7 0、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 6 0、C D 2 2 6、C D 2 7 6、D R 3、G A L 9、G I T R、H V E M、I D O 1、I D O 2、誘導性 T 細胞共刺激 (I C O S)、K I R、L A I R 1、L I G H T、コラーゲン様構造を有するマクロファージ受容体 (M A R C O)、ホスファチジルセリン (P S)、O X - 4 0、S L A M、T I G I T、V I S T A、V T C N 1、又はその任意の組合せの阻害剤である、段落 (2 3) に記載の方法。

30

【 0 4 0 8 】

[00415] (2 5) 上記デポー形成ワクチンの上記疎水性担体が油又は油の混合物である、段落 (1) ~ (2 4) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 0 9 】

[00416] (2 6) 上記疎水性担体が植物油、堅果油、又は鉱物油を含む、段落 (2 5) に記載の方法。

【 0 4 1 0 】

[00417] (2 7) 上記疎水性担体が、鉱物油である、又は鉱物油溶液、たとえばモンタニド (登録商標) I S A 5 1 中のオレイン酸マンニドである、段落 (2 5) に記載の方法。

40

【 0 4 1 1 】

[00418] (2 8) 上記デポー形成ワクチンが水を実質的に含まない、段落 (1) ~ (2 7) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 2 】

[00419] (2 9) 上記デポー形成ワクチンが水を含まない、段落 (1) ~ (2 7) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 3 】

[00420] (3 0) 上記 1 つ又は複数の抗原が上記油中に混和性であるように、上記 1 つ又は複数の抗原が十分に疎水性である、又は十分に疎水性にする、段落 (2 5) ~ (2 9)

50

）のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 4 】

[00421] (3 1) 上記 1 つ又は複数の抗原が天然に疎水性である、段落 (3 0) に記載の方法。

【 0 4 1 5 】

[00422] (3 2) 上記 1 つ又は複数の抗原の疎水性が上記抗原の修飾によって増加されている、段落 (3 0) に記載の方法。

【 0 4 1 6 】

[00423] (3 3) 上記 1 つ又は複数の抗原が脂質化によって修飾されたペプチド抗原である、段落 (3 2) に記載の方法。

10

【 0 4 1 7 】

[00424] (3 4) 上記脂質化が、N末端のミリストイル化、コレステロールのC末端付着、C末端又はその付近のシステイン残基のS - プレニル化、システイン残基のS - パルミトイル化、及びアジュバント活性を有する脂質の付着のうちの 1 つ又は複数である、段落 (3 3) に記載の方法。

【 0 4 1 8 】

[00425] (3 5) 上記アジュバント活性を有する脂質が、ジパルミトイル - S - グリセリル - システイン (P A M ₂ C y s)、トリパルミトイル - S - グリセリル - システイン (P A M ₃ C y s)、パルミチン酸、又は他のリポアミノ酸を含む、段落 (3 4) に記載の方法。

20

【 0 4 1 9 】

[00426] (3 6) 上記アジュバント活性を有する脂質が P a m - 2 - C y s - S e r - (L y s) 4 又は P a m - 3 - C y s - S e r - (L y s) 4 である、段落 (3 5) に記載の方法。

【 0 4 2 0 】

[00427] (3 7) 疎水性イオン対合を使用して上記 1 つ又は複数の抗原を疎水性分子、化合物、又は複合体と非共有結合で複合体化する、段落 (3 0) に記載の方法。

【 0 4 2 1 】

[00428] (3 8) 上記疎水性イオン対合の技法が、正荷電の抗原と負荷電の有機分子、化合物、又は複合体との間の静電的相互作用によって免疫原性複合体を形成することを含む、段落 (3 7) に記載の方法。

30

【 0 4 2 2 】

[00429] (3 9) 上記負荷電の有機分子、化合物、又は複合体がサポニン又はサポニン複合体である、段落 (3 8) に記載の方法。

【 0 4 2 3 】

[00430] (4 0) 上記 1 つ又は複数の抗原が、上記デポー形成ワクチン中の両親媒性物質の存在によって十分に疎水性になる、段落 (3 0) に記載の方法。

【 0 4 2 4 】

[00431] (4 1) 上記両親媒性物質が上記 1 つ又は複数の抗原と密に会合して、上記 1 つ又は複数の抗原が上記疎水性担体中で混和性になる、段落 (4 0) に記載の方法。

40

【 0 4 2 5 】

[00432] (4 2) 上記両親媒性物質がシート又は小胞構造を形成し、上記 1 つ又は複数の抗原を部分的に又は完全に囲む、段落 (4 1) に記載の方法。

【 0 4 2 6 】

[00433] (4 3) 上記両親媒性物質が脂質である、段落 (4 0) ~ (4 2) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 2 7 】

[00434] (4 4) 上記脂質が上記 1 つ又は複数の抗原の周りに閉じた小胞構造を形成する、段落 (4 3) に記載の方法。

【 0 4 2 8 】

50

[00435] (45) 上記閉じた小胞構造が単層小胞構造（たとえばミセル）又は二重層小胞構造（たとえば単層若しくは多重膜リポソーム）である、段落（44）に記載の方法。

【0429】

[00436] (46) 上記脂質がリン脂質である、段落（43）～（45）のいずれか一項に記載の方法。

【0430】

[00437] (47) 上記デポー非形成ワクチンが水性担体を含む、段落（1）～（46）のいずれか一項に記載の方法。

【0431】

[00438] (48) 上記水性担体が水又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）である、段落（47）に記載の方法。

【0432】

[00439] (49) 上記デポー形成ワクチン及び/又は上記デポー非形成ワクチンがアジュバントをさらに含む、段落（1）～（48）のいずれか一項に記載の方法。

【0433】

[00440] (50) 上記アジュバントがポリI：Cポリヌクレオチドである、段落（49）に記載の方法。

【0434】

[00441] (51) 上記1つ又は複数の抗原が、(i)たとえば、エボラウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）、炭疽菌（*Bacillus anthracis*）、若しくは四日熱マラリア原虫（*Plasmodium malariae*）などのウイルス、細菌、若しくは原虫に由来する、(ii)たとえばサバイピン抗原などの膜表面結合癌抗原である、又は(iii)たとえばコカインなどの毒素である、段落（1）～（50）のいずれか一項に記載の方法。

【0435】

[00442] (52) 上記1つ又は複数の抗原が、少なくとも1つのB細胞エピトープ、少なくとも1つのCTLエピトープ、又はその組合せを含む、段落（1）～（51）のいずれか一項に記載の方法。

【0436】

[00443] (53) 上記抗原がサバイピン抗原である、段落（1）～（52）のいずれか一項に記載の方法。

【0437】

[00444] (54) 上記サバイピン抗原が、サバイピンタンパク質からのアミノ酸配列を含むペプチド抗原（配列番号53）、又は上記ペプチド抗原をコードしている核酸分子である、段落（53）に記載の方法。

【0438】

[00445] (55) 上記抗原が、アミノ酸配列FEELTLGEF（配列番号54）、FTELTTLGEF（配列番号55）、LTLGEFLKL（配列番号56）、LMLGEFLKL（配列番号2）、RISTFKNWPF（配列番号57）、RISTFKNWPK（配列番号58）、STFKNWPF（配列番号59）、及びLPPAWQPFL（配列番号60）、若しくはその任意の組合せを含むペプチド抗原、又は上記ペプチド抗原をコードしている核酸分子である、段落（1）～（52）のいずれか一項に記載の方法。

【0439】

[00446] (56) 上記1つ又は複数の抗原が、アミノ酸配列FTELTTLGEF（配列番号55）、LMLGEFLKL（配列番号2）、RISTFKNWPK（配列番号58）、STFKNWPF（配列番号59）、又はLPPAWQPFL（配列番号60）を含む5つのペプチド抗原の混合物を含む、段落（1）～（52）のいずれか一項に記載の方法。

【0440】

10

20

30

40

50

[00447] (5 7) 上記抗原がヒトパピローマウイルス (H P V) に由来するペプチド抗原又は上記ペプチド抗原をコードしている核酸分子である、段落 (1) ~ (5 2) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 1 】

[00448] (5 8) 上記 H P V に由来するペプチド抗原が、アミノ酸配列 Y M L D L Q P E T T (配列番号 4 4)、Y M L D L Q P E T (配列番号 4 5)、L L M G T L G I V (配列番号 4 6)、又は T L G I V C P I (配列番号 4 7) を含む、段落 (5 7) に記載の方法。

【 0 4 4 2 】

[00449] (5 9) 上記抗原が自己抗原である、段落 (1) ~ (5 2) のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 4 4 3 】

[00450] (6 0) 上記抗原が癌関連抗原である、段落 (1) ~ (5 2) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 4 】

[00451] (6 1) 上記抗原が免疫原性の弱い抗原である、段落 (1) ~ (6 0) のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 5 】

[00452] (6 2) 上記デポー形成ワクチン及び / 又は上記デポー非形成ワクチンがヘルパー T エピトープをさらに含む、段落 (1) ~ (6 1) のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 4 4 6 】

[00453] (6 3) 上記ヘルパー T エピトープがアミノ酸配列 F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E (配列番号 6 3) を含むペプチドである、段落 (6 2) に記載の方法。

【 0 4 4 7 】

[00454] (6 4) 上記デポー形成ワクチンが、(i) アミノ酸配列 F T E L T L G E F (配列番号 5 5)、L M L G E F L K L (配列番号 2)、R I S T F K N W P K (配列番号 5 8)、S T F K N W P F L (配列番号 5 9)、及び L P P A W Q P F L (配列番号 6 0) を含む 5 つのサバイピンペプチド抗原、(i i) アミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 6 1) を含む破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパー T エピトープ、(i i i) ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント、(i v) 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、並びに (v) 上記疎水性担体モンタニド (登録商標) I S A 5 1 V G を含む、段落 (1) ~ (2 4) のいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 4 4 8 】

[00455] (6 5) 上記デポー非形成ワクチンが、同じ構成成分 (i)、(i i)、(i i i)、及び (i v)、並びに水担体を含む、段落 (6 4) に記載の方法。

【 0 4 4 9 】

[00456] (6 6) 上記デポー形成ワクチンが、(i) ヒトパピローマウイルス (H P V) に由来するペプチド抗原、(i i) アミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 6 1) を含む破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパー T エピトープ、(i i i) ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント、(i v) 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) とコレステロール脂質混合物の脂質分子混合物、及び (v) 上記疎水性担体モンタニド (登録商標) I S A 5 1 V G を含む、段落 (1) ~ (2 4) のいずれか一項に記載の方法。

40

【 0 4 5 0 】

[00457] (6 7) 上記デポー非形成ワクチンが、同じ構成成分 (i)、(i i)、(i i i)、及び (i v)、並びに水担体を含む、段落 (6 6) に記載の方法。

【 0 4 5 1 】

[00458] (6 8) 上記対象において細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) 免疫応答を強化す

50

るためのものである、段落（１）～（６７）のいずれか一項に記載の方法。

【０４５２】

[00459]（６９）上記対象において抗体免疫応答を強化するためのものである、段落（１）～（５２）のいずれか一項に記載の方法。

【０４５３】

[00460]（７０）上記対象が上記抗原に対して事前の免疫応答を有していない、段落（１）～（６９）のいずれか一項に記載の方法。

【０４５４】

[00461]（７１）癌、感染性疾患、又は嗜癪疾患を治療又は予防するためのものである、段落（６８）～（７０）のいずれか一項に記載の方法。

10

【０４５５】

[00462]（７２）癌を治療又は予防するためのものである、段落（６８）に記載の方法。

【０４５６】

[00463]（７３）上記癌が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、輸卵管癌、腹膜癌、膠芽細胞腫、又はびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫である、段落（７１）又は（７２）に記載の方法。

【０４５７】

[00464]（７４）上記デポー非形成ワクチンが、上記デポー形成ワクチンよりも素早く注射部位からクリアランスされる、段落（１）～（７３）のいずれか一項に記載の方法。

20

【０４５８】

[00465]（７５）上記免疫応答の強化が注射部位反応の発生率の低下を含む、段落（７４）に記載の方法。

【０４５９】

[00466]（７６）抗原に対する免疫応答を強化するための、デポー非形成ワクチンと組み合わせたデポー形成ワクチンの使用であって、少なくとも１回の用量の、上記抗原及び疎水性担体を含む上記デポー形成ワクチンが、上記抗原を含む上記デポー非形成ワクチンの前に投与するためのものである、使用。

【０４６０】

[00467]（７７）上記デポー形成ワクチンが上記抗原に対する上記免疫応答をプライミングし、続く上記デポー非形成ワクチンの投与が上記抗原に対する上記免疫応答を維持及び／又はブーストする、段落（７６）に記載の使用。

30

【０４６１】

[00468]（７８）上記デポー非形成ワクチンが、上記デポー形成ワクチンよりも素早く注射部位からクリアランスされる、段落（７６）又は（７７）に記載の使用。

【０４６２】

[00469]（７９）上記免疫応答の強化が注射部位反応の発生率の低下を含む、段落（７６）～（７８）のいずれか一項に記載の使用。

【０４６３】

[00470]（８０）上記デポー形成ワクチンが段落（２５）～（４６）、（４９）、（５０）、（６２）、（６３）、（６４）、及び（６６）のいずれか一項に定義した通りであり、上記デポー非形成ワクチンが段落（４７）～（５０）、（６２）、（６３）、（６５）、及び（６７）のいずれか一項に定義した通りである、段落（７６）～（７９）のいずれか一項に記載の使用。

40

【０４６４】

[00471]（８１）上記デポー形成ワクチンが段落（６４）に定義した通りであり、上記デポー非形成ワクチンが段落（６５）に定義した通りである、段落（７６）～（８０）のいずれか一項に記載の使用。

【０４６５】

[00472]（８２）上記デポー形成ワクチンが段落（６６）に定義した通りであり、上記

50

デポー非形成ワクチンが段落(67)に定義した通りである、段落(76)~(81)のいずれか一項に記載の使用。

【0466】

[00473](83)1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含むデポー形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器と、上記1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンを含む少なくとも1つの容器とを含むキット。

【0467】

[00474](84)上記デポー非形成ワクチンが水性担体を含む、段落(83)に記載のキット。

【0468】

[00475](85)上記デポー形成ワクチン及びデポー非形成ワクチンがヘルパーTエпитープをさらに含む、段落(83)又は(84)に記載のキット。

【0469】

[00476](86)上記ヘルパーTエпитープがアミノ酸配列FNNFTVSWLRVPKVSASHLE(配列番号63)を含むペプチドである、段落(85)に記載のキット。

【0470】

[00477](87)上記デポー形成ワクチン及びデポー非形成ワクチンがアジュバントをさらに含む、段落(83)~(86)のいずれか一項に記載のキット。

【0471】

[00478](88)上記アジュバントがポリI:Cポリヌクレオチドである、段落(87)に記載のキット。

【0472】

[00479](89)上記デポー形成ワクチン及びデポー非形成ワクチンが脂質をさらに含む、段落(83)~(88)のいずれか一項に記載のキット。

【0473】

[00480](90)上記脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)である、段落(89)に記載のキット。

【0474】

[00481](91)それぞれが1つ又は複数の抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質を含む少なくとも2つの容器と、疎水性担体を含む少なくとも1つの容器と、水性担体を含む少なくとも1つの容器とを含むキットであって、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、上記疎水性担体を用いて再溶解してデポー形成ワクチンを調製するためのものであり、抗原、ヘルパーTエпитープ、アジュバント、及び脂質の少なくとも1つの容器が、上記水性担体を用いて再溶解してデポー非形成ワクチンを調製するためのものである、キット。

【0475】

[00482](92)上記ヘルパーTエпитープがアミノ酸配列FNNFTVSWLRVPKVSASHLE(配列番号63)を含むペプチドである、段落(91)に記載のキット。

【0476】

[00483](93)上記アジュバントがポリI:Cポリヌクレオチドである、段落(91)又は(92)に記載のキット。

【0477】

[00484](94)上記脂質が1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)及びコレステロールである、段落(91)~(93)のいずれか一項に記載のキット。

【0478】

[00485](95)上記1つ又は複数の抗原が、アミノ酸配列FTELTTLGEF(配列番号55)、LMLEFLKL(配列番号2)、RISTFKNWPK(配列番号58

10

20

30

40

50

)、STFKNWPF L (配列番号59)、又はLPPAWQPFL (配列番号60)を含む5つのペプチド抗原の混合物を含む、段落(83)~(94)のいずれか一項に記載のキット。

【0479】

[00486] (96) 上記抗原がヒトパピローマウイルス (HPV) に由来するペプチド抗原である、段落(83)~(94)のいずれか一項に記載のキット。

【0480】

[00487] (97) 上記デポー形成ワクチンを用いて上記免疫応答をプライミングし、上記デポー非形成ワクチンを用いて上記免疫応答を維持及び/又はブーストすることによって、対象における免疫応答の強化において使用するための、段落(83)~(96)のいずれか一項に記載のキット。

10

【0481】

[00488] (98) 上記デポー形成ワクチンが水を含まない又は水を実質的に含まない、段落(83)~(97)のいずれか一項に記載のキット。

【0482】

[00489] (99) 段落(1)~(75)のいずれか一項に記載の方法において使用するための、1つ又は複数の抗原及び疎水性担体を含むデポー形成ワクチンと、上記1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンとの組合せ。

【0483】

[00490] (100) 上記対象に少なくとも1回の用量の上記デポー形成ワクチンを投与し、続いて対象に少なくとも1回の用量の上記デポー非形成ワクチンを投与する、対象において抗原に対する免疫応答を強化する方法で使用するための、疎水性担体中に1つ又は複数の抗原を含むデポー形成ワクチンと、水性担体中に上記1つ又は複数の抗原を含むデポー非形成ワクチンとの組合せ。

20

【0484】

[00491] 本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに例示される。

【実施例1】

【0485】

[00492] 実施例1 :

【0486】

30

[00493] 6~12週齢の病原体を有さないHHD-DR1トランスジェニックマウスを施設内で繁殖させ、施設の指針に従って、水及び食料を自由に与え、フィルターで制御された空気循環を用いて飼育した。HHD-DR1マウスは、ヒトMHCクラスI及びII分子、HLA-A*0201、並びにHLA-DR*0101を発現し、対応するネズミMHC分子H-2D^b、-IA、又は-IE (2m^a/、H-2D^b/、IA^a/、IA^a/、IE^a/)を発現しない。

【0487】

[00494] マウスに、油ベースのデポー形成ワクチン又は水性ベースのワクチン中で配合した5つのサバイピンペプチド抗原の混合物をワクチン接種した。それぞれのサバイピンペプチド抗原は異なるHLA (HLA-A1、A2、A3、A24、及びB7) によって制限されている。また、ワクチン配合物は、破傷風トキソイドに由来するユニバーサルヘルパーTエпитープ及びポリI:Cポリヌクレオチドアジュバントも含有していた。ワクチンを調製するために、まず、ペプチド及びアジュバントを、DOPC及びコレステロール (Lipoid、ドイツ) を含む酢酸緩衝液 (0.1M、pH9.5) 中で再溶解した。その後、ワクチン構成成分を凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成した。注射の直前に、乾燥ケーキをISA51 VG油 (SEPPIC、フランス) 中に再懸濁させて油ベースの配合物を調製した、又は水中に再懸濁させて水性ベースの配合物を調製した。最終ワクチン配合物は、それぞれのサバイピンペプチド抗原を1ミリグラム/ミリリットル、ヘルパーTを500マイクログラム/ミリリットル、アジュバントを400マイクログラム/ミリリットル、DOPCを120ミリグラム/ミリリットル、及びコレステロールを12ミ

40

50

リグラム／ミリリットルで含有していた。

【 0 4 8 8 】

[00495] ワクチン配合物の免疫原性は、HHD - DR1 トランスジェニックマウスにワクチン接種することによって試験した。50 マイクロリットル用量のそれぞれのワクチンをマウスの右脇腹に皮下投与した。第1群のマウス (n = 5 匹) には、上述の油ベースの配合物中で配合したペプチド及びアジュバントをワクチン接種した。第2群のマウス (n = 5 匹) には、上述の水性配合物中で配合したペプチド及びアジュバントをワクチン接種した。ワクチンは右脇腹に皮下送達した。免疫化の8日後、すべてのマウスを安楽死させ、右鼠径リンパ節を取り出した。単一細胞懸濁液を調製し、リンパ節細胞を、ELISPOT プレート (BD Bioscience、カリフォルニア州 San Jose) の抗 IFN - ガンマでコーティングされたウェル (200, 000 個の細胞 / ウェル) 内にローディングした。また、HLA - A2 制限サバイピンペプチド (SurA2 . M、LM LG E F L K L、配列番号2) でローディングした成熟した同系の樹状細胞、無関係のHLA - A2 制限ペプチド (ALMEQQHYV、配列番号1)、又はローディングしていない (バックグラウンド) もウェルに加えた (20, 000 個の細胞 / ウェル)。細胞をELISPOT プレート中で18時間インキュベートした。翌日、AEC キット (Sigma、モンタナ州 St. Louis) を使用してプレートを展開させ、個々のIFN - ガンマ分泌細胞を、イムノスポットプレートリーダー (Cellular Technology Ltd、オハイオ州 Shaker Heights) を使用して数えた。結果を図1に示す。

【 0 4 8 9 】

[00496] 第1群のマウスは、SurA2 . M ペプチドを用いた刺激に対して97 スポット形成単位 (SFU) の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10 SFU 未満の無視できるほどであった。SurA2 . M 刺激によって生じた応答は、二元ANOVAによって無関係のペプチドに対する応答よりも有意に高かった、*** p < 0.001。

【 0 4 9 0 】

[00497] 第2群のマウスは、SurA2 . M ペプチドを用いた刺激に対して2 SFU の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10 SFU 未満の無視できるほどであった。SurA2 . M 刺激によって生じた応答は、二元ANOVAによって無関係のペプチドに対する応答と有意に差異がなかった、p > 0.05。

【 0 4 9 1 】

[00498] これらのデータは、抗原特異的免疫応答の誘導において油ベースのワクチンの投与が水性ベースのワクチンよりも有効であることを実証している。

【 0 4 9 2 】

[00499] 実施例2：

【 0 4 9 3 】

[00500] 6 ~ 12 週齢の病原体を有さないHHD - DR1 トランスジェニックマウスを施設内で繁殖させ、施設の指針に従って、水及び食料を自由に与え、フィルターで制御された空気循環を用いて飼育した。HHD - DR1 マウスは、ヒトMHCクラスI及びII分子、HLA - A * 0201、並びにHLA - DR * 0101を発現し、対応するネズミMHC分子H - 2D^b、- I A、又は - I E (2 m⁻ / -、H - 2D^b - / -、I A - / -、I A - / -、I E - / -) を発現しない。

【 0 4 9 4 】

[00501] マウスに、油ベースのデポー形成ワクチン又は水性ベースのワクチン中で配合した5つのサバイピンペプチド抗原の混合物をワクチン接種した。それぞれのサバイピンペプチド抗原は異なるHLA (HLA - A1、A2、A3、A24、及びB7) によって制限されている。また、ワクチン配合物は、破傷風トキソイドに由来するユニバーサルヘルパーTエпитープ及びポリI : C ポリヌクレオチドアジュバントも含有していた。ワクチンを調製するために、まず、ペプチド及びアジュバントを、DOPC 及びコレステロー

ル (Lipoid、ドイツ) を含む酢酸緩衝液 (0.1 M、pH 9.5) 中で再溶解した。その後、ワクチン構成成分を凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成した。注射の直前に、乾燥ケーキをISA51 VG油 (SEPPIC、フランス) 中に再懸濁させて油ベースの配合物を調製した、又は水中に再懸濁させて水性ベースの配合物を調製した。最終ワクチン配合物は、それぞれのサバイピンペプチド抗原を1ミリグラム/ミリリットル、ヘルパーTを500マイクログラム/ミリリットル、アジュバントを400マイクログラム/ミリリットル、DOPCを120ミリグラム/ミリリットル、及びコレステロールを12ミリグラム/ミリリットルで含有していた。

【0495】

[00502] また、マウスを、20マイクログラム/キログラム/日の用量を経口投与によって7日間の連続した日の間与えた、規則的なシクロホスファミド (Sigma-Aldrich、モンタナ州 St. Louis) でも治療した。

【0496】

[00503] ワクチン配合物の免疫原性は、HHD-DR1トランスジェニックマウスにワクチン接種することによって試験した。2つの群のマウス (n = 5匹) に、上述の油ベースの配合物中のペプチド抗原及びアジュバントの2回の50マイクロリットルの免疫化を、3週間の間隔で、研究の0及び21日目にワクチン接種した。研究の84日目、2回目のワクチン接種の9週間後に、第1群のマウスを、同じ油ベースの配合物の50マイクロリットル免疫化でブーストした。第2群のマウスは、水性ベースの配合物の50マイクロリットル免疫化でブーストした。研究の全体にわたって、両群のマウスは、初回免疫化の7日前に開始して、隔週で規則的なシクロホスファミドでも治療した。ブースト免疫化の8日後、研究の92日目に、すべてのマウスを安楽死させ、脾臓を取り出した。また、1匹のナীবマウスも屠殺し、これはワクチン接種していない対照として役割を果たした。単一細胞懸濁液を調製し、脾細胞を、ELISPOTプレート (BD Bioscience、カリフォルニア州 San Jose) の抗IFN-ガンマでコーティングされたウェル (500, 000個の細胞/ウェル) 内にローディングした。細胞を、10マイクログラム/ミリリットルのHLA-A2制限サバイピンペプチド (SurA2.M、LM LG E F L K L、配列番号2)、無関係のHLA-A2制限ペプチド (ALMEQQHYV、配列番号1)、又はペプチドを含有しない培地 (バックグラウンド) で刺激した。細胞をELISPOTプレート中で18時間インキュベートした。翌日、AECキット (Sigma、モンタナ州 St. Louis) を使用してプレートを展開させ、個々のIFN-ガンマ分泌細胞を、イムノスポットプレートリーダー (Cellular Technology Ltd、オハイオ州 Shaker Heights) を使用して数えた。結果を図2に示す。

【0497】

[00504] 第1群のマウスは、SurA2.Mペプチドを用いた刺激に対して423スポット形成単位 (SFU) の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。SurA2.M刺激によって生じた応答は、二元ANOVAによって無関係のペプチドに対する応答よりも有意に高かった、*** p < 0.0001。

【0498】

[00505] 第2群のマウスは、SurA2.Mペプチドを用いた刺激に対して147SFUの平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。SurA2.M刺激によって生じた応答は、二元ANOVAによって無関係のペプチドに対する応答よりも有意に高かった、* p < 0.05。

【0499】

[00506] これらのデータは、水性ベースのワクチンが、油ベースのワクチンを用いた免疫化によって事前にプライミングしたマウスにおいて抗原特異的なリコール応答を誘導できることを実証している。

【0500】

[00507] 実施例 3 :

【 0 5 0 1 】

[00508] 6 ~ 8 週 齢 の 病 原 体 を 有 さ な い C 5 7 B L / 6 N C r l マウスを、C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s (S t . C o n s t a n t 、ケベック州) から購入し、施設の指針に従って、水及び食料を自由に与え、フィルターで制御された空気循環を用いて飼育した。

【 0 5 0 2 】

[00509] マウスに、H P V 1 6 E 7 _{4 9 - 5 7} ペプチド抗原 (R 9 F 、 R A H Y N I V T F 、配列番号 3) 、破傷風毒素 _{9 4 7 - 9 6 7} に由来するユニバーサルヘルパー T エピトープ (F 2 1 E 、 F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E 、配列番号 6 3) 、及びポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバントをワクチン接種した。ペプチド及びアジュバントを、油ベースのデポー形成ワクチン又は水性ベースのワクチン中で配合した。ワクチンを調製するために、ペプチドを、まず、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d 、ドイツ) を含む 3 0 % の t e r t - ブタノール中で再溶解した。この抗原 - 脂質混合物にアジュバントを添加し、凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成した。注射の直前に、乾燥ケーキを I S A 5 1 V G 油 (S E P P I C 、フランス) 中に再懸濁させて油ベースの配合物を調製した、又は水中に再懸濁させて水性ベースの配合物を調製した。それぞれの用量は、5 マイクログラムの R 9 F ペプチド、5 マイクログラムの F 2 1 E ペプチド、2 0 マイクログラムのアジュバント、6 ミリグラムの D O P C 、及び 0 . 6 ミリグラムのコレステロールを含有していた。

【 0 5 0 3 】

[00510] また、マウスを、2 0 マイクログラム / キログラム / 日の用量を経口投与によって 7 日間の連続した日の間与えた、規則的なシクロホスファミド (S i g m a - A l d r i c h 、モンタナ州 S t . L o u i s) でも治療した。

【 0 5 0 4 】

[00511] 3 つの群のマウス (n = 5 匹) にワクチン接種することによって、ワクチン配合物の免疫原性を試験した。第 1 群のマウスには、0 、 2 1 、 4 2 日目に油ベースのワクチン配合物をワクチン接種した。第 2 群のマウスには、0 及び 2 1 日目に油ベースのワクチン配合物、並びに 4 2 日目に水性配合物をワクチン接種した。第 3 群のマウスには、0 日目に油ベースの配合物、並びに 2 1 及び 4 2 日目に水性配合物をワクチン接種した。すべてのマウス群に、初回免疫化 (0 日目) の 7 日前に開始して、交互する 1 週間オン及び 1 週間オフでシクロホスファミドを与えた。すべてのマウスを 5 0 日目に屠殺し、分析のために脾臓を取り出した。単一細胞懸濁液を調製し、脾細胞を、E L I S P O T プレート (B D B i o s c i e n c e 、カリフォルニア州 S a n J o s e) の抗 I F N - ガンマでコーティングされたウェル (5 0 0 , 0 0 0 個の細胞 / ウェル) 内にローディングした。細胞を、1 0 マイクログラム / ミリリットルの H P V 1 6 E 7 _{4 9 - 5 7} ペプチド (R 9 F 、 R A H Y N I V T F 、配列番号 3) 、無関係の H - 2 b 制限ペプチド (R M F P N A P Y L 、配列番号 4) 、又はペプチドを含有しない培地 (バックグラウンド) で刺激した。細胞を E L I S P O T プレート中で 1 8 時間インキュベートした。翌日、A E C キット (S i g m a 、モンタナ州 S t . L o u i s) を使用してプレートを展開させ、個々の I F N - ガンマ分泌細胞を、イムノスポットプレートリーダー (C e l l u l a r T e c h n o l o g i e L t d 、オハイオ州 S h a k e r H e i g h t s) を使用して数えた。結果を図 3 に示す。

【 0 5 0 5 】

[00512] 第 1 群のマウスは、R 9 F ペプチドを用いた刺激に対して 1 7 7 スポット形成単位 (S F U) の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は 1 0 S F U 未満の無視できるほどであった。

【 0 5 0 6 】

[00513] 第 2 群のマウスは、R 9 F ペプチドを用いた刺激に対して 1 2 7 スポット形成単位 (S F U) の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応

答は10SFU未満の無視できるほどであった。

【0507】

[00514]第3群のマウスは、R9Fペプチドを用いた刺激に対して194スポット形成単位(SFU)の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。

【0508】

[00515]R9F刺激によって生じた応答は、一元ANOVAによってそれぞれの群間で有意な差異がなかった。

【0509】

[00516]これらのデータは、水性ワクチンが、油ベースのワクチン配合物を用いた1又は2回の免疫化でプライミングした全身性リコール応答を誘導することができ、同じ抗原を含有する水性ワクチンを用いたブーストでそのような免疫応答を維持できることを実証している。

【0510】

[00517]実施例4：

【0511】

[00518]6～8週齢の病原体を有さないC57BL/6NCrlマウスを、Charles River Laboratories (St. Constant、ケベック州)から購入し、施設の指針に従って、水及び食料を自由に与え、フィルターで制御された空気循環を用いて飼育した。

【0512】

[00519]マウスに、HPV16E7₄₉₋₅₇ペプチド抗原(R9F、RAHYNIIVTF、配列番号3)、破傷風毒素₉₄₇₋₉₆₇に由来するユニバーサルヘルパーTエпитープ(F21E、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE、配列番号63)、及びポリI:Cポリヌクレオチドアジュバントをワクチン接種した。ペプチド及びアジュバントを、油ベースのデポー形成ワクチン又は水性ベースのワクチン中で配合した。ワクチンを調製するために、ペプチドを、まず、DOPC及びコレステロール(Lipoid、ドイツ)を含む30%のtert-ブタノール中で再溶解した。この抗原-脂質混合物にアジュバントを添加し、凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成した。注射の直前に、乾燥ケーキをISA51VG油(SEPPIC、フランス)中に再懸濁させて油ベースの配合物を調製した、又は水中に再懸濁させて水性ベースの配合物を調製した。それぞれの用量は、5マイクログラムのR9Fペプチド、5マイクログラムのF21Eペプチド、20マイクログラムのアジュバント、6ミリグラムのDOPC、及び0.6ミリグラムのコレステロールを含有していた。

【0513】

[00520]また、マウスを、20マイクログラム/キログラム/日の用量を経口投与によって7日間の連続した日の間与えた、規則的なシクロホスファミド(Sigma-Aldrich、モンタナ州St. Louis)でも治療した。

【0514】

[00521]治療の有効性を、HPV16E7を発現するC3腫瘍を保有するマウスにおいて試験した。研究0日目腫瘍を皮下移植し、成長を週に1回モニタリングした。明白な腫瘍を週に2回ノギスを使用して測定して、長さ及び幅を記録した。腫瘍体積が事前に定義したエンドポイント体積である2000mm³に達した際に、マウスを人道的に安楽死させた。第1群のマウスは治療しないままであり、腫瘍成長対照群(n=9匹)として役割を果たした。第2～4群のマウス(n=10匹)は、腫瘍細胞移植の5日後に開始した規則的なシクロホスファミドで治療し、12、33、54日目にワクチン接種した。第2群のマウスには、油ベースのワクチンを12、33、及び54日目にワクチン接種した。第3群のマウスには、油ベースのワクチンを12及び33日目に、並びに54日目に水性ワクチンをワクチン接種した。第4群のマウスには、油ベースのワクチンを12日目に、並びに水性ワクチンを33及び54日目にワクチン接種した。結果を図4に示す。

【 0 5 1 5 】

[00522]図 4 A は、それぞれの群について記録された平均腫瘍体積を示す。第 1 群のマウスの大多数は大きな腫瘍体積又は腫瘍潰瘍形成が原因で研究の 29 日目までに屠殺されており、この時点での平均腫瘍体積は $468 \pm 41 \text{ mm}^3$ であった。研究の 49 日目に、第 2 群の平均腫瘍体積は $281 \pm 99 \text{ mm}^3$ であり、第 3 群の平均腫瘍体積は $226 \pm 75 \text{ mm}^3$ であり、第 4 群の平均腫瘍体積は $327 \pm 103 \text{ mm}^3$ であった。統計分析を直線回帰によって行い、第 2、3、及び 4 群の間に有意差は検出されなかった。

【 0 5 1 6 】

[00523]図 4 B は、それぞれの群のパーセント生存を示す。研究の 64 日目までに、第 1 群のマウス 0 % が残っており、第 2 群のマウスの 60 % が残っており、第 3 群のマウスの 50 % が残っており、第 4 群のマウスの 80 % が残っていた。統計分析をマンテル - コックスによって行い、第 2、3、及び 4 の間に有意差は検出されなかった。

【 0 5 1 7 】

[00524]このデータは、油ベースのワクチンを用いたプライミング、及びその後の同じ抗原を含有する水性ワクチンを用いたブーストが、腫瘍成長からの有効な保護を提供できることを実証している。

【 0 5 1 8 】

[00525]実施例 5 :

【 0 5 1 9 】

[00526]6 ~ 12 週齢の病原体を有さない H H D - D R 1 トランスジェニックマウスを施設内で繁殖させ、施設の指針に従って、水及び食料を自由に与え、フィルターで制御された空気循環を用いて飼育した。H H D - D R 1 マウスは、ヒト M H C クラス I 及び I I 分子、H L A - A * 0 2 0 1、並びに H L A - D R * 0 1 0 1 を発現し、対応するネズミ M H C 分子 H - 2 D ^b、- I A、又は - I E ($2 \text{ m}^{\cdot} / \cdot$ 、H - 2 D ^b \cdot / \cdot 、I A \cdot / \cdot 、I A \cdot / \cdot 、I E \cdot / \cdot) を発現しない。

【 0 5 2 0 】

[00527]マウスに、油ベースのデポー形成ワクチン中で配合した 5 つのサバイピンペプチド抗原の混合物をワクチン接種した。それぞれのサバイピンペプチド抗原は異なる H L A (H L A - A 1、A 2、A 3、A 2 4、及び B 7) によって制限されている。また、ワクチン配合物は、破傷風トキソイドに由来するユニバーサルヘルパー T エピトープ及びポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバントも含有していた。ワクチンを調製するために、まず、ペプチド及びアジュバントを、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d、ドイツ) を含む酢酸ナトリウム緩衝液 (0 . 1 M、p H 9 . 5) 中で再溶解した。その後、ワクチン構成成分を凍結乾燥させて乾燥ケーキを形成した。注射の直前に、乾燥ケーキを I S A 5 1 V G 油 (S E P P I C、フランス) 中に再懸濁させた。最終ワクチン配合物は、それぞれのサバイピンペプチド抗原を 1 ミリグラム / ミリリットル、ヘルパー T を 500 マイクログラム / ミリリットル、アジュバントを 400 マイクログラム / ミリリットル、D O P C を 120 ミリグラム / ミリリットル、及びコレステロールを 12 ミリグラム / ミリリットルで含有していた。

【 0 5 2 1 】

[00528]ワクチンの免疫原性は、H H D - D R 1 トランスジェニックマウスに 50 マイクロリットル用量の油ベースのワクチンを側腹部に皮下でワクチン接種することによって試験した。第 1 群のマウス (n = 5 匹) は、研究 0 日目に 1 回ワクチン接種し、8 日目に屠殺した。第 2 群のマウス (n = 5 匹) は、研究の 0 及び 21 日目に 2 回ワクチン接種し、28 日目 (2 回目の免疫化の 8 日後) に屠殺した。第 3 群のマウスは、研究の 0 及び 21 日目に 2 回ワクチン接種し、48 日目 (2 回目の免疫化の 27 日後) に屠殺した。屠殺後に脾臓を取り出した。単一細胞懸濁液を脾臓から調製し、脾細胞を、E L I S P O T プレート (B D B i o s c i e n c e、カリフォルニア州 S a n J o s e) の抗 I F N - ガンマでコーティングされたウェル (500 , 000 個の細胞 / ウェル) 内にローディングした。細胞を、10 マイクログラム / ミリリットルの H L A - A 2 制限サバイピンペ

プチド (SurA2 . M、LMLGEFLKL、配列番号2)、無関係のHLA-A2制限ペプチド (ALMEQQHYV、配列番号1)、又はペプチドを含有しない培地 (バックグラウンド) で刺激した。細胞をELISPOTプレート中で18時間インキュベートした。翌日、AECキット (Sigma、モンタナ州St. Louis) を使用してプレートを展開させ、個々のIFN-ガンマ分泌細胞を、イムノスポットプレートリーダー (Cellular Technology Ltd、オハイオ州Shaker Heights) を使用して数えた。結果を図5に示す。

【0522】

[00529]第1群のマウスは、SurA2 . Mペプチドを用いた刺激に対して131スポット形成単位 (SFU) の平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。

10

【0523】

[00530]第2群のマウスは、SurA2 . Mペプチドを用いた刺激に対して351SFUの平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。

【0524】

[00531]第3群のマウスは、SurA2 . Mペプチドを用いた刺激に対して49SFUの平均応答を生じた。バックグラウンド及び無関係のペプチドに対する応答は10SFU未満の無視できるほどであった。

20

【0525】

[00532] SurA2 . M刺激によって生じた応答は第1及び2群間で有意な差異があった、 $p < 0.05$ 。予想どおり、2回目のワクチン用量を用いたブーストは、免疫応答を維持及び増加させた (第1群対第2群)。SurA2 . M刺激によって生じた応答は第2及び3群間で有意な差異があり、 $p < 0.01$ 、これは、免疫応答がブースターワクチン接種の投与後、27日間以内に顕著に降下したことを実証している。これらのデータは、ワクチンによって誘導された抗原特異的な応答は、ブーストなしでは時間と共に減退することを実証しており、そのような免疫応答、詳細には細胞性免疫応答を維持するためにブースター免疫化を投与することの重要性を強調している。統計分析は、チューキー事後検定を用いた一元ANOVAによって行った。

30

【0526】

[00533]実施例6:

【0527】

[00534]米国 (IND # 14731) 及びカナダ (CTA-A # 183600) で実施された、ONC-DPX-Survivac-03と命名された第Ib相研究は、卵巣癌対象において、低用量シクロホスファミドと共に油ベースのワクチンを用いたプライミング (デポー形成)、次いで水性ベースのワクチン配合物 (デポー非形成) を用いたブーストの安全性及び免疫効力を調査した、対象のコホートを含有していた。

【0528】

[00535]本研究で使用したワクチンは、5つのヒト白血球抗原 (HLA) 制限エピトープ (HLA-A1: FTELT LGEF (配列番号55)、HLA-A2: LMLGEFLKL (配列番号2)、HLA-A3: RISTFKNWP K (配列番号58)、HLA-A24: STFKNWPF L (配列番号59)、及びHLA-B7: LP PAWQP FL (配列番号60))、破傷風トキソイドからのユニバーサルヘルパーTエピトープ (AQYIKANSKF I G I T E L、配列番号61)、ポリI: Cポリヌクレオチドアジュバント、並びにDOPC及びコレステロールからなるリポソームからなるDPX-Survivacであった。抗原/アジュバント/リポソーム複合体は、リン酸緩衝液中で配合し、バイアルに満たし、凍結乾燥させて乾燥ケーキにする。診療所では、注射前にケーキを1×体積の疎水性担体モンタニドISA51 VG (SEPPIC、フランス) に再懸濁させて、油ベースの配合物を調製する。水性ベースの配合物を調製するためには、疎水性担体の代わりに2×体積の滅菌水を使用して乾燥ケーキを再懸濁させる。最終ワクチン

40

50

配合物中の用量体積及び送達物を表 4 に示す。

【 0 5 2 9 】

[00536]

【表 5】

表 4:それぞれの用量の油ベースの DPX-Survivac ワクチン及び水性ベースの DPX-Survivac ワクチンの構成成分。

構成成分	DPX-Survivac(油)	DPX-Survivac(水性)
希釈剤	モンタニドISA51 VG	滅菌水
用量体積	0.250ミリリットル	0.500ミリリットル
抗原	0.250ミリグラム	0.250ミリグラム
ヘルパーT	0.125ミリグラム	0.125ミリグラム
アジュバント	0.1ミリグラム	0.1ミリグラム
DOPC	30ミリグラム	30ミリグラム
コレステロール	3ミリグラム	3ミリグラム

【 0 5 3 0 】

[00537]臨床研究では、対象は、2回の0.25ミリリットル用量のDPX-Survivac(油)の皮下プライミング注射及び3回の0.50ミリリットル用量のDPX-Survivac(水性)の皮下ブースト注射を、4週間の間隔で受けた。また、対象は、研究の期間の間、隔週で50ミリグラムBID(1日2回)の経口シクロホスファミドでも治療した。臨床治験は図6に示すスケジュールに従って実施した。

【 0 5 3 1 】

[00538]有害事象は、国立癌研究所の有害事象共通用語規準(CTCAE)バージョン4.03に従って評価した。最初のワクチン接種の前(ベースライン)、それぞれのワクチン接種時点、及び2回目のプライミングワクチン接種の2週間後に血液を採取した(研究の0、28、42、56、84、及び112日目)。末梢血単核球(PBMC)を単離し、(i)インターフェロン-ガンマELISPOT及び(ii)多量体分析によって免疫機能及びワクチンに誘導されたT細胞免疫を研究するために冷凍保存した。

【 0 5 3 2 】

[00539](i)PBMC中の機能的な抗原特異的T細胞を検出するためのインターフェロン-ガンマELISPOTアッセイ

【 0 5 3 3 】

[00540]ワクチン接種に应答して生じた抗原特異的なT細胞は、同族ペプチドに遭遇した際にサイトカインインターフェロンガンマ(IFN-ガンマ)を分泌する。ELISPOTアッセイは、IFN-ガンマの分泌量を測定し、ペプチドを用いた刺激に应答してそれを分泌している細胞の数を提供することができる。

【 0 5 3 4 】

[00541]臨床治験対象から採取したPBMC試料を、指定された試験抗原に対するリコール応答についてインターフェロン-ガンマ(IFN-ガンマ)ELISPOTアッセイ

で試験した。E L I S P O TはC . T . L . L t d . (米国オハイオ州S h a k e r H e i g h t s) から購入したキットを用いて行った。P B M Cを解凍し、5つのサバイニンペプチドのプールで刺激した。抗原、陰性対照(培地単独中の細胞)、並びに陽性対照(T細胞活性化剤P M A及びイオノマイシン) に対する応答を2つ組のウェル中で試験した。臨床試料からのP B M Cを96ウェルE L I S P O Tプレートのウェルに300, 000個の細胞/ウェルの濃度で播種した。また、健康な対照対象からのP B M Cも対照として使用した。

【0535】

[00542] 1日目に、プレートを、リン酸緩衝生理食塩水(P B S) で1 : 250に希釈した捕捉抗体(精製抗I F N - ガンマ) でコーティングし、プレートを2 ~ 6 の冷蔵庫内で終夜インキュベートした。2日目に、プレートをP B S で1回洗浄した。洗浄は、200マイクロリットル/ウェルの緩衝液を加え、次いでプレートを反転させ、内容物を流し台にはじき出すことによって行った。抗原は、無血清C T L - テスト(C T L - T e s t) (商標) 培地(C . T . L . L t d) 中、それぞれ100マイクログラム/ミリリットルの濃度で調製した。P B M Cは、無血清C T L - テスト(商標) 培地中に3 x 10⁶個の細胞/ミリリットルの濃度で再懸濁させた。ペプチド及び細胞をそれぞれ、ウェルにそれぞれ100マイクロリットル/ウェルで加え、200マイクロリットルの最終体積とした。プレートを加湿した37、5%のC O₂ インキュベーター内で終夜インキュベートした。3日目に、C . T . L . L t d から購入したヒトI F N - ガンマE L I S P O Tセット試薬を使用してプレートを展開させた。プレートをP B S で2回、0.05%のツイン20 - P B S で2回洗浄し、次いで100マイクロリットル/ウェルの検出抗体(ビオチン標識した抗I F N - ガンマ) を加えた。室温(18 ~ 23) で2時間のインキュベーションの後、プレートを0.05%のツイン20 - P B S で3回洗浄し、次いで100マイクロリットル/ウェルのストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ試薬を加え、室温で2時間インキュベートした。プレートを0.05%のツイン20 - P B S で2回、P B S で2回洗浄し、その後、100マイクロリットルの新しく調製したT r u e B l u e ペルオキシダーゼ基質展開溶液を加えた。スポット展開を室温で15 ~ 20分間モニタリングして、抗原含有ウェル中のスポットの出現を確認した。プレートを水道水ですすぐことによって反応を停止させた。プレートを終夜空気乾燥させ、室温で保管した。E L I S P O Tプレートのウェル内のスポットの数を、自動プレート分析器(イムノスポット S 6 C o r e A n a l y z e r、C . T . L . L t d .) を使用して数えた。データは、それぞれの2つ組のウェルのS F Uの平均をとり、その後それに3.33を掛け算することによって得られる、100万個のP B M Cあたりのスポット形成単位(S F U) として表す。

【0536】

[00543] (i i) 多量体染色

【0537】

[00544] 抗原特異的なC D 8 + T細胞は、抗原提示細胞の表面上のM H C分子中に提示される特異的ペプチドを認識することによって免疫応答を媒介する。これらは、そのT細胞受容体(T C R) を介してこれを行う。多量体試薬を免疫蛍光分析と併せて使用して、抗原特異的なT C Rを保有するすべてのC D 8 + T細胞のパーセントを定量することができる。このアッセイは、P B M C並びに蛍光コンジュゲート多量体試薬及び抗体を使用して行い、フローサイトメトリーによって検出した。

【0538】

[00545] P B M Cを解凍し、1 x 10⁷の濃度で無血清C T L - テスト(商標) 培地に再懸濁させた。細胞を終夜、37、5%のC O₂ インキュベーター内で培養した。翌日、トリパンブルー排除染色を使用して細胞生存度を評価した。細胞をアッセイチューブに分割し、P Eコンジュゲート多量体試薬を用いて、緩衝液(P B S + 2%のウシ胎児血清、F B S) 中で30分間、4、暗所で染色した。その後、1ミリリットルのP B S + 2%のF B Sを加え、300 x gで5分間遠心分離することによって細胞を洗浄した。上

清を廃棄し、細胞ペレットを100マイクロリットルのPBS+2%のFBSに再懸濁させ、抗ヒト-CD3-APC(OKT3)及び抗ヒト-CD8アルファ-FITC(OKT8)を用いて30分間、4℃、暗所で染色した。その後、細胞を上記の様に洗浄し、ペレットを100マイクロリットルのPBS+2%のFBSに再懸濁させた。フローサイトメーターでの取得の15分前に、5マイクロリットルの7-AAD生存度色素をそれぞれの試料に加えた。データはFACSCalibur(BD Bioscience)を使用して取得し、WinList6.0(Verity Software House)を使用して分析した。ゲートは非生存細胞を排除し(7-AAD+)、その後、CD3+及びCD8+細胞を含めるように設定した。

【0539】

[00546] IFN-ガンマELISPOT及び四量体分析によって評価した、本研究に登録されている2人の対象の抗原特異的免疫応答を実施例7及び8に記載する。

【0540】

[00547] 実施例7:

【0541】

[00548] 対象03-28は、研究ONC-DPX-Survivac-03に含める14カ月前に3c段階の卵巣癌を診断された、66歳のHLA-A2陽性の女性である。診断時、対象は標準の減量手術、次いで1クルの白金及びタキソールに基づく化学療法を受けた。対象は本臨床研究への登録前に再発は示さず、標準治療が完了した9カ月後に治療を開始した。

【0542】

[00549] 免疫応答は、は、研究の0、28、42、56、84、及び112日目に採取した血液から単離した対象PBMCを使用して、実施例6に記載したIFN-ガンマELISPOT及び多量体フローサイトメトリーによってモニタリングした。結果を図7に示す。ELISPOT応答はDPX-Survivac(油)を用いたプライミングワクチン接種が完了した後に徐々に上昇し、DPX-Survivac(水性)を用いたブーストワクチン接種の後に増加したように見えた。多量体フローサイトメトリーによって検出された、循環SurA2.Mに特異的なCD8+T細胞は、研究の56日目にピークとなり、研究の112日目までバックグラウンドより高く維持された。

【0543】

[00550] これらの結果は、DPX-Survivac(油)が、ワクチン抗原に対して事前の免疫応答を有さないHLA-A2+対象において免疫応答をプライミングできることを実証している。DPX-Survivac(水性)を用いたブーストによりこれらの免疫応答が維持された。

【0544】

[00551] 実施例8:

【0545】

[00552] 対象03-30は、研究ONC-DPX-Survivac-03に含める13カ月前に3a段階の卵巣癌を診断された、52歳のHLA-A1陽性対象である。診断時、対象は標準治療の減量手術、次いで1クルの白金及びタキソールに基づく化学療法を受け、完全な応答を経験した。対象は本臨床研究への登録前に再発は示さず、標準治療が完了した8カ月後に治療を開始した。

【0546】

[00553] 免疫応答は、は、研究の0、28、42、56、84、及び112日目に採取した血液から単離した対象PBMCを使用して、実施例6に記載したIFN-ガンマELISPOT及び多量体フローサイトメトリーによってモニタリングした。結果を図8に示す。ELISPOT応答はDPX-Survivac(油)を用いたプライミングワクチン接種中に迅速に上昇し、DPX-Survivac(水性)を用いたブースト免疫化の間、上昇したレベルで維持された。多量体フローサイトメトリーによって検出された、循環SurA1.Tに特異的なT細胞は、DPX-Survivac(油)を用いたプライ

ミング免疫化の2週間後である研究の42日目にピークとなり、DPX-Survivac（水性）を用いたブースト免疫化の期間の間、バックグラウンドより高いレベルで維持された。

【0547】

[00554]これらの結果は、DPX-Survivac（油）が、ワクチン抗原に対して事前の免疫応答を有さないHLA-A1+対象において免疫応答をプライミングできることを実証している。DPX-Survivac（水性）を用いたブーストによりこれらの免疫応答が維持された。

【0548】

[00555]DPX-Survivac（油）プライム用量の後にDPX-Survivac（水性）配合物を受けた、実施例中に概要を示した患者では、すべての注射部位反応は穏やかであり（グレード1）、紅班、そう痒症、硬結、及び疼痛からなっていた。これらの部位反応の大多数は、特に注射部位が水性配合物を受けた場合は2～3カ月後に完全に回復していた。

【0549】

[00556]本明細書中で引用されているすべての出版物及び特許出願は、それぞれの個々の出版物又は特許出願が具体的且つ個々に参考として組み込まれていると示されているかのように、本明細書中に参考として組み込まれている。任意の出版物の引用は、出願日前でのその開示のためであり、先行発明の理由に基づいて本発明がそのような出版物に先行する権利を有さないという承認として解釈されるべきでない。

【0550】

[00557]前述の発明は、理解を明瞭にする目的のために例示及び実施例によって多少詳細に記載されているが、本発明の教示に鑑みて、添付の特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱せずにそれに特定の変化及び改変を行い得ることは、当業者には容易に明らかである。

【0551】

[00558]本明細書及び添付の特許請求の範囲中で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」には、内容により明らかにそうでないと指示される場合以外は、複数形の言及が含まれることに注意する必要がある。別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の技術者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0552】

[00559]明細書及び特許請求の範囲中で使用する語句「及び/又は」は、そのように結合された要素の「一方又は両方」、すなわち、一部の場合に接続的に存在し、他の場合には非接続的に存在する要素を意味すると理解されるべきである。「及び/又は」を用いて列挙した複数の要素は、同じ様式で、すなわち、そのように結合された要素の「1つ又は複数」と解釈されるべきである。具体的に同定した要素に関連しているか関連していないかにかかわらず、「及び/又は」節によって具体的に同定した要素以外の他の要素も任意選択で存在し得る。したがって、非限定的な例として、「A及び/又はB」への言及は、「含む」などのオープンエンドの言葉と併せて使用した場合、一実施形態ではAのみ（任意選択でB以外の要素が含まれる）、別の実施形態ではBのみ（任意選択でA以外の要素が含まれる）、さらに別の実施形態ではA及びBの両方（任意選択で他の要素が含まれる）などを指す可能性がある。

【0553】

[00560]明細書及び特許請求の範囲中で使用する「又は」には、上記定義した「及び/又は」と同じ意味が包含されると理解されるべきである。たとえば、リストの項目を分離する場合、「又は」又は「及び/又は」は、包括的であると解釈されるべきである、すなわち、数個の要素又は要素のリストの少なくとも1つが包含されるが、そのうちの複数、及び任意選択で追加の列挙していない項目も含まれる。

【0554】

[00561]明細書又は添付の特許請求の範囲中にかかわらず、本明細書中で使用する移行用語「含む (comprising)」、「含まれる (including)」、「保有する (carrying)」、「有する (having)」、「含有する (containing)」、「含む (involving)」などは、包括的又はオープンエンド（すなわち、含むがそれだけに限定されないことを意味する）であると理解され、これらは列挙していない要素、材料、又は方法ステップを排除しない。移行語句「からなる」及び「から本質的になる」のみが、特許請求の範囲及び本明細書中の例示的な実施形態の段落に関してそれぞれクロード又は部分的にクロードの移行語句である。移行語句「からなる」は、具体的に列挙していないすべての要素、ステップ、又は成分を排除する。移行語句「から本質的になる」は、範囲を指定した要素、材料、又はステップ、並びに本明細書中に開示及び／又は特許請求した本発明の基本特徴（複数可）に実質的な影響を与えないものに限定する。

10

参考文献：

- 1) Cox JC, DraneDP, Suhrbier A. Immunogenic complexes and method relating there to. CSL Ltd. EP1150710B1, filed 2000-02-17, published 2010-04-21.
- 2) Hayman WA, TothI, Flinn N, Scanlon M, Good MF. Enhancing the immunogenicity and modulating the fine epitope recognition of antisera to a helical group A streptococcal peptide vaccine candidate from the M protein using lipid-core peptide technology. *Immunol Cell Biol.* 2002 Apr;80(2):178-87.
- 3) Irvine DJ, Swartz MA, Szeto GL. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. *Nat Mater.* 2013 Nov;12(11):978-90. doi: 10.1038/nmat3775.
- 4) Karkada M, Weir GM, Quinton T, Samatur L, MacDonald LD, Grant A, Liwski R, Juskevicius R, Sinnathamby G, Philip R, Mansour M. A novel breast/ovarian cancer peptide vaccine platform that promotes specific type-1 but not Treg/Tr1-type responses. *J Immunother.* 2010 Apr;33(3):250-61. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181c1f1e9.
- 5) Karpen HE, Bukowski JT, Hughes T, Gratton JP, Sessa WC, Gailani MR. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2001 Jun 1;276(22):19503-11. Epub 2001 Mar 1.
- 6) Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007 May;121(1):1-14. Epub 2007 Mar 26.
- 7) Kovjazin R, Volovitz I, Daon Y, Vider-Shalit T, Azran R, Tsaban L, Carmon L, Louzoun Y. Signal peptides and trans-membrane regions are broadly immunogenic and have high CD8+ T cell epitope densities: Implications for vaccine development. *Mol Immunol.* 2011 Apr;48(8):1009-18. doi: 10.1016/j.molimm.2011.01.006. Epub 2011 Feb 12.
- 8) Moyle PM, Toth I. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. *Curr Med Chem.* 2008;15(5):506-16.
- 9) Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Aug 12;1451(1):1-16.
- 10) Robinson JH, Case MC, Brooks CG. Palmitic acid conjugation of a protein antigen enhances major histocompatibility complex class II-restricted presentation to T cells. *Immunology.* 1992 Aug;76(4):593-8.
- 11) Sabbatini P, Tsuji T, Ferran L, Ritter E, Sedrak C, Tuballes K, Jungbluth AA, Ritter G, Aghajanian C, Bell-McGuinn K, Hensley ML, Konner J, Tew W, Spriggs DR, Hoffman EW, Venhaus R, Pan L, Salazar AM, Diefenbach CM, Old LJ, Gnjatic S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2012 Dec 1;18(23):6497-508. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2189. E

20

30

40

50

pub 2012 Oct2.

12) Smotrys JE, Linder ME. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:559-87.

13) Stills HF Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005;46(3):280-93.

14) Tsuji T, Sabbatini P, Jungbluth AA, Ritter E, Pan L, Ritter G, Ferran L, Spriggs D, Salazar AM, Gnjatovic S. Effect of Montanide and poly-ICLC adjuvant on human self/tumor antigen-specific CD4⁺ T cells in phase I overlapping long peptide vaccine trial. *Cancer Immunol Res.* 2013 Nov;1(5):340-50. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0089. Epub 2013 Sep 16.

15) Yoo HS, Choi HK, Park TG. Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2001 Feb;90(2):194-201.

16) Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:241-69.

10

【図 1】

【図 2】

Figure 1

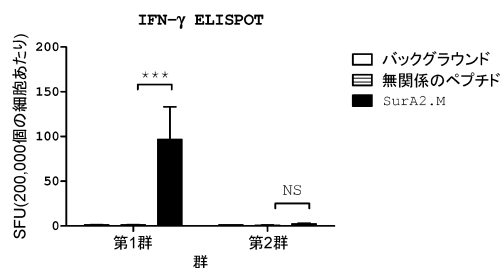
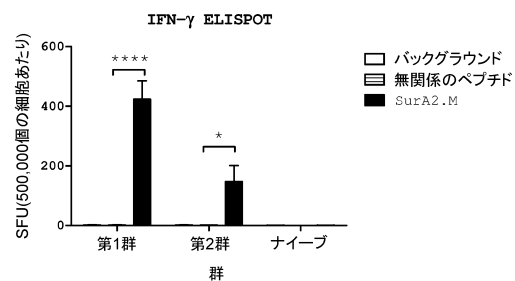
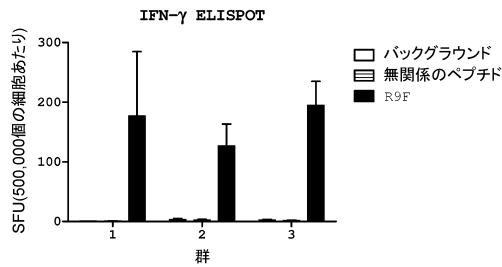


Figure 2



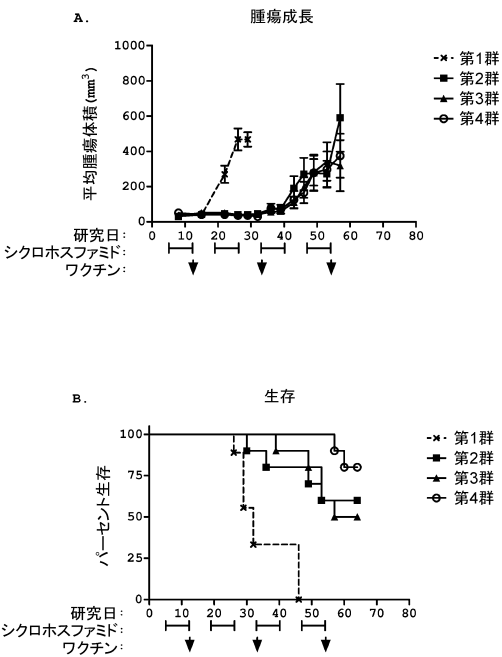
【 図 3 】

Figure 3



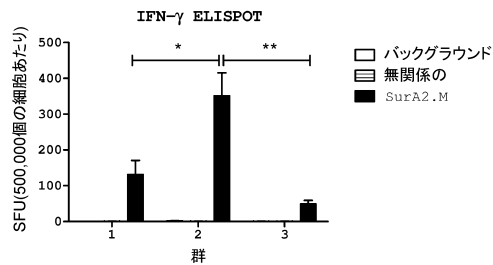
【 図 4 】

Figure 4



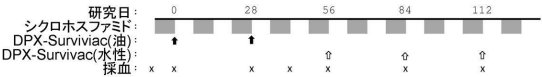
【 図 5 】

Figure 5



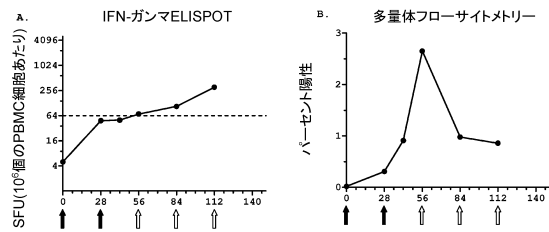
【 図 6 】

Figure 6



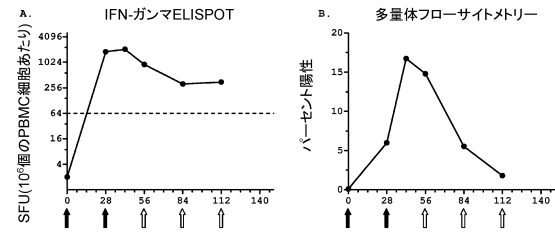
【図 7】

Figure 7



【図 8】

Figure 8



【配列表】

[0006851983000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 9/127 (2006.01)		A 6 1 K 39/12	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
		A 6 1 P 35/00	

- (72)発明者 マンスール, マーク
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー3エヌ 1エル8, ハリファックス, オールトン
ドライヴ 17
- (72)発明者 ウェア, ジェネヴィーブ メアリ
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー2ダブリュー 1エックス8, ダートマス, スプリ
ング アヴェニュー 468
- (72)発明者 サマトゥール, リーラダー
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー3エム 0エー7, ハリファックス, ファトム コ
ート 46
- (72)発明者 ラジャゴパラン, ラジカナン
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー2ダブリュー 4ジー3, ダートマス, コリンズ
グローヴ 1
- (72)発明者 スタンフォード, マリアンヌ
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー3ゼット 1エヌ3, アッパー タンタロン, パー
クリン コート 132
- (72)発明者 マクドナルド, リーサ ダイアナ
カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー3エヌ 2エル7, ハリファックス, ルーフアス
アヴェニュー 54

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 国際公開第2014/055289(WO, A1)
国際公開第2014/153636(WO, A1)
PNAS, 2010年, 107(27), 12198-12203
Virology, 2007年, 366, 197-211

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/00
A 6 1 K 9/00
A 6 1 K 47/00
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/675
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)