

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6608422号
(P6608422)

(45) 発行日 令和1年11月20日 (2019. 11. 20)

(24) 登録日 令和1年11月1日 (2019. 11. 1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/39 (2006. 01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 A
A 6 1 K 39/02 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 39/12 (2006. 01)	A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/21 (2006. 01)	A 6 1 K 39/12

請求項の数 21 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-502920 (P2017-502920)	(73) 特許権者	516285825
(86) (22) 出願日	平成27年3月25日 (2015. 3. 25)		ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド
(65) 公表番号	特表2017-515889 (P2017-515889A)		ステイツ, アズ リプレゼンティッド
(43) 公表日	平成29年6月15日 (2017. 6. 15)		バイ ザ セクレタリー オブ ジ アー
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/022461		ミー
(87) 国際公開番号	W02015/148648		アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 7
(87) 国際公開日	平成27年10月1日 (2015. 10. 1)		0 2, フォート デトリック, スコット
審査請求日	平成30年3月19日 (2018. 3. 19)		ストリート 5 0 4
(31) 優先権主張番号	61/970, 118	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成26年3月25日 (2014. 3. 25)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノホスホリルリピッド A (MPLA) 含有リボソーム組成物およびサポニンを含む非毒性アジュバント製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リボソーム二重層を有する単層リボソームを含むアジュバント製剤であって、前記リボソーム二重層は、

(a) リン脂質として、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアシルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) およびジステアシルホスファチジルグリセロール (DSPG) からなる群から選択される少なくとも 1 つのホスファチジルコリン (PC) および／またはホスファチジルグリセロール (PG)；

(b) コレステロール；

(c) モノホスホリルリピッド A (MPLA)；および

(d) サポニン

からなり、

コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比は、50：50 超であり、単層リボソームは、光散乱分析によって検出される、マイクロメーター範囲の中央値直径サイズを有する、アジュバント製剤。

【請求項 2】

前記サポニンが、QS-7、QS-18、QS-21 またはそれらの混合物から選択される、請求項 1 に記載のアジュバント製剤。

【請求項 3】

前記サポニンが、Q S - 2 1 である、請求項 1 または請求項 2 のいずれかに記載のアジュバント製剤。

【請求項 4】

前記コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比が、5 5 : 4 5 ~ 7 1 : 2 9 の範囲にある、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

【請求項 5】

前記コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比が、5 5 : 4 5 である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

【請求項 6】

前記リン脂質が、ジミリストイルホスファチジルコリン (D M P C) を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

【請求項 7】

前記リン脂質が、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (D M P G) をさらに含む、請求項 6 に記載のアジュバント製剤。

【請求項 8】

前記リン脂質が、P C および P G の両方を含み、前記 P C 対前記 P G (m o l / m o l) の比が、約 0 . 5 : 1、約 1 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、約 1 0 : 1、約 1 1 : 1、約 1 2 : 1、約 1 3 : 1、約 1 4 : 1 または約 1 5 : 1 である、請求項 1 に記載のアジュバント製剤。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤およびリン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 を含むリポソーム懸濁液であって、

(i) 1 . 2 7 2 m M ~ 5 0 m M のリン脂質 (a)、および

(i i) 約 5 m g / m l 以下、約 4 m g / m l 以下、約 3 m g / m l 以下、約 2 m g / m l 以下、約 1 m g / m l 以下、約 0 . 9 m g / m l 以下、約 0 . 8 m g / m l 以下、約 0 . 7 m g / m l 以下、約 0 . 6 m g / m l 以下、約 0 . 5 m g / m l 以下、約 0 . 4 m g / m l 以下、約 0 . 3 m g / m l 以下、約 0 . 2 m g / m l 以下、約 0 . 1 m g / m l 以下、約 0 . 0 9 m g / m l 以下、約 0 . 0 8 m g / m l 以下、約 0 . 0 7 m g / m l 以下、約 0 . 0 6 m g / m l 以下、約 0 . 0 5 m g / m l 以下、約 0 . 0 4 m g / m l 以下、約 0 . 0 3 m g / m l 以下、約 0 . 0 2 m g / m l 以下または約 0 . 0 1 m g / m l 以下の M P L A (c) を含む、リポソーム懸濁液。

【請求項 1 0】

前記 M P L A (c) 対リン脂質 (a) のモル比が、約 1 : 5 . 6 ~ 約 1 : 8 8 0 または約 1 : 8 8 ~ 約 1 : 2 2 0 である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

【請求項 1 1】

請求項 1 から 8 および 1 0 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤およびリン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 を含むリポソーム懸濁液であって、

(i) 1 . 2 7 2 m M ~ 5 0 m M のリン脂質 (a)、および

(i i) 約 1 m g / m l 以下、約 0 . 9 m g / m l 以下、約 0 . 8 m g / m l 以下、約 0 . 7 m g / m l 以下、約 0 . 6 m g / m l 以下、約 0 . 5 m g / m l 以下、約 0 . 4 m g / m l 以下、約 0 . 3 m g / m l 以下、約 0 . 2 m g / m l 以下、約 0 . 1 m g / m l 以下、約 0 . 0 9 m g / m l 以下、約 0 . 0 8 m g / m l 以下、約 0 . 0 7 m g / m l 以下、約 0 . 0 6 m g / m l 以下、約 0 . 0 5 m g / m l 以下、約 0 . 0 4 m g / m l 以下、約 0 . 0 3 m g / m l 以下、約 0 . 0 2 m g / m l 以下または約 0 . 0 1 m g / m l 以下のサポニン (d) を含む、リポソーム懸濁液。

【請求項 1 2】

(i) 免疫原および

(i i) 請求項 1 から 8 および 1 0 のいずれか一項に記載のアジュバント製剤または請

10

20

30

40

50

求項 9 または 11 に記載のリボソーム懸濁液を含む免疫原性組成物。

【請求項 13】

生理学的に許容される媒体をさらに含む、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

前記免疫原が、天然に存在するまたは人工的に創り出されるタンパク質、組換えタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、炭水化物、ハプテン、全ウイルス、細菌、原生動物およびウイルス様粒子からなる群から選択される、請求項 12 または請求項 13 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記免疫原が、HIV-1 エンベロープタンパク質である、請求項 14 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

動物を免疫するためのワクチンとして使用するための、請求項 12 から 15 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

アジュバントとしてのサポニンの毒性を低減する、またはアジュバント製剤を調製する方法であって、

モノホスホリルリピッド A (MPLA) 含有リボソーム組成物を、前記サポニンに加えてリボソーム二重層を有する単層リボソームを形成する工程を含み、

前記リボソーム二重層は、

(a) リン脂質として、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアリルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) およびジステアリルホスファチジルグリセロール (DSPG) からなる群から選択される少なくとも 1 つのホスファチジルコリン (PC) および／またはホスファチジルグリセロール (PG)；

(b) コレステロール；

(c) モノホスホリルリピッド A (MPLA)；および

(d) サポニン

からなり、

コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比は、50：50 超であり、

単層リボソームは、光散乱分析によって検出される、マイクロメーター範囲の中央値直径サイズを有する、方法。

【請求項 18】

前記サポニンが、QS-7、QS-18、QS-21 およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記サポニンが、QS-21 である、請求項 17 または請求項 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

前記コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比が、55：45～71：29 の範囲にある、請求項 17 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記コレステロール (b) 対リン脂質 (a) のモル比が、55：45 である、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、その全体が本明細書に組み込まれる、2014年3月25日に出願された米国仮出願第61/970,118号の利益を主張する。

【0002】

米国政府の権利

本開示の実施形態の開発中に行われた研究の一部は、米国国防総省付与番号W81XWH-07-2-0067による米国政府の資金を利用した。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

10

【0003】

分野

本明細書に記載されているものは、モノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リボソームおよび少なくとも1種のサポニン、例えば、QS-21を含む組成物に関する。リボソームは、i) 炭化水素鎖が23℃以上の水中融解温度を有するリン脂質を含む脂質二重層 (lipid bilayer comprising phospholipids) およびii) コレステロールを約50% (mol/mol) を超えるモルパーセント濃度で含む。

【背景技術】

【0004】

背景

20

現代の多くのワクチンが最適な有益効果をもたらすには、注射後に全身の安全性および最小限の副反応を維持しながら免疫応答を強化するワクチンアジュバントの使用を必要とする。リポ多糖類 (LPS) は、グラム陰性細菌の外膜の外葉の主要な表面分子であり、外葉にのみ存在している。LPSは、血清中の補体および食細胞による細菌の破壊を妨げ、コロニー形成のための付着に関与している。LPSは、リピッドAを含有する、およそ10、000ダルトンの構造的に関連のある複合分子の1群であり、リピッドAは、LPSの最も内側の領域にあり、疎水性のアンカーとしての役割を果たし、長鎖脂肪酸を有するリン酸化グルコサミン二糖単位を含む。

【0005】

致死毒性、発熱原性およびアジュバント活性などの、LPSの生物学的活性は、リピッドA部分に関連していることが示されている。LPSおよびリピッドAの両方は、それらの強力なアジュバント効果が昔から知られているが、これらの分子の高い毒性によって、ワクチン製剤における使用が制限されてきた。それらのアジュバント活性を維持しながら、LPSまたはリピッドAの毒性を低減する方向に、かなりの科学的努力が行われてきた。

30

【0006】

一般的に使用されている他の非ヒトアジュバントは、キラヤ (Quillaja) サポニンであり、これは、キラヤ・サポナリア (Quillaja saponaria) の樹皮から抽出される、両親媒性のトリテルペン配糖体の混合物である。粗サポニンは、動物用のアジュバントとして用いられてきた。Quil-Aは、キラヤ (Quillaja) サポニン原料の部分精製された水性抽出物であり、QS-21は、Quil-AのHPLC精製された画分である。QS-21 (QA21と称される) を生成する方法は、米国特許第5,057,540号明細書に開示されている。しかし、使用するQS-21などのサポニンの主要な副作用の1つは、その細胞毒性である。具体的には、正確な細胞毒性機構は現在のところ知られていないが、サポニンは、赤血球の破壊または溶解である溶血を引き起こす。

40

【0007】

必要とされているものは、免疫応答を強化するが関連した細胞毒性を有しないアジュバントを含む、ワクチン送達組成物である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

【0008】

要旨

よって、当技術分野において、より強力であると同時により安全なアジュバント製剤を開発することが依然として必要とされている。本明細書において、モノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リポソーム (L (MPLA)) 組成物およびサポニンを含み、リピッドAまたはサポニンの最小限の毒性を示すアジュバント製剤が提供される。

【0009】

よって、モノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リポソーム組成物および少なくとも1種のサポニンを含むアジュバント製剤であって、リポソーム組成物は、i) 炭化水素鎖が23℃以上の水中融解温度を有するリン脂質で構成された脂質二重層 (lipid bilayer composing phospholipids) およびii) コレステロールを約50% (mol/mol) を超えるモルパーセント濃度で含む、アジュバント製剤が提供される。サポニンは、QS-7、QS-18、QS-21またはそれらの混合物から選択され得る。好ましくは、サポニンは、QS-21であり得る。

10

【0010】

一態様では、アジュバント製剤のリポソーム組成物は、コレステロールを約55%～約71% (mol/mol) または好ましくは約55% (mol/mol) のモルパーセント濃度で含む得る。アジュバント製剤のリポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびジステアリルホスファチジルコリン (DSPC) からなる群から選択されるホスファチジルコリン (PC) を含む得る。

20

【0011】

あるいは、アジュバント製剤のリポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) およびジステアリルホスファチジルグリセロール (DSPG) からなる群から選択されるホスファチジルグリセロール (PG) を含む得る。アジュバント製剤のリポソーム組成物は、PC対PG (mol/mol) の比が、約0.5:1、約1:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、約10:1、約11:1、約12:1、約13:1、約14:1または約15:1であり得る。アジュバント製剤のリポソーム組成物は、多層小胞 (MLV) または小型単層小胞 (SUV) を含んでよく、小型単層小胞は、直径が約50～約100nmであり、多層小胞は、直径が約1～約4μmである。

30

【0012】

別の態様では、アジュバント製剤のリポソーム組成物は、約5mg以下、約4mg以下、約3mg以下、約2mg以下、約1mg以下、約0.9mg以下、約0.8mg以下、約0.7mg以下、約0.6mg以下、約0.5mg以下、約0.4mg以下、約0.3mg以下、約0.2mg以下、約0.1mg以下、約0.09mg以下、約0.08mg以下、約0.07mg以下、約0.06mg以下、約0.05mg以下、約0.04mg以下、約0.03mg以下、約0.02mg以下または約0.01mg以下のMPLA (リポソーム懸濁液1ml当たりの総重量) を含む得る。アジュバント製剤のリポソーム組成物は、約1:5.6～約1:880または約1:88～約1:220のMPLA:リン脂質モル比を有し得る。

40

【0013】

さらなる態様では、アジュバント製剤は、約1mg以下、約0.9mg以下、約0.8mg以下、約0.7mg以下、約0.6mg以下、約0.5mg以下、約0.4mg以下、約0.3mg以下、約0.2mg以下、約0.1mg以下、約0.09mg以下、約0.08mg以下、約0.07mg以下、約0.06mg以下、約0.05mg以下、約0.04mg以下、約0.03mg以下、約0.02mg以下または約0.01mg以下の含量のサポニン (リポソーム懸濁液1ml当たりの総重量) を有し得る。

【0014】

50

免疫原およびアジュバント製剤を含む免疫原性組成物も提供される。免疫原性組成物は、典型的には、生理学的に許容される媒体を含み得る。免疫原性組成物の免疫原は、天然に存在するまたは人工的に創り出されるタンパク質、組換えタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、炭水化物、ハプテン、全ウイルス (whole virus)、細菌、原生動物およびウイルス様粒子からなる群から選択され得る。好ましくは、免疫原性組成物の免疫原は、H I V-1 エンベロープタンパク質であり得る。免疫原性組成物を投与する工程を含む、動物を免疫する方法も提供される。

【0015】

アジュバントとしてのサポニンの毒性を低減する、またはアジュバント製剤を調製する方法であって、モノホスホリルリピッド A (MPLA) 含有リポソーム組成物を、サポニンに
10
加える工程を含み、リポソーム組成物は、i) 炭化水素鎖が 23 °C 以上の水中融解温度を有するリン脂質を含む脂質二重層および ii) コレステロールを約 50 % (mol/mol) を超えるモルパーセント濃度で含む、方法がさらに提供される。サポニンは、QS-7、QS-18、QS-21 およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。好ましくは、サポニンは、QS-21 であり得る。リポソーム組成物は、コレステロールを約 55 % ~ 約 71 % (mol/mol)、好ましくは、約 55 % (mol/mol) のモルパーセント濃度で含み得る。

【0016】

添付の図面は、本開示に組み込まれ、種々の実施形態の限定されない説明を提供するものである。
20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、実施例1に記載されているように、種々の QS-21 濃度 (図1A: 10 μg/ml QS-21; 図1B: 50 μg/ml QS-21) を有するリポソーム組成物の溶血活性を描くグラフである。

【図2】図2は、実施例1に記載されているように、リポソームとともに予備インキュベートされた QS-21 による赤血球の溶血を描くグラフである。QS-21 は、総計 5 μmol のリン脂質を含有する DMPC/DMPG リポソームと 22 °C で混合した。リポソームは、33.7、43 または 55 mol % Chol も含有した。

【図3】図3は、実施例1に記載されているように、リポソームとともに予備インキュベートされたサポニンによる赤血球の溶血を描くグラフである。
30

【図4】図4は、リポソーム中 MPLA (liposomal MPLA) によるリポソーム中 Chol への QS-21 の結合の障害を描くグラフである。実験は、実施例2に記載されているように実施された。平均 ± S. D. は、L を有する 14 個の独立したリポソームバッチおよび L (MPLA) を有する 4 個の独立したバッチを用いて示されている。

【図5】図5は、リン脂質の脂肪酸アシル鎖長が QS-21 の結合に対するリポソーム中 Chol の接近可能性に及ぼす影響を描くグラフである。実験は、実施例2に記載されているように実施された。図5Aは、33.7 mol % Chol を有し、MPLA を有さないリポソームの結果を説明するグラフである。図5Bは、55 mol % Chol を有し、MPLA を有さないリポソームの結果を説明するグラフである。図5Cは、55 mol %
40
Chol および MPLA を有するリポソームの結果を説明するグラフである。

【図6】図6は、MPLA による DMPC/DMPG リポソーム間の Chol 移動の障害を描くグラフである。MPLA を含有しない (図6A) または MPLA を含有する (MPLA: リン脂質 = 1: 5.6) (図6B) リポソームへ結合する QS-21 によって、Chol 移動を検出した。

【図7】図7は、リポソーム中 Chol 含量の増加による DMPC/DMPG/Chol/MPLA リポソームの LAL 陽性度 (positivity) の抑制を描くグラフである。図7Aは、33.7 mol % Chol を含有するリポソームへの LAL 結合の結果を示すグラフであり、図7Bは、55 mol % Chol を含有するリポソームへの LAL 結合の結果を示すグラフである。
50

【図8】図8は、QS-21の非存在下（図8A）および存在下（図8B）（ALFQ）で、ALF SUVおよびALF MLVの光散乱によって測定された典型的なサイズ分布を描くグラフである。図8Aにおいて、SUVの2つの曲線は、MPLA：リン脂質比が1：88または1：5.6であるリポソームから構成された。MLVの2つの曲線は、（左から右に）MPLA：リン脂質比が1：220または1：88であるリポソームから構成された。図8Bにおいて、曲線は、最初のALFが、（左から右に）それぞれ、MPLA：リン脂質比が1：220であるMLV；およびMPLA：リン脂質比が1：88および1：5.6であるSUVから構成されたALFQを表す。

【図9】図9は、gp140に対するIgGの終点力価（endpoint titer）を描くグラフである。示されているMPLA：リン脂質モル比を含有し、各製剤には20 μgのMPLAが存在する、ALF+CN gp140（図9A）およびALFQ+CN gp140（図9B）で、マウスを免疫した。血清は9週目由来のものであり、ELISAによってアッセイした。値は、1群につき動物6匹の平均±標準偏差である。

【図10-1】図10は、実施例4ならびに原料および方法に記載されているように、抗-gp140抗血清のIgGサブタイプのプロファイルを描くグラフである。マウスをALF+gp140（図10A）またはALFQ+gp140（図10B）で免疫した。ELISAプレートでgp140でコーティングした。サブタイプ分析を実施し、値を標準曲線から算出した。各パネルは、9週目の免疫マウスからの1群由来の貯留血清を表す。

【図10-2】図10は、実施例4ならびに原料および方法に記載されているように、抗-gp140抗血清のIgGサブタイプのプロファイルを描くグラフである。マウスをALF+gp140（図10A）またはALFQ+gp140（図10B）で免疫した。ELISAプレートでgp140でコーティングした。サブタイプ分析を実施し、値を標準曲線から算出した。各パネルは、9週目の免疫マウスからの1群由来の貯留血清を表す。

【図11】図11は、一次免疫後9週目のマウス由来の脾細胞によるIFN-γ（図11A）およびIL-4（図11B）の産生を描くグラフである。脾細胞をプレーティングし、gp140 CN54で18時間刺激し、サイトカインを産生している細胞の数を、ELISPOTによって決定した。縦軸は、6動物／群の平均を表す（未処置：非免疫対照マウス）。

【図12】図12は、貯留抗血清によるHIVの中和を描くグラフである。ワクチン製剤がX-軸上に示されている。ID50値は、一次免疫後9週目のマウス由来の血清サンプルの示されている希釈での、偽ウイルスMW965.26PV（図12A）およびGS015PV（図12B）の50%中和を表す。対照は、非免疫マウス由来の血清であった。20未満のID50値は、バックグラウンドとみなした。MuLV PVは、アッセイの陰性対照として使用した（データは示さず）。

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

1. 定義および略語

1. 1. 略語および頭文字

ABTS 2, 2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）

ALF Army リポソーム製剤

ALFQ ALF+QS-21

BCIP 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸

Chol コレステロール

cRPMI 完全RPMI 1640培地

DMEM ダルベッコ変法イーグル培地

DMPC ジミリストイルホスファチジルコリン

DMPG ジミリストイルホスファチジルグリセロール

DPPC ジパルミトイルホスファチジルコリン

10

20

30

40

50

D S P C	ジステアロイルホスホコリン
E L I S A	酵素結合免疫吸着アッセイ
E L I S P O T	酵素結合免疫スポット
F B S	ウシ胎仔血清
H R P	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
I D 5 0	血清の50%阻害希釈
I F N - γ	インターフェロン- γ
I L - 4	インターロイキン-4
L (M P L A)	モノホスホリルリピッドA (M P L A) 含有リポソーム
L A L	カプトガニ血球抽出成分
L P S	リポ多糖類
M L V	多層小胞
M P L A	モノホスホリルリピッドA
M u L V	マウス白血病ウイルス
N B T	ニトロブルーテトラゾリウム
P B S	リン酸緩衝生理食塩水
P C	ホスファチジルコリン
P G	ホスファチジルグリセロール
P H A	フィトヘマグルチニン
S U V	小型単層小胞

10

20

【0019】

1. 2. 定義

「免疫原」は、体液性および／または細胞性免疫応答を誘導することができる物質である。本明細書に記載されているような免疫原は、抗原、ハプテンまたは不活化病原体であり得る。本明細書に記載されているような免疫原性組成物は、例えば、ワクチン製剤であり得る。

【0020】

本明細書において使用される「リポソーム」は、閉じ込められた水性容積を含有する閉じた二重膜を指す。リポソームはまた、単一膜二重層を有する単層小胞であり得るまたは多重膜二重層を有し、それぞれが水性層によって隣と分離されている多層小胞であり得る。得られた膜二重層の構造は、脂質の疎水性（非極性）の尾部が二重層の中央方向に配向され、親水性（極性）の頭部が水性相方向に配向しているものである。リポソームは、それらが通常使用される場合、スメクチック中間層からなり、リン脂質または非リン脂質のスメクチック中間層からなり得る。スメクチック中間層は、Small, HANDBOOK OF LIPID RESEARCH, Vol. 4, Plenum, NY, 1986, pp. 49-50によって、最も正確に記載されている。Smallによると、「与えられた分子が加熱されると、融解して直ちに等方性液体になる代わりに、むしろそれは中間層または液晶と呼ばれる中間状態を通過し得る。この状態は、いくつかの方向には秩序が残っているが、他の方向では秩序が失われていることを特徴とする……。一般に、液晶の分子は、幅広いというよりも幾分長く、分子の縦方向に沿ったある場所に、極性または芳香族部分を有する。分子の形および極性－極性または芳香族の相互作用によって、分子は、部分的に秩序を保った配置に整列することができる……。これらの構造は、一端に極性基を有する分子において特徴的に生じる。分子の長軸方向に長距離秩序を有する液晶は、スメクチック液晶、層状液晶またはラメラ液晶と呼ばれる……。スメクチック状態では、分子は単層または二重層の状態であり、層面に対して垂直または傾いており、凝固したまたは融解した脂肪族鎖を有し得る。」

30

40

【0021】

リピッドAは、一組の複雑な、大いにアシル化およびアミド化されたジグルコサミン二リン酸エステル分子であり、グラム陰性細菌由来のすべてのリポ多糖類（L P S；エンドトキシンとしても知られている）に共通している脂質部分である。L P Sは、すべてのグラム陰性細菌の外表面のほぼ全体を覆っており、リピッドAは、L P Sを細菌の脂質の外

50

表面に繋ぎ留めている。野生型のスムーズ型細菌におけるLPSのO-多糖部分は、ラフ型変異体に発現される比較的保存されたコアオリゴ糖に結合されており、これは次に、時には細菌の生存に必要とされ、LPSにおいてのみ見出される独特の化学構造である高度に保存された2-ケト-3-デオキシオクタン酸糖を介して、リピッドAに結合されている。例えば、Alving et al., 2012, Expert Rev. Vaccines 11: 733-44を参照のこと。「モノホスホリルリピッドA」は、リピッドAの類似物であり、頭部極性基上のグルコサミン-1-リン酸基が取り除かれている。MPLAの類似物も多数存在する。

【0022】

本明細書において使用されるリポソーム組成物の「コレステロールのモルパーセント濃度」は、リポソーム組成物の調製に最初に使用される、Chol:総リン脂質（すなわち、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルグリセロール）の比を指す。

10

【0023】

本明細書において使用される「生理学的に許容される媒体」は、in vivo投与（例えば、経口、経皮または非経口投与）またはin vitroでの使用、すなわち、細胞培養に適した媒体を指す。例示的な生理学的に許容される媒体は、米国特許第4,186,183号明細書および同第4,302,459号明細書に開示されているような、リポソームの生理学的に許容される成分であることができる。

【0024】

本明細書において使用される「好ましい」および「好ましくは」は、欧州のみにおける請求項の解釈のためのものと解釈されるべきである。この用語は、それらが米国の請求項の解釈のために現れる文およびパラグラフの解釈から、除外または削除されるべきである。

20

【0025】

本明細書において使用される「約」は、言及されている値の±5%を指す。

【0026】

他に特に定義されない限り、本明細書において使用される科学技術用語はすべて、当業者によって共通に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書において使用される場合、単数形「a」、「and」および「the」は、文脈が他に特に明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことが留意されなければならない。したがって、例えば、「抗体」への言及は、複数のそのような抗体を含み、「投与量(dosage)」への言及は、1回または複数の投与量および当業者に知られているその等価物などへの言及を含む。

30

【0027】

2. サポニン

本実施形態に関して、適したサポニンは、Quil A、その誘導体またはその精製された任意の成分（例えば、QS-7、QS-18、QS-21またはそれらの混合物）である。Quil Aは、南米の樹木であるキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)から単離されるサポニン調製物であり、アジュバント活性を有することが最初に見出された。Dalsgaard et al., 1974, Archiv. fur die gesamte Virusforschung, 44: 243-254。Quil Aの精製された断片は、HPLCによって単離されており（欧州特許第0362278号明細書）、例えば、QS-7およびQS-21（それぞれQA7およびQA21としても知られている）などを含む。QS-21は、CD8+細胞傷害性T細胞(CTLs)、Th1細胞および優れたIgG2a抗体応答を誘導することが示されている。

40

【0028】

3. モノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リポソーム (L(MPLA))

リポソームは、閉じ込められた水性容積を含有する閉じた二重膜である。リポソームはまた、単一膜二重層を有する単層小胞であり得るまたは多重膜二重層を有し、それぞれが水性層によって隣と分離されている多層小胞であり得る。得られた膜二重層の構造は、脂質の疎水性（非極性）の尾部が二重層の中央方向に配向され、親水性（極性）の頭部が水性相方向に配向しているものである。リポソームを囲むための適した親水性ポリマーは、

50

限定されることなく、米国特許第6, 316, 024号明細書、同第6, 126, 966号明細書、同第6, 056, 973号明細書および同第6, 043, 094号明細書に記載されているような、PEG、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリアスパルタミドおよび親水性ペプチド配列を含む。リポソームは、親水性ポリマーを用いずに作製することができる。それ故に、リポソーム製剤は、親水性ポリマーを含有しても、含有しなくてもよい。

10

【0029】

リポソームは、当技術分野において知られている任意の脂質または脂質の組合せから構成され得る。例えば、小胞を形成する脂質は、米国特許第6, 056, 973号明細書および同第5, 874, 104号明細書に開示されているような、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイルノシトールおよびスフィンゴミエリンなどの、リン脂質を含む、天然に存在するまたは合成の脂質であり得る。

【0030】

小胞を形成する脂質はまた、米国特許第6, 056, 973号明細書にも開示されているような、1, 2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアミノ)プロパン(DOTAP)、N-[1-(2, 3-ジテトラデシルオキシ)プロピル]-N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)、N-[1-[(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DORIE)、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、3[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DCChol)またはジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)などの、糖脂質、セレブロシドまたは陽イオン性脂質であり得る。コレステロールはまた、米国特許第5, 916, 588号明細書および同第5, 874, 104号明細書に開示されているように、リポソーム小胞に安定性を付与する適切な範囲に存在し得る。追加的なリポソームの技術は、米国特許第6, 759, 057号明細書、同第6, 406, 713号明細書、同第6, 352, 716号明細書、同第6, 316, 024号明細書、同第6, 294, 191号明細書、同第6, 126, 966号明細書、同第6, 056, 973号明細書、同第6, 043, 094号明細書、同第5, 965, 156号明細書、同第5, 916, 588号明細書、同第5, 874, 104号明細書、同第5, 215, 680号明細書および同第4, 684, 479号明細書に記載されている。これらは、リポソームおよび脂質コーティングされた超微粒気泡ならびにそれらの製造方法を記載していた。したがって、当業者は、本開示およびこれらの他の特許の開示の両方を考慮して、本実施形態の目的のためのリポソームを生成することができた。本実施形態に関して、リポソーム組成物は、典型的には、約1 mM〜約150 mMのリン脂質を含有する。

20

30

40

【0031】

以上の例示的なリポソームはいずれも、モノホスホリルリピッドA(MPLA)を含むまたは他のリポソームおよびリピッドA(MPLA)と組み合わせることができる。MPLAは単独で、ヒトおよび動物に対して毒性であり得る。しかし、リポソーム中に存在する場合、毒性は検出されない。例えば、Alving et al., 2012を参照のこと。本明細書に記載されているような、MPLAを含むリポソームの調製のための例示的な手順は、少なくともAlving et al., 2012に教示されている。MPLAは、強力なアジュバントとしての役割を果たし、リポソームおよびリポソームと関連するペプチド、タンパク質またはハプテンの免疫原性を高める役割を果たす。

【0032】

50

本実施形態に関して、典型的なモノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リポソーム (L (MPLA)) は、もともとはWalter Reedリポソームと称されるものであるが、今ではワクチンアジュバントとして、Armyリポソーム製剤 (ALF) として知られているものである。例えば、Alving et al., 2012を参照のこと。ALFアジュバントリポソームは、(1) 炭化水素鎖が23℃以上の水中融解温度を有するリン脂質、通常はジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) およびジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) を含む脂質二重層; (2) 安定化剤としてのコレステロール; および (3) 免疫賦活物質としてのモノホスホリルリピッドA (MPLA) を含む。ヒトを対象とした臨床試験において、ALF型リポソームアジュバントは、マラリア、HIV-1 およびがんに対するワクチン候補の中で、安全かつ強力であることが分かった。例えば、Fries et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 358-62; Alving, 2002, Vaccine, 20: S56-64を参照のこと。ALFにQS-21を加えてALFQを形成するALFの特定の組成物は、コレステロールを約50% (mol/mol) を超えるモルパーセント濃度で、好ましくは約55%~約71% (mol/mol) またはより好ましくは約55% (mol/mol) のモルパーセント濃度で含む。

10

【0033】

本実施形態に関して、L (MPLA) は、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) およびジステアрилホスファチジルコリン (DSPC) からなる群から選択されるホスファチジルコリン (PC) を含む得る。L (MPLA) は、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) およびジステアрилホスファチジルグリセロール (DSPG) から選択されるホスファチジルグリセロール (PG) も含む得る。リポソームのPC対PG比 (mol/mol) は、約0.5:1、約1:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、約10:1、約11:1、約12:1、約13:1、約14:1または約15:1であり得る。リポソームは、約5mg以下、約4mg以下、約3mg以下、約2mg以下、約1mg以下、約0.9mg以下、約0.8mg以下、約0.7mg以下、約0.6mg以下、約0.5mg以下、約0.4mg以下、約0.3mg以下、約0.2mg以下、約0.1mg以下、約0.09mg以下、約0.08mg以下、約0.07mg以下、約0.06mg以下、約0.05mg以下、約0.04mg以下、約0.03mg以下、約0.02mg以下または約0.01mg以下の含量のMPLA (リポソーム懸濁液1ml当たりの総重量) を有し得る。あるいは、リポソームは、約1:5.6~約1:880、好ましくは約1:88~約1:220のMPLA:リン脂質モル比を有し得る。リポソームは、多層小胞 (MLV) または小型単層小胞 (SUV) を含む得る。小型単層小胞は、直径が約50~約100nmであり得るが、多層小胞は、直径が約1~約4μmであり得る。

20

30

【0034】

4. リポソームおよびサポニンを含むアジュバント製剤

AS01として知られている (AS01BまたはAS01Eとしても知られている) アジュバント製剤は、これまでにGlaxoSmithKlineによって売り出された。AS01では、脂質二重層は、ジオレオイルホスファチジルコリン、コレステロール、MPLAおよびQS-21などの室温で「非結晶性」である中性脂肪から構成されていた。米国特許出願公開第2011/0206758号明細書を参照のこと。AS01の製造中に、小型単層リポソーム小胞 (SUV) が最初に創り出され、次いで、精製されたQS-21がSUVに加えられる。QS-21は、それがリポソーム中コレステロールに結合し、その場所でそれが貫通 (穴) をもたらすまたはリポソームに他の永久的な構造変化をもたらすという点において、独特の特性を付与する。例えば、Paepenmuller et al., 2014, Int. J. Pharm., 475: 138-46を参照のこと。遊離QS-21の量が減少されると、遊離QS-21によって頻繁に引き起こされる注射局所疼痛を恐らく軽減させることになる。例えば、Waite et al., 2001, Vaccine, 19: 3957-67; Mbawuik et al., 2007, Vaccine, 25: 3263-69を参照のこと。AS01製剤は、「さらに強いT細胞媒介性免疫応答の誘

40

50

導が必要とされる場合のワクチンのために」創り出された。Garcon et al., 2007, Expert. Rev. Vaccines, 6: 723-39を参照のこと。A S O 1 製剤は、種々のワクチンのためのアジュバントとして開発されている。Garcon & Mechelen, 2011, Expert. Rev. Vaccines, 10: 471-86を参照のこと。A S O 1 製剤は、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 0 6 7 5 8 号明細書に記載されているように、コレステロール（ステロール）を 1 ~ 5 0 % (m o l / m o l)、好ましくは 2 0 ~ 2 5 % (m o l / m o l) のモルパーセント濃度で含有し得る。

【0035】

本開示に記載されているように、Q S - 2 1 を A L F リポソームに加えると（結果として A L F + Q S - 2 1、または「A L F Q」となり）、リポソーム膜の膜生化学および物理学的構造に複雑な変化をもたらすことになる。M P L A：リン脂質比ならびに Q S - 2 1、M P L A およびコレステロールの相対的なモル濃度およびモル比などの因子は、M P L A およびコレステロールの可視性に影響を及ぼした。これらの因子は、付近の赤血球の溶血によって決定されるように、加えられた Q S - 2 1 の相対毒性に影響を及ぼした。

【0036】

本実施形態に関して、アジュバント製剤は、モノホスホリルリピッド A (M P L A) 含有リポソーム組成物および少なくとも 1 種のサポニンを含み、リポソーム組成物は、i) 炭化水素鎖が 2 3 °C 以上の水中融解温度を有するリン脂質（例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン (D M P C) および／またはジミリストイルホスファチジルグリセロール (D M P G)）を含む脂質二重層および i i) コレステロールを約 5 0 % (m o l / m o l) を超えるモルパーセント濃度で、または好ましくは約 5 5 % ~ 約 7 1 % (m o l / m o l) またはより好ましくは約 5 5 % (m o l / m o l) のモルパーセント濃度で含む。少なくとも、これらの 2 つの特徴は、以上に論じられている A S O 1 のものとは異なる。サポニンは、Q S - 7、Q S - 1 8、Q S - 2 1 もしくはそれらの混合物から選択され得る、またはサポニンは、好ましくは Q S - 2 1 であり得る。アジュバント製剤は、リポソーム懸濁液 1 m l 当たり、約 1 m g 以下、約 0 . 9 m g 以下、約 0 . 8 m g 以下、約 0 . 7 m g 以下、約 0 . 6 m g 以下、約 0 . 5 m g 以下、約 0 . 4 m g 以下、約 0 . 3 m g 以下、約 0 . 2 m g 以下、約 0 . 1 m g 以下、約 0 . 0 9 m g 以下、約 0 . 0 8 m g 以下、約 0 . 0 7 m g 以下、約 0 . 0 6 m g 以下、約 0 . 0 5 m g 以下、約 0 . 0 4 m g 以下、約 0 . 0 3 m g 以下、約 0 . 0 2 m g 以下または約 0 . 0 1 m g 以下のサポニンを含有し得る。

【0037】

本実施形態のアジュバント製剤は、免疫原と混合して、免疫原性組成物、例えば、ワクチン製剤を得るために使用され得る。免疫原性組成物は、生理学的に許容される媒体、例えば、米国特許第 5, 8 8 8, 5 1 9 号明細書に記載されているものの任意の 1 つを含み得る。免疫原性組成物は、天然に存在するもしくは人工的に創り出されるタンパク質、組換えタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、炭水化物、ハプテン、全ウイルス、細菌、原生動物またはウイルス様粒子を免疫原として含み得る。免疫原性組成物は、H I V - 1 エンベロープタンパク質、例えば、g p 1 4 0 であり得る。免疫原性製剤は、インフルエンザ、H I V - 1、A 型肝炎、B 型肝炎、ヒト乳頭腫ウイルス、A 型髄膜炎菌性髄膜炎、B 型髄膜炎菌性髄膜炎、C 型髄膜炎菌性髄膜炎、破傷風、ジフテリア、百日咳、ポリオ、B 型インフルエンザ菌 (Haemophilus influenza)、デング熱、手足口病、腸チフス、肺炎球菌 (Pneumococcus)、日本脳炎ウイルス、炭疽、带状疱疹、マラリア、ノロウイルスまたはがんのためのワクチンとして、適切に使用され得る。

【実施例】

【0038】

以下の実施例は、本開示のある特定の代表的な実施形態および態様を実証し、さらに説明するために提供されるものであり、本明細書または特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0039】

10

20

30

40

50

原料および方法

脂質、サポニンおよび他の試薬

ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) および合成モノホスホリリピッド A (MPLA) (PHAD (商標)) を、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から購入した。DMPC および Chol は、新たに蒸留されたクロロホルムに溶解し、DMPG および MPLA は、クロロホルム：メタノール (9：1) に溶解した。精製された QS-21 (Desert King International San Diego, CA, USA) は、PBS 中に 1 mg/ml で溶解した。サポニンは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

10

【0040】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヒツジ抗マウス IgG HRP を、The Binding Site から購入した (カタログ番号 AP272)。HRP 結合ヤギ抗マウス IgG1 (A90-105P)、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG2a (A90-107P)、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG2b (A90-109P)、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG3 (A90-111P) ならびに精製されたマウス IgG1 (MI10-102)、IgG2a (MI10-103)、IgG2b (MI10-104) および IgG3 (MI10-105) は、Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) から購入した。非コンジュゲートヤギ抗マウス IgG Fab (1015-01) は、Southern Biotech (Birmingham, AL, USA) からであった。精製された抗マウス IFN- γ (51-2525KZ)、精製されたラット抗マウス IL-4 (BVD4-1D11)、ビオチン-標識抗マウス IFN- γ (51-1818KA) およびビオチン-標識ラット抗マウス IL-4 (BVD6-24G2) は、BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入した。

20

【0041】

10% ウシ胎仔血清 (FBS)、100 単位/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン および 2 mM L-グルタミンを含有するダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は、TZM.b1 細胞を培養するためおよび HIV-1 中和アッセイに使用した。10% FBS、100 単位/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン および 2 mM L-グルタミンを含有する完全 RPMI 1640 培地 (cRPMI) は、マウス脾リンパ球を培養するためおよび ELISPOT 分析に使用した。

30

【0042】

リポソームの調製

リポソームの調製を、Matyas et al., 2003, Methods Enzymol., 373: 34-50 に既に記載されているように行った。実施例 1～3 に関して、脂質を混合し、真空下で乾燥し、次いで pH: 7.4 の PBS 中に、総リン脂質が 50 mM または 1.272 mM の最終濃度で、リポソームを形成した。リポソーム中のホスファチジルコリン および ホスファチジルグリセロールは、9：1 のモル比であった。リポソーム中 Chol は、示されているように変化させた。MPLA を使用する場合には、MPLA：総リン脂質のモル比は、示されている箇所では 45：1 または 5.6：1 であった。リポソーム中 Chol のモルパーセント濃度は、リポソームの調製に最初に使用される、Chol：全リン脂質 (すなわち、ホスファチジルコリン および ホスファチジルグリセロール) のモル比に基づいている。

40

【0043】

アジュバント効力を評価するために、DMPC、DMPG、Chol および MPLA を含有する Army リポソーム製剤 (ALF) を、Matyas et al., 2003 に記載されている脂質沈着法 (lipid deposition method) によって調製した。実施例 4 に関して、脂質を混合し、ロータリーエバポレーションによって乾燥した。pH: 7.4 の PBS を、総リン脂質が 50 mM または 20 mM または 2 mM の最終濃度で、水性リポソーム懸濁液に加えることによって、多層小胞 (MLV) を形成した。総計 20 μ g の MPLA を各リポ

50

ソームの調製に使用し、MPLAとリン脂質との間のモル比は、それぞれ1：220、1：88および1：5.6であった。リポソーム中のホスファチジルコリンおよびホスファチジルグリセロールは、9：1のモル比であった。リポソーム中Chol濃度は、QS-21を欠くすべてのALF調製物において、43mol%であった。Microfluidics LV1低容量高剪断マイクロ流動化装置（ATS Scientific Inc.、Burlington、Ontario、Canada）を使用して、30,000psiでリポソームをマイクロ流動し、SUVを形成した。リポソームの直径サイズ分布を、Horiba LB-550粒径測定装置（Horiba Scientific、New Jersey、NJ）によって測定した。Armyリポソーム製剤+QS-21（ALFQ）は、Chol濃度が55mol%であるMLVまたはSUVリポソームを、QS-21と混合することによって作製した。QS-21は、これらの条件下で、リポソーム中のCholに不可逆的に結合し、緩衝液中に存在する遊離のQS-21は検出されなかった。免疫に使用した各ALFQ製剤中のQS-21の総量は、10μgであった。

【0044】

HIV-1 clade C CN54 gp140エンベロープ抗原（Polymun Scientific Inc.、Klosterneuberg、Austria）の総注射用量10μgを、PBS中で、ALFまたはALFQリポソームの各製剤と混合した。リポソーム中MPLA：リン脂質比が、MLVについては1：220または1：88であり、SUVについては1：88または1：5.6である、4つの異なるALF-gp140製剤を作製した。MPLA：リン脂質比が、MLVは1：220または1：88であり、ALF SUVは1：5.6であるALF SUVまたはMLVに、QS-21を加えることによって、3つの異なるALFQ-gp140製剤を調製した。

【0045】

コレステロール分析

リポソーム製剤のコレステロールおよびリン脂質濃度を間接的に確認するために、確立された方法によって、コレステロール含量を分析した。例えば、Zlatkis et al., 1953, J. Lab. Clin. Med., 41: 486-492を参照のこと。簡単に言えば、リポソーム5～200μlを水に加え、最終容量を200μlにした。氷酢酸3mlを加えた後、氷硫酸中0.1%塩化第二鉄2mlを加えた。サンプルを混合し、次いで室温に平衡化した後、吸光度を560nmで読み取った。リポソームのコレステロール濃度を、コレステロールの標準曲線から決定した。

【0046】

溶血アッセイ

赤血球の溶血を、示されている実験条件下で、遊離QS-21の相対量およびQS-21の毒性の両方の尺度として使用した。ヒト赤血球は、独立施設内審査委員会（the independent Institutional Review Board）、Division of Human Subjectsによって再検討されたWalter Reed Army Institute of Researchのprotocolsの下で、Research Blood Components LLC（Boston、MA、USA）から購入した。赤血球をPBSで洗浄し、Beckman CoulterカウンターモデルACT10（Indianapolis IN、USA）によって定量化した。この試験の各アッセイでは、リポソームを用いてまたは用いずにインキュベートしたQS-21の溶血活性を220μl容量で決定し、アッセイの各ステップは室温（22℃）で行った。100マイクロリットルのQS-21の希釈液を、100μlのリポソームまたはPBSのみを用いて、Daigler Rocker（Vernon Hills、IL、USA）上で15分間インキュベートした。リポソームを混合した後、PBS 20μl中の赤血球 2×10^7 個を混合物に加え、Daigler Rocker上で追加の30分間インキュベートした。プレートを800×gで6分間、遠心分離した。上清をポリスチレン製96-ウェルプレートに移し、吸光度を541nmで読み取った

。QS-21 がリポソーム中Cholへ結合することによる溶血を、遊離QS-21による最大溶血率%として表した。

【0047】

カプトガニ血球抽出成分アッセイ

リン脂質鎖長およびCholのモル分率がMPLAのリポソーム表面発現に及ぼす役割を調べるために、カプトガニ血球抽出成分(LAL)アッセイをプローブとして使用した。凝固タンパク質を含有するリムルス・ポリフェムス(Limulus polyphemus) (アメリカカプトガニ)の血液由来の血球抽出成分は、LPSまたはリピッドAのエンドトキシン活性を検出するための代用プローブとして、幅広く使用されている。例えば、Brandenburg et al., 2009, Curr. Med. Chem., 16: 2653-2660を参照のこと。リムルスタンパク質が結合するリピッドA (またはMPLA)の正確な分子のエピトープまたは構造は、まだ完全には明らかになっていないが、リピッドAのリポソーム二重層への組み込みは、エンドトキシン活性およびLAL活性の両方を大いに遮蔽する。例えば、Harmon et al., 1997, Anal. Biochem., 250: 139-146を参照のこと。LAL活性の遮蔽は、リポソームの脂質二重層におけるリピッドAの「リムルスー反応性」基を捕捉することで、リムルスタンパク質のリピッドAへの結合を阻害することによると考えられている。しかし、「リムルスー陽性」(すなわち、反応性)および「リムルスー陰性」(すなわち、非反応性)リポソームは、リポソーム中リピッドAの濃度を、それぞれ、より高い量またはより低い量に変化させることによって創り出すことができる。Richardson et al., 1983, Infect. Immun., 39: 1385-1391を参照のこと。他のリポソーム中脂質と同様に、リピッドAは、自己会合して、リピッドAが豊富なドメインを形成することができ、これらは層状または非層状であり得る。例えば、Kubiak et al., 2011, Biophys. J., 100: 978-986; Brandenburg et al., 1998, Chem. Phys. Lipids, 91: 53-69を参照のこと。高濃度のリポソーム中リピッドAは、恐らく自己会合または相分離し、リピッドAのリムルスー反応基の表面可視性が高まることになる。

【0048】

カプトガニ血球抽出成分(LAL)動的-QCLアッセイを、Lonza (Allendale, NJ, USA)から購入した。アッセイは、Spectramax M5 (Molecular Devices) プラットホーム上で、SoftMax Pro Chromo-LALプロトコルを使用し、37℃にて、以下のパラメータ： $\Delta t = 150$ 秒、測定フィルター=405nm、 $\Delta OD = 0.2$ 、読み取り数=40を使用して行った。結果は、EU/ml単位で提示された。

【0049】

マウスの免疫

雌Balb/cマウス(Charles River Laboratories, Indianapolis, IN, USA) (5~6週齢; 6匹/群)を、ワクチン0.05mlで、注射によって、大腿後部のどちらかに、0、3および6週に筋肉内(IM)免疫した。4つのマウス群を、以上に掲載されているALF+gp140製剤で免疫し、3群をALFQ+gp140製剤で免疫した。1つのマウス群は免疫せずに、免疫学的試験のための陰性対照として使用した。最初の免疫前および一次免疫後3週および6週に、動物から採血した。9週目に、動物を放血致死させ、脾臓を採取した。

【0050】

ワクチン接種後の抗体応答のELISAによる検出

IgG抗体の終点力価を決定するために、gp140タンパク質(PBS中0.1μg/0.1ml/ウェル)を、Immulon 2HB平底プレート(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に加えた。4℃で一晩インキュベートした後、さらなるすべてのステップを室温で行った。プレートを、PBS中0.5%乳/0.1%Tween 20 (ブロッキング緩衝液)250μlで、2時間ブロックした。サンプルを1:400希釈から始めて連続的に2倍希釈し、希釈した血清サンプル100μlをプレートに加えた。プレートを1時間インキュベートし、Tris

緩衝生理食塩水／0.1% Tween 20で4回洗浄した。HRP結合ヒツジ抗マウスIgG (100 µl ブロッキング緩衝液中0.1 µg) を各ウェルに加え、プレートを1時間インキュベートした後、洗浄した。100 µl のABTS 2-成分基質 (Kirkgaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を各ウェルに加え、プレートを1時間インキュベートした。1% SDSを1ウェルにつき100 µl 加えることによって、発色を停止させた。吸光度を405 nmで読み取った。終点力価を、吸光度がバックグラウンドの2倍であった希釈度と定義した。

【0051】

IgGサブタイプの決定を、Glenn et al., 1995, Immunol. Let. 47: 73-78から改変した。非コンジュゲートヤギ抗マウスIgG (Fab) を使用して、標準曲線を作製した。Fab (PBS中1 µg/ml) 100 µl を96-ウェルImmulon 2 HB平底プレートのウェルに加え、プレートを4℃で一晩インキュベートした。プレートをPBS中0.05% Tween 20 (洗浄緩衝液) で3回洗浄し、PBS中0.5% 脱脂乳 (ブロッキング緩衝液) を1ウェルにつき250 µl 加えてブロックし、室温 (RT) で1時間インキュベートした。洗浄後、ブロッキング緩衝液100 µl を、各ウェルに加えた。精製されたマウスIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3を、200 ng/ml のブロッキング緩衝液から始めて2倍希釈した。各希釈液100 µl をプレートに加えた。プレートを、室温で2時間インキュベートし、3回洗浄した。100 µl のHRP結合ヤギ抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3 (ブロッキング緩衝液中1:1000希釈) を対応するウェルに加え、プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、100 µl のABTSを加えた。1% SDSを1ウェルにつき100 µl 加えることによって、発色を停止させた。吸光度を405 nmで読み取った。サブクラスの分析に関して、標準ELISAについては、各群において貯留しておいたマウス血清を、gp140コーティングプレートに加えた。HRP結合ヤギ抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3を加え、ELISAを標準曲線と一緒に実施した。各群の貯留血清の免疫グロブリンサブクラスの濃度を、標準曲線を使用して算出した。

【0052】

INF-γおよびIL-4のための酵素結合免疫スポットアッセイ

安楽死させたマウスからの脾臓を、100-µmナイロン製細胞ストレーナー (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA、カタログ番号4620F05) に通し、シリンジのプランジャーを用いて押し出した。脾細胞の懸濁液を、cRPMI培地中に収集し、同培地で3回洗浄した。ELISPOTを、Rao et al., 2002, J. Virol., 76: 9176-85に記載されているように実施した。脾臓を採取する前に、multiscreen 96-ウェルマイクロタイタープレート (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) を、70%エタノールで前処理し、PBSで3回洗浄し、PBS中に希釈した5 µg/ml のキャプチャーINF-γ-特異的IgGまたはPBS中に希釈した2 µg/ml のキャプチャーIL-4-特異的IgGを、100 µl /ウェルでコーティングした。プレートを4℃で一晩インキュベートし、次いでcRPMIで2回洗浄し、200 µl /ウェルのcRPMIを用いて、RTで2時間ブロックした。50 µl のマウス細胞懸濁液 (8×10⁶ 細胞/ml) を、各サイトカインアッセイのために、二連でプレーティングした。非賦活細胞については50 µl のcRPMIをもしくは賦活細胞については10 µg/ml gp140 CN54を、または陽性対照として50 µl の10 µg/ml Con-Aをまたは陰性対照として50 µl の2 µg/ml PHAを、対応するウェルに加えた。プレートをCO₂インキュベーター中で、37℃にて18時間インキュベートした。0.002% Tween 20 (洗浄緩衝液) を含有するPBSで、プレートを3回洗浄した。PBS中2 µg/ml ビオチン-標識検出INF-γまたはIL-4抗体100 µl を、各ウェルに加えた。プレートを、室温で3時間インキュベートし、次いで3回洗浄した。100 µl のストレプトアビジン-アル

10

20

30

40

50

カリホスファターゼ溶液 (Southern Biotech、カタログ番号 7100-04)、PBS/5% FCS/0.001% Tween 中 1:1000 に希釈したもの) を各ウェルに加え、プレートを暗所で室温にて 1 時間インキュベーションした。プレートを 3 回洗浄し、BCIP/NBT 色原体基質 (Kirkgaard & Perry, カatalog番号 50-81-07) を 1 ウェルにつき 100 μ l 加えた。スポットが現れた後、プレートを蒸留水で完全に洗い流した。IFN- γ および IL-4 産生細胞の頻度を、BioReader 3000 Elispot Reader (Bio-Sys GmbH, Karben, Germany) を使用して測定した。データは、スポットの平均数として表される。

【0053】

中和アッセイ

2 つの tier 1 HIV-1 Env 偽ウイルスに対する中和抗体応答を、ルシフェラーゼに基づいたウイルス中和アッセイを使用し、既に記載されているような TZM. b1 細胞を用いることによって測定した。例えば、Brown et al., 2007, J. Virol., 81: 2087-91 を参照のこと。血清の 50% 阻害希釈 (ID₅₀) の算出は、細胞対照の相対発光単位を差し引いた後、ウイルス対照ウェルと比較して、相対発光単位の 50% 減少に帰着する血清希釈として行った。簡単に言えば、血清サンプルを 25 μ l で 4 倍連続希釈したものを、96-ウェル平底プレート中、二連で、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中でアッセイした。HIV clade C、GS015 PV および MW965. 26 PV (25 μ l) を各ウェルに加え、プレートを 37°C で 1 時間インキュベートした。次いで、Brown et al., 2008. に既に記載されているように、TZM. b1 細胞を、DEAE-デキストランを含有する 10% DMEM 中、50 μ l 容量で加え (104 細胞/ウェル)、中和抗体価を決定した。ネズミ白血病ウイルス (MuLV) 陰性対照を、すべてのアッセイに含めた。

【0054】

統計解析

統計解析は、GraphPad Prism を使用して行った。抗体サブタイプの定量化に関して、シグモイド型 4 パラメータ非線形回帰曲線フィッティングを使用した。複数の群間における統計的比較は、一元配置 ANOVA 法、ダンの補正を用いたクラスカル-ウォリス検定を使用して行った。カラム比較分析は、対応のない t-検定 (マンホイットニー検定) を使用して行った。

【0055】

実施例 1 リポソーム中 Chol が共インキュベートした QS-21 の溶血活性に及ぼす影響の特性決定

QS-21 を有するリポソーム組成物の溶血活性を、QS-21 の濃度を変化させることによって、最初に特性決定した。簡単に言えば、33.7%、43% および 55% コレステロールを含有するリン脂質リポソーム 50 ミリモルを、10 μ g/ml および 50 μ g/ml の QS-21 と混合し、室温で 20 分間インキュベートした。赤血球をリポソーム-QS-21 の混合物に加え、30 分間インキュベートした。遊離 QS-21 は、陽性対照としての役割を果たした。細胞を遠心分離し、上清の光学密度を 541 nm で測定して、溶血のレベルを反映した。結果は、図 1 に提示されているように、QS-21 を有するリポソーム組成物による溶血のレベルは、リポソーム中のコレステロールの濃度によって決まることを示唆している。

【0056】

QS-21 を有するリポソーム組成物の溶血活性を、リポソーム中 Chol の mol% を変化させることによって、さらに特性決定した。QS-21 によって引き起こされる赤血球の損傷度は、QS-21 とともに予備インキュベートされたリポソーム中 Chol の mol% に逆相関することが見出された (図 2)。遊離 QS-21 は、およそ 2 μ g で最大溶血を引き起こしたが、QS-21 を、33.7 または 43 mol% Chol を含有するリポソームとともに予備インキュベートした場合には、最大溶血は、およそ 4 μ g の Q

10

20

30

40

50

S-21で起こった(図2)。55mol%Cholを有するリポソームは、QS-21の溶血の影響を200μgまで完全にブロックした(図2)。同様の結果が、濃度を変化させたサポニンを含むリポソーム組成物について観察された(図3)。リポソームが55mol%コレステロールを含む場合には、500μg/mlまでのサポニンについて、溶血は全く検出されなかった。

【0057】

実施例2 QS-21とリポソーム中Cholとの間の相互作用の特性決定

0.127μmol総リン脂質および50mol%Cholを含むDMPC/DMPG/CholリポソームへのQS-21の結合を、0.025μmolのMPLA(DMPC/DMPG/Chol/MPLA)も含む同リポソームと比較した。簡単に言えば、総計0.127μmolのリン脂質(DMPC/DMPG、9/1)、50mol%CholからなるリポソームおよびMPLA、(L)またはL(MPLA)(MPLA:リン脂質=1:5.6)を欠いているまたは含むリポソームとともに、QS-21を予備インキュベートした。次いで、溶血活性を測定した。図4に示されているように、MPLA(L)を含まない50mol%Cholリポソームは、25μgのQS-21の濃度でようやく100%の溶血に到達した。リポソームがMPLA(L(MPLA))を有すると、溶血は5μgのQS-21で最大レベルに到達し、これは遊離QS-21の溶血曲線に類似していた。したがって、50%Cholは、MPLAを欠いているものと比較すると、MPLAを含むリポソーム中のQS-21に対して可視性がより少ないことは明らかである。

【0058】

0.114μmolのホスファチジルコリンを含むし、それぞれDMPC、DPPCおよびDSPCからなり、0.0127μmolのDMPGと一緒に、33.7%または55%Cholを含むし、2.85nmolのMPLAを含むまたは含まない3種のリポソーム組成物を、QS-21とともに予備インキュベートした(図5)。次いで、溶血活性を評価した。図5Aに示されているように、10μgまでのQS-21について、33.7mol%Cholを有するDMPC、DPPCまたはDSPCリポソームに結合されたQS-21は、ほとんどまたは全くなかった。しかし、リポソーム中Cholを55%に増加させると(図5B)、DSPCリポソームにおいておよび顕著にはDMPCリポソームにおいて、CholへのQS-21の結合が増加した。これとは対照的に、55%Cholを有するDPPCリポソームは、DMPCまたはDSPCリポソームに比べて、QS-21への結合が非常に少なかった(図5B)。MPLAの存在は、55%Cholを有するDMPCリポソームへのQS-21の結合を阻害したが、DPPCまたはDSPCリポソームへの結合を阻害しなかった(図5C)。

【0059】

さらに、66%Cholを含むリポソームから、Cholを欠いているリポソームへのCholの移動を、QS-21をプローブとして使用することによって検出した(図6)。QS-21を[L(0%Chol)+L(66%Chol)]とともに予備インキュベートしたところ、QS-21をL(0%Chol)またはL(66%Chol)と別々に予備インキュベートした後に観察されたものの中間に位置する、QS-21の溶血活性をもたらした(図6A)。QS-21を、MPLAを含むし、Cholを含むまたは欠いているリポソームの同等の混合物[L(0%Chol+MPLA)+L(66%Chol+MPLA)]とともに予備インキュベートしたところ、同様にQS-21による中間のレベルの溶血をもたらした(図6B)。しかし、図6Bに示されている[L(0%Chol+MPLA)+L(66%Chol+MPLA)]の曲線は、MPLAを欠いているリポソーム[L(0%Chol)+L(66%Chol)](図6A)と比較すると、より大きな溶血活性の方向へシフトされた。したがって、リポソーム中のMPLAの存在が、リポソーム間のChol移動を阻害したまたはリポソームの混合物中のCholの可視性を遮蔽したことは明らかである。

【0060】

実施例3 リポソーム中Cholの量を増加させることによる、DMPC/DMPG/Chol/MPLAリポソームのカプトガニ血球抽出成分の認識抑制

カプトガニ血球抽出成分(LAL)アッセイを、Cholの種々の量を含有するDMPC/DMPG/Chol/MPLAリポソームについて実施した。図7Aは、33.7mol%Cholを含有するDMPC/DMPG/Chol/MPLA、DPPC/DMPG/Chol/MPLAまたはDSPC/DMPG/Chol/MPLAリポソーム中のMPLAが、LALアッセイによって検出されたことを示している。33.7mol%Cholを含有するリポソームにおける、MPLAのLALによる認識は、ホスファチジルコリンの飽和脂肪酸アシル鎖の長さに比例し、LALが、DSPC>DPPC>DMPCの順に結合した。しかし、55mol%Cholでは、各リポソームにおいて、LALがMPLAを検出する能力が劇的に減少した(図7B)。

10

【0061】

実施例4 L(MPLA)およびサポニンを含む製剤のアジュバント効力の特性決定

リポソームサイズがアジュバント効力に及ぼす影響を試験するために、それぞれがALFリポソーム(すなわち、MPLAを含有する)のタイプである、大型MLVおよびSUVを構築した。図8に示されているように、光散乱分析に基づいて、ALF SUV粒子の直径サイズ範囲は、50から100nmの間であり、ALF MLVは、1から4μmの間であった。この後者のMLVでの結果は、光散乱分析が多くの大型粒子を検出したことを示しているが、電子的粒径分析によって示されている双曲的な分布において、MLVは多数の小型粒子も含有している。例えば、Alving et al., 1975, Biochim. Biophys. Acta., 394: 157-65を参照のこと。したがって、光散乱分析を用いた場合、MLV中に存在した小型粒子が、大型粒子の影に隠れた。いずれにせよ、それぞれ測定した粒子集団の分布は狭く、中央値ピークを1つのみ有した。ALF SUVの場合には、これは同種の集団の存在を示した。高MPLA:リン脂質比でさえも、ALF SUVは、小型粒子の単一分布を形成した。しかし、QS-21を欠いているリポソームとは対照的に、QS-21を含有するすべてのALFリポソーム(ALFQ)の中央値サイズは、最初のALF粒子がSUVであるかMLVであるかにかかわらず、マイクロメーターの値域で測定された(図8B)。以上に示されているように、このことは小型粒子が同時に発生している集団の可能性の余地を与えない。ALFQ粒子の全体的なサイズの範囲内で、明確なわずかに異なる中央値サイズを有する大型ALFQの個々の小集団が、MPLA:リン脂質比に

20

30

【0062】

原料および方法に記載されているように、種々の組成物を使用して、抗体産生を免疫マウスから測定し、結果を図9にまとめた。図9Aに示されているように、MPLA:リン脂質が1:88の比で含有するALF SUVは、同一のMPLA:リン脂質比を有するALF MLVに比べて、統計学的に有意的に、より高いIgG抗-gp140結合抗体の産生をマウスにおいて誘導した。MPLA:リン脂質比が1:5.6であるALF SUVは、結合抗体の最も高い力価を誘導した。図9Bは、すべてのALFQ-アジュバント化製剤が、ALF MLV-アジュバント化製剤のいずれよりも有意に高い、gp140に対する結合抗体を誘導したことを示している。すべてのALFQ-アジュバント化群における総計のgp140-特異的IgG結合抗体レベルは、リポソームのサイズまたは相対リン脂質濃度とは無関係であるように思われる。

40

【0063】

IgGサブタイプの決定は、抗体産生をさらに特性決定するために実施した。ALF+gp140で免疫したすべてのマウス群は、gp140に対するIgG1結合抗体の中等度または高度の力価を明らかにした(図10A)。ALF MLVは、IgG1サブクラスを優位に誘導したが、一方、ALF SUVは、IgG1とIgG2aとの間のバランスのとれた産生を誘導し、またIgG2b産生も誘導した。MPLA:リン脂質比を増加させると、すべてのサブクラスの抗体応答がより高くなった(図10A)。図10Bに示されているように、ALFQ群において、IgG1の血清中濃度は常に高く、すべてのサ

50

ブタイプが誘導されたが、これらは、A L F Qの創作に最初に利用した、A L F S U V またはA L F M L VのM P L A：リン脂質比とは無関係であった。

【0064】

T h 1対T h 2の免疫応答を比較するために、アジュバント化g p 1 4 0で免疫したマウスから新たに単離した脾リンパ球について、E L I S P O T分析を行った。図11に示されているように、A L F－アジュバント化製剤のすべてがI N F－ γ を産生する脾リンパ球の増殖を誘導し、これは未処置対照で観察されたよりも高かった。A L F Q製剤は、A L Fより多数のI N F－ γ －陽性細胞を誘導した(図11A)。免疫マウスのすべてが高I L－4産生を示し、これは未処置マウスに比べて有意に($p < 0.0001$)高かった(図11B)。I L－4を産生する細胞数の有意差は、免疫群間で観察されなかった。以上の結果を考慮すると、A L F Qリポソームが、M P L A：リン脂質比に関係なく、I N F－ γ 分泌の顕著な誘導を引き起こしたように思われる。したがって、A L F Qリポソームは、T h 1型免疫を誘導するための有用なアジュバントになり得る可能性を秘めている。

10

【0065】

H I V－1エンベロープタンパク質に対する非中和結合抗体は、第3相有効性試験において、予防に相関することが報告されたが、中和抗体は、H I V－1に対する予防的ワクチンにとって重要であると広く考えられている。このために、A L FおよびA L F Qがアジュバントとしての役割を果たし、モデルg p 1 4 0エンベロープタンパク質に対する中和抗体を誘導する能力を試験した。マウス群の貯留血清サンプルを、2つのt i e r 1、c l a d e C H I V初代分離株に対して試験した。図12に示されているように、1つのA L F－アジュバント化および2つのA L F Q－アジュバント化ワクチン群は、M W 9 6 5、2 6 P V(図12A)およびG S 0 1 5 P V(図12B)の両方を、高I D 5 0で中和する抗－g p 1 4 0抗血清を誘導した。M P L A：リン脂質比が1：5.6であるA L Fは、最も高い中和力価を誘導し、一方、M P L A：リン脂質比が1：88および1：220であるA L F Qも、中和抗体を誘導したが、それは幾分低い力価であった。

20

本発明は、以下の態様を包含し得る。

[1]

モノホスホリルリピッドA(M P L A)含有リポソーム組成物および少なくとも1種のサポニンを含むアジュバント製剤であって、前記リポソーム組成物は、i)炭化水素鎖が23℃以上の水中融解温度を有するリン脂質で構成された脂質二重層およびii)コレステロールを約50%(mol/mol)を超えるモルパーセント濃度で含む、アジュバント製剤。

30

[2]

前記サポニンが、Q S－7、Q S－18、Q S－21またはそれらの混合物から選択される、上記[1]に記載のアジュバント製剤。

[3]

前記サポニンが、Q S－21である、上記[1]または上記[2]のいずれかに記載のアジュバント製剤。

40

[4]

前記リポソーム組成物が、コレステロールを約55%～約71%(mol/mol)のモルパーセント濃度で含む、上記[1]から[3]のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

[5]

前記リポソーム組成物が、コレステロールを約55%(mol/mol)のモルパーセント濃度で含む、上記[1]から[4]のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

[6]

リポソームが、ジミリストイルホスファチジルコリン(D M P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(D P P C)およびジステアリルホスファチジルコリン(D S P C)

50

からなる群から選択されるホスファチジルコリン（PC）を含む、上記〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

〔7〕

前記リポソーム組成物が、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）およびジステアシルホスファチジルグリセロール（DSPG）からなる群から選択されるホスファチジルグリセロール（PG）をさらに含む、上記〔6〕に記載のアジュバント製剤。

〔8〕

前記PC対前記PG（mol/mol）の比が、約0.5：1、約1：1、約2：1、約3：1、約4：1、約5：1、約6：1、約7：1、約8：1、約9：1、約10：1、約11：1、約12：1、約13：1、約14：1または約15：1である、上記〔7〕に記載のアジュバント製剤。

〔9〕

前記リポソーム組成物が、約5mg以下、約4mg以下、約3mg以下、約2mg以下、約1mg以下、約0.9mg以下、約0.8mg以下、約0.7mg以下、約0.6mg以下、約0.5mg以下、約0.4mg以下、約0.3mg以下、約0.2mg以下、約0.1mg以下、約0.09mg以下、約0.08mg以下、約0.07mg以下、約0.06mg以下、約0.05mg以下、約0.04mg以下、約0.03mg以下、約0.02mg以下または約0.01mg以下のMPLA（リポソーム懸濁液1ml当たりの総重量）を含む、上記〔1〕から〔8〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

〔10〕

前記リポソーム組成物が、約1：5.6～約1：880または約1：88～約1：220のMPLA：リン脂質モル比を有する、上記〔1〕から〔9〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

〔11〕

サポニンの含量（リポソーム懸濁液1ml当たりの総重量）が、約1mg以下、約0.9mg以下、約0.8mg以下、約0.7mg以下、約0.6mg以下、約0.5mg以下、約0.4mg以下、約0.3mg以下、約0.2mg以下、約0.1mg以下、約0.09mg以下、約0.08mg以下、約0.07mg以下、約0.06mg以下、約0.05mg以下、約0.04mg以下、約0.03mg以下、約0.02mg以下または約0.01mg以下である、上記〔1〕から〔10〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

〔12〕

前記リポソーム組成物が、多層小胞（MLV）または小型単層小胞（SUV）を含み、小型単層小胞は、直径が約50～約100nmであり、多層小胞は、直径が約1～約4μmである、上記〔1〕から〔11〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤。

〔13〕

免疫原および上記〔1〕から〔12〕のいずれか一項に記載のアジュバント製剤を含む免疫原性組成物。

〔14〕

生理学的に許容される媒体をさらに含む、上記〔13〕に記載の免疫原性組成物。

〔15〕

前記免疫原が、天然に存在するまたは人工的に創り出されるタンパク質、組換えタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、炭水化物、ハプテン、全ウイルス、細菌、原生動物およびウイルス様粒子からなる群から選択される、上記〔13〕または上記〔14〕のいずれかに記載の免疫原性組成物。

〔16〕

前記免疫原が、HIV-1エンベロープタンパク質である、上記〔15〕に記載の免疫原性組成物。

〔17〕

上記〔13〕から〔16〕のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与する工程を含む、動物を免疫する方法。

〔18〕

アジュバントとしてのサポニンの毒性を低減する、またはアジュバント製剤を調製する方法であって、

モノホスホリルリピッドA (MPLA) 含有リポソーム組成物を、前記サポニンに加える工程を含み、前記リポソーム組成物は、i) 炭化水素鎖が 23°C 以上の水中融解温度を有するリン脂質を含む脂質二重層およびii) コレステロールを約50% (mol/mol) を超えるモルパーセント濃度で含む、方法。

〔19〕

前記サポニンが、QS-7、QS-18、QS-21およびそれらの混合物からなる群から選択される、上記〔18〕に記載の方法。

〔20〕

前記サポニンが、QS-21である、上記〔18〕または上記〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕

前記リポソーム組成物が、コレステロールを約55%～約71% (mol/mol) のモルパーセント濃度で含む、上記〔18〕から〔20〕のいずれか一項に記載の方法。

〔22〕

前記リポソーム組成物が、コレステロールを約55% (mol/mol) のモルパーセント濃度で含む、上記〔18〕から〔21〕のいずれか一項に記載の方法。

10

20

【図1】

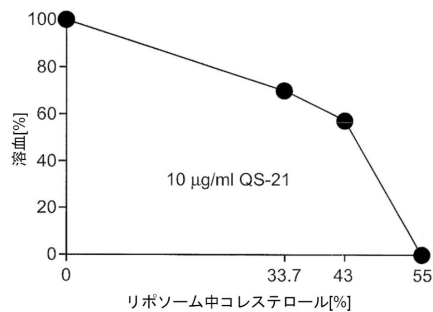


図 1A

【図2】

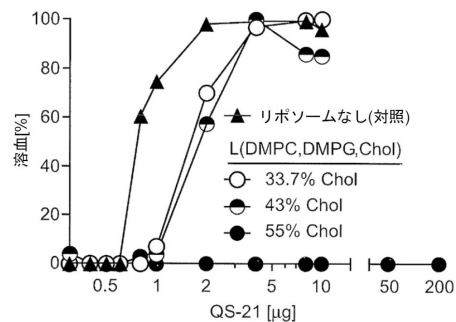


図 2

【図3】

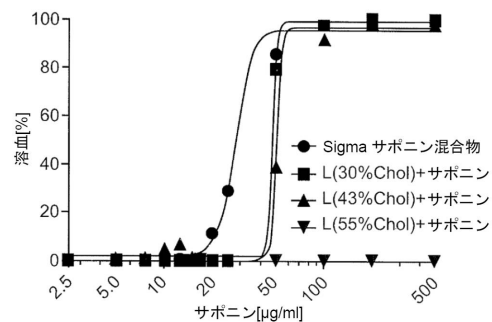


図 3

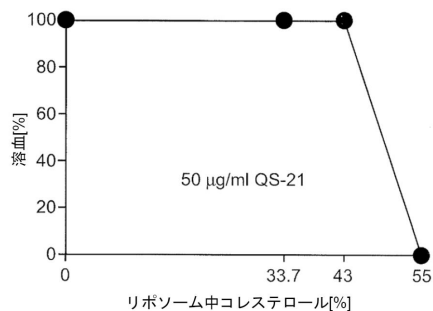
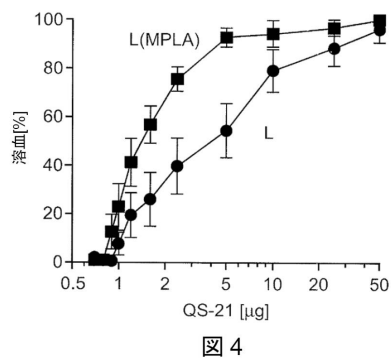


図 1B

【図 4】



【図 5】

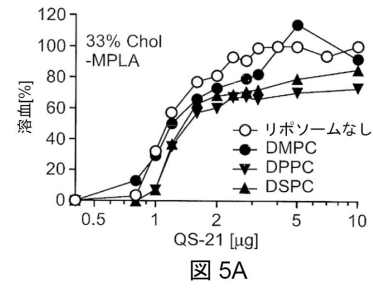


図 5A

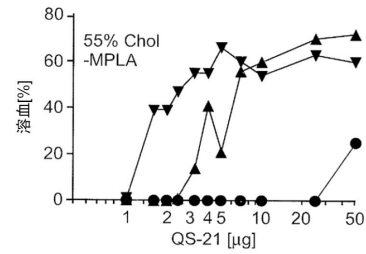


図 5B

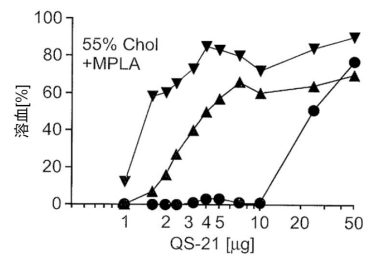


図 5C

【図 6】

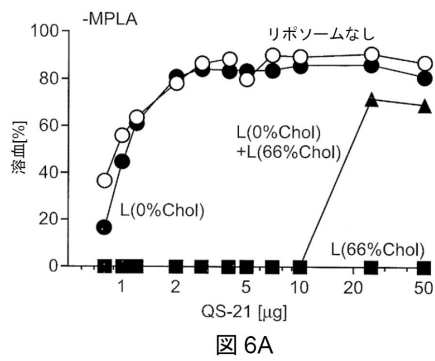


図 6A

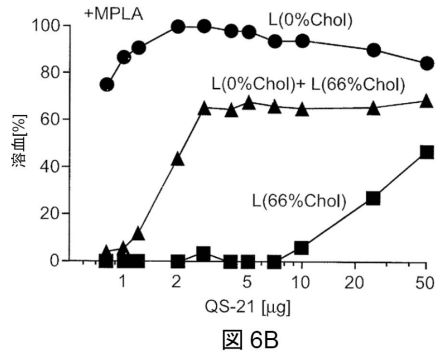


図 6B

【図 7】

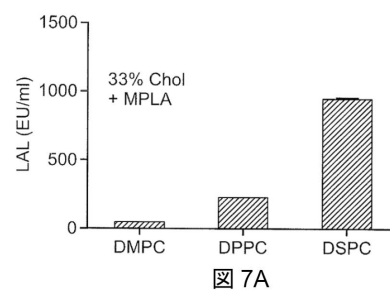


図 7A

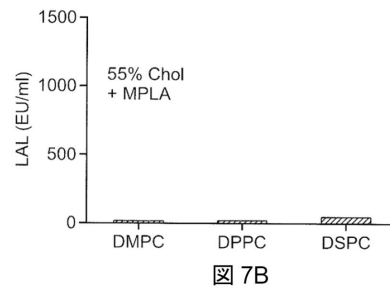


図 7B

【図 8】

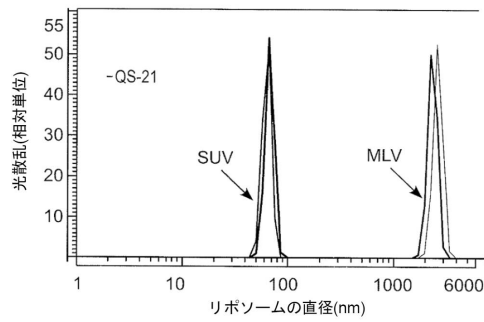


図 8A

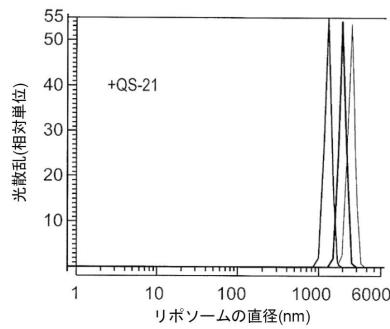


図 8B

【図 9】

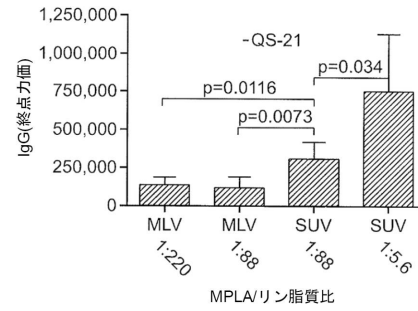


図 9A

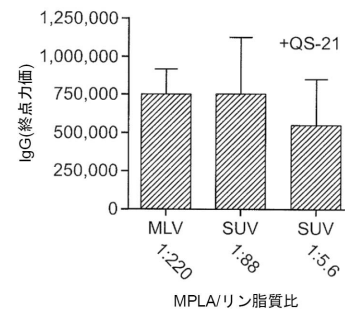


図 9B

【図 10 - 1】

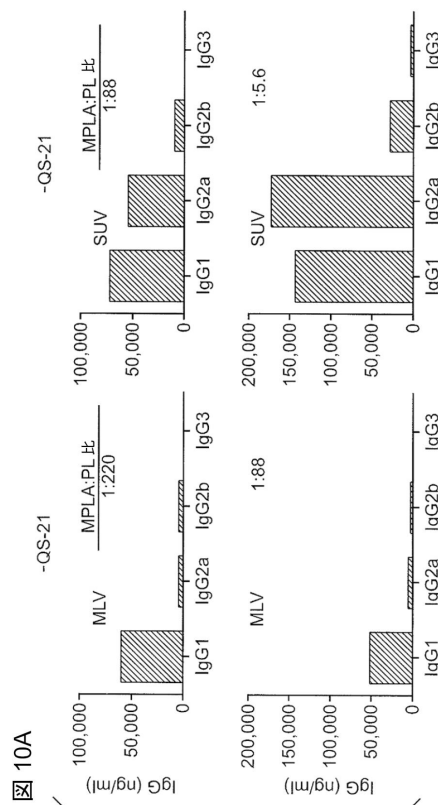


図 10A

【図 10 - 2】

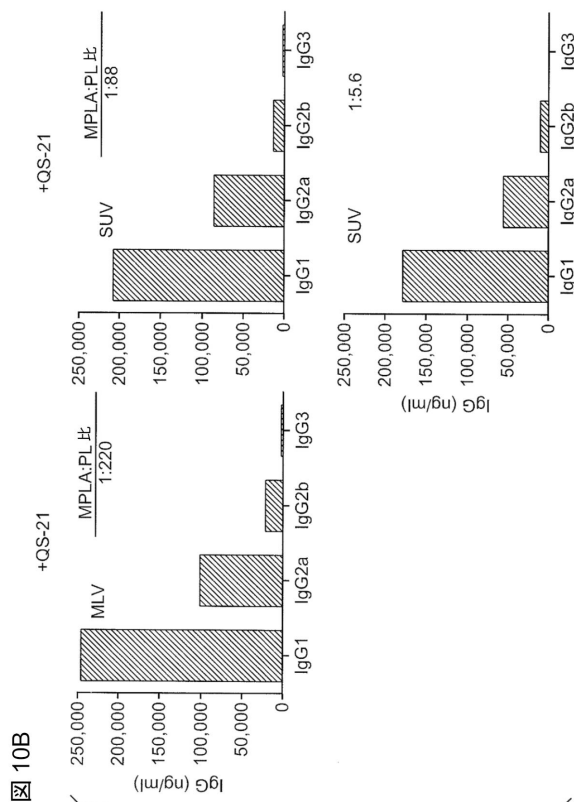
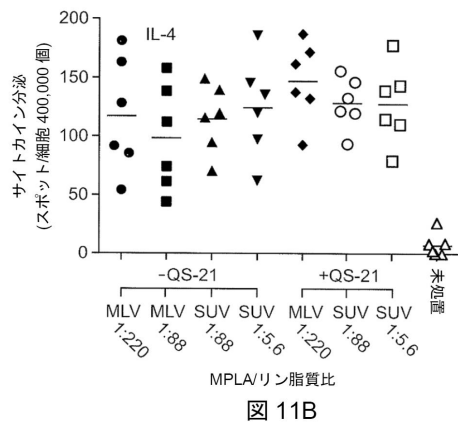
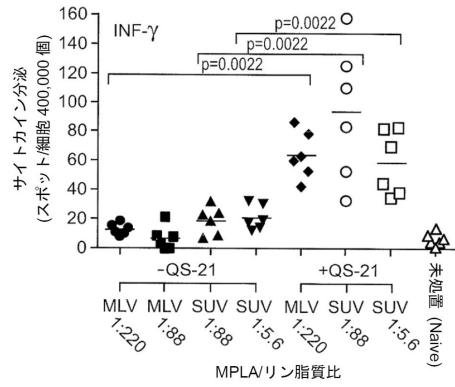
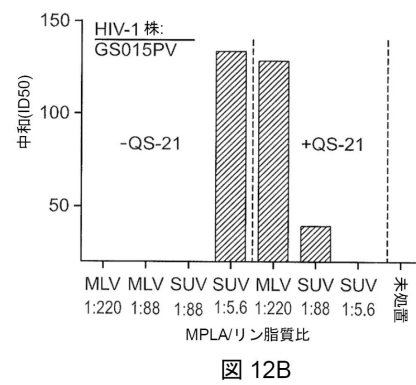
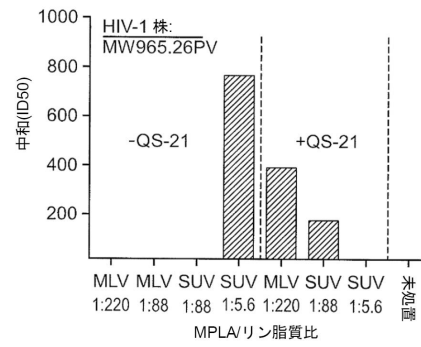


図 10B

【図 1 1】



【図 1 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 9/127 (2006.01) A 6 1 K 39/21
A 6 1 K 47/24 (2006.01) A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/28 (2006.01) A 6 1 K 47/24
A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 K 47/28
A 6 1 P 37/04

(72)発明者 アルビング, カール アール.
アメリカ合衆国 メリーランド州 20814, ベテスダ, グレンブルック ロード 7118

(72)発明者 ベック, ゴルタン
アメリカ合衆国 メリーランド州 20853, ロックビル, オリエンタル ストリート 13524

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 特表平11-504020 (JP, A)
国際公開第94/014454 (WO, A1)
特表2012-529464 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 39/
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)