

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-522231

(P2013-522231A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int.Cl.

A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/145
A 61 K 39/39
A 61 P 31/16
A 61 P 37/04

テーマコード(参考)

4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2012-557263 (P2012-557263)
(86) (22) 出願日 平成23年3月10日 (2011.3.10)
(85) 翻訳文提出日 平成24年9月25日 (2012.9.25)
(86) 國際出願番号 PCT/US2011/027993
(87) 國際公開番号 WO2011/112871
(87) 國際公開日 平成23年9月15日 (2011.9.15)
(31) 優先権主張番号 61/313,101
(32) 優先日 平成22年3月11日 (2010.3.11)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 512018726
イミューン デザイン コーポレイション
アメリカ合衆国 ワシントン 98104
, シアトル, コロンビア ストリート
1124, スイート 700
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者 クレッグ, クリストファー エイチ.
アメリカ合衆国 ワシントン 98104
, シアトル, コロンビア ストリート
1124, スイート 700
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザのためのワクチン

(57) 【要約】

薬学的組成物およびワクチン組成物は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素と、GLAを含有するアジュバントとを含有する。特に関係のあるプレパンデミックインフルエンザウイルスはH5N1である。これらの組成物を使用するキットおよび方法も提供される。本発明は、ワクチンとして使用するための組成物、および対象にワクチンを予防接種する方法に関し、該ワクチンは、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスおよびアジュバント由来の組換え赤血球凝集素を含有する。

【選択図】図3A

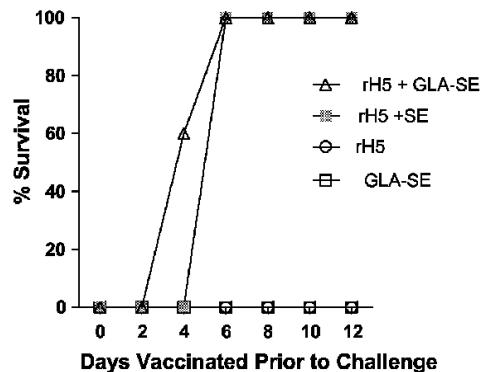


FIG. 3A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬学的組成物であって、

(a) プレパンデミック(世界的流行前)またはパンデミック(世界的に流行している)インフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rHA)と、

(b) アジュバントであって、前記アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有する、アジュバントと、

を含有し、前記薬学的組成物の一回の注射によって、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する予防接種を必要としている対象に、予防接種を行う方法で使用するための、薬学的組成物。

【請求項 2】

前記組成物の投与は、前記一回の注射後に集団の少なくとも50%に血清転換を実現する、請求項1に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 3】

前記組成物は乳剤を含まない、先行する請求項のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 4】

前記組成物は油分を含まない、先行する請求項のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 5】

前記アジュバントはGLAである、先行する請求項のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 6】

プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する予防接種を必要としている対象に、予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物であって、前記組成物は、

(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rHA)と、

(b) アジュバントであって、前記アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有し、前記組成物は、投与量を節約する、アジュバントと、を含有する、薬学的組成物。

【請求項 7】

前記rHAは、用量を節約する量で存在する、請求項6に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に予防接種を行う方法で使用する

10

20

30

40

50

ための薬学的組成物。

【請求項 8】

前記 r H A は、アジュバントがない場合は防御免疫を提供しない濃度で存在する、請求項 6 に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 9】

前記組成物は、単一の組換えタンパク質を含有する、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 10】

一用量当たりの前記 r H A 量は、約 1.5 ~ 約 1 μ g の範囲である、請求項 6 に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 11】

前記アジュバントは G L A であり、前記 r H 5 は H 5 N 1 インフルエンザの病原性株に由来する、請求項 6 に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府資金による研究に関する声明

本発明は、米国立アレルギー感染病研究所によって付与された第 5 R 4 3 A I 0 8 1 3 8 3 - 0 2 号の下、政府の支援を受けて実施された。連邦政府は発明の特定の権利を有する場合がある。

【0002】

本特許出願は、概して、鳥インフルエンザ（例えば、H 5 N 1）、豚インフルエンザ（例えば、H 1 N 1）、H 7 N 7、および H 9 N 2 等のプレパンデミック（世界的流行前）またはパンデミック（世界的に流行している）インフルエンザのワクチンとして使用するための組成物に関する。本組成物は、概して、候補インフルエンザウイルス由来の組換え赤血球凝集素およびアジュバントを含有する。

【背景技術】

【0003】

パンデミックとは、新たな病気が勃発し、ヒトに感染して重篤な病状を生じさせ、ヒトからヒトへと感染が拡大しやすい場合に蔓延する伝染性疾患の世界的流行である。インフルエンザのパンデミックは、インフルエンザウイルスの新しい株または亜型が、別の種類の動物（例えば、鳥または豚）から、関連ウイルスの事前の暴露による免疫を持たないヒトの集団に伝染する場合に、生じ得る。インフルエンザのパンデミックは最も古いもので 1500 年代後半から見られ、それ以来、定期的に発生しており、一番最近のものに、1957 年の「アジア型インフルエンザ」（H 2 N 2）、1968 年の「香港型インフルエンザ」（H 3 N 2）および 2009 年の「豚インフルエンザ」（H 1 N 1）がある。1990 年代に発生した H 5 N 1 「鳥インフルエンザ」ウイルスは、ヒトに感染したが、ヒトからヒトへの感染効率が低かったため、これまでのところパンデミックには至っていない。国から国への移動や、都市化が進むにつれて、新たなウイルスによって生じるインフルエンザの流行の拡大は、非常に短い期間でパンデミックを引き起こすと予測されている（WHO、「Pandemic preparedness」）。

【0004】

鳥インフルエンザは、分節 RNA ゲノムを含有するオルトミクソウイルスによって引き起こされる。感染は、ウイルス性赤血球凝集素（H A）タンパク質が宿主細胞上のシアル酸結合糖タンパク質に結合することで生じる。赤血球凝集素タンパク質は、抗原および配列の特性に基づき、16 の亜型に分割できる。H A に加えて、インフルエンザウイルスは

10

20

30

40

50

、さらなる表面タンパク質、感染後の細胞からのウイルスの放出に伴われるノイラミニダーゼ(N A)を含有する。ノイラミニダーゼタンパク質は、現在、9の亜型に分割される。16 H A および9 N A の亜型の全ての考えられる組み合わせは、野鳥(例えは、アヒル)が無症候性ウイルス保有宿主の役割を果たす自然界に存在すると考えられている。時により、インフルエンザウイルスは、野鳥から家畜の鳥類に伝染し、2つの病気の形式について記述する。一つの形式は通常見られるものであるが症状は軽く、もう一方の形式は稀であるが非常に致死率が高い。鳥類における非常に病原性の強い鳥インフルエンザウイルス(H P A I)の感染は、通常、H 5 およびH 7 亜型によって生じる。H P A I ウィルスのH A タンパク質は、H A 切断部位内の一組の塩基性アミノ酸によって、他のより病原性の弱いH 5 およびH 7 の亜型H A タンパク質とは区別される。

10

【 0 0 0 5 】

特定のH P A I ウィルスによる鳥類の一定の感染、および鳥類ならびにヒトの相対的に近接性により、鳥インフルエンザ(H 5 N 1 、 H 7 N 3 、 H 7 N 7 、および H 9 N 2)の4つの亜型がヒトへ感染するに至った。H 7 または H 9 亜型ウイルスのヒトへの感染は、概して、軽度の非致命的な病気を引き起こす。対照的に、H 5 亜型ウイルスのヒトへの感染は、重度で、多くの場合、致命的な病気を引き起こす(2010年2月17日にWHOに報告された、「C u m u l a t i v e n u m b e r o f C o m f i r m e d H u m a n C a s e s o f A v i a n I n f l u e n z a A / (H 5 N 1) 」、www.who.int)。

20

【 0 0 0 6 】

野鳥および家畜用の鳥類のウイルスの地理的拡大に関連する、H 5 N 1 ウィルスのヒトへの感染が継続することによって、H 5 N 1 ウィルスは遺伝的に進化しており、現在では、遺伝的および抗原的に、明確なクレードおよびサブクレードに分類が可能である(非特許文献1)。万一、これらの新規ウイルスのいずれかがヒト間で容易に伝染可能になった場合には、H 5 N 1 インフルエンザのパンデミックの可能性は高い。H 5 N 1 感染と関連付けられる高い死亡率のため、こうしたパンデミックと関連付けられる潜在的な世界規模の影響は極めて深刻になる可能性がある。そのため、WHOは、パンデミック警戒のプロセスを開始した。

【 0 0 0 7 】

インフルエンザのパンデミックに効くワクチンの開発は、WHOおよび多くの政府にとって、インフルエンザのパンデミック対策計画の土台となる。米国および世界の他の国における潜在的需要を満たすためには、膨大な数の安全かつ効果的なパンデミックワクチン用量が必要である。現在広まっているプレパンデミック株に対するワクチンの備蓄が、現在のパンデミック予防策の重要な要素である。これらのワクチンは、新たに勃発したパンデミックウイルスと同一ではない可能性があっても十分な予防効果があると見込まれているが、より特化した、株に一致したワクチンの製造が進められている。現在までに、3つのH 5 N 1 ワクチン(2つのスプリットビリオンおよび一つの全ビリオン)が法的な認可を受けており、さらに、いくつかのワクチンが開発の最終段階にある。

30

【 0 0 0 8 】

現在、多くの国がこうしたワクチンを備蓄しており、米国の当面の目標は、2千万人の治療に十分なワクチンを蓄えることである。しかしながら、数多くの科学的、技術的、および経済的課題が、世界的なインフルエンザのパンデミックに対する備えを複雑化している。重要な点として、従来の卵由来の方法によるプレパンデミックまたはパンデミックワクチンの製造は、時間がかかりすぎ、高価であり、世界中の高リスクの個人に予防接種を行う十分なワクチン用量を製造するためには何億という卵を必要とする。弱毒化ウイルスを製造するための細胞を基本とした代替的な戦略が開発中であるが、これらの再集合体ウイルスは、典型的には、比較的低いワクチン抗原レベルを含有している。鳥類のH 5 赤血球凝集素は、他の亜型からのH A よりも、ヒトにおいて本質的により少ない低い免疫原性を有するらしいことから、この低抗原収率が、H 5 N 1 ワクチンに関連して特に懸念されている。そのため、季節性インフルエンザワクチンに対する抗体反応を誘発するためには

40

50

、より多い抗原用量が必要とされる。さらに、ヒトはH5赤血球凝集素に対する免疫を持っているため、一用量の予防接種スケジュールでは予防効果が得られない可能性がある。これらの点を説明するために、H5クレード1ウイルス(A/ベトナム/1203/2004)に基づく最初のFDA認可ワクチンは、研究の参加者の54%のみに「予防的」中和力値を誘導し、季節性ワクチンのHA含有量の12倍である、90μgのHAの二用量を必要とした(非特許文献2)。

【0009】

H5N1免疫原性を高めると同時に、ワクチン製造能力を大幅に向上可能な、さらなる技術が必要である。プレパンデミックワクチンの理想的なプロファイルは、容易な方法かつ低コストで製造され、保存可能期間が長いということである。重要な点としては、最小限の抗原を用いて着実な予防的免疫反応を生じさせる必要があり、遺伝的に明確なウイルス、および理想的には、異なるクレードによるウイルスに対する交差防御を提供する。加えて、ワクチンは安全でなければならない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】WHO Global Influenza Program Surveillance Network, Emerging Infectious Diseases 11:1515-1521, 2005

20

【非特許文献2】Treanor et al. New England Journal of Medicine 354: 1343-1351, 2006

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、ワクチンとして使用するための組成物、および対象にワクチンを予防接種する方法に関し、該ワクチンは、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスおよびアジュバント由来の組換え赤血球凝集素を含有する。一実施形態では、アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖として記述される合成物(DSLP合成物)であり、ここで、非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)またはアミノ(-NH-)基のいずれかによって還元末端の6'位で炭素へ結合され、二糖は、非還元末端の4'炭素によってリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(O)-)および/またはエステル(-O-C(O)-)結合によって複数の脂質基へ結合され、ここで、エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(O)-)基は脂質基へ直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有する。特定の組成物および方法では、アジュバントは、種々の実施形態において、水中油型乳剤として処方されるまたはカリ明礬、アルミニウム塩等の他のアジュバントで処方される、オイルフリーであり得る、GLAである(例えば、米国特許出願公開第2008/0131466号を参照)。特定の目的のための赤血球凝集素は、非常に病原性の強いH5N1ウイルス由来のH5およびH1N1(「豚インフルエンザ」)パンデミックインフルエンザ由来のH1を含む。組成物は用量を節約するものであり得る、および/または組換え赤血球凝集素は、用量を節約する量で存在し得る。方法は、組成物の複数の注射ではなく一回の注射で対象に予防接種を行うことを含み得る。例えば、組成物は、以下の、rHAは用量を節約する量で存在する、rHAは免疫アジュバントがない予防免疫を提供しない濃度で存在する、rHAは鳥インフルエンザの病原性株に由来する、rHAはH5N1インフルエンザの病原性株に由来する、rHAはクレード1またはクレード2に由来する、rHAはパンデミック豚インフルエンザウイルス株に由来する、rHAはパンデミックH1N1株に由来する、組成物は、単一の、つまり一つ以下の明確な組換えタンパク質を含有する、一用量のrHAの量は約15~約0.1μgの範囲である、rHAは、好適なレベルの糖鎖を実現するために昆虫または哺乳類細胞のいずれかから発現される、rHAは融合タンパク質として表される、アジュバントはGLAにすぎないま

30

40

50

たは G L A を含む、アジュバントは 3 D - M P L にすぎないまたは 3 D - M P L を含む、組成物はオイルフリーである、組成物は、約 1 % v / v 未満の油または約 0 . 1 % v / v 未満の油を含有する、アジュバントは抗原と組み合わせる前に、水溶液として処方される、アジュバントは、抗原と組み合わせる前に、リポゾーム含有組成物中に処方される、組成物はさらに、アルミニウム塩またはサポニンを含有する、の 1 つ以上（つまりいずれかの組み合わせ）によって定義され得る。

【 0 0 1 2 】

一実施形態では、本発明は、(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素 (r H A) と、(b) アジュバントであって、アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、非還元末端の 1 位の炭素は、エーテル (- O -) 基またはアミノ (- NH -) 基のいずれかを介して、還元末端の 6 ' 位の炭素に結合され、二糖は、非還元末端の 4 ' 炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド (- NH - C (O) -) および / またはエステル (- O - C (O) -) 結合を介して、複数の脂質基へ結合され、エステルまたはアミド結合のカルボニル (- C (O) -) 基は、脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも 8 つの炭素を含有する、アジュバントと、を含有し、投与は、一回の注射後に血清変換を実現する、薬学的組成物の一回の注射によって、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する予防接種を必要としている対象に、予防接種を行う方法を提供する。個別にまたはいずれかの組み合わせにおいて発明をさらに定義し得る種々の実施形態において、組成物は、乳剤を含まず、アジュバントは G L A であり、アジュバントは 3 D - M P L である。

10

20

30

40

【 0 0 1 3 】

例えば、発明は、一実施形態では、薬学的組成物の一回の注射によって、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する予防接種を必要としている対象に、予防接種を行う方法で使用するために、(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素 (r H A) と、(b) アジュバントであって、アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、非還元末端の 1 位の炭素は、エーテル (- O -) 基またはアミノ (- NH -) 基のいずれかを介して、還元末端の 6 ' 位の炭素に結合され、二糖は、非還元末端の 4 ' 炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド (- NH - C (O) -) および / またはエステル (- O - C (O) -) 結合を介して、複数の脂質基へ結合され、エステルまたはアミド結合のカルボニル (- C (O) -) 基は、脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも 8 つの炭素を含有する、薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、組成物の投与により、一回の注射後に集団の少なくとも 50 % 、または少なくとも 60 % 以上において血清変換を実現する、集団に、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスの予防接種を行う方法で使用し得る。一態様では、薬学的組成物は油分を含まない、つまりオイルフリーである、または組成物の血清変換有効性に影響しない最小限の油分量を含有し、油分含有乳剤は含まない。これらの実施形態のいずれかとの組み合わせにおいて、発明の一態様は、アジュバントとして G L A を使用することである。別の態様では、3 D - M P L は、アジュバントとして使用し得る。

40

【 0 0 1 4 】

別の実施例として、発明は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する予防接種を必要としている対象に予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物を提供し、(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素 (r H A) と、(b) アジュバントであって、アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、非還元末端の 1 位の炭素は、エーテル (- O -) 基またはアミノ (- NH -) 基のいずれかを介して、還元末端の 6 ' 位の炭素に結合され、二糖は、非還元末端の 4 ' 炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド (- NH - C (O) -)

50

) および / またはエステル (- O - C (O) -) 結合を介して、複数の脂質基へ結合され、エステルまたはアミド結合のカルボニル (- C (O) -) 基は、脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも 8 つの炭素を含有し、組成物は、用量を節約する、アジュバントと、を含有する。対象者にプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスの予防接種を行う方法で使用するための薬学的組成物、r H A は、用量を節約する量で存在する。個別にまたはいずれかの組み合わせで発明をさらに定義する種々の実施形態において、r H A は、アジュバントがない予防免疫を提供しない濃度で存在し、単一の、つまり 1 つ以下の組換えタンパク質を含有し、一用量の r H A 量は約 15 ~ 約 1 μ g の範囲であり、アジュバントは G L A であり、r H 5 は H 5 N 1 インフルエンザの病原性株に由来する。

10

【0015】

これらおよび他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照により、明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1 A】 r H 5 / G L A - S E ワクチンの一回の注射は、マウスの H 5 N 1 感染を予防する。(A) マウス (5 / 群) に、2 % v / v の S E 乳剤または G L A - S E アジュバント (20 μ g G L A) に処方された 50、150、450、900、または 2700 ng の r H 5 (VN) で、一度、予防接種を行い、次いで、14 日目に、H 5 N 1 ウィルス (1000 \times L D₅₀) で攻撃した (IN)。群毎の最大体重減少割合の平均を、二週間にわたって、各群で決定した。曲線下の領域 (経時的体重減少 (%)) が、r H 5 の各用量について決定された。(B) ウィルス攻撃後の連続した日におけるマウスの体重減少 (%)。マウスは、S E のみまたは G L A - S E アジュバントで、またはタンパク質がない G L A - S E または S E で処方された 50 ng の r H 5 がワクチン投与された。各データポイントは、群 + / - 平均値の標準誤差毎の平均の体重減少を表す。(C) c 57 B 1 / 6 マウスにおけるアジュバント媒介 r H 5 保護。マウス (5 / 群) に、G L A - S E のみ、または 2 % v / v の S E のみ、5 μ g の G L A のみ、または 5 μ g の G L A - S E で処方された 50 ng の r H 5 (VN) で一度ワクチン投与した。マウスは、14 日目に、H 5 N 1 ベトナム 1203 ウィルス (1000 \times L D₅₀) で攻撃され (IN)、生存および体重減少がモニターされた。各データポイントは、群毎の平均の体重減少 + / - 平均値の標準誤差を表す。

20

30

40

【図 1 B】 r H 5 / G L A - S E ワクチンの一回の注射は、マウスの H 5 N 1 感染を予防する。(A) マウス (5 / 群) に、2 % v / v の S E 乳剤または G L A - S E アジュバント (20 μ g G L A) に処方された 50、150、450、900、または 2700 ng の r H 5 (VN) で、一度、予防接種を行い、次いで、14 日目に、H 5 N 1 ウィルス (1000 \times L D₅₀) で攻撃した (IN)。群毎の最大体重減少割合の平均を、二週間にわたって、各群で決定した。曲線下の領域 (経時的体重減少 (%)) が、r H 5 の各用量について決定された。(B) ウィルス攻撃後の連続した日におけるマウスの体重減少 (%)。マウスは、S E のみまたは G L A - S E アジュバントで、またはタンパク質がない G L A - S E または S E で処方された 50 ng の r H 5 がワクチン投与された。各データポイントは、群 + / - 平均値の標準誤差毎の平均の体重減少を表す。(C) c 57 B 1 / 6 マウスにおけるアジュバント媒介 r H 5 保護。マウス (5 / 群) に、G L A - S E のみ、または 2 % v / v の S E のみ、5 μ g の G L A のみ、または 5 μ g の G L A - S E で処方された 50 ng の r H 5 (VN) で一度ワクチン投与した。マウスは、14 日目に、H 5 N 1 ベトナム 1203 ウィルス (1000 \times L D₅₀) で攻撃され (IN)、生存および体重減少がモニターされた。各データポイントは、群毎の平均の体重減少 + / - 平均値の標準誤差を表す。

【図 1 C】 r H 5 / G L A - S E ワクチンの一回の注射は、マウスの H 5 N 1 感染を予防する。(A) マウス (5 / 群) に、2 % v / v の S E 乳剤または G L A - S E アジュバント (20 μ g G L A) に処方された 50、150、450、900、または 2700 ng

50

の rH5 (VN) で、一度、予防接種を行い、次いで、14日目に、H5N1ウイルス (1000 × LD₅₀) で攻撃した (IN)。群毎の最大体重減少割合の平均を、二週間にわたって、各群で決定した。曲線下の領域 (経時的体重減少 (%)) が、rH5 の各用量について決定された。 (B) ウイルス攻撃後の連続した日におけるマウスの体重減少 (%)。マウスは、SE のみまたは GLA - SE アジュバントで、またはタンパク質がない GLA - SE または SE で処方された 50ng の rH5 がワクチン投与された。各データポイントは、群 + / - 平均値の標準誤差毎の平均の体重減少を表す。 (C) c57B1 / 6 マウスにおけるアジュバント媒介 rH5 保護。マウス (5 / 群) に、GLA - SE のみ、または 2% v / v の SE のみ、5 μg の GLA のみ、または 5 μg の GLA - SE で処方された 50ng の rH5 (VN) で一度ワクチン投与した。マウスは、14日目に、H5N1 ベトナム 1203 ウイルス (1000 × LD₅₀) で攻撃され (IN)、生存および体重減少がモニターされた。各データポイントは、群毎の平均の体重減少 + / - 平均値の標準誤差を表す。

【図 2】GLA - SE アジュバントは、不均質 H5N1 ウイルスによる攻撃後にワクチン投与されたマウスの生存を向上させる。マウス (5 / 群) に、GLA - SE アジュバントで処方された 50ng の同種 (VN) rH5、GLA - SE アジュバント中に処方された 50ng または 200ng の不均質 (Indo) rH5、または 200ng の不均質 rH5 のみあるいは SE 乳剤で処方された rH5 をワクチン投与した。マウスは、14日目に、H5N1 ベトナム 1203 ウイルス (1000 × LD₅₀) で攻撃され (IN)、生存および体重減少をモニターした。各データポイントは、群毎の平均の体重減少 + / - 平均値の標準誤差を表す。

【図 3 A】GLA - SE は、抗原特異的免疫の誘導および病気からの回復を促進する。 (A) 攻撃前のワクチン投与された日数の関数としてのマウスの生存率。マウスは、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5、または GLA - SE のみで予防接種を行い、H5N1 ベトナム 1203 ウイルス (1000 × LD₅₀) によるワクチン接種後、0、2、4、6、8、10、または 12 日目に (IN) を攻撃した。 (B) ウイルス性攻撃前 6 日目または 14 日目における、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5 がワクチン投与されたマウスにおける経時的体重減少 (%)。 (C) 観察的スコアシステムに基づく (B) からのマウスの全般的な健康状態の変化 (0 = 普通、1 = 病気の疑いあり、2 = 症状は軽いが病気である、3 = 中程度の症状の病気、4 = 死に瀕するほどの深刻な病気)。

【図 3 B】GLA - SE は、抗原特異的免疫の誘導および病気からの回復を促進する。 (A) 攻撃前のワクチン投与された日数の関数としてのマウスの生存率。マウスは、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5、または GLA - SE のみで予防接種を行い、H5N1 ベトナム 1203 ウイルス (1000 × LD₅₀) によるワクチン接種後、0、2、4、6、8、10、または 12 日目に (IN) を攻撃した。 (B) ウイルス性攻撃前 6 日目または 14 日目における、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5 がワクチン投与されたマウスにおける経時的体重減少 (%)。 (C) 観察的スコアシステムに基づく (B) からのマウスの全般的な健康状態の変化 (0 = 普通、1 = 病気の疑いあり、2 = 症状は軽いが病気である、3 = 中程度の症状の病気、4 = 死に瀕するほどの深刻な病気)。

【図 3 C】GLA - SE は、抗原特異的免疫の誘導および病気からの回復を促進する。 (A) 攻撃前のワクチン投与された日数の関数としてのマウスの生存率。マウスは、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5、または GLA - SE のみで予防接種を行い、H5N1 ベトナム 1203 ウイルス (1000 × LD₅₀) によるワクチン接種後、0、2、4、6、8、10、または 12 日目に (IN) を攻撃した。 (B) ウイルス性攻撃前 6 日目または 14 日目における、50ng の rH5 のみ、または SE あるいは GLA - SE で処方された rH5 がワクチン投与されたマウスにおける経時的体重減少 (%)。 (C) 観察的スコアシステムに基づく (B) からのマウスの全般的な健康状態の変化 (0 = 普通、1 = 病気の疑いあり、2 = 症状は軽いが病気である、3

10

20

30

40

50

= 中程度の症状の病気、4 = 死に瀕するほどの深刻な病気。

【図4A】GLAベースのrH5ワクチンは、同種および不均質のウイルス攻撃後のマウスの恒久的予防免疫を提供する。(A)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの同種(VN)rH5をワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃した。マウスは、攻撃後2週間、毎日、体重変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(B)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの不均質(Indo)rH5でワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃された。マウスは、攻撃後、二週間にわたり、毎日、体重の変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(C)攻撃後3日目または6日目に、示された処方の同種(VN)または不均質(Indo)のrH5をワクチン投与されたマウスにおいて、ウイルス負荷量が決定された。

【図4B】GLAベースのrH5ワクチンは、同種および不均質のウイルス攻撃後のマウスの恒久的予防免疫を提供する。(A)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの同種(VN)rH5をワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃した。マウスは、攻撃後2週間、毎日、体重変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(B)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの不均質(Indo)rH5でワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃された。マウスは、攻撃後、二週間にわたり、毎日、体重の変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(C)攻撃後3日目または6日目に、示された処方の同種(VN)または不均質(Indo)のrH5をワクチン投与されたマウスにおいて、ウイルス負荷量が決定された。

【図4C】GLAベースのrH5ワクチンは、同種および不均質のウイルス攻撃後のマウスの恒久的予防免疫を提供する。(A)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの同種(VN)rH5をワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃した。マウスは、攻撃後2週間、毎日、体重変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(B)マウス(5/群)は、それのみまたは説明のように処方された50ngの不均質(Indo)rH5でワクチン投与され、46日後にH5N1ベトナム1203ウイルス(1000×LD₅₀)によって攻撃された。マウスは、攻撃後、二週間にわたり、毎日、体重の変化をモニターされた。各データポイントは、群毎の平均体重減少+/-平均値の標準誤差を表す。(C)攻撃後3日目または6日目に、示された処方の同種(VN)または不均質(Indo)のrH5をワクチン投与されたマウスにおいて、ウイルス負荷量が決定された。

【図5A】GLAベースのrH5ワクチンの一回の接種は、フェレットをH5N1の感染から予防する。フェレット(4/群)は、0.5μgのrH5抗原のみ、または示された処方により、一回、接種が行われ、28日目に、H5N1VN1203(0.75×10⁶pfu)の鼻内感染で攻撃された。(A)体重変化(%)。各データ点は、フェレット+/-平均値の標準誤差の平均を示すが、例外として、GLA-SEおよびrH5のグループは、それぞれ、1匹および2匹の生き残ったフェレットによる結果を示す。(B)観察的スコアシステムに基づく、全体的な健康の変化:0=普通、1=病気の疑いあり、2=症状は軽いが病気である、3=中程度の症状の病気、4=死に瀕するほどの深刻な病気。

【図5B】GLAベースのrH5ワクチンの一回の接種は、フェレットをH5N1の感染から予防する。フェレット(4/群)は、0.5μgのrH5抗原のみ、または示された処方により、一回、接種が行われ、28日目に、H5N1VN1203(0.75×10⁶pfu)の鼻内感染で攻撃された。(A)体重変化(%)。各データ点は、フェレット

10

20

30

40

50

+ / - 平均値の標準誤差の平均を示すが、例外として、G L A - S E および r H 5 のグループは、それぞれ、1 匹および 2 匹の生き残ったフェレットによる結果を示す。(B) 観察的スコアシステムに基づく、全体的な健康の変化：0 = 普通、1 = 病気の疑いあり、2 = 症状は軽いが病気である、3 = 中程度の症状の病気、4 = 死に瀕するほどの深刻な病気。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本開示は、ワクチンとして使用するための組成物およびワクチンを対象に予防接種する方法を提供し、ワクチンは、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスによる組換え赤血球凝集素を含有し、アジュバントワクチンは、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスを予防し、概して、体液性および細胞性免疫の両方をもたらし、記憶免疫細胞を生じさせる。

10

【0018】

本明細書に記載されるワクチンおよび薬学的組成物は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの赤血球凝集素 (H A) および D S L P アジュバント、例えば、G L A であり得る、化学式 (1) に従うアジュバントを含有しプレパンデミックおよびパンデミックの段階においてヒトがこのウイルスに罹患することを予防することを目的とする。さらに、組成物は、アジュバント (用量または抗原を節約する) がない場合に必要であるよりもより少ないワクチン接種 (用量を節約する) および / またはより低い H A 投与量で、関連するウイルスに対する免疫反応を増強させ、関連するウイルスに対する交差再活性をもたらすという利点を提供する。

20

【0019】

A. 赤血球凝集素の調製

1. H A 源

少なくとも 4 つの異なるインフルエンザ A ウィルス、H 5 N 1、H 1 N 1、H 7 N 7、および H 9 N 2 について、現在、プレパンデミックまたはパンデミックの懸念がある。

【0020】

インフルエンザ A ウィルス亜型 H 5 N 1 は、ヒトおよび多くの他の動物の種において病気を引き起こし得るインフルエンザウイルスの亜型である。H 5 N 1 (H P A I H 5 N 1) の非常に病原性の強い株は、「鳥類インフルエンザ」または「鳥インフルエンザ」の原因となる。現在では鳥類の疾患であるが、感染した鳥と広範囲に物理的に接觸したほとんどまたは全てのヒトに感染する可能性がある。パンデミックの全ての条件が満たされているわけではないため、H 5 N 1 はプレパンデミックウイルスとして分類され、最も留意すべき点として、ウイルスはヒト同士で容易にかつ持続的に拡大しない。

30

【0021】

H 5 N 1 型の鳥類インフルエンザ (本明細書では「H 5 N 1」と称する) は、アジアで最初に発生し、世界中に広まった。H 5 N 1 ウィルスは進化しつつあり、それらの H A 分子の抗原および配列特性に基づいて、明確なクレードおよびサブクレードに分類できる。

「クレード」は、共通の祖先に由来する関連する有機体を指す。ヒトにおいて H 5 N 1 感染が 2003 年の再出現以来、いくつかの異なるクレードが、ヒト疾患の 300 ケースよりも多くから、分離されている。WHO (世界保健機関) は、非常に病原性の強い H 5 N 1 鳥類インフルエンザウイルスの命名法システムの統一化に着手した (Brown et al., Influenza Other Respir Viruses 3:59-62, 2009, Donis et al., Emerg Infect Dis. 14: e1, 2008、さらに、「Continuing progress toward a unified nomenclature system for the highly pathogenic H 5 N 1 avian influenza viruses」www.who.int も参照)。2009 年 3 月の時点で、10 の明確なウイルスクレード (0 ~ 9 番) が特定された。

40

【0022】

50

主に東南アジアおよびアジアで分離されてきたクレード1およびクレード2ウイルスは、最も多く、ワクチン開発の対象となっている。最初のFDA認可H5N1ワクチンは、H5クレード1ウイルスに基づく従来のワクチンであったが、研究参加者の約半分のみにおいては、予防レベルの中和力価を誘導し、さらに、大量のHAを二用量、必要とした。試験における組換えワクチンは、同様の結果をもたらした(Treanor et al., Vaccine 19: 1732-1737)。パンデミックに対処可能なワクチンは、より多くの個人を予防するだけでなく、用量節約および投与量節約の両方の改善点を必要とする。

【0023】

NCB Iの「Influenza Virus Resource」(2010年1月14日アクセス)において、およそ1335の独自の全長H5配列が存在する。これらのH5配列のいずれも使用可能である。HA配列は、いずれのクレードまたはサブクレードに由来してもよい。最も多いものとして、HAは、クレード1または2に由来する。WHOの参照H5 HA抗原は、主にクレード2であるが、さらに、クレード1、4、および7のHAを含む(www.who.intでアクセスされる、「Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines」2009年2月)。参照抗原は、以下の表に示される抗原を含む。

【0024】

【数1】

ウイルス名	クレード	GenBank受託番号または参考文献*
A/ベトナム/1203/2004	1	ABW90135
A/インドネシア/5/2005	2.1	ABP51969
A/アヒル/湖南/795/2002	2.1	ACA47835
A/オオハクチョウ/MG/244/2005	2.2	ACD68156
A/トルコ/65-596/2006	2.2	ABQ58925
A/インドガン/青海/1A/2005XPR8	2.2	Chen et al. J. Virol. 80: 5976 (2006)
A/ニワトリ/インド/NIV-33487/2006	2.2	ABQ45850
A/エジプト/321-NAMRU3/2007	2.2	
A/ニワトリ/韓国/金堤/2008	2.3.2	
A/安徽/I/2005	2.3.4	ABD28180
A/安徽/I/2005XPR8IBDC RG-6	2.3.4	
A/ニワトリ/マレーシア/935/2006	2.3.4	
A/メジロ/香港/1038/2006	2.3.4	ABJ96775
A/ガチョウ/貴陽/337/2006	4	ABJ96698
A/ニワトリ/ベトナム/NCVD-016/2008	7	ACO07033

* 全てのGenBank受託番号および参考文献における配列は、それらの全体が組み込まれる。

【0025】

パンデミックが懸念されている別の亜型は、H1N1パンデミックウイルス(「豚インフルエンザ」ウイルス)、つまり2009年のインフルエンザパンデミックおよび1918年のスペイン型インフルエンザの元になった型である。2009年のパンデミックを引き起こした株は、パンデミックH1N1 2009ウイルスと呼ばれる。2010年2月18日現在、900を超えるHAの非冗長タンパク質配列が、NCB Iおよびインフルエンザ研究データベース(fludb.org)において利用可能である。米国では、A/カリフォルニア/4/2009(その全体が組み込まれる、受託番号ACP41105)

10

20

30

40

50

および A / カリフォルニア / 7 / 2009 (その全体が組み込まれる、受託番号 A C Q 5 5 3 5 9) は、ワクチンを作成するために使用される株である。他の株による H A 10 も適している。

【 0 0 2 6 】

他の可能性のあるインフルエンザのパンデミックウイルスは、オランダで発生した H 7 N 7 および中国で発生した H 9 N 2 を含む。2003 年以来、オランダは、鳥類における別の非常に病原性の強い鳥インフルエンザウイルス (H 7 N 7) の発生を報告している。仕事で鳥類を扱う人および家族の間で、約 90 人のヒトの感染が確認されており、ウイルスの抗体は、感染した鳥類と接触しなくても、感染した個人との家庭内の近接した接触によって、ヒト同士で広範囲に広がっていることがわかり、これにより高レベルのヒト間感染が示唆されている。H 9 N 2 は、中国におけるヒト疾患を生じさせたことがわかった別の鳥インフルエンザウイルスである。米国立アレルギー感染病研究所は、パンデミックの可能性のあるウイルスとして H 9 N 2 を特定している。いくつかの適した株には、A / 香港 / 1073 / 99 (H 9 N 2) および A / NL / 209 / 07 (H 7 N 7) を含む。

【 0 0 2 7 】

薬学的組成物およびワクチン用の赤血球凝集素タンパク質は全長であり得るが、前駆タンパク質、断片、融合タンパク質の一部、またはペプチドでもあり得る。全長タンパク質は成熟タンパク質を指し、例えば、赤血球凝集素タンパク質の場合、成熟タンパク質は、ビリオンでみられる形態である（例えば、リーダーペプチドが欠けている、H A 0 から H A 1 および H A 2 へ開裂され得る）。前駆体タンパク質（プレタンパク質）は、処理が生じる前の発生期の翻訳されたタンパク質、または部分的に処理されたタンパク質である。融合タンパク質の一部として、H A タンパク質は、前駆または全長タンパク質あるいはタンパク質断片またはペプチドとして存在し得る。タンパク質の断片またはペプチドは免疫的であることが必要であり、免疫反応をもたらす 1 つ以上のエピトープを含有する。

【 0 0 2 8 】

ペプチドは、T 細胞受容体への結合のために M H C 分子と複合するように選択され、概して最大で約 30 のアミノ酸長さ、または最大で約 25 のアミノ酸長さ、または最大で約 20 のアミノ酸長さ、または最大で約 15 のアミノ酸長さ、最大で約 12 のアミノ酸長さ、最大で約 9 のアミノ酸長さ、最大で約 8 のアミノ酸長さである。概して、より短いペプチドは、M H C クラス I 分子と結合するまたはこれを関連付け、より長いペプチドは、M H C クラス I I 分子に結合するまたはこれを関連付ける。適したペプチドは、多数の生物情報プログラムのいずれかを使用して予測でき、公知の方法を用いて試験できる。

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載されるように、適したタンパク質は、前駆タンパク質、成熟タンパク質、断片、融合タンパク質およびペプチドを含む。1 つよりも多い H A は、組成物に存在し得る。複数の H A タンパク質が使用される場合、H A タンパク質は、同じウイルス、または異なるウイルスに由来し得る。さらに、複数のタンパク質は、同じ形態またはこれらの形態の混合物として存在し得る。例えば、H A タンパク質は、成熟タンパク質としておよび断片としての両方で、存在し得る。

【 0 0 3 0 】

典型的には、薬学的またはワクチン組成物における H A は、リーダー配列を有する糖タンパク質の真核生物の発現によって、典型的には、リーダー配列が存在しない成熟タンパク質（シグナルペプチドとしても公知である）が生じるため、前駆タンパク質以外になる。H A の疎水性リーダー配列の長さは、分離株同士でいくらか異なり得るが、典型的には約 18 のアミノ酸長さである。しかしながら、組換え発現のために、シグナルペプチドは、前駆タンパク質の一部であってもよい。シグナルペプチドは、H A の天然配列または当該技術で公知の他の配列を含む。

【 0 0 3 1 】

タンパク質断片は、免疫原性である必要がある。いくつかのケースにおいて、断片は、免疫優勢ペプチド配列を含有する。免疫原性ペプチド配列は、B または T 細胞（例えば、

10

20

30

40

50

CD4またはCD8T細胞)によって識別されるものである。ペプチド配列は、概して一連の重複するペプチドを使用して、完全な配列に由来するペプチドのスクリーニングによって識別できる。種々のアッセイを、BまたはT細胞がペプチドに識別および反応するかどうかを決定するために使用できる。例えば、クロム放出細胞毒性法(アッセイの方法のために、本方法に組み込まれるKim et al., J Immunol 181:6604-6615, 2008)、ELISPOTアッセイ、細胞内サイトカイン染色法およびMHC多量体染色(Novak et al. J Clin Invest 104:R63-R67, 1999, Altman et al., Science 274:94-96, 1996)、ELISアッセイ、キャリアに結合されたペプチドによるマウスの予防接種後の他の種類の抗体測定が、適したアッセイである。免疫原性ペプチドも、生物情報ソフトウェア(Molecular Biology vol. 409, 2007の「Immunoinformatics: Predicting immunogenicity in silico」方法)によって予測できる。いくつかの例示的なプログラムおよびデータベースは、FRED(Feldgahn et al. Bioinformatics 15:2758-9, 2009)、SVMHC(DonnesおよびKohlbacher, Nucleic Acids Res 34:W1940, 197, 2006)、AntigenDB(Ansari et al., Nucleic Acids Res 38:D847-853, 2010)、TEPITOPE(Bian and Hammer Methods 34:468-475, 2004)を含む。

10

20

30

40

【0032】

HAは、融合タンパク質の一部として組み込み可能である。他の融合パートナーまたはパートナーは、インフルエンザノイラミニダーゼ等の別のHAタンパク質または非HAタンパク質にすることができる。融合タンパク質を使用するためのいくつかの共通の理由は、発現を向上させるまたは生成されたタンパク質の精製を支援することである。例えば、発現システムの宿主細胞に調整されたシグナルペプチド配列は、HAタンパク質に結合できる、またはタンパク質精製で使用するためのタグ配列を結合でき、従って、切断配列も組み込まれる場合に開裂できる。タンパク質のうちの1つ以上からの複数のペプチドエピトープを融合することができる、またはタンパク質のうちの1つ以上からの断片を融合することができる。複数のペプチドエピトープは、いずれかの順序にできる。

30

【0033】

組成物におけるHAの他の適した源は、HAを含有するウイルス様粒子(VLP)(その全体が組み込まれる、米国特許第2005009008号)、核酸エンコーディングHA(全て、その全体が組み込まれる、米国特許第2003045492号、米国特許第7537768号、国際公開第WO09092038号、Smith et al. Vaccine Jan 29, 2010)、さらに、弱毒化および不活性化ウイルス(全て、その全体が組み込まれる、米国特許第6022726号、米国特許第7316813号、米国特許第2009010962号、国際公開第WO99/57284号、米国特許第2008254060号)を含む。

40

【0034】

2. 組換合成ベクター構成

前駆タンパク質、断片、融合タンパク質およびペプチドを含むHAタンパク質は、インキュベート細胞において製造され得る、または化学的に合成され得る。(「HAタンパク質」は、これらの全ての形態を含むために、本明細書において使用されている。)ペプチドは、特に、機械(多くが市販されている)を使用してまたは手で、化学的に便利に合成され得る。あるいは、多様な適した発現システム、原核細胞および真核性システムの両方が公知であり、使用され得る。よく使用され、タンパク質製造に適している宿主細胞は、大腸菌、酵母、昆虫、および哺乳類を含む。発現ベクターおよび宿主細胞が、市販されている(例えば、Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)または構成され得る。例示的なベクターは、プロモーターおよび配列が手術的に(Ope

50

r a t i v e l y) 結合されるように、対象のタンパク質をエンコーディングする配列のプロモーターおよびクローニング部位を含有する。分泌シグナル配列（リーダー配列と呼ばることもある）、タグ配列（例えば、hexa-His）、転写終結シグナル、特に、ベクターが染色体外で複製される場合の複製源、および選択可能な生成物をエンコーディングする配列等の、他の要素が存在し得る。選択的な要素が、それらの目的に従ってベクター内に配置される。宿主細胞に核酸を導入するための方法および手順も公知である。

【0035】

HAは糖鎖タンパク質であるため、最も多くの場合、選択した発現システムは、酵母（例えば、米国特許第5856123号、米国再発行特許第RE35749号、米国特許第4925791号、さらに、Pichia Pink（登録商標）Invitrogen、CA USA、クルイベロミセス・ラクチスタンパク質発現キット、NEB, MA, USA）、哺乳類細胞およびバキュロウイルス（米国特許第4745051号、米国特許第5762939号、米国特許第5858368号、米国特許第6103526号、本明細書において識別される全ての米国特許参照は、その全体が本明細書中に組み込まれる）等のタンパク質を糖化する真核性システムである。

【0036】

HAのコーディング配列を含むバキュロウイルスが昆虫細胞に感染し、HAを発現させる昆虫発現システムは、特に適した発現システムである。昆虫細胞内の発現は、概して、高い濃度および量のタンパク質を生じさせ、真核性翻訳後修飾（例えば、糖鎖）を有するタンパク質を作り出し、プレパンデミックワクチンで充分なタンパク質を生成する製造レベルまでスケールを拡大することができる。発現システムおよび方法が当該技術で公知であり、例えば、多くの市販のシステムおよびサービスプロバイダーが存在している（例えば、Invitrogen, Carlsbad CA, Protein Sciences Meriden, CT, Clontech, Mountain View, CA, baculovirus.comにてベンダーおよびサービスプロバイダーのリストも参照）。

【0037】

例示的な昆虫発現システムにおいて、主要な遺伝子生成物は、加工されておらず（例えば、全長赤血球凝集素）、分泌されておらず、感染した細胞の表在性膜に関連付けられたままである（米国特許第5762939号）。感染後数日目に、組換えHA（rHA）を表在性膜から抽出できる（米国特許第5858368号、rHAの抽出および精製について組み込まれた参考文献）。適した一抽出方法は、非変性、非イオン性洗浄剤または他の公知の技術の使用を伴う。出現されたタンパク質は、「そのまま」使用してもよい、またはより典型的には、分析およびさらに精製してもよい。さらなる精製を、例えば、親和性クロマトグラフィ、ゲルクロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィまたは当業者に公知の他の同等の方法によって行うことができる。rHAは、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の純度に精製される。

【0038】

純度または数量を決定するための典型的な手順は、ゲル電気泳動、ウェスタンプロット法、質量分析法、およびELISAを含む。タンパク質の活性は、概して、実施例に記載されているもの等の生物学的アッセイで査定される。必要な場合または所望の場合には、タンパク質は、さらに精製してもよい。多くの精製方法が公知であり、サイズクロマトグラフィ、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィ、析出、免疫析出等を含む。タンパク質の意図的な使用は、典型的には、最も高いレベルの純度を必要とする可能性のあるヒトにおける使用について、精製の程度を決定する。

【0039】

B. アジュvant

本発明は、アジュvantを含むおよび/または利用する組成物、キット、方法等を提供する。アジュvantは、D S L Pとして示される群から選択される1つ以上の合成物である。D S L P合成物は、グルコースおよびアミノ置換グルコースから選択される2つの单

10

20

30

40

50

糖群の結合によって形成される二糖 (D S) 基を含有するという特徴を共有し、ここで、二糖は、リン酸 (P) 基および複数の脂質 (L) 基の両方に化学的に結合する。特に、二糖は、それぞれ、6つの炭素を有する2つの単糖ユニットから形成されるものとして視覚化され得る。二糖において、単糖のうちの1つは還元端を形成し、他の単糖は、非還元端を形成する。便宜上、還元末端を形成する単糖の炭素は、従来の炭水化物番号指定命名法に従う、1、2、3、4、5、および6位に位置するものとして示されるが、非還元末端を形成する単糖の対応する炭素は、1'、2'、3'、4'、5'、および6'位に位置するものとして示される。D S L Pにおいて、非還元末端の1位の炭素は、エーテル (-O-) またはアミノ (-NH-) 基のいずれかを介して、還元末端の6'位の炭素に結合される。リン酸基は、好適には非還元末端の4'炭素を介して、二糖に結合される。脂質基のそれぞれは、アミド (-NH-C(O)-) またはエステル (-O-C(O)-) のいずれかを介して二糖と結合し、ここで、カルボニル基は脂質基と結合する。二糖は、アミドまたはエステル基、すなわち、非還元末端の2'、3'、および6'位、ならびに還元末端の1、2、3、および4位に結合され得る、7つの位置を有する。

10

【0040】

脂質基は、少なくとも6つの炭素、好適には少なくとも8つの炭素、およびより好適には少なくとも10の炭素を有し、ここで、各ケースにおいて、脂質基は、好適には24以下の炭素、好適には22以下の炭素、およびより好適には20以下の炭素を有する。一態様において、共に取られる脂質基は、60～100の炭素、好適には70～90の炭素を提供する。脂質基は、炭素および水素原子のみで構成されていてもよい、つまり、ヒドロカルビル脂質基であってもよい、または1つのヒドロキシル基を含有してもよい、つまりヒドロキシル置換脂質基であってもよい、あるいは、エステル基のカルボニル (-C(O)-)、つまりエステル置換脂質を介して、ヒドロカルビル脂質またはヒドロキシル置換脂質基に結合される、エステル基を含有してもよい。ヒドロカルビル脂質基は飽和または不飽和であってもよく、不飽和ヒドロカルビル脂質基は、隣接する炭素原子の間の1つの二重結合を有する。

20

【0041】

D S L Pは、3、または4、または5、または6または7つの脂質を含有する。一態様では、D S L Pは、3つから7つの脂質を含有し、一方で、別の態様では、D S L Pは、4～6つの脂質を含有する。一態様では、脂質は、ヒドロカルビル脂質、ヒドロキシル置換脂質、およびエステル置換脂質から独立して選択される。一態様では、1、4'および6'位はヒドロキシルによって置換される。一態様では、単糖ユニットはそれぞれグルコサミンである。D S L Pは、自由酸の形態、または塩の形態であってもよい(例えば、アンモニウム塩)。

30

【0042】

一態様では、D S L P上の脂質は、次のように記述できる。つまり、3'位は-O-(C O)-CH₂-CH(R_a)(-O-C(O)-R_b)によって置換され、2'位は、-NH-(C O)-CH₂-CH(R_a)(-O-C(O)-R_b)によって置換され、3位は、-O-(C O)-CH₂-CH(OH)(R_a)によって置換され、2位は、-NH-(C O)-CH₂-CH(OH)(R_a)によって置換される。ここで、R_aおよびR_bのそれぞれは、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシルから選択され、ここで、これらの用語はそれぞれ、飽和ヒドロカルビル基を指す。一実施形態では、R_aは、ウンデシルであり、R_bはトリデシルであり、ここで、このアジュバントは、例えば米国特許出願公開第2008/0131466号において「GLA」と記述される。R_aがウンデシルでありR_bがトリデシルである合成物は、例えばPHAD(登録商標)アジュバントとしてAvanti Polarから利用可能なものとして、立体化学的に定義された形態で使用され得る。

40

【0043】

別の態様では、D S L Pは、3D-MPLとして公知の天然由来の合成物の混合物である。3D-MPLアジュバントは、それらのMPL(登録商標)アジュバントとしてGa

50

x o Smith Kline Company による薬学的グレード形態で商業的に製造される。3 D - M P L は、科学文献および特許文献において広範囲に記載されており、例えば、Vaccine Design: the subunit and adjuvant approach、Powell M. F. and Newman, M. J. eds., Chapter 21 Monophosphoryl Lipid as an adjuvant: past experiences and new directions by Ulrich, J. T. and Myers, K. R., Plenum Press, New York (1995) および米国特許第4,912,094号を参照されたい。

【0044】

別の態様では、D S L P アジュバントは、(i) 非還元末端グルコサミンのヘキソサミン1位および還元末端グルコサミンのヘキソサミン6位の間のエーテル結合を介して、非還元末端グルコサミンに結合される還元末端グルコサミンを有するジグルコサミン主鎖、(ii) 非還元末端グルコサミンのヘキソサミン4位に結合するO-ホスホリル基、および(iii) 最大で6つの脂肪アシル鎖を含有するものとして記載され得る。ここで、脂肪アシル鎖のうちの1つがエステル結合を介して還元末端グルコサミンの3-ヒドロキシに結合し、脂肪アシル鎖のうちの1つがアミド結合を介して非還元末端グルコサミンの2-アミノに結合し、エステル結合を介して12よりも多い炭素原子のアルカノイル鎖に結合するテトラデカノイル鎖を含有し、脂肪アシル鎖のうちの1つがエステル結合を介して非還元末端グルコサミンの3-ヒドロキシに結合し、エステル結合を介して、12よりも多い炭素原子のアルカノイル鎖に結合するテトラデカノイル鎖を含有する。例として、米国特許出願公開第2008/0131466号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0045】

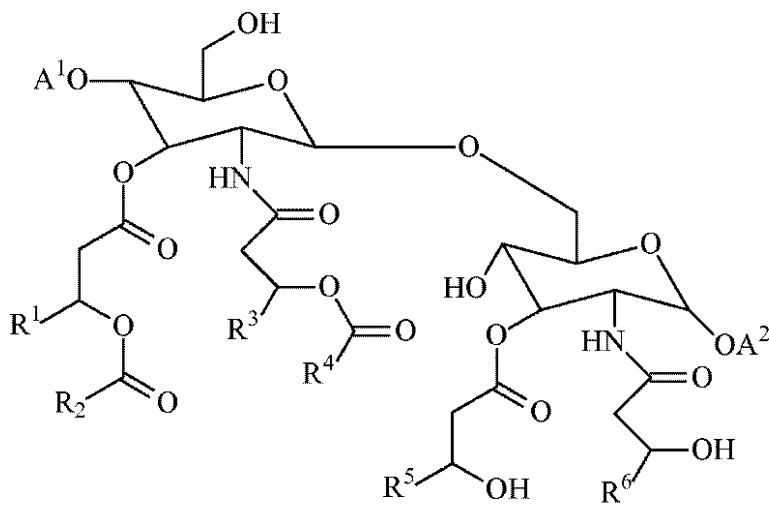
別の態様では、本発明に記載されるアジュバントは、米国特許出願公開第2010/0310602号に記載されるように、6つの脂質基を有する合成二糖であってもよい。

【0046】

別の態様では、本発明で使用されるアジュバントは、化学式(1)によって識別され得る。

【0047】

【化1】



(1)

化学式(1)において、部分A¹およびA²は、水素、リン酸、およびリン酸塩の基から独立して選択される。ナトリウムおよびカリウムは、リン酸塩の例示的な対イオンである。好適にはリン酸基であるA¹O-基は、非還元末端の4'位で二糖に結合する。非還元末端は、その1位を介してエーテル基に結合され、これは、次に、還元末端の6'位に

結合される。化学式(1)の合成物は、それぞれ、部分R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶のうちの1つを組み込む6つの脂質基を有し、ここで、これらのR基は、C₃～C₂₃によって表される、3～23の炭素を有するヒドロカルビル基から独立して選択される。さらなる理解のために、部分が「複数のメンバーを有する特定の基」から独立して選択される場合に、最初の部分に選択されたメンバーは、第2の部分について選択されたメンバーの選択に全く影響しないまたは制限しないことを理解されたい。R¹、R³、R⁵およびR⁶が結合される炭素原子は非対称であり、このため、RまたはSの立体化学のいずれかで存在し得る。一実施形態では、これらの炭素原子の全てはR立体化学であり、一方で、別の実施形態において、これらの炭素原子の全てはS立体化学である。

【0048】

10

「ヒドロカルビル」は、全て水素および炭素によって形成される化学部分を指し、ここで、炭素原子の構成は直鎖または分岐した、非環状または環状であってもよく、隣接する炭素原子の間の結合は、(飽和ヒドロカルビルを提供するために)完全に単一の結合であってもよく、または、(不飽和ヒドロカルビルを提供するために)いずれか2つの隣接する炭素原子の間に存在する二重または三重の結合であってもよく、ヒドロカルビル基内の炭素原子数は3～24の炭素原子である。ヒドロカルビルはアルキルであってもよく、ここで、代表的な直鎖アルキルは、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペントデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル等を含む、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル等を含み、一方で、分岐したアルキルは、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチル等を含む。代表的な飽和環状ヒドロカルビルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等を含み、一方で、不飽和環状ヒドロカルビルは、シクロペニルおよびシクロヘキセニル等を含む。不飽和ヒドロカルビルは、隣接する炭素原子の間の少なくとも1つの二重または三重結合を含有する(ヒドロカルビルが非環状である場合、それぞれ、「アルケニル」または「アルキニル」と称され、ヒドロカルビルが少なくとも部分的に環状である場合、それぞれ、「シクロアルケニル」および「シクロアルキニル」と称される)。代表的な直鎖および分岐したアルケニルは、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2、3-ジメチル-2-ブテニル等を含み、一方で、代表的な直鎖および分岐したアルキニルは、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニル等を含む。

20

【0049】

30

DSLPアジュバントは、当該技術で公知の合成方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれるPCT国際公開第WO2009/035528号、並びに同第WO2009/035528号において特定される公報に開示される合成方法によって取得することができ、これらの公報もそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。化学的に合成されたDSLPアジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントは、存在するDSLP分子、つまり化学式(1)の合成物に対して、少なくとも80%、好適には少なくとも85%、より好適には少なくとも90%、より好適には少なくとも95%であり、さらにより好適には少なくとも96%、97%、98%または99%純粋である調製を指す、実質的に均質な形態で調製できる。所与のアジュバント調製の純度の決定は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析および/または核磁気共鳴分析法等の適正な分析用化学的方法を専門とする者により、容易に行うことができる。天然材料から得られるDSLPアジュバントは、典型的には化学的に純粋な形態での製造が容易ではなく、このため合成的に製造されたアジュバントが、本発明の好適なアジュバントである。前述のように、アジュバントの特定のものは、商業的に取得し得る市販されている。好適なアジュバントは、Alabaster ALのAvanti Polar Lipidsのカタログにおいて識別される製品番号699800であり、以下の、E10と組み合わせたE1を参照されたい。

40

50

【0050】

発明の種々の実施形態において、アジュバントは化学式(1)の化学構造を有するが、部分A¹、A²、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、およびR⁶は、これらの部分について以前に提供されるオプションのサブセットから選択され、ここで、これらのサブセットは、E1、E2等によって、以下に識別される。

E1: A₁はリン酸またはリン酸塩であり、A₂は水素である。

E2: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₃-C₂₁アルキルであり、R²およびR⁴はC₅-C₂₃ヒドロカルビルである。

E3: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₅-C₁₇アルキルであり、R²およびR⁴はC₇-C₁₉ヒドロカルビルである。 10

E4: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₇-C₁₅アルキルであり、R²およびR⁴はC₉-C₁₇ヒドロカルビルである。

E5: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₉-C₁₃アルキルであり、R²およびR⁴はC₁₁-C₁₅ヒドロカルビルである。

E6: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₉-C₁₅アルキルであり、R²およびR⁴はC₁₁-C₁₇ヒドロカルビルである。

E7: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₇-C₁₃アルキルであり、R²およびR⁴はC₉-C₁₅ヒドロカルビルである。

E8: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₁₁-C₂₀アルキルであり、R²およびR⁴はC₁₂-C₂₀ヒドロカルビルである。 20

E9: R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₁₁アルキルであり、R²およびR⁴はC₁₃ヒドロカルビルである。

E10: R¹、R³、R⁵およびR⁶はウンデシルであり、R²およびR⁴はトリデシルである。

【0051】

特定のオプションでは、E2~E10のそれぞれは実施形態E1に組み合わせられ、および/またはE2~E9のヒドロカルビル基はアルキル基、好適には直鎖アルキル基である。

【0052】

DSLPアジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントは、それぞれ後述のように、選択的にコアジュバントを有する薬学的組成物に処方し得る。これに關し、製剤、例えばGLAアジュバントのための水性製剤(AF)および安定乳剤製剤(SE)を提供する米国特許公開第2008/0131466号が参照され、化学式(1)のアジュバントを含む、DSLPアジュバントのうちのいずれかに、これらの製剤を利用し得る。 30

【0053】

DSLPアジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントを提供する本発明は、本明細書でコアジュバントと称される第2のアジュバントとの組み合わせで利用され得る。発明の3つの実施形態において、コアジュバントは送達システムであってもよく、または免疫増強物質であってもよく、あるいは送達システムおよび免疫増強物質の両方として機能する組成物であってもよい(例えば、O'Hagan DT and Rappuoli

R., Novel approaches to vaccine delivery, Pharm. Res. 21(9): 1519-30 (2004)を参照されたい。コアジュバントは、Toll様受容体ファミリー生体分子のメンバーによって作動する免疫増強物質であり得る。例えば、コアジュバントは、TLR4作動薬、またはTLR8作動薬あるいはTLR9作動薬として、その主要な作用モードのために選択され得る。あるいは、または補足として、コアジュバントは、そのキャリアの性質について選択し得る(例えば乳剤、リポゾーム、微粒子、またはカリ明礬にし得る)。 40

【0054】

一態様では、コアジュバントはカリ明礬であり、ここで、この用語は、アルミニウムリン酸(AlPO₄)および水酸化アルミニウム(Al(OH)₃)等のアルミニウム塩を

10

20

30

40

50

指す。コアジュバントとしてカリ明礬が使用される場合、カリ明礬は、約 100~1,000 μg 、または 200~800 μg 、または 300~700 μg または 400~600 μg の量のワクチン用量で存在し得る。D S L P アジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントは、典型的には、カリ明礬未満の量で存在し、種々の態様において、D S L P アジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントは、重量ベースで、カリ明礬重量に対して 0.1~1%、または 1~5%、または 1~10%、または 1~100% で存在する。

【0055】

一態様では、コアジュバントは、ワクチニアジュバント性質を有する乳剤である。かかる乳剤は、水中油型乳剤を含む。完全なアジュバント(I F A)内のフロイントは、あるかかるアジュバントである。別の適した水中油型乳剤は、スクアレン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween(登録商標)80界面活性剤としても公知の)およびソルビタントリオレエートを含有するMF-59(登録商標)アジュバントである。スクアレンは、アマランサス種子、米ぬか、小麦胚芽、およびオリーブを含む、植物源(主に植物油)からも利用可能であるが、もともとサメ肝油から得られる天然の有機合成物である。他の適したアジュバントは、好物油ベースのアジュバントであるMontanide(登録商標)ISA50V、Montanide(登録商標)ISA206、およびMontanide(登録商標)IMS1312を含むMontanide(登録商標)アジュバント(Seppic Inc.、Fairfield NJ)である。鉱物油は、コアジュバントに存在し得るが、一実施形態では、本発明のワクチン組成物の油分成分は、全ての代謝可能な油である。

10

20

30

【0056】

コアジュバントとしての本発明の実施において利用され得る免疫増強物質の実施例は、3D-MPLまたはMPL(登録商標)アジュバント、MDPおよび誘導体、オリゴヌクレオチド、二重らせんRNA、代替病原菌に関連する分子パターン(PAMPs)、サポニン、小分子免疫増強剤(SMIP)、サイトカイン、およびケモカインを含む。

【0057】

一実施形態では、コアジュバントは3D-MPLまたはMPL(登録商標)アジュバントであり、MPL(登録商標)アジュバントは、Ribi ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, Montanaが開発元であるが、GlaxoSmithKlineによって市販されている。例えば、Ulrich and Myers, Chapter 21 from Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds. Plenum Press, New York(1995)を参照されたい。MPL(登録商標)アジュバントに関連し、本発明のコアジュバントとして適しているのは、AS02(登録商標)アジュバントおよびAS04(登録商標)アジュバントである。AS02(登録商標)アジュバントは、MPL(登録商標)アジュバントおよびQS-21(登録商標)アジュバント(本明細書の他の部分にて記載されるサポニンアジュバント)の両方を含有する水中油型乳剤である。AS04(登録商標)アジュバントは、MPL(登録商標)アジュバントおよびカリ明礬を含有する。MPL(登録商標)アジュバントは、UlrichおよびMyersによる記事によってより完全に記載されているように、弱酸性のLPSの処理および変性LPSの精製後の塩基加水分解によって、サルモネラ・ミネソタR595のリポ多糖(LPS)から調製される。

40

50

【0058】

一実施形態では、コアジュバントは、キラヤ・サポナリア樹木種の木の皮に由来するものの等のサポニン、または変性サポニンであり、例えば、米国特許番号第5,057,540号、5,273,965号、第5,352,449号、第5,443,829号、および第5,560,398号を参照されたい。Antigenics, Inc. Lexington, MAによって販売される製品の、QS-21(登録商標)アジュバントは、D S L P アジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントと共に使用し得る例示的なサポ

50

ニン含有コアジュバントである。サポニンに関連するものは、Isco tec (スウェーデン) が開発元であるアジュバントのISCOM (登録商標) ファミリー、および典型的には、全てハニカム状構造に形成された、キラヤ・サポナリアまたは合成類似化合物、コレステロール、およびリン脂質に由来するサポニンから形成される。

【0059】

一実施形態では、コアジュバントは、コアジュバントとして機能するサイトカインであり、例えば、Lin R. et al. Clin. Infect. Dis. 21 (6) : 1439-1449 (1995)、Taylor, C. E., Infect. Immun. 63 (9) : 3241~3244 (1995)、およびEgilmez, N. K., Chap. 14 in Vaccine Adjuvant and Delivery Systems, John Wiley & Sons, Inc. (2007) を参照されたい。種々の実施形態において、サイトカインは、例えば、顆粒球・マクロファージコロニーリー刺激因子 (GM-CSF) であってもよく (例えば、Change D. Z. et al. Hematology 9 (3) : 207-215 (2004)、Dranoff, G. Immunol. Rev. 188 : 147-154 (2002)、および米国特許第5,679,356号を参照)、またはタイプIインターフェロン (例えばインターフェロン- (IFN-) またはインターフェロン- (IFN-)) あるいはタイプIIインターフェロン (例えばインターフェロン- (IFN-)) 等のインターフェロン (例えば、Boehm, U. et al. Ann. Rev. Immunol. 15 : 749-795 (1997) およびTheofilopoulos, A. N. et al. Ann. Rev. Immunol. 23 : 307-336 (2005) を参照)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2) を特に含むインターロイキン (例えばNelson, B. H., J. Immunol. 172 (7) : 3983-3988 (2004) を参照)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-12 (IL-12) (例えば、Portielje, J. E., et al., Cancer Immunol. Immunother. 52 (3) : 133-144 (2003) およびTrinchieri, G. Nat. Rev. Immunol. 3 (2) : 133-146 (2003) を参照)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)、胎児肝臓チロシンキナーゼ3リガンド (Filt3L)、または腫瘍壞死因子 (TNF) であってもよい。D S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントは、ワクチン抗原、または抗原との組み合わせ前にサイトカインによって共処方されてもよく、D S L Pアジュバント、例えば、化学式 (1) のアジュバントおよびサイトカインのコアジュバントは、別々に処方され、次いで、組み合わせてもよい。

【0060】

一実施形態では、コアジュバントは、本明細書に記載されるインフルエンザ抗原に選択的共役される非メチル化CpGジヌクレオチドである。

【0061】

コアジュバントがD S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントとの組み合わせで利用される場合、2つのアジュバントの相対的量は、抗原のみに対するアジュバントを含有するワクチン組成物の所望のパフォーマンスの性質を実現するように選択され得る。例えば、アジュバントの組み合わせは、抗原の抗体反応を高める、および/または対象の先天性免疫システム反応を高めるために選択し得る。ケモカインおよびサイトカインの製造における先天性免疫システム結果の活性化により、次に、適応 (獲得された) 免疫反応が活性化される。適応免疫反応の活性化の重要な結果は、宿主が抗原に再び遭遇する場合に、より迅速かつ概してより良い質で免疫反応が起こるようにする、記憶免疫細胞の形成である。

【0062】

ワクチンアジュバントの組み合わせは、プレパンデミックおよびパンデミックインフル

10

20

30

40

50

エンザの制御に必要な免疫反応の数量および質の両方を調整するために戦略的に使用可能である。水および油分乳剤ベースのアジュバントによって、T h 2 T 細胞免疫が誘導される。それらの使用は、ウイルス感染の予防を行う中和抗体の製造を実行する上で重要であるが、これらの乳剤は、細胞媒介免疫の刺激において効果的ではない。パンデミックの発生のために、T h 1 T 細胞の誘発は、宿主内の病状の進行を制限し、集団内のウイルス感染を減らすために重要である。T h 1 T 細胞は、I F N - およびT N F の製造によって、ヒトインフルエンザウイルスの直接の抗ウイルス性の役割を果たす (K a n n a g a n a t e t a l . , I 8 1 : 8 4 6 8 - 8 4 7 6 , 2 0 0 7)。これらは、さらに、(マウスのI g G 2 a)高いウイルス中和活性がない場合でも、インフルエンザを予防する抗体のサブクラスの製造を刺激すると共に、ウイルス排除に重要な抗ウイルス性C D 8 細胞傷害T - リンパ球の拡大、維持、および復活を調整する (H u b e r e t a l . C l i n V a c c i n e I m m u n o l 1 3 : 9 8 1 - 9 9 0 , 2 0 0 6)。T h 1 反応を誘発するための最も直接的な方法は、病原菌由来の糖、タンパク質、脂質、および核酸を認識および結合するT o 1 1 様受容体 (T L R) の活性化を伴う。T o 1 1 様受容体は、樹状細胞成熟を刺激し、通常の先天性および適応性の免疫に必要とされる。D S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントのみがこれらの種々の目標のそれぞれを実現し得るが、本発明は、一実施形態において、アジュバント組み合わせは、これらの目標を実現するために、パンデミックインフルエンザ抗原と組み合わせて利用し得ることを規定する。しかしながら、別の実施形態では、ワクチン内に存在するアジュバントのみが、その種々の実施形態を含むD S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントであり、ここで、G L Aは、化学式 (1) の好適なD S L Pアジュバントである。

【0063】

さらに、水中油型乳剤内のG L Aは、抗原特異的抗体およびH A I 力価の増加によって計測される際に、マウス内のF l u z o n eワクチンの免疫原性を大幅に向上させ、用量を節約し、インフルエンザの抗原泳動株 (a n t i g e n - d r i f t e d s t r a i n) に対する交差再活性を広げた。これらの同じ実験では、抗原特異的I g G 2 a力価およびI F N 製造における劇的な増加によって示されるように、G L Aは、T h 1 T 細胞反応を誘導した。

【0064】

C . 薬学的組成物、ワクチン、およびそれらの利用

1 . 製剤

薬学的組成物は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザおよびD S L Pアジュバント、例えばG L A等の化学式 (1) のアジュバントからの組換え赤血球凝集素 (H A) を含有する。D S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントは、3つの例として、水中油型乳剤内に、水性溶液として、またはリポゾーム内に処方され得る。組成物は、さらに、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザのノイラミニダーゼ等の他のタンパク質、アルミニウム塩 (例えば、カリ明礬) またはサポニンおよびサポニン誘導体等の他のアジュバント、-トコフェロールまたは誘導体等の賦形剤、キャリア、緩衝液、安定剤、結合剤、チメロサール等の保存剤、界面活性剤等を含有する。

【0065】

D S L Pアジュバント、例えば化学式 (1) のアジュバントは、それのみで使用できる、または、2つの選択肢として、アジュバントが油相に組み込まれる水中油型乳剤に処方できる。それのみで使用される場合、つまり乳剤と組み合わせる利点がない場合、アジュバントは、典型的には完全にオイルフリーである、または約1% v / v 未満の油分を含有する組成物内に存在する。オイルフリーの組成物、水、アジュバント (例えば、G L Aは好適なアジュバントである) および界面活性剤を調製するために、例えばリン脂質、例えば1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフォコリン (P O P C) を組み合わせてもよい。組成物は、G L Aの事前重量測定された量に、エタノールおよびP O P Cの溶液を添加することで、調製され得る。この湿潤G L Aは、できる限りG L Aを拡散させるために、10分間、超音波分解される。次いで、G L Aは窒素ガスによっ

10

20

20

30

40

50

て乾燥される。乾燥したG L AおよびP O P Cは、分量を修正するために、W F I (水 - f o r - 注射)で再構成される。この溶液は、全てのG L AおよびP O P Cが溶解するまで、15～30分間、60で超音波分解される。長期保存のためには、G L A - A F 製剤を凍結乾燥する必要がある。凍結乾燥プロセスは、全量の2%になるまで、グリセロールを溶液に添加することで構成される。次いで、溶液は、1～10ml量のバイアルに入れられる。バイアルは、溶液を凍結させ、および次いで、昇華によって凍結水をなくすために、真空下にされることで構成される、凍結乾燥プロセスが行われる。

【0066】

アジュバントが油と組み合わせられる場合、ヒトでの使用のため、油分は好適には代謝可能である。油分は、植物油、魚油、動物油または合成油であってもよく、油分は、摂取対象にとって有毒であるべきではなく、代謝による形態変換が可能である。ナツ(ピーナツオイル等)、種、および穀物は、植物油の通常の原料である。特に適した代謝可能な油は、多くの異なる油に見られ、サメ肝油に多く見られる不飽和油であるスクアレン(2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサミン)を含む。スクアレンは、コレステロールの生体合成の中間体である。さらに、水中油型乳剤は、典型的には、-トコフェロール(ビタミンE、米国特許第5,650,155号、米国特許第6,623,739号)等の抗酸化剤を含有する。また、トリグリセリド等の安定剤、等張性をもたらす材料、および他の材料を追加し得る。

【0067】

油の液滴の平均の大きさは、典型的には1ミクロン未満であり、30～600nmの範囲、および通常は約80～約120nmまたは約150nm未満であり得る。油の液滴の大きさは、光子相關分光法によって計測し得る。典型的には、油の液滴の少なくとも約80%は、所望の範囲内、または少なくとも約90%あるいは少なくとも約95%にすべきである。乳剤の油分の一部は、概して2～10%の範囲であり(例えば、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%および約10%)、約2～約10%の-トコフェロール、および約0.3～3%の界面活性剤等の抗酸化剤の一部である。好適には、より適した乳剤を提供するため、油：トコフェロールの比率は1以下である。ソルビタントリオレエート(例えば、Span(登録商標)85)は、約1%のレベルでも存在し得る。いくつかのケースでは、本発明のワクチンはさらに安定剤を含有することが有利であり得る。

【0068】

水中乳剤内の油分を製造する方法が、当該技術の業者に公知である。通常、方法は、ホスファチジルコリン、プロック共ポリマー、またはT W E E N 8 0 (登録商標)溶液等の界面活性剤と油相を混合し、ホモジナイザーを用いて均質化を行うことを含む。例えば、注射器針によって一度、二度またはより多くの回数、混合物を排出させることを含む方法は、少量の液体を均質化するために適している。同様に、マイクロフリイダイザーによる入荷プロセス(M 1 1 0 Sマイクロ流体力学装置、最大で50回排出、最大圧力入力6バール(出力圧力約850バール)において2分間)は、より少量またはより多量の乳剤を製造するように適合できる。この適合は、必要な直径の油の液滴によって調製が実現されるまで、生成された乳剤の測定を含むルーティンの実験によって実現できる。乳剤を生成するために、他の装置またはパラメータも使用し得る。

【0069】

スクアレンを使った例示的な水中油型乳剤が、「S E」として公知であり、-トセラフォール(t o c e r a p h o l)を有するアンモニウムリン酸緩衝液pH5.1内の界面活性剤として、スクアレン、グリセロール、ホスファチジルコリンまたはレシチンまたは他のプロック共ポリマーを含有する。D S L PとしてG L Aが使用される場合、生成される組成物は、G L A - S Eとも称される。かかる組成物を作製するために、G L A(100マイクログラム、A v a n t i P o l a r L i p i d s , I n c . , A l a b a s t e r , A L、製品番号699800)は、抗酸化剤として0.5mg D, L--トコフェロールを選択的に使用する25ミリモルアンモニウムリン酸緩衝液中に(pH=

10

20

30

40

50

5.1)、グリセロール(22.7mg)、ホスファチジルコリンまたはレシチン(7.64mg)、Pluronics(登録商標)F-68(BASF Corp.、Mount Olive, NJ)または同様のブロック共ポリマー(0.364mg)により、スクアレン(34.3mg)において乳化される。混合物は、分離しない、180nm未満の平均粒子サイズを有する乳剤が形成されるまで、高圧で処理される。次いで、乳剤は、ガラス製の単回用量バイアルへと殺菌過され、より長期間の保存のために密閉される(capped)。2~8で保存される場合、少なくとも3年間、この調製を使用し得る。本明細書に記載されるように、D S L P およびタンパク質を含む他の油分含有組成物は、米国特許第5,650,155号、第5,667,784号、第5,718,904号、第5,961,970号、第5,976,538号、第6,630,161号、および第6,572,861号に記載されるように調製されたこれらの組成物と同様に調製し得る。

10

【0070】

いくつかの特定の組成物およびワクチンは、プレパンデミックH5N1ウイルス由来のrH5を含有する。ワクチンに適したrHAの種々の形態が前述されているが、簡潔に言うと、これらは、全長rHA、rHAの断片、rHAを含有する融合タンパク質、またはペプチドを含む。さらに、1つよりも多いrHAを共に使用可能である、またはノイラミニダーゼ等の他のタンパク質と共に、組成物およびワクチン内にあってもよい。1つよりも多いrHA形態、またはrHA配列、あるいはその両方は、本発明の組成物に組み込まれてもよい。

20

【0071】

ワクチン内のrHAタンパク質の量は、典型的には、例えば約0.1μg~約15μgの低用量である。この低用量は、0.1μg、0.5μg、1μg、2μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg、10μg、11μg、12μg、13μg、14μg、または15μgのいずれかのrHAタンパク質であり得る。rHAタンパク質の低用量は、以下に詳述するように、有効性の国際的(例えば、EUまたはFDA)基準に適合するワクチン製剤を可能にするならば、実際にできる限り低用量にし得る。用量は、典型的には、活性、意図される投与数、およびサイズならびに対象条件によって決定される。

30

【0072】

タンパク質は溶液として提供し得るが、乾燥した(例えば、水分除去した)で形態提供することもでき、この場合、使用者は、必要な液体を添加する。典型的には、緩衝液、安定剤、保存剤、賦形剤、キャリア、および他の非活性材料等の添加剤も存在する。添加剤は、典型的には、薬学的に受容可能かつ生体適合可能である。

【0073】

D S L P アジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントを、溶液として提供する、水分除去または乳化する、適した水中油型乳剤として便利な方法で提供し得る。D S L P アジュバント、例えば化学式(1)のアジュバントに加えて、アジュバント含有組成物は、緩衝液、安定剤、賦形剤、保存剤、キャリア、または他の非活性材料も含有し得る。添加剤は、典型的には薬学的に受容可能および生体適合可能である。本明細書の他の部分により詳細に記載されるように、さらなるアジュバントも存在し得る。これらのコアジュバントは、2'-5'オリゴA、細菌内毒素、RNA二本鎖、単一のらせんRNA、リポタンパク質、ペプチドグリカン、フラジエリン、CpG DNA、リポ多糖、MPA(モノホスホリル脂質A)、3-O-脱アシル化MPL、リポ多糖、QS21(サポニン)、水酸化カリ明礬物(「カリ明礬」)および他の鉱物塩、油分乳剤(例えば、MF59(登録商標)、R848および他のイミダゾキノリン、ウイロゾームおよび他の微粒子アジュバント(その全体が組み込まれる、Vogel and Powell, "A compendium of Vaccine adjuvants and excipients" Pharm Biotechnol 6: 141-228, 1995を参照)を含む。

40

50

【0074】

量 D S L P アジュvant、例えば、化学式(1)のアジュvant、例えば、ワクチンとして有用な抗原も含有する、本発明の組成物の用量に使用される G L A (用量は、その必要とされる対象に投与される組成物の量)は、一実施形態では、約 0.5 μg ~ 約 50 μg であり、別の実施形態では、約 1.0 μg ~ 25 μg であり、本発明の種々の他の実施形態では、約 1 μg、約 2 μg、約 2.5 μg、約 5 μg、約 7.5 μg、約 10 μg、約 15 μg、約 20 μg または約 25 μg であり得る。用量内の組成物の全量は、典型的には、0.5 ml ~ 1.0 ml の範囲である。S E 等の乳剤は、組成物に存在してもよく、種々の実施形態において、乳剤の油分成分は、組成物の全量の約 0.1%、約 0.5%、約 1.0%、約 1.5%、約 2%、約 2.5%、約 3%、約 4%、約 5%、約 7.5% または約 10% を構成する。10

【0075】

D S L P アジュvant、例えば化学式(1)のアジュvant、およびタンパク質は、別の容器で提供され、その場で混合されるまたは事前に混合され得る。加えて、タンパク質は、別の容器に存在し得る、または単一の容器に組み合わせ得る。容器は、バイアル、アンプル、管、または多重ウェル型装置のウェル、保有宿主、注射器またはいずれかの他の種類の容器にすることができる。容器または容器は、キットとして提供し得る。容器のうちの 1 つ以上が、水分除去材料を含有する場合、再構成のための液体は、キット内にも提供され得る、または使用者によって提供され得る。各容器内の溶液量または各容器に追加される量は、投与の経路および各容器内の用量に相応する。注射によって与えられるワクチンは、典型的には約 0.1 ml ~ 約 1.0 ml であり、一方で、経口投与によるワクチンは、例えば、約 1 ml ~ 約 10 ml のより多い分量にし得る。適した分量は、対象の大きさおよび年齢に従って変動し得る。20

【0076】

組成物は、概して殺菌して提供される。典型的な殺菌方法は、ろ過、照射およびガス処理を含む。

【0077】

2. 投与

ワクチンは、皮内、粘膜(例えば、経鼻投与、経口投与)、筋肉内、皮下、舌下、直腸、腔内等の適した送達経路によって投与できる。他の送達経路も当該技術で公知である。30

【0078】

筋肉内投与経路は、ワクチン組成物の適した一経路である。適した i. m. 送達デバイスは、インシュリンまたはエピネフリンの送達のために自宅で自己注射で使用されるもの等の針および注射器、針のない注射デバイス(例えば Bioprojector, Bioproject, OR USA)、またはペンインジェクタデバイスを含む。皮内および皮下送達が、他の適した経路である。適したデバイスは、注射器および針、短い針の注射器、およびジエット注射デバイスを含む。

【0079】

ワクチンは、粘膜経路によって、例えば経鼻投与的に投与され得る。多くの経鼻投与送達デバイスが利用可能であり、当該技術で公知である。噴霧デバイスが、かかるデバイスの一つである。経口投与は、対象に、飲み込むための溶液を提供するだけの簡単なものである。40

【0080】

单一の部位または複数の部位にワクチンを投与し得る。複数の部位における場合、投与の経路は各部位において同じであり得る(例えば異なる筋肉内の注射)、または異なり得る(例えば筋肉および鼻内噴霧内の注射)。さらに、单一の時点または複数の時点においてワクチンを投与し得る。概して、複数の時点で投与する場合、投与間の時間は、免疫反応を向上させるために決定されている。

【0081】

病気または感染の症状を予防または低減させるために、有利な免疫反応に効果を及ぼす

10

20

30

40

50

ために十分な用量でワクチンが投与される。有利な反応の一指針は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスの抗体の開発、特に、中和抗体の開発である。他の指針は、ウイルスに対するCD8またはCD4T細胞の増加した分量または機能あるいは頻度、およびウイルス感染の低減を含む。

【0082】

ELISAおよびウイルス感染(中和)アッセイの阻害を含む抗体を検出および定量化するために、多くの公知の手順が利用可能である。一実施例では、ELISAアッセイは、HAタンパク質で多重ウェルプレートのウェルをコーティングし、血清からプレートへHA特異的抗体を捕捉する、標識が付けられる抗ヒト抗体を有するHA特異的抗体を検出し、次に、標識の読み出しを行うことによって実施される。標識は放射性にすることができるが、より普通には、物質を比色分析で検出可能なものに変換する、ホースラディッシュのペルオキシダーゼ等の酵素である。

10

【0083】

例示的なインフルエンザ中和アッセイは、感染性の阻害によって中和抗体が検出されるブラークアッセイに基づく。ウイルス中和試験は、非常に繊細なものであり、動物およびヒト内のインフルエンザウイルス特異的抗体を識別するための特定のアッセイである。中和試験は、次の2つの段階、つまり、(1)ウイルスが血清の希釈と混合され、ウイルスへの抗体結合を可能にするためにインキュベートされるウイルス抗体反応ステップ、および(2)混合物は、適正な宿主システムに接種される(例えば、MDCK細胞、孵化した卵、または動物等の細胞培養)接種ステップで実行される。細胞が使用される場合、ウイルス感染した細胞は、ミクロン中立化アッセイで次の日に検出される。細胞が固定され、感染した細胞内のインフルエンザAウイルス核酸タンパク質(NP)の存在がELISAによって検出される。NPの検出は、その血清希釈における中和抗体の欠如を示す。感染性がないということは、陽性の中和反応を構成し、血清サンプル内のウイルス特異的抗体の存在を示す。(“Influenza Virus Microneutralization Assay,” CDC publication, LP-004, R-2 (K Hancock) 2009年10月19日に有効)インフルエンザウイルスの他の中和試験は、MDCK細胞培養の細胞変性効果(CPE)形成の阻害に基づく(Sidwell and Smee, Antiviral Res. 48: 1-16, 2000を参照)。

20

【0084】

別の公知のアッセイは、インフルエンザウイルスHAに対する免疫反応を査定する血球凝集阻害アッセイである。ウイルス表面上のHAタンパク質は、赤血球(赤血球、RBC)を凝集させる。HAの抗体がHAに結合する場合、凝集は阻害される。概して、HA抗原の標準化された分量が連続的に希釈された血清サンプルと混合され、赤血球が添加され、凝集の程度が査定される。血清内の凝集の非特定の阻害因子は、最初にRBC上の血清の吸収によって除去される(“Serologic Detection of Human Influenza Virus Infections by Hemagglutination-Inhibition Assay Using Turkey RBCs,” CDC publication, LP-003, R-1 (K Hancock) 2009年10月2日に有効)。

30

【0085】

製造された抗体の型および亜型も、決定し得る。IgM、IgGおよびIgG亜型、ならびにIgAを決定するためのアッセイが当該技術で公知である。通常使用されているアッセイは、ELISAである。簡潔に言うと、マイクロタイタープレートは、抗原、例えばrHAまたは活性化されていない完全ウイルスによってコーティングされる。タンパク質を含有する溶液内のブロック後に(例えば、1%ウシ血清アルブミン)、血清サンプルの連続希釈がウェルに添加され、次に、免疫グロブリンイソ型特異の二次抗体で処理される。抗イソ型抗体は標識が付けられる、または標識抗体結合分子が添加される。標識の量が決定される。

40

50

【0086】

プレパンデミックワクチンについてのFDAに対する基準は、交差反応性である免疫を誘導するための能力であり、ワクチンが異なるクレードおよびサブ・クレードからの遺伝的に明確なウイルスに対する免疫を誘導することを意味する。交差再活性は、本明細書に記載される抗体アッセイのいずれかまたは当該技術で公知の他のアッセイによって試験できる。例示的なアッセイでは、血清は、免疫HAを含有するウイルスを含む、多様なウイルスからのHAへの抗体について試験される。これらのアッセイについて、HAタンパク質または完全ウイルス（好適には不活性化された）を使用可能である。

【0087】

T細胞機能のアッセイは、IFN-ELISPOTおよびICS（細胞内サイトカイン染色）を含む。いくつかのサイトカインのためにサイトカイン製造を計測することにより、Th1/Th2プロファイルを確立できる特に、望ましいパターンは、IFN-およびIL-2製造が増加し、IL-5およびIL-4製造が減少することである。インターフェロン- γ を検出するELISPOTアッセイは、候補ワクチンへのCD4およびCD8T細胞反応を量子化するために幅広く使用される。ELISPOTアッセイは、固定化した抗体によって捕捉され、かつ、酵素結合された第2の抗体によって視覚化されるサイトカインのELISA検出抗原誘導分泌の法則に基づく。ICSは、T細胞表面分子の抗体またはMHCクラス分子を結合させるペプチド等の、作動薬による刺激後にサイトカイン発現によって細胞傷害T細胞による定量化のために通常使用される方法である。ICSおよびELISPOTの例示的な手順を、以下の実施例に記載する。

10

20

【0088】

抗原特異的T細胞機能も計測可能である。共にIFN-、IL-2およびTNFを発現させるインフルエンザ特異的CD4+T細胞は、単一のサイトカインを製造する細胞に対して可能性のあるより良い機能活性および共刺激を有する。このため、複数のサイトカイン製造CD4+T細胞の誘導が望ましい。抗原特異的T細胞刺激アッセイは、IFN-、IL-2、TNF-、およびフローサイトメトリーによるその組み合わせを製造するCD4T細胞の頻度を推定するために使用し得る。このアッセイへのIL-5の追加は、Th2CD4+細胞に対してTh1を区別するために使用できる。予防接種後3、6、12、および24週の経時変化による実験が、長期にわたるT細胞反応を決定するために実施される。フローサイトメトリーは、エフェクター記憶CD4+T細胞（TEM: CD4+CD62L-CCR7-IFN-+）および中央記憶CD4T（TCM: CD4+CD62L+CCR7+IL2+IFN-+/-）細胞の生成を計測および区別するために使用することもできる。IFN-、TNFおよびIL-2の製造を誘導し、CD4CMを増加させるワクチン製剤が望ましい。細胞傷害CD8+T細胞は、さらに、ウイルス負荷を除去し、病気の進行を制限する役目を果たす。抗原特異的CD8+T細胞を引き出すワクチンが望ましい。

30

【0089】

一態様において、本発明は、ウイルスに接触する可能性があるヒト集団にプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスの予防接種を行う方法を提供する。本方法は、薬学的組成物の一回の注射を投与することを含み、ここで、この一回の注射により、一回の注射を受ける集団の少なくとも50%に血清変換が実施される。薬学的組成物は、(a)プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザのウイルスからの組換え赤血球凝集素(rHA)と、(b)DSLPアジュバントであって、該アジュバントは、例えば、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有する、DSLPアジュバントと、を含有し、非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、還元末端の6'位の炭素に結合され、二糖は、非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(O))-および/またはエステル(-O-C(O))-結合を介して、複数の脂質基へ結合され、エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(O))-基は、脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有

40

50

する。種々の実施形態において、組成物は乳剤を含まない、または油、例えばスクアレンを含まない。オイルフリーの組成物は、医療従事者から、副作用を引き起こしにくいと考えられている。例えば、乳剤は、油分が存在する場合、ワクチンは、注射を受ける対象に刺激および痛みを生じさせる可能性があるという点で、ワクチン組成物を反応原性にする傾向があることに懸念が高まっている。乳剤フリーの組成物の別の利点は、典型的な使用において、ワクチン組成物は2つの成分、つまり、抗原含有組成物およびアジュバント含有組成物から作成され、最終的なワクチンを調製するためにこれらの2つの組成物が混合される。組成物のそれぞれの安定性は、好適には、長期にわたって高い。アジュバントまたは抗原のキャリアとしての乳剤の一つの問題は、乳剤が、長期にわたり安定しない傾向がある、またはそれらの安定性を維持するために特別な条件または化学物質を必要とするということである。本発明は、一実施形態では、良好な安定性および良好な有効性をもたらす、オイルフリーの（例えば乳剤を含有しない）組成物を提供する。好適な実施形態において、D S L P アジュバントは G L A であり、より好適には、ある期間において保存可能な、オイルフリーのキャリア内の G L A （または他の D S L P アジュバント）（例えば、アジュバントおよび界面活性剤のみで構成される凍結乾燥された形態、例えば、リン脂質）であり、次いで、効果的なワクチンを提供するためにキャリアおよび抗原と混合される。

10

【0090】

ワクチンの他の望ましい態様は、用量および投与量を節約する性質を含む。投与量の節約とは、所望のまたは効果的な免疫反応をさらに上げるために人に投与され得る通常よりも少ない用量である。用量の節約は、そうでなければ所望のまたは効果的な免疫反応を上げるためにより少ない量の抗原が必要であることを意味する。用量および投与量の節約は、ヒトにおいて鳥類または豚ウイルスの H A をもたらす弱い免疫反応等の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対するワクチンの開発に関連付けられる技術的な問題を克服することを意味する。以前のパンデミックインフルエンザワクチンの開発中に、大きな多中心トライアルにより、ヒトの 54 % のみが予防されていれば、28日の間隔で、90 μ g の H 5 の注射を二回行うべきであることがわかっている（T r e a n o r et al . , N e w E n g l a n d J o u r n a l o f M e d i c i n e 3 5 4 : 1 3 4 3 - 1 3 5 1 , 2 0 0 6 ）。世界中において、現在、所望の期間内に、90 μ g の注射を二回投与されるパンデミックインフルエンザのワクチンは、7 千万分の用量のみを製造可能であると推定されている（P o l a n d , G . A . , N e w E n g l a n d J o u r n a l o f M e d i c i n e , 3 5 4 : 1 4 1 1 - 1 4 1 3 , 2 0 0 6 ）。好適なワクチン製剤は、（用量または投与量の節約によって血清変換を実行するための）ワクチン接種に必要なタンパク質量を減少させる。

20

【0091】

本明細書に記載されるアッセイのいずれかを、用量および / または投与量節約を検証するために使用可能である。用量および投与量の節約を検証するための例示的なアッセイは、ワクチン接種に対する血清抗体反応を測定する血球凝集阻害（H A I ）アッセイである。F D A は、40 以上の H A I 力価が、自然の感染からの防御を予測するための適した免疫学的パラメータであることを述べるパンデミックインフルエンザワクチンの評価ガイドラインを確立している（F o o d a n d D r u g A d m i n i s t r a t i o n 2 0 0 7 G u i d a n c e f o r i n d u s t r y : 季節性不活性化インフルエンザワクチンの免許下付のサポートに必要な臨床データを参照）。本明細書に記載されるように、40 以上の H A I 力価を有するヒトは、血清変換を実行したヒトと考えられる。抗原の例示的な用量は、一回、つまり一度だけ、抗原製剤がワクチン投与された個人の約 50 % における、約 40 の H A I 力価を実現するために効果のあるワクチン製剤内の抗原の量である。抗原の別の例示的な用量は、抗原製剤で一回ワクチン投与された個人の約 70 % における、約 40 の H A I 力価を実現するために効果的なワクチン製剤内の抗原の量である。抗原の別の例示的な用量は、抗原製剤で一回ワクチン投与された個人の約 80 % において約 40 の H A I 力価を実現するために効果的なワクチン製剤内の抗原の量である。

30

40

50

【0092】

本明細書に記載される薬学的組成物、ワクチン組成物、およびキットは、インフルエンザ感染を防止または予防する、または感染後の病気の治療のために、個人に投与され得る。投与は、プレパンデミックの段階またはパンデミック時に実施され得る。

【0093】

本組成物を受ける対象は、病気または死んだ動物（例えば鳥（H5N1ウイルス））と身近に接触するまたは身近に接触する可能性がある人々、パンデミックの「対処の」ために選択された集団、子供、年配者、妊婦、特定の慢性病または免疫抑制症状を抱える人々等の高リスクの個人、および理想的には世界人口を含む。

【0094】

インフルエンザは、単一の用量（例えば、注射）としてまたは複数の用量としての組成物の投与によって回避し得る。複数の用量が投与される場合、ある時間間隔後に、概して、二回目および以降の用量が投与される。多くの場合、初期の用量の投与は、免疫反応の「準備刺激」と呼ばれ、以降の用量の投与は、免疫反応の「追加免疫」と呼ばれる。より短いまたはより長い期間も使用し得るが、典型的には、第1および第2の投与の間の期間は少なくとも2週間である。前の投与後少なくとも2-4週間でさらなる用量が投与され得る、また、いくつかのケースでは、前の用量後、長期間の後（例えば、1年）で、投与され得る。インフルエンザ感染後の用量の投与は、疾患の治療上、役立つ。

10

【0095】

パンデミックウイルスのHA配列は泳動することができるため、および、プレパンデミック段階において、可能性のあるウイルスのどれがパンデミックかがわかつていないため、関連するウイルスに対して幅広い範囲を提供するワクチンを投与することが望ましい。本明細書に示すように、関連するウイルスの抗体は、あるrHAタンパク質の投与から得られた。幅広い範囲を得るための別の方法は、あるrHAで刺激し、異なるrHAで追加免疫することであってもよい。

20

【0096】

組成物は、他の抗ウイルス性薬剤と共に投与し得る。抗ウイルス性薬剤は、ウイルスの増殖阻止に直接作用する薬、ドラッグ、ハーブ等である。いくつかの公知の抗ウイルス性薬剤は、タミフル（登録商標）（オセルタミビル）、アマンタジン（シンメトレル（登録商標））、リマンタジン（フルマジン（登録商標））、ザナミビル（リレンザ（登録商標））、ペラミビル、ラニナミビルを含む。他のノイラミニダーゼ阻害因子およびM2阻害因子も利用可能であり得る。組成物と共に中国漢方も投与され得る。他の薬剤は、咳用シロップ等の症状を治療するものを含み、アスピリン、イブプロフェン等のNSAIDも提供され得る。

30

【0097】

例示として以下の実施例を示すが、これらに制限されない。

【実施例】

【0098】

(実施例1)

マウスにおける一回の注射のRHA/GLA-SEインフルエンザワクチンの有効性

40

この実施例は、組換えインフルエンザH5（rH5）タンパク質による一回のワクチン接種により、H5N1ウイルスの高い力値で攻撃されたマウスの予防的抗ウイルス免疫反応を効果的に刺激できることを示す。Balb/cマウス（5/群）を、rH5タンパク質（H5N1ベトナム1203由来、Protein Sciences, Meriden, CTから販売されている）のみ、またはGLA-SEアジュバントで処方した、増加する量（0、50、150、450、900、または2700ng）のrH5タンパク質（20μgの2%SEのGLA）を、一回、筋肉内に（IM）注射した。マウスを、14日後に、H5N1ベトナム1203（1000×LD₅₀）の経鼻投与により攻撃した。毎日、マウスの体重減少をモニターし、体重の減少が20~30%よりも多い場合には安樂死させた。アジュバントがないrH5を接種された全てのマウスは、ウイルス攻撃後に

50

自然に死んだか（25匹中18匹）、または高い疾患率を示し、安楽死させられた（25匹中7匹）ため、rH5タンパク質のみによるワクチン接種は予防免疫を提供しなかった。しかしながら、最も低用量のrH5タンパク質の投与であっても、rH5+GLA-SEアジュvantでワクチン投与された全てのマウスは生き残った（25匹中25匹）。これらの結果から、GLA-SEアジュvantが処方されている場合、組換えサブユニットインフルエンザワクチンの一回の注射で、マウスに予防免疫をもたらし得ることがわかる。この予防免疫は、抗原用量を50倍低下させた場合でも観察された。

【0099】

rH5ワクチンにGLAアジュvantを添加する利点は、ウイルス攻撃後にワクチン投与されたマウスの体重減少を精査することにより、さらに高まった。Balb/cマウス（5/群）に、rH5タンパク質のみの増加する量（0、50、150、450、900、または2700ng）、または、20μgのGLA-SEアジュvantまたはSE乳剤のみ（100μLの2%溶液）で処方されたrH5タンパク質を、一回、注射した。マウスは、14日後にH5N1ベトナム1203（1000×LD₅₀）で攻撃され、攻撃後14日目に体重を測定した。rH5タンパク質のみでワクチン投与されたマウスはウイルス攻撃後に大きく体重が減少し、最も高用量をワクチン投与したものであっても、回復することなく死んだ。対照的に、GLA-SEアジュvantが処方されたrH5タンパク質をワクチン投与した全てのマウスは、ウイルス攻撃後も生き残り、以前の体重まで増加した。SE乳剤のみで処方されたrH5タンパク質がワクチン投与されたマウスも、ウイルス攻撃から回復し、体重が増加した。

10

20

30

【0100】

これらの2つの群の間の回復の差を定量化するために、全ての群における、14日間の試験期間にわたる平均体重変化割合を、2週間の試験期間における毎日の体重変化を表す曲線下の領域を計測することにより、計算した。図1Aにこれらの値を表す棒グラフが示され、これは、GLA-SEが処方されたrH5が接種されたマウスが、SE乳剤のみが処方されたrH5処方が接種されたマウスよりも、体重減少が大幅に小さいことを示す。これらの結果は、GLAアジュvantが処方されたrH5が、全ての抗原用量において優れた予防効果を誘導することを示す。このため、rH5タンパク質へのGLAアジュvantの添加によって、マウスの一回の低用量注射として投与される場合に予防免疫を確立する、大幅に改善したワクチンが得られる。これらの結果は、GLAアジュvantの処方が、組換えタンパク質ベースのパンデミックインフルエンザのワクチン開発に関連付けられた攻撃のうちのいくつかに対する効果の高い可能性のある溶液を提供する、すなわち、一回のワクチン注射のみで予防免疫が確立される、抗原免疫原性の増強を示唆する。ワクチンの用量節約は、考えられるインフルエンザパンデミックの備えにおける、公的医療機関の緊急の優先事項である。

30

40

50

【0101】

GLAアジュvantで構成されるrH5ワクチンの改善した性質が、ウイルス攻撃後のワクチン投与されたマウスにおける動態学的体重変化を計測することにより、さらに精査された。上記のように、Balb/cマウス（5/群）に、GLA-SEアジュvantまたはSE乳剤のみに処方された50ngのrH5タンパク質が、一回、注射され、次いで、14日後に、H5N1ベトナム1203（1000×LD₅₀）で攻撃された。対照として、マウスに、rH5タンパク質がない、GLA-SEアジュvantまたはSE乳剤がワクチン投与された。マウスについて、ウイルス攻撃の翌日以降、毎日、体重測定をし、攻撃前のマウスの体重に対する体重減少（%）が決定された。この攻撃モデルにおいて、予防接種を行っていない、無処置のマウスは、急速な体重減少が見られた後で死亡することによって裏付けられるように、ウイルス攻撃から回復していない。図1Bに示されるように、それらの体重は、最初に、予防接種を行っていない、対照群で観察されるものと同一の割合で減少したため、ウイルス攻撃で生き残った全てのマウスは感染の症状を示していた。しかしながら、ウイルス攻撃後10～12日目に、ワクチン接種前レベルに戻った体重増加によって示されるように、GLA-SEが処方されたrH5を予防接種されたマ

ウスはウイルス攻撃から回復した。S E 乳剤のみが処方された r H 5 を予防接種去れたマウスも回復したが、それらの回復率は、G L A - S E アジュバントで処方された r H 5 がワクチン投与されたマウスで観察されるものに対して、大幅に遅かった。G L A - S E アジュバントまたはS E 乳剤のみが予防接種されたマウスは、無処置のマウスのものと同様にウイルス性攻撃に反応したことから、この予防効果は r H 5 タンパク質に依存していた。重要な点として、これらのデータは、一回の注射の有効性の向上、低用量 r H 5 ワクチンが、r H 5 タンパク質およびG L A アジュバントの組み合わせられた活性に依存することを示す。

G L A アジュバント注に処方された r H 5 ワクチンの改善した有効性に必要な要素をさらに定義するために、G L A - S E アジュバントのみ、r H 5 タンパク質 + S E のみ、r H 5 + G L A のみ、またはr H 5 + G L A - S E をワクチン投与したマウスにおいて、体重変化の動態を測定した。図1Cに示されるように、予防接種をしていない対照マウスおよびr H 5 タンパク質がないG L A - S E の予防接種が行われたマウスは、体重が劇的に減少し、上述のように、ウイルス攻撃後に死んだ。対照的に、r H 5 およびG L A - S E の組み合わせで予防接種を行ったマウスは、ウイルス攻撃から回復し、完全に体重が戻った。S E のみまたはG L A のみが処方された r H 5 の予防接種を行ったマウスも回復したが、これらの2つの群で観察される回復率は、r H 5 + G L A - S E ワクチンを接種されたマウスの回復率に対して大きな遅れがある。これらのデータは、S E 乳剤内の r H 5 およびG L A アジュバントの組み合わせが、いずれかの個々の成分の性質に対し、優れた性質を示すことを示す。

【0102】

(実施例2)

一回の注射として投与される場合に、r H 5 / G L A - S E インフルエンザワクチンはマウスにおける均質免疫をもたらす

この実施例では、不均質なウイルス攻撃に対する、G L A アジュバントが処方された組換えワクチンの予防有効性が示された。これらの実験で、マウスは、H 5 N 1 インドネシア（クレード2.3）から分離された r H 5 タンパク質分離株の一回の注射によって予防接種が行われ、次に、上記のように H 5 N 1 V N ウィルスの攻撃が行われた。陽性対照として、マウスは、H 5 N 1 ベトナムからの同種の r H 5 タンパク質がワクチン投与され、一方で、陰性対照として、マウスは、H S V - 2 ウィルス性タンパク質 (r G 0 1 3) でワクチン投与された。表1に示されるように、タンパク質/アジュバントの処方に関係なく、H S V - 2 タンパク質がワクチン投与されたマウスは全て死んだ。5 0 n g の同種の r H 5 V N タンパク質のみがワクチン投与されたマウスは全て死んだが、一方で、以前の所見と同様に、G L A - S E アジュバントが処方された r H 5 V N をワクチン投与されたマウスは、全て生き残った。重要な点として、G L A - S E が処方された 5 0 n g または 2 0 0 n g の不均質 r H 5 I n d o タンパク質を接種されたマウスは全て生き残り、G L A - S E が交差クレード予防免疫を効果的に増大させることが示された。興味深いことに、投与された最低量の用量の r H 5 I n d o (5 0 n g)において、S E のみを有するタンパク質の処方は、ウイルス攻撃からマウスを保護できず（マウスは一匹も生存しなかった）、一方で、S E 乳剤がないG L A の処方は、マウス (2 / 5) の 4 0 %において防御を示した。

【0103】

10

20

30

40

【表1】

表1

抗原	(ng)	rH5のみ	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE	
rH5 VN	50	0/5	5/5	5/5	5/5	10
rH5 Indo	50	0/5	0/5	1/5	5/5	
rH5 Indo	200	0/5	2/5	2/5	5/5	
rG103	200	0/5	0/5	0/5	0/5	

図2に示されるように、さらに、ウイルス攻撃後に、体重減少の回復がモニターされた場合に、GLAアジュバントを処方された場合の改善した有効性rH5 Indoワクチンが観察された。以前の実験で観察されるように、rH5タンパク質のみがワクチン投与されたマウスはウイルス攻撃から回復せず、一方で、GLA-SEアジュバントが処方されたrH5を接種されたマウスは、急速に回復し、攻撃前のレベルに体重が戻った。GLA-SEアジュバント中に処方された不均質rH5 Indoタンパク質がワクチン投与されたマウスは、さらに、組換えタンパク質の用量に依存した動態で、迅速に回復した。こうして、GLA-SEは、同種および不均質組換えインフルエンザワクチンの両方の有効性を向上させる。用量および投与量を節約するワクチンによる交差クレード予防免疫の確立は、候補パンデミックインフルエンザワクチンの特に有利な性質である。

【0104】

(実施例3)

GLA-SEがマウスの抗原特異的免疫の確立を促進する

この実施例は、予防接種後、毎日、インフルエンザウイルスでマウスを攻撃することにより、マウス予防モデルの免疫を確立させるための一時的な要件を示す。上述のように、マウスは、SEのみまたはGLA-SEアジュバントが処方された低用量のrH5タンパク質の一回の注射でワクチン投与された。対照として、マウスは、rH5タンパク質またはGLA-SEのみがワクチン投与された。マウスは、ワクチン接種後の、様々な日数後(0、2、4、6、8、10、または12日目)に攻撃され、14日目後に生存率が判断された。図3Aに示されるように、GLAアジュバントで処方されたrH5タンパク質は、ワクチン接種後4~6日目以内に予防免疫を確立した。予想されたように、これらの成分のいずれも持たないワクチンを接種されたマウスは全て死んだことから、この効果は、組換えタンパク質およびGLA-SEの両方に依存していた。この群における予防免疫の獲得は、rH5+GLA-SE群で観察されたものに対して、一日以上遅れがあったが、SEのみに処方されたrH5を接種されたマウスは、ウイルス攻撃からの予防効果を示した。

【0105】

以下に記載するように、体重減少の動態が、予防接種後6日目または14日目のいずれかにウイルスによって攻撃されたマウスにおいて、計測された。図3Bに示されるように、予防接種後6日目にマウスが攻撃された場合、rH5+SE乳剤のみの群は、rH5+GLA-SEアジュバントを接種された群と比べて、より体重減少が大きかった。群の間で観察されるこの差は、ワクチン接種後14日目に対する攻撃の遅れについて、小さくなかった(図3Bを参照)。これらのデータは、GLAアジュバント内に処方されたrH5によるワクチン接種がウイルス攻撃後の体重減少の低下につながるだけではなく、マウスの回復を大幅に短縮させる。全体的な健康において同様の傾向が、臨床スコア方法(図3Cを参照)を用いて観察された。rH5+GLA-SEで治療されたマウスは、ワクチン接種の時期に関わらず、rH5+SEのみの群よりも病状が軽く、より早く回復したようであった。このように、GLA-SEアジュバントは、SE乳剤のみに対する抗原特異的免疫の確立を促進する。予防免疫を迅速に誘発するための用量および投与量を節約す

10

20

30

40

50

る組換えワクチンの能力は、パンデミックインフルエンザワクチンの非常に望ましい性質であり、予期しなかった幅広く迅速なウイルス性感染に対して効果的である。

【0106】

(実施例4)

G L A - S E 内に処方された R H 5 タンパク質によるワクチン接種により、マウスについて非常に恒久的な防御免疫を確立する

この実施例では、低用量の同種 (r H 5 V N) または不均質 (r H 5 I n d o) 抗原で一回、マウスに予防接種を行い、46日目に H 5 N 1 V N でウイルス攻撃を行うことにより、アジュバント依存防御の永続性が評価された。表2に示されるように、G L A アジュバントが処方された組換え H 5 抗原をワクチン投与された全てのマウスが、ワクチン接種が同種または不均質のどちらの r H 5 タンパク質に由来するかに関わらず、ワクチン接種後46日目において、ウイルス攻撃後も生き残っていた。さらに、図4 および B に示されるように、この群のマウスは、ウイルス攻撃から非常に迅速に回復し、体重減少はほとんどなかった。図4 C は、これらの群のウイルス負荷量も低下していることを示す。重要な点として、これらの結果は、低用量の r H 5 タンパク質および G L A アジュバントの組み合わせで構成されたワクチンが、マウスのインフルエンザウイルスに対する効果的かつ恒久的な交差クレード防御をもたらすことを示す。

10

【0107】

【表2】

表2

20

抗原	(ng)	rH5	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE
rH5 VN	50	3/5	3/5	5/5	5/5
rH5 Indo	50	2/5	4/5	3/5	5/5

(実施例5)

フェレットにおける R H 5 / G L A - S E インフルエンザワクチンの一回の注射の有効性

30

この実施例に記載されている実験は、インフルエンザワクチン開発の適した臨床前宿主である、フェレットの低用量 r H 5 ワクチンの一回の注射によって、予防免疫が確立されるかどうかを説明する。6~12か月のオスのケナガイタチ (T r i p l e F F a r m s , S a y r e , P A) を、全ての実験で使用した。接種前、全てのフェレットは、ヘマグルチニン阻害 (H I) アッセイにより、流行している季節性インフルエンザ (インフルエンザ H 1 N 1 、 H 3 N 2 、およびインフルエンザ B) について血清学的に陰性であることが確認された。全ての実験で、フェレットは、D u o - F l o B i o c l e a n 移動式クリーンルーム内に閉じ込められたケージに収容された (L a b P r o d u c t s , S e a f o r d , D E) 。感染前のおよそ3日間、毎日、基礎血清、体温および体重のデータが取られた。体温は、皮下移植可能体温トランスポンダー (B i o M e d i c D a t a S y s t e m s , S e a f o r d D E) を使用して計測された。フェレット (群につき4匹) に、それのみまたはアジュバントと共に、0.5 μg の r H 5 V N が一回、ワクチン投与され、次いで、ワクチン接種後28日目に H 5 N 1 V N で攻撃された。全量 1 m l の、A / V N / 1 2 0 3 / 0 5 (H 5 N 1) ウイルスの 7.5 × 1 0 5 P F U が、フェレットに対し、鼻腔内に接種された。感染後1日目に開始し、7日間継続して、24時間毎に、全てのフェレットから鼻腔器具 (N a s a l w a s h) が回収された。神経的症状がみられる、または瀕死の状態であると判断される、0日目に体重の 25% 以上が減少したフェレットは、人道的に安楽死させられた。表3に示されるように、r H 5 、さらに S E 、 G L A 、または G L A - S E を接種された全てのフェレットはウイルス攻撃に対して生き残り、一方でアジュバントがない r H 5 タンパク質またはインフルエンザ抗

40

50

原がないの G L A - S E アジュバントのワクチン接種は、全てのフェレットをウイルスから保護することができなかった。ウイルス攻撃後の体重減少の動態が計測された際、r H 5 のみまたは S E 乳剤中に処方された r H 5 (図 A 5 を参照) がワクチン投与されたフェレットとは対照的に、G L A アジュバントが処方された r H 5 ワクチンがワクチン投与されたフェレットでは体重の減少はほとんどないことが観察された。この動物モデルにおいて、フェレットにおける r H 5 + G L A ワクチンの最適な有効性のために、S E 乳剤は不要であるように考えられる。この傾向は、図 5 B に示されるように、各群の臨床スコアが決定された際に要約された。G L A アジュバント内に処方された r H 5 を接種されたフェレットは、r H 5 のみを接種されたフェレットとは対照的に、臨床観察に基づいて正常であると考えられる。総じて、これらの結果から、G L A アジュバントを含有する低用量 r H 5 ワクチンの一回の注射が、フェレットの H 5 N 1 感染を効果的に予防していることが示される。このように、一回の注射の有効性を大幅に向上させる G L A アジュバントの能力、低用量の組換え H 5 ワクチンが、防御免疫の 2 つの異なる動物モデルにおいて示されている。

10

【 0 1 0 8 】

【 表 3 】

表3

抗原	(ng)	無処置	GLA-SE	rH5	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE
rH5 VN	50	0/4	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4

20

上記の記述から、例示のために特定の実施形態が本明細書に記載されているが、発明の精神および範囲を逸脱しない限り、種々の修正を行い得ることが理解されよう。従って、本発明は、添付される請求項による場合を除いて、制限されるものではない。

【図 1 B】

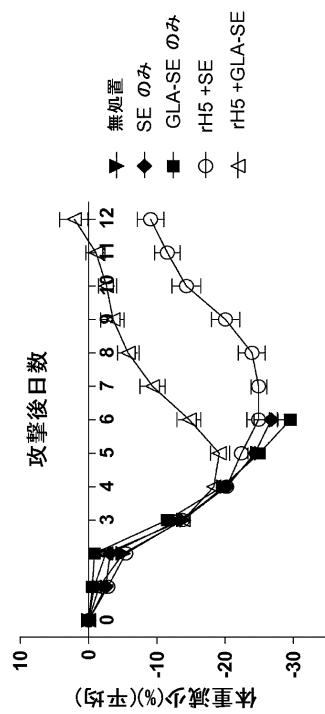


FIG. 1B

【図 1 C】

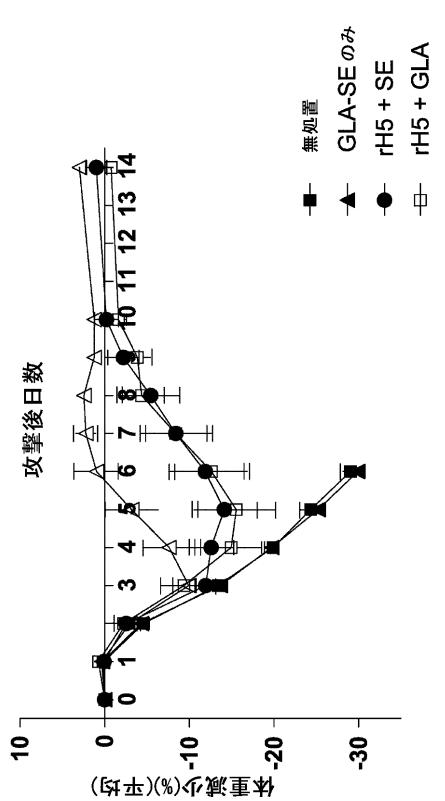


FIG. 1C

【図 2】

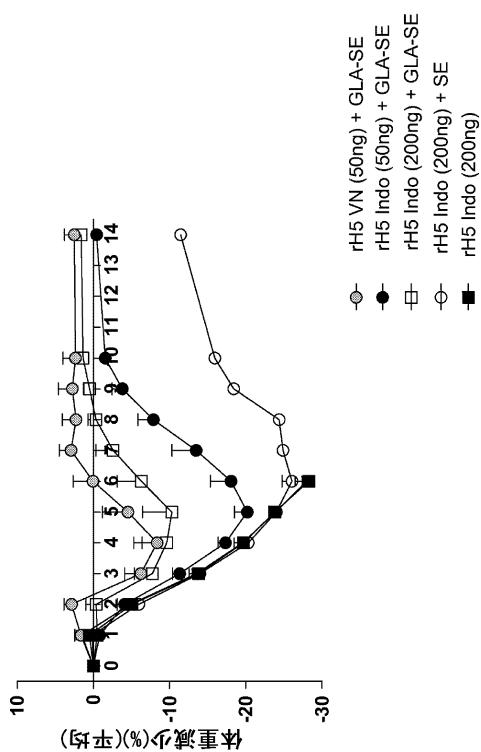


FIG. 2

【図 3 B】

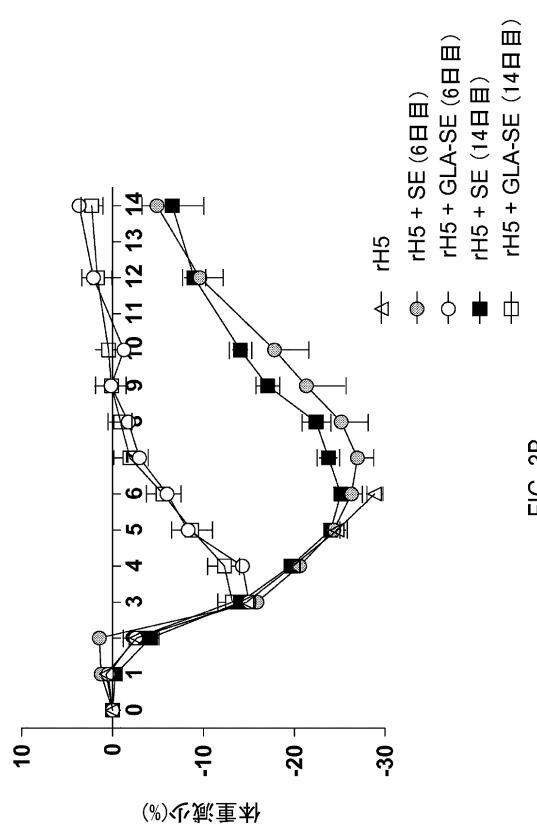


FIG. 3B

【図 3 C】

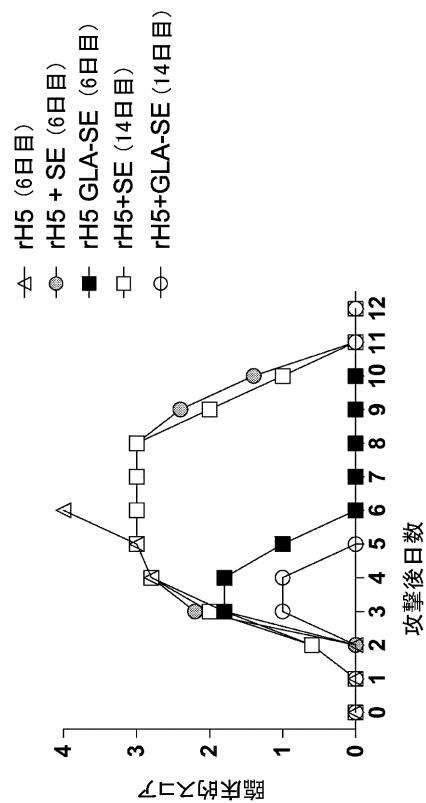


FIG. 3C

【図 4 C】

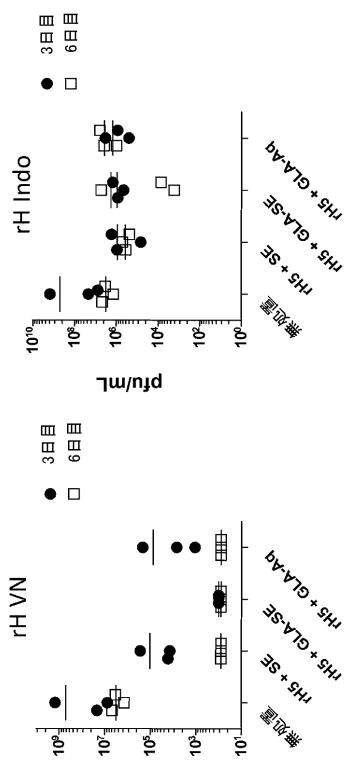


FIG. 4C

【図 5 A】

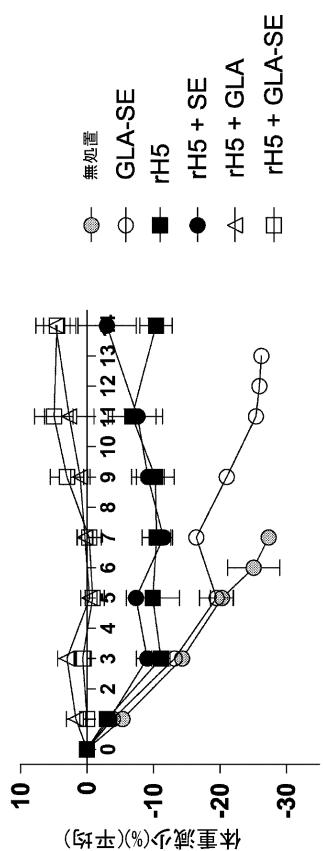


FIG. 5A

【図 5 B】

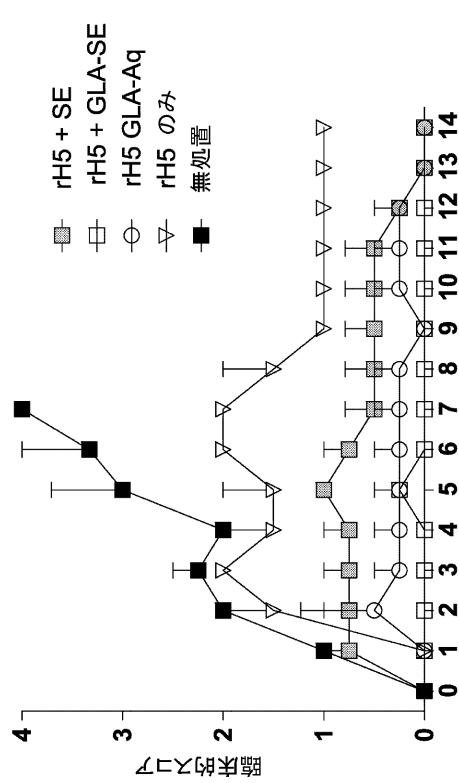


FIG. 5B

【図 1 A】

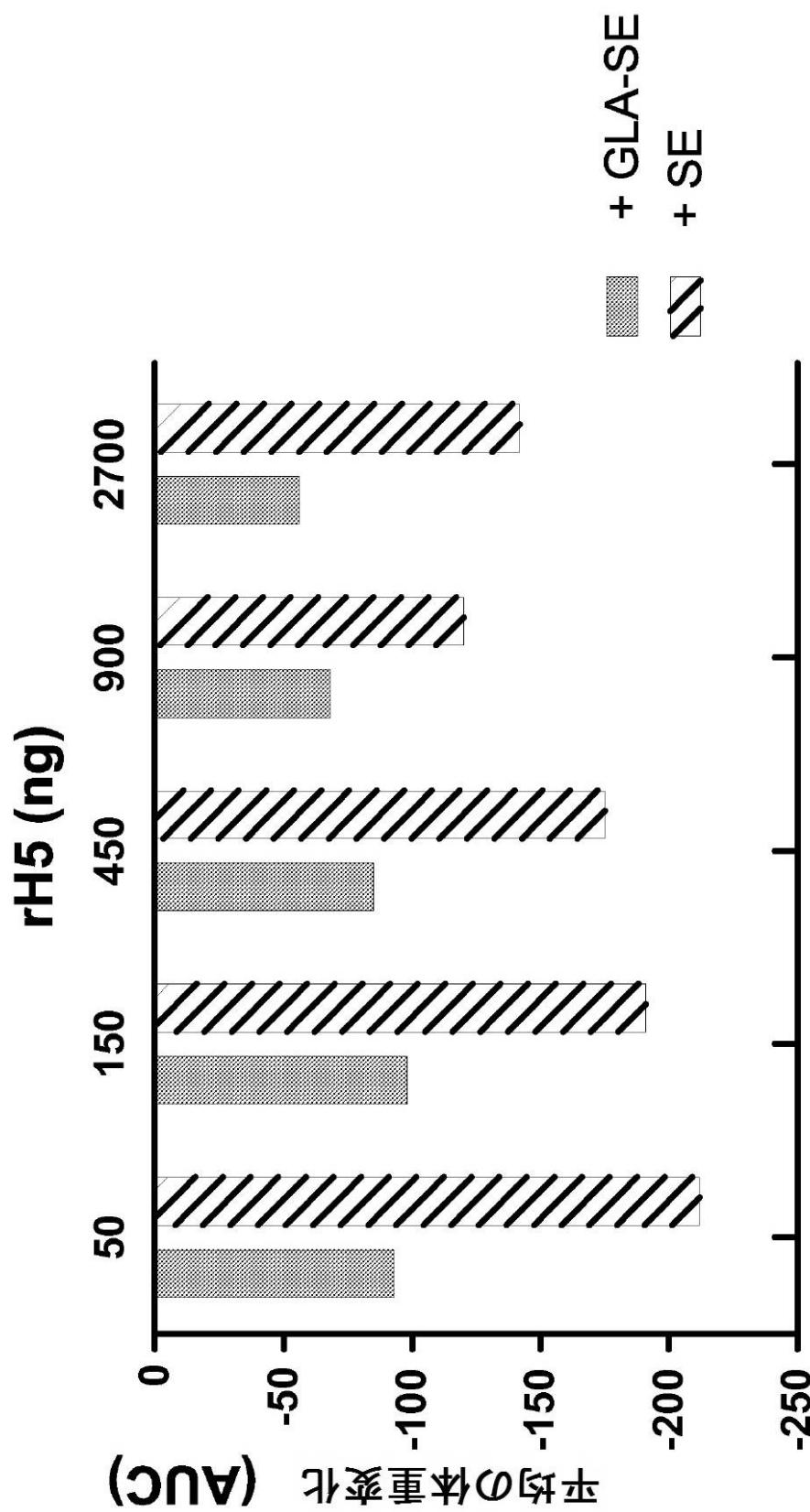


FIG. 1A

【図 3 A】

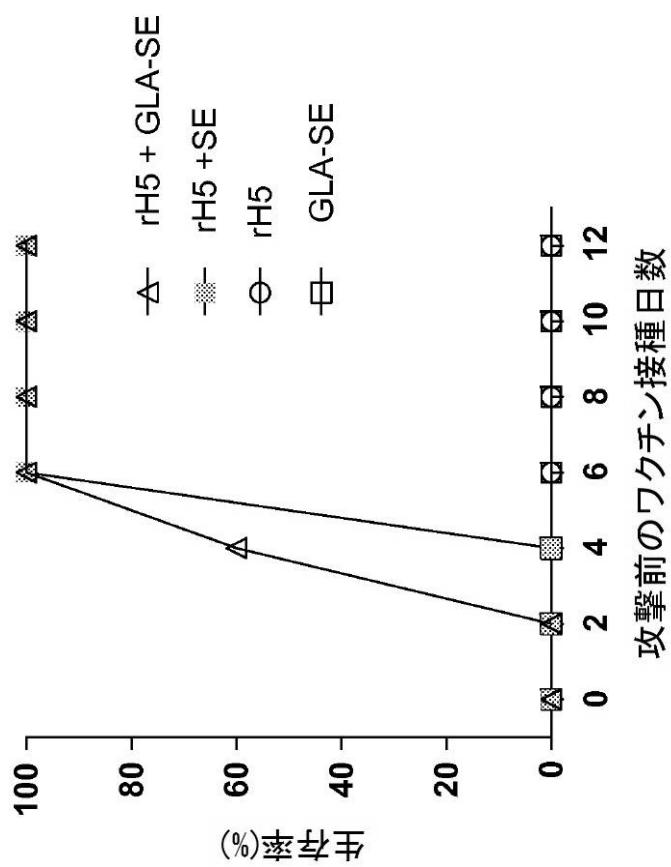


FIG. 3A

【図 4 A】

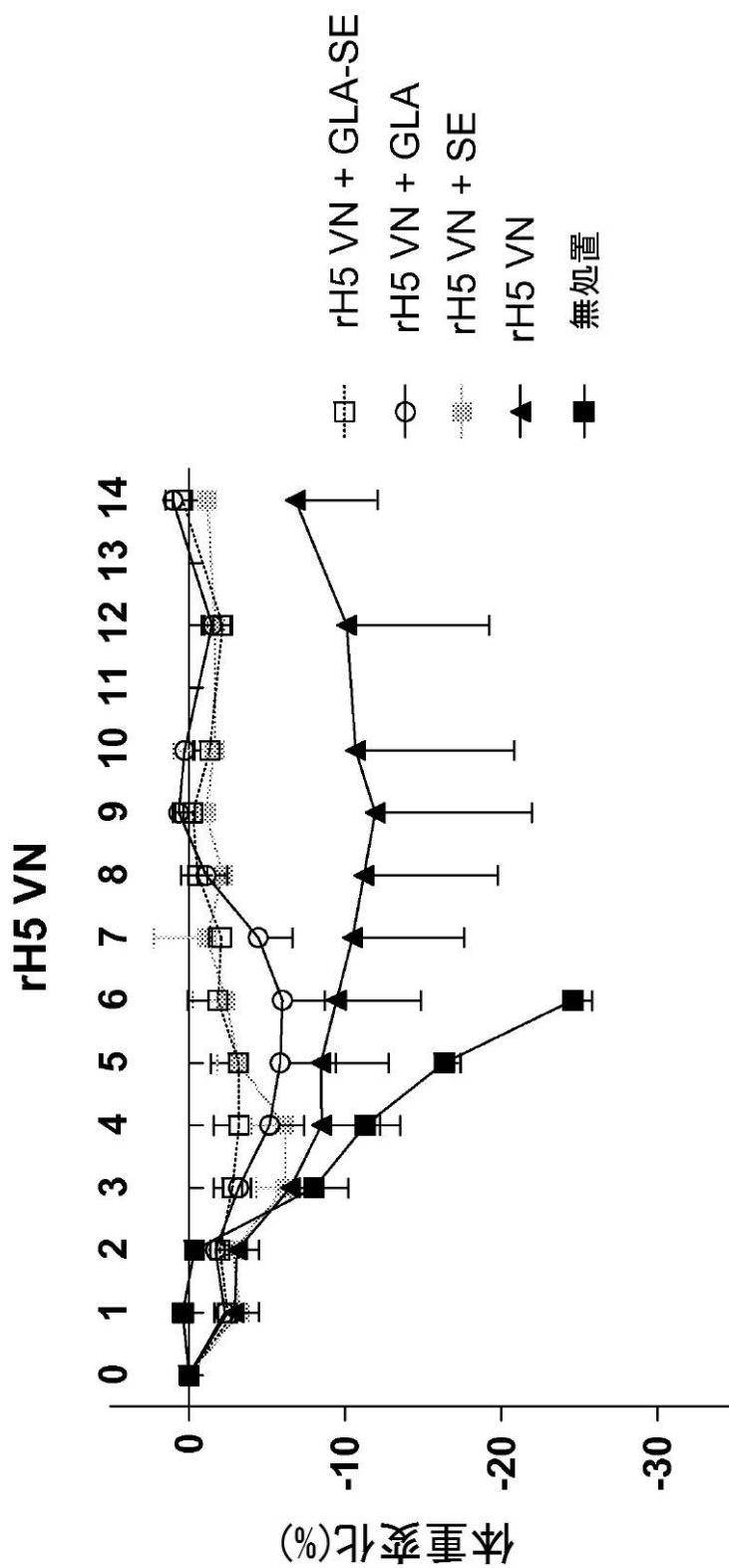


FIG. 4A

【図 4 B】

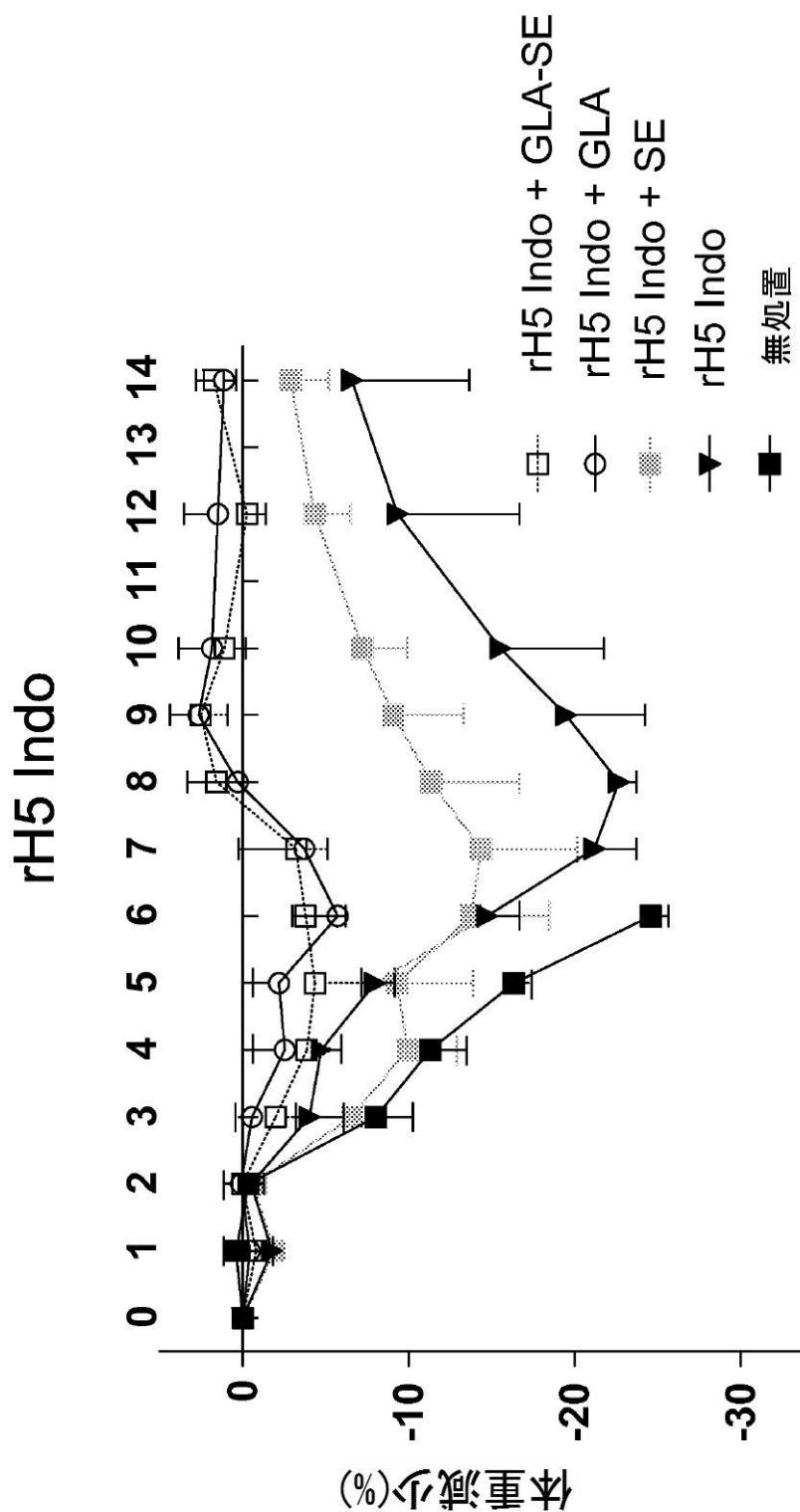


FIG. 4B

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月13日(2012.11.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザウイルスに対する免疫化を必要としている対象に、免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物であって、前記組成物は、

(a) インフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rH A)と、
 (b) アジュバントであって、前記アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有し、前記組成物は、投与量を節約する、アジュバントと、を含有する、薬学的組成物。

【請求項2】

薬学的組成物であって、

(a) インフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rH A)と、
 (b) アジュバントであって、前記アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有する、アジュバントと、

を含有し、前記薬学的組成物の一回の注射によって、インフルエンザウイルスに対する免疫化を必要としている対象に、免疫化を行う方法で使用するための、薬学的組成物。

【請求項3】

一用量当たりの前記rH A量は、約15～約0.1μgの範囲である、インフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項1～2のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

一用量当たりの前記rH A量は、約10～約0.5μgの範囲である、請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

一用量当たりの前記rH A量は、約5～約1μgの範囲である、請求項4に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

インフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項1、2または3のいずれか一項に記載の薬学的組成物であって、前記アジュバントはGLAであり、前記rH Aは、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに由来するrH 5である、組成物。

【請求項7】

H5N1、H1N1、H7N7、H9N2、およびH3N2、鳥インフルエンザ、H5、H5 クレード1、H5 クレード2、H5 クレード4、およびH5 クレード7ウイルスからなる群から選択されるインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

前記インフルエンザは、H5である、請求項7に記載の薬学的組成物。

【請求項9】

前記rH Aは、アジュバントがない場合は防御免疫を提供しない濃度で存在する、インフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項1に記載

の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記組成物は、単一の組換えタンパク質を含有する、インフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項 3～9のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

インフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための請求項 3～9のいずれか一項に記載の薬学的組成物であって、前記組成物は、第二のインフルエンザウイルス由来の $r\text{H}\text{A}$ タンパク質を含む、組成物。

【請求項 12】

前記組成物の投与は、前記一回の注射後に集団の少なくとも 50% に血清転換を実現する、請求項 2 または 3 に記載のインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 13】

前記組成物は乳剤を含まない、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 14】

前記組成物は油分を含まない、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【請求項 15】

前記アジュバントは G L A である、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

別の実施例として、発明は、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する免疫化を必要としている対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物を提供し、(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素 ($r\text{H}\text{A}$) と、(b) アジュバントであって、アジュバントは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、非還元末端の 1 位の炭素は、エーテル (-O-) 基またはアミノ (-NH-) 基のいずれかを介して、還元末端の 6' 位の炭素に結合され、二糖は、非還元末端の 4' 炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド (-NH-C(=O)-) および / またはエステル (-O-C(=O)-) 結合を介して、複数の脂質基へ結合され、エステルまたはアミド結合のカルボニル (-C(=O)-) 基は、脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも 8 つの炭素を含有し、組成物は、用量を節約する、アジュバントと、を含有する。対象者にプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスの免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物、 $r\text{H}\text{A}$ は、用量を節約する量で存在する。個別にまたはいずれかの組み合わせで発明をさらに定義する種々の実施形態において、 $r\text{H}\text{A}$ は、アジュバントがない予防免疫を提供しない濃度で存在し、単一の、つまり 1 つ以下の組換えタンパク質を含有し、一用量の $r\text{H}\text{A}$ 量は約 15～約 1 μg の範囲であり、アジュバントは G L A であり、 $r\text{H}\text{5}$ は H 5 N 1 インフルエンザの病原性株に由来する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

薬学的組成物であって、

(a) プレパンデミック(世界的流行前)またはパンデミック(世界的に流行している)
インフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rHA)と、

(b) アジュvantであって、前記アジュvantは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有する、アジュvantと、

を含有し、前記薬学的組成物の一回の注射によって、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する免疫化を必要としている対象に、免疫化を行う方法で使用するための、薬学的組成物。

(項目2)

前記組成物の投与は、前記一回の注射後に集団の少なくとも50%に血清転換を実現する、項目1に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目3)

前記組成物は乳剤を含まない、先行する項目のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目4)

前記組成物は油分を含まない、先行する項目のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目5)

前記アジュvantはGLAである、先行する項目のいずれか1項に記載の、プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、集団に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目6)

プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対する免疫化を必要としている対象に、免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物であって、前記組成物は、

(a) プレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスからの組換え赤血球凝集素(rHA)と、

(b) アジュvantであって、前記アジュvantは、グルコシルおよびアミノ置換グルコシルからそれぞれ独立して選択される還元末端および非還元末端を有する二糖を含有し、前記非還元末端の1位の炭素は、エーテル(-O-)基またはアミノ(-NH-)基のいずれかを介して、前記還元末端の6'位の炭素に結合され、前記二糖は、前記非還元末端の4'炭素を介してリン酸基へ、かつ、アミド(-NH-C(=O)-)および/またはエステル(-O-C(=O)-)結合を介して、複数の脂質基へ結合され、前記エステルまたはアミド結合のカルボニル(-C(=O)-)基は、前記脂質基に直接結合され、各脂質基は、少なくとも8つの炭素を含有し、前記組成物は、投与量を節約する、アジュvantと、を含有する、薬学的組成物。

(項目7)

前記rHAは、用量を節約する量で存在する、項目6に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目8)

前記rHAは、アジュvantがない場合は防御免疫を提供しない濃度で存在する、項目

6に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目9)

前記組成物は、単一の組換えタンパク質を含有する、項目6～8のいずれか1項に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目10)

一用量当たりの前記rHA量は、約15～約1μgの範囲である、項目6に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

(項目11)

前記アジュvantはGLAであり、前記rH5はH5N1インフルエンザの病原性株に由来する、項目6に記載のプレパンデミックまたはパンデミックインフルエンザウイルスに対して、対象に免疫化を行う方法で使用するための薬学的組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/027993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/145 A61K39/39
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2009/143457 A2 (INFECTIOUS DISEASE RES INST [US]; REED STEVEN G [US]; CARTER DARRICK []) 26 November 2009 (2009-11-26) page 40, line 7 - line 8 page 41, line 27 - page 42, line 10 page 100, line 12 - line 31 figures 17A, 17B, 22</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

12 July 2011

27/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Malamoussi, A

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/027993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Reed: "New adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines", 13 October 2009 (2009-10-13), pages 1-57, XP002649018, Retrieved from the Internet: URL:http://2009.ncnv.org/presentations/Sesson%206/1300%20-%20Reed%20%28for%20publis%29.pdf [retrieved on 2011-07-11] page 25</p> <p>-----</p>	1,4-7,10
X,P	<p>RHEA N. COLER ET AL: "A Synthetic Adjuvant to Enhance and Expand Immune Responses to Influenza Vaccines", PLOS ONE, vol. 5, no. 10, 27 October 2010 (2010-10-27), pages E13677-E13677, XP55002458, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0013677 the whole document</p> <p>-----</p>	1,4-7,10
A	<p>Anonymous: "Influenza Virus Vaccine USP-FluZone", April 2001 (2001-04), pages 1-8, XP002649020, Retrieved from the Internet: http://www.ctvia.org/docs/Vaccine%20Pk%20Insert%20-%20Influenza%20Virus%20Vaccine%20USP%20Trivalent%20Types%20A%20%20B%20-%20FluZone%20-%20Aventis%20Pasteur.pdf [retrieved on 2011-07-11] page 1, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>KEITEL ET AL: "Preparing for a possible pandemic: influenza A/H5N1 vaccine development", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 7, no. 5, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 484-490, XP022300861, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2007.06.004 Box 1 table 1</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-11
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/027993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BALDWIN S L ET AL: "Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone<(>R) adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, no. 43, 9 October 2009 (2009-10-09), pages 5956-5963, XP026643892, ISSN: 0264-410X, DOI: DOI:10.1016/J.VACCINE.2009.07.081 [retrieved on 2009-08-11] abstract figures 2-4 page 5961, right-hand column, paragraph 2 -----	1-11
A	VAJO ZOLTAN: "Influenza A (H5N1) pandemic prototype vaccine Fluval", EXPERT REVIEW OF VACCINES, UK, vol. 8, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 619-624, XP009150094, ISSN: 1744-8395 the whole document -----	1-11
A	"ADVERTISING: SYNTHETIC ADJUVANT", INTERNET CITATION, 15 May 2007 (2007-05-15), pages 1-6, XP002546530, ISSN: 0022-1767 Retrieved from the Internet: URL: http://www.jimmunol.org/cgi/issue_pdf/advertising_pdf/178/10.pdf [retrieved on 2009-09-17] page 3 -----	1-11
A	PERSING D H ET AL: "TAKING TOLL: LIPID A MIMETICS AS ADJUVANTS AND IMMUNOMODULATORS", TRENDS IN MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD., KIDLINGTON, GB, vol. 10, no. 10, SUPPL, 1 January 2002 (2002-01-01), pages S32-S37, XP009067296, ISSN: 0966-842X, DOI: DOI:10.1016/S0966-842X(02)02426-5 abstract table 1 ----- -/-	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/027993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIDDLETON DEBORAH ET AL: "Evaluation of vaccines for H5N1 influenza virus in ferrets reveals the potential for protective single-shot immunization", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 83, no. 15, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 7770-7778, XP002608561, ISSN: 0022-538X abstract -----	1-11
A	JOOST H. C. M. KREIJTZ ET AL: "MVA-Based H5N1 Vaccine Affords Cross-Clade Protection in Mice against Influenza A/H5N1 Viruses at Low Doses and after Single Immunization", PLOS ONE, vol. 4, no. 11, 1 January 2009 (2009-01-01), pages E7790-E7790, XP55002466, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0007790 abstract -----	1-11
A	LEROUX-ROELS ET AL: "Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial", THE LANCET, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 370, no. 9587, 16 August 2007 (2007-08-16), pages 580-589, XP022202258, ISSN: 0140-6736, DOI: DOI:10.1016/S0140-6736(07)61297-5 abstract page 581, left-hand column, paragraph 6 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/027993

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009143457 A2	26-11-2009	CN 102112135 A EP 2291190 A2 US 2009181078 A1 US 2011014274 A1 US 2011070290 A1	29-06-2011 09-03-2011 16-07-2009 20-01-2011 24-03-2011

フロントページの続き

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

(72)発明者 リード, スティーブン ジー.

アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シアトル, コロンビア ストリート 1124,
スイート 700

(72)発明者 バン ホーベン, ニール

アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シアトル, コロンビア ストリート 1124,
スイート 700

F ターム(参考) 4C085 AA03 BA55 DD86 EE06 FF14 GG01