

(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2004-527524

(P2004-527524A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/09	A 6 1 K 39/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/095	A 6 1 K 39/09	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/102	A 6 1 K 39/095	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-578702 (P2002-578702)	(71) 出願人	591076811 カイロン コーポレーション アメリカ合衆国, カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560
(86) (22) 出願日	平成14年4月5日 (2002.4.5)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月1日 (2003.10.1)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/010869	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/080648		
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		
(31) 優先権主張番号	60/282, 389		
(32) 優先日	平成13年4月5日 (2001.4.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , CA, JP		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非経口初回抗原刺激後の粘膜追加免疫

## (57) 【要約】

1つ以上の抗原を用いる粘膜の免疫が後に続く、同じ抗原または異なる抗原の非経口投与が記載される。被験体における免疫応答を生成する方法が記載されており、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 1つ以上のポリペプチド抗原を含む第1の免疫原性組成物を非経口的に投与する工程、および；(b) 1つ以上の抗原を含む第2の免疫原性組成物を粘膜に投与する工程であって、これによって、被験体において免疫応答を誘導する、工程。さらに、腫瘍抗原に対する免疫応答を生成する方法が、記載されており、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 1つ以上の腫瘍抗原を含む第1の免疫原性組成物を非経口的に投与する工程、および；(b) 1つ以上の腫瘍抗原を含む第2の免疫原性組成物を粘膜に投与する工程。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体において免疫応答をもたらす方法であって、

( a ) 1 つ以上のポリペプチド抗原を含む第 1 の免疫原性組成物を非経口投与する工程、および；

( b ) 1 つ以上の抗原を含む第 2 の免疫原性組成物を経粘膜投与する工程、を包含し、これらによって被験体における免疫応答を誘導する、方法。

## 【請求項 2】

前記経粘膜投与が鼻腔内投与である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記経粘膜投与が直腸内投与である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記経粘膜投与が膈内投与である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記非経口投与が経皮的である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 の免疫原性組成物が、微粒子をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記第 2 の免疫原性組成物が、微粒子を用いて送達される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記微粒子が P L G を含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記免疫応答が全身性の免疫応答である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記免疫応答が、粘膜の免疫応答である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記免疫応答が、1 つ以上の病原体に由来する抗原に対してもたらされる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記病原体が、細菌である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記細菌が、*Neisseria meningitidis* である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記細菌が、*Neisseria meningitidis* のサブグループ B である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記細菌が、*Neisseria meningitidis* のサブグループ C である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記抗原がカプセルのオリゴ糖である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記サッカリドが CRM 197 に結合体化される、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記細菌が、*Haemophilus influenzae* B 型 ( H I B ) である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記細菌が、*Streptococcus pneumoniae* である、請求項 12 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 20】

前記細菌が、Streptococcus agalactiaeである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 21】

前記病原体が、ウイルスである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ウイルスが、A型肝炎ウイルス(HAV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、RSウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)、インフルエンザ、B型肝炎ウイルス(HBV)、単純疱疹ウイルス(HSV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、およびヒトパピローマウイルス(HPV)からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記ウイルスが、HIV-1である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ウイルスが、RSVである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記ウイルスが、PIVである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ウイルスが、HCVである、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記抗原の1つ以上が、腫瘍抗原である、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第1および第2の免疫原性組成物が、同じ病原体由来の抗原を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第1および第2の免疫原性組成物が同じである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第2の免疫原性組成物が、前記第1の免疫原性組成物の抗原とは異なる少なくとも1つの抗原を含む、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 31】

前記第1および第2の免疫原性組成物が、異なる病原体由来の抗原を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 32】

前記第1の免疫原性組成物が、1つ以上の抗原をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第2の免疫原性の抗原の1つ以上が、1つ以上のポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 1 ~ 32 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第2の免疫原性組成物の抗原が、ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 35】

工程(a)が、2回以上実行される、請求項 1 ~ 34 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 36】

工程(b)が、2回以上実行される、請求項 1 ~ 35 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 37】

被験体において腫瘍抗原に対する免疫応答をもたらす方法であって、

1つ以上の腫瘍抗原を含む第1の免疫原性組成物を非経口投与する工程、および；

1つ以上の腫瘍抗原を含む第2の免疫原性組成物を経粘膜投与する工程、

50

を包含する、方法。

【請求項 38】

前記第 1 の免疫原性組成物が、前記腫瘍抗原をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項 37 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般に、抗原による非経口初回抗原刺激後の 1 つ以上の同じまたは別の抗原の粘膜免疫に関する。後の免疫応答を誘導するためのこれらの粘膜追加免疫系の使用はまた 10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

種々の病原体に対する免疫(特に粘膜免疫)を呼び起こすワクチンの開発は、好ましい。多くの疾患の原因病原体(例えば、細菌、ウイルス、寄生生物、および他の微生物)が、粘膜表面を介して感染される。

【0003】

粘膜表面を介して感染されると考えられる 1 つの例は、捕捉された免疫不全症候群(AIDS)である。AIDS は、現代医学が直面している最大の健康脅威の 1 つとして認識されており、そして世界中の HIV 性感染は、AIDS を引き起こす原因である。今なお、AIDS の治療もワクチンも存在しない。 20

【0004】

1983 年~1984 年において、3 つのグループが別々に AIDS の疑わしい病因因子を同定した。例えば、Barre-Sinoussi ら、(1983) Science 220: 868-871; Montagnier ら、Human T-Cell Leukemia Viruses (Gallico, Essex & Gross 編、1984); Vilmer ら(1984) The Lancet 1: 753; Popovic ら(1984) Science 224: 497-500; Levy ら(1984) Science 225: 840-842 を参照のこと。これらの単離は、様々に、リンパ節関連ウイルス(LAV)、ヒト T 細胞リンパ増殖性ウイルス III 型(HTLV-III)、または AIDS 関連ウイルス(ARV)と呼ばれた。これらの単離体全てが、同じウイルス株であり、そして後に、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と集合的に名付けられた。関連する AIDS 原因ウイルスの単離について、当初 HIV と呼ばれた株は、現在 HIV-1 と呼ばれ、そしてその関連ウイルスは、HIV-2 と呼ばれる。例えば、Guyader ら(1987) Nature 326: 662-669; Brun-Vezinet ら(1986) Science 233: 343-346; Clavel ら(1986) Nature 324: 691-695 を参照のこと。従って、世界中で、HIV 感染の処置および/または予防に適する組成物もしくは方法の必要性が、当該分野において存在する。 30

【0005】

HIV ウイルスについての多くの情報が集められ、そして HIV によってコードされる env 遺伝子産物、gag 遺伝子産物、pol 遺伝子産物、または tat 遺伝子産物を含む、ワクチン開発のためのいくつかの標的が、試験されている。ネイティブ HIV および合成 HIV がコードしているポリヌクレオチドによる免疫は、例として記載されるように、共有に係る PCT/US99/31245 および本明細書中に引用される文献において記載されている。さらに、ワクチンを同定するための種々の試みにおいて、HIV をコードするポリヌクレオチドが投与されている。(例えば、Bagarazzi ら(1999) J. Infect. Dis. 180: 1351-1355; Wang ら(1997) Vaccine 15: 821-825 を参照のこと)。CTL 応答を誘発し得る HIV のマ 40 50

トリクス/キャプシドドメインを保有している、複製能力を有するベネズエラウマ脳脊髄炎 (VEE) ウイルスベクターは、動物において皮下に投与されている (Caleyら (1997) J. Virol. 71: 3031-3038)。さらに、シンドビスウイルス由来の ウイルスベクターもまた、動物において HIV gag - 特異的応答を誘発することが示されている (Gardnerら (2000) J. Virol. 74: 11849-11857)。同様に、HIVペプチドもまた、動物被験体に投与されている。(Staatsら (1997) AIDS Res Hum Retroviruses 13: 945-952; Belyakov (1998) J. Clin. Invest. 102: 2072)。

#### 【0006】

粘膜表面を介して感染され得る細菌の1つの例は、*Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis* または *N. men.*) である。*Neisseria meningitidis* は、細菌性髄膜炎および細菌性敗血症の原因因子である。髄膜炎菌は、被膜抗原および細胞壁抗原免疫学的特性に基づく血清学的群に分類される。現在認識されている血清型としては、A、B、C、W-135、X、Y、Z および 29E が挙げられる。血清型特異性の原因であるポリサッカリドは、これらの群のいくつかから精製されており、A、B、C、W-135、および Y が挙げられる。WO 00/66791; WO 99/24578; WO 00/71574; WO 99/36544; WO 01/04316; WO 99/57280; WO 01/31019; WO 00/22430; WO 00/66741; WO 00/71725; WO 01/37863; WO 01/38350; WO 01/52885; WO 01/64922; WO 01/64920; WO 96/29412; および WO 00/50075 をまた参照のこと。

#### 【0007】

*N. meningitidis* 血清型 B (本明細書中で、「Men B」または「Nm B」と呼ばれる) は、米国およびヨーロッパに住んでいる乳児および子供における細菌性髄膜炎の大きな割合を占めている。この生物はまた、若い成人において致死的な敗血症を引き起こす。思春期に、外部膜タンパク質 (OMP) ピヒクルからなる試験的な Men B ワクチンは、幾分か保護性である。しかし、保護は、ワクチン接種を受けた乳児 (疾患の最も高い危険性である年齢群) においては観察されなかった。さらに、OMP ワクチンは、血清型 - 表現型 - 特異的であり、そして優性の Men B 株は、このようなワクチンの有用性を制限する、地理的変動および時間的変動の両方に共される。

#### 【0008】

有効な被膜ポリサッカリドベースのワクチンは、血清型 A、C、Y および W135 によって引き起こされる髄膜炎菌疾患に対して開発されてきた。さらに、Men B / Men C ワクチンの組み合わせが記載されている。WO 99/61053 を参照のこと。しかし、Men B ポリサッカリドワクチンを開発するための同様の試みは、被膜 Men B ポリサッカリド (本明細書中で「Men B PS」と呼ばれる) の弱い免疫原性に起因して失敗した。Men B PS は、(N-アセチル (2->8)) ノイラミン酸のホモ単量体である。*Escherichia coli* K1 は、同一の皮膜ポリサッカリドを有する。Men B PS によって誘発される抗体は、宿主ポリシアル酸 (PSA) と交差反応する。PSA は、胎児および新生児の組織において、特に脳組織において発見された神経細胞接着分子 (「NCAM」) 上に、大量に発現される。PSA はまた、腎臓、心臓、および嗅神経を含む成人組織において、より少ない程度で見出される。従って、ほとんどの抗 Men B PS 抗体がまた、自己抗体である。従って、このような抗体は、胎児発達に悪影響を与える可能性、または自己免疫疾患を引き起こす可能性を有する。

#### 【0009】

Men B PS 誘導体は、Men B PS の弱い免疫原性を回避するための試みにおいて調製されている。例えば、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> N-アシル-置換 Men B PS 誘導体が、記載されている。Jenningsらへの EP 公報第 504, 202 B を参照のこと。同様

10

20

30

40

50

に、Jenningsらへの米国特許第4,727,136号は、本明細書中において「NPr-MenB PS」と称されるN-プロピオニル化MenB PS分子を記載する。NPr-MenB PS 複合糖質により免疫されたマウスは、高力価のIgG抗体を誘発することが報告された。Jenningsら、(1986) J. Immunol. 137:1708。ウサギにおいて、2つの異なる抗体の集団が、誘導体を用いて産生され、この2つの異なる抗体は、称するところによれば、2つの異なるエピトープに結合し、一つはネイティブのMenB PSによって共有され、そして一つは共有されない。殺菌活性は、MenB PSと交差反応しない抗体集団において見出される。Jenningsら、(1987) J. Exp. Med. 165:1207。この結合体によって誘発される保護抗体と反応する細菌表面エピトープの本質は、未知のままである。また、このワクチンによって誘発される抗体のサブセットが、宿主のポリシアル酸との自己反応性を有する(Granoffら、(1998) J. Immunol. 160:5028)ので、ヒトにおけるこのワクチンの安全性は、不確かなままである。従って、MenBに対する安全かつ効果的なワクチンの産生が特に望ましいことは、容易に理解される。

10

#### 【0010】

癌(腫瘍)抗原は、安全かつ効果的なワクチンを有すること望まれる抗原のなお別の多様なクラスを形成する。(例えば、Moingeon(2000) Vaccine 19:1305-1326; Rosenber(2001) Nature 411:380-384を参照のこと)。種々の腫瘍特異的抗原が同定されており、そして試みは、細胞全体の溶解物または特徴付けられていない腫瘍溶解物に基づくワクチンの開発するために行われている。Moingeon、前出。しかし、現在のところ、種々の癌に対する立証されたワクチンは存在しない。

20

#### 【0011】

免疫の特定の初回抗原刺激-追加免疫方法が記載されている。特に、ポリヌクレオチドに関する遺伝的免疫は、記載されているとおりである。(例えば、WO 01/81609; WO 00/11140; Cooneyら、(1993) Proc Nat'l Acad Sci USA 90(5):1882-1886(HIV-1エンベロープを発現している組換えワクシニア(vac/env)ウイルスによる筋内初回抗原刺激および組換えバキュロウイルス由来のgp160糖タンパク質(rgp160)による筋内追加免疫による免疫応答の誘導を記載している); Bruhlら、(1998) AIDS Res Hum Retroviruses 14:401-407(組換えワクシニアによる、粘膜初回抗原刺激、続いて非経口初回抗原刺激を記載している); およびEoら、(2001) J. Immunol. 166:5473-5479(HSVのgBタンパク質を発現している組換えワクシニアウイルスによる、粘膜初回抗原刺激および粘膜追加免疫を記載している)を参照のこと)。Leeら、(1999) Vaccine 17:3072-3082は、組換えHelicobacter pyloriウレアーゼワクチンを用いた、粘膜初回抗原刺激および非経口の追加免疫のレジメンを記載する。

30

#### 【0012】

しかし、これらまたは他の研究にも関わらず、種々の抗原(現在、効果的なワクチンおよび/または処置が有るか無しかの病原体または癌を含む)に対する粘膜および全身の免疫を増強する組成物および方法の必要性が残っている。

40

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

##### (発明の要旨)

本発明は、非経口初回抗原刺激によって、続いて粘膜追加免疫によって、哺乳動物における免疫応答を生じるための方法を提供する。

#### 【0014】

1つの局面において、被験体における免疫応答を生成する方法が記載されている。この方法は、以下の工程を包含する:(a)1つ以上のポリペプチド抗原を含む第1の免疫原性

50

組成物を非経口的に投与する工程、および；(b) 1つ以上の抗原を含む第2の免疫原性組成物を粘膜に投与する工程であって、これによって、被験体において免疫応答を誘導する、工程。

【0015】

別の局面において、腫瘍抗原に対する免疫応答を生成する方法が記載されており、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 1つ以上の腫瘍抗原を含む第1の免疫原性組成物を非経口的に投与する工程、および；(b) 1つ以上の腫瘍抗原を含む第2の免疫原性組成物を粘膜に投与する工程。

【0016】

この粘膜投与は、例えば、直腸内、鞘膜内または鼻腔内であり得る。さらに、本明細書中に記載されるいずれかの方法において、非経口投与は、例えば、経皮的であり得る。第1および/または第2の免疫原性組成物はさらに、1つ以上のさらなる薬剤(例えば、アジュバンド、および/または送達ビヒクル(例えば、PLGの様な微粒子))を含み得る。

【0017】

特定の実施形態において、少なくとも1つの抗原は、細菌(例えば、*Neisseria meningitidis*の亜群A、亜群Bおよび/または亜群C(例えば、莢膜オリゴ糖抗原単独またはCRM197に結合した)；*Haemophilus influenzae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus agalactiae*)由来である。他の実施形態において、少なくとも1つの抗原は、ウイルス(例えば、A型肝炎ウイルス(HAV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)、インフルエンザ、B型肝炎ウイルス(HBV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、C型肝炎ウイルス(HCV)および/またはヒトパピローマウイルス(HPV))由来である。なお他の実施形態において、少なくとも1つの抗原は、腫瘍由来である。

【0018】

本明細書中に記載されるいずれかの方法において、免疫応答は、体液性および/または細胞性であり得、そしてさらに、全身性免疫応答(例えば、IgG産生)、粘膜免疫応答(例えば、IgA産生)あるいは全身性応答および粘膜応答の組み合わせであり得る。本明細書中に記載される方法は、1つ以上の病原体(例えば、細菌、ウイルス、腫瘍など)に対する免疫応答を生じるために使用され得る。

【0019】

本明細書中に記載されるいずれかの方法において、第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物は、同じ病原体(例えば、細菌、ウイルスおよび/または腫瘍)由来の抗原を含み得る。特定の実施形態において、第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物は、同じものである。他の実施形態において、第1の免疫原性組成物および第2の免疫原性組成物は、例えば、同じ病原体由来の異なる抗原、抗原の異なる形態、異なる病原体由来の抗原および/または異なるアジュバンドを有することによって、異なる。

【0020】

本明細書中に記載されるいずれかの方法において、この免疫原性組成物は、全てまたは一部分の、1つ以上の抗原をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、第1の免疫原性組成物はさらに、1つ以上の抗原をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。他の実施形態において、第2の免疫原性の抗原の全てまたはいくつかは、1つ以上のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0021】

さらに、本明細書中に記載されるいずれかの方法において、本明細書中に記載される方法はさらに、工程(a)および/または工程(b)を含む工程を1回以上繰り返すことを包含する。特定の局面において、工程(b)は、2回以上実施される。工程(b)の粘膜投与の間の時間間隔は、時間、日数、月数または年数であり得る。特定の実施形態において、繰り返される工程は、同じ免疫原性組成物か、あるいは異なる免疫原性組成物を用いて実施される。

10

20

30

40

50

## 【0022】

従って、本発明の目的は、非経口の免疫応答の初回抗原刺激に続く粘膜の追加免疫のための代替方法または改善された方法を提供することである。本発明は、哺乳動物における免疫応答を引き起こすための方法（第1の免疫原性組成物の非経口投与、続く第2の免疫原性組成物の粘膜投与を含む方法）を提供する。この粘膜投与はさらに、粘膜のアジュバンド（例えば、CpG含有オリゴ、生物接着性ポリマー、あるいはE. coliの易熱性エンテロトキシン（enterotoxin）（「LT」）またはそれらの無毒化された変異体、あるいはコレラ毒素（「CT」）またはその無毒化された変異体、あるいは生分解性または無毒の物質から形成された微粒子）の使用を含む。この非経口投与は、好ましくは、非経口アジュバンド（例えば、ミョウバンなど）の使用をさらに含む。特定の実施形態において、微粒子は、免疫原性組成物の送達のために使用される。

10

## 【0023】

第1の免疫原性組成物は、非経口的に投与される。非経口投与の適切な経路としては、筋内経路、皮下経路、静脈内経路、腹腔内経路、真皮内経路、経皮性（transcutaneous）経路、または経皮性（transdermal）経路、ならびに組織の間質性空間への送達が挙げられる。1つの実施形態において、非経口の初回抗原刺激は、筋内経路を介する。この第1の免疫原性組成物は、好ましくは、代表的に、滅菌されかつ発熱物質を含まない、注射可能な形態において、非経口投与に適応される（例えば、WO 99/43350を参照のこと）。特定の実施形態において、この第1の免疫原性組成物は、非経口アジュバンドまたは免疫学的アジュバンドを含む。さらに、この第1の免疫原性組成物は、生分解性または無毒の微粒子上に吸着され得る。第2の免疫原性組成物は、粘膜に投与される。粘膜投与の適切な経路としては、経口経路、経鼻腔経路、胃内経路、肺性経路、腸管経路、直腸経路、眼の経路および腔経路が挙げられる。鼻腔内投与または経口投与が、好ましい。

20

## 【0024】

特定の局面において、第2の免疫原性組成物は、好ましくは、粘膜投与に適応し得る。組成物が、経口投与用である場合、錠剤またはカプセル剤の形態であり得、必要に応じて、腸溶性、液状、トランスジェニック植物などであり得る。この組成物が、経鼻投与用である場合、鼻内噴霧、点鼻液（nasal drops）、ゲルまたは散剤の形態であり得る。特定の実施形態において、第2の免疫原性組成物はさらに、粘膜アジュバンドを含む。適切なアジュバンドとしては、以下が挙げられる：CpG含有オリゴ、生物接着性ポリマー（WO 99/62546およびWO 00/50078を参照のこと）；E. coliの易熱性エンテロトキシン（「LT」）またはそれらの無毒化された変異体、あるいはコレラ毒素（「CT」）またはその無毒化された変異体、あるいは生分解性または無毒の物質から形成された微粒子。好ましいLT変異体としては、K63、またはR72が挙げられる。例えば、PCT EP 92/03016；PCT IB 94/00068；PCT IB 96/00703およびPCT IB 97/00183を参照のこと。

30

## 【0025】

他の局面において、第1の免疫原性組成物および/または第2の免疫原性組成物は、微粒子に吸着される。特定の実施形態において、第1の免疫原性組成物および/または第2の免疫原性組成物において使用される微粒子は、直径100nm~150nmであり、より好ましくは、直径200nm~30μmであり、そして最も好ましくは、直径500nm~10μmであり、そして、例えば、ポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなどから作成される。例えば、WO 00/06123およびWO 98/33487を参照のこと。

40

## 【0026】

本発明の使用に適切な免疫原性組成物としては、ウイルス、細菌、寄生生物、真菌および/または癌抗原をコードする、タンパク質および/またはポリヌクレオチドが挙げられる。

## 【0027】

50

本発明の種々の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照する際に証拠となる。さらに、種々の参照は、より詳細な特定の手順または組成物（例えば、プラスミドなど）において記載され、以下に示される。

【0028】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他に示されない限り、当業者の範囲内の従来の化学方法、生化学方法、分子生物学方法、免疫学方法および薬理学方法を利用する。このような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編, Academic Press, Inc.); ならびに Handbook of Experimental Immunology, 第I~IV巻 (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S編, CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 第4版 (Ausubelら編, 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course (Reamら編, 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 第2版 (Newton & Graham編, 1997, Springer Verlag); PetersおよびDalrymple, Fields Virology (第2版) Fieldsら (編) B. N. Raven Press, New York, NYを参照のこと。

【0029】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、その文脈が明らかに他を示さない限り、複数形の参照を含む。従って、例えば、「抗原（単数形）」に対する言及は、2つ以上のこのような因子の混合物を含む。

【0030】

本発明を示す前に、本明細書中以降で使用される特定の用語の定義を最初に示す。

【0031】

「ポリヌクレオチド」とは、生物学的に活性な（例えば、免疫学的または治療的）タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子である。このポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの特性に依存して、ポリヌクレオチドは、10程度に少ないヌクレオチドを含み得る（例えば、このポリヌクレオチドが抗原をコードする場合）。さらに、「ポリヌクレオチド」は、二本鎖配列および一本鎖配列の両方を含み得、そしてウイルスMRNA、原核生物MRNA、または真核生物MRNA由来のcDNA、ウイルス（例えば、RNAウイルスおよびDNAウイルスならびにレトロウイルス）または原核生物DNA由来のゲノムRNA配列およびゲノムDNA配列、特に、合成DNA配列をいうがこれらに限定されない。この用語はまた、DNAおよびRNAの任意の公知の塩基アナログを含む配列を包含し、そしてその核酸配列が治療タンパク質または抗原性タンパク質をコードする限りので、ネイティブな配列に対する、欠失、付加、および置換（一般的に天然において保存的である）のような改変を含む。これらの改変は、部位特異的変異誘発のように、意図的であり得るか、または抗原を産生する宿主の変異を介してのように偶発的であり得る。ポリヌクレオチドの改変は、任意の数の効果（例えば、宿主細胞におけるポリペプチド産物の発現を促進することが挙げられる）を有し得る。

【0032】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをいい、そして

最少の長さの産物に限定されない。従って、ペプチド、オリゴペプチド、ダイマー、マルチマーなどは、この定義内に含まれる。全長タンパク質およびそのフラグメントの両方が、この定義によって含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。さらに、本発明の目的に関して、「ポリペプチド」は、そのタンパク質が所望の活性を維持する限りは、ネイティブな配列に対する欠失、付加および置換（一般的に、天然において保存的である）などの改変を含むタンパク質をいう。これらの改変は、意図的であり得るか（例えば、部位特異的変異誘発を介して）、または偶発的であり得る（例えば、タンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅に起因するエラーを介して）。さらに、以下の効果：毒性の軽減；細胞プロセッシング（例えば、分泌、抗原提示など）の促進；ならびにB細胞および/またはT細胞に対する提示の促進、の1つ以上を有する改変がなされ得る。

10

## 【0033】

「融合分子」は、2つ以上のサブユニットの分子が（好ましくは、共有結合で）連結された分子である。このサブユニット分子は、同じ化学的型の分子であり得るか、または異なる化学的型の分子であり得る。これらの融合分子の例としては、融合ポリペプチド（例えば、2つ以上の抗原間の融合物）および融合核酸（例えば、本明細書中に記載される融合ポリペプチドをコードする核酸）が挙げられるが、これらに限定されない。融合分子を製する方法については、Sambrookら、前出およびAusubelら、前出もまた参照のこと。

## 【0034】

「抗原」は、体液性抗原特異的応答および/または細胞性抗原特異的応答を生成するように宿主の免疫系を刺激する1つ以上のエピトープ（線状、コンフォメーション的のいずれか、または両方）を含む分子をいう。この用語は、用語「免疫原」と交換可能に使用される。通常、エピトープは、約3～15アミノ酸、一般的には約5～15アミノ酸の間を含む。通常、B細胞エピトープは、少なくとも5アミノ酸を含むが、これは3～4アミノ酸ほど小さいものでもあり得る。T細胞エピトープ（例えば、CTLエピトープ）は、少なくとも約7～9アミノ酸を含み、そしてヘルパーT細胞エピトープは、少なくとも12～20アミノ酸を含む。通常、エピトープは、約7アミノ酸と15アミノ酸との間のアミノ酸（例えば、9、10、12、または15アミノ酸）を含む。用語「抗原」は、サブユニット抗原（すなわち、その抗原が天然で会合する生物全体から、隔離または分離されている抗原）、および殺傷されたか、弱毒化されたかまたは不活性化された、細菌、ウイルス、真菌、寄生生物または他の微生物ならびに細胞表面レセプターの細胞外ドメインおよびT細胞エピトープを含み得る細胞内部分を含む腫瘍抗原の両方を示す。抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはそのフラグメント、および合成ペプチドミモトープ（mimotope）（これは、抗原または抗原決定基を模倣し得る）もまた、本明細書中に使用されるような抗原の定義の下に捕えられる。同様に、インビボにおいて（例えば、遺伝子治療およびDNA免疫適用において）抗原または抗原決定基を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドもまた、本明細書の抗原の定義内に含まれる。

20

30

## 【0035】

所定のタンパク質のエピトープは、当該分野において周知の任意の数のエピトープマッピング技術を用いて同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris 編, 1996) Humana Press, Totowa, New Jerseyを参照のこと。例えば、線状エピトープが、例えば、固体支持体上の多数のポリペプチドを同時に合成し（このペプチドは、このタンパク質分子の部分に対応する）そしてこれらのペプチドがこれらの支持体になお付着したままで、これらのペプチドと抗体とを反応させることによって決定され得る。このような技術は、当該分野において公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号；Geysenら、(1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998-4002；Geysenら、(1986) Molec. Immunol 23:709-

40

50

715に記載される。

【0036】

同様にして、コンフォメーションエピトープは、アミノ酸の空間的なコンフォメーションを決定することによって（例えば、X線結晶学および核磁気共鳴によって）容易に同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols前出を参照のこと。

【0037】

本発明の目的に関して、抗原は、以下により完全に記載されるように、腫瘍および/または任意のいくつかの既知のウイルス、細菌、寄生生物および真菌から誘導され得る。この用語はまた、種々の腫瘍抗原のいずれかまたは免疫応答が所望される任意の他の抗原を意図する。さらに、本発明の目的に関して、「抗原」は、本明細書中に規定されるように、そのタンパク質が免疫学的応答を誘発する能力を維持する限りは、ネイティブな配列に対する欠失、付加および置換（一般的に、天然において保存的である）のような改変を含むタンパク質をいう。これらの改変は、意図的であり得るか（例えば、部位特異的変異誘発を介して）、または偶発的であり得る（例えば、抗原を産生する宿主の変異を介して）。

【0038】

抗原または組成物に対する「免疫学的応答」は、目的の組成物中に存在する抗原に対する被験体における体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答の発生である。本発明の目的に関して、「体液性免疫応答」は、抗体分子によって媒介される免疫応答をいい（分泌（IgA）分子またはIgG分子を含む）、一方、「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球および/もしくは他の白血球によって媒介される免疫応答である。細胞性免疫の1つの重要な局面は、細胞溶解性T細胞（「CTL」）による抗原特異的応答を含む。CTLは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）によってコードされ、そして細胞の表面上に発現されるタンパク質と共に提示されるペプチド抗原に対して、特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の破壊またはこのような微生物で感染された細胞の溶解を、誘導および促進するように補助する。細胞性免疫の別の局面は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答を含む。ヘルパーT細胞は、その表面上にMHC分子と共にペプチド抗原を提示する細胞に対して、非特異的なエフェクター細胞の機能を刺激し、そしてその非特異的なエフェクター細胞の活性に焦点をあわせるように補助するように作用する。「細胞性免疫応答」はまた、サイトカイン、ケモカイン、ならびに活性化T細胞および/または他の白血球によって産生される他のこのような分子の産生をいい、これには、CD4+ T細胞、およびCD8+ T細胞由来の分子が挙げられる。さらに、ケモカイン応答は、投与された抗原に免疫して種々の白血球または内皮細胞によって誘導され得る。

【0039】

細胞性免疫応答を惹起する組成物またはワクチンは、その細胞表面でのMHC分子と会合した抗原の提示によって、脊椎動物被験体有感作するために役立ち得る。その細胞媒介性免疫応答は、その表面に抗原を提示する細胞にかまたはその細胞付近に対する。さらに、抗原特異的Tリンパ球が、免疫された宿主の将来的防御を可能にするために生成され得る。

【0040】

特定の抗原が細胞媒介性免疫応答を刺激する能力は、多数のアッセイにより決定され得、そのようなアッセイは、例えば、リンパ増殖（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイ、または感作された被験体におけるその抗原に特異的なTリンパ球についてのアッセイである。そのようなアッセイは、当該分野で周知である。例えば、Ericssonら、J. Immunol. (1993) 151: 4189 - 4199; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369 - 2376を参照のこと。細胞媒介性免疫応答を測定する最近の方法としては、細胞内サイトカインまたはT細胞集団によるサイトカイン分泌の測定（例えば、ELISPOT技術による）、あるいはエピトープ特異的T細胞の測定（例えば、テトラマー技術による）（McMichael, A. J. およびO'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187 (9)

10

20

30

40

50

: 1367 - 1371, 1998; Mcheyzer - Williams, M. G. ら、  
Immunol. Rev. 150: 5 - 21, 1996; Lalvani, A. ら、J.  
Exp. Med. 186: 859 - 865, 1997により概説される)が、挙げられる。

#### 【0041】

従って、本明細書中で使用される場合、免疫学的応答は、CTLおよび/またはヘルパーT細胞の生成もしくは活性化を刺激する応答であり得る。ケモカインおよび/またはサイトカインの生成もまた、刺激され得る。目的の抗原は、抗体媒介性免疫応答も惹起し得る。従って、免疫学的応答は、以下の効果のうちの1つ以上を包含し得る: B細胞による抗体(例えば、IgAまたはIgG)の生成; ならびに/あるいは目的の組成物またはワクチン中に存在する抗原に特異的に指向されるサブレッサーT細胞、細胞傷害性T細胞、もしくはヘルパーT細胞および/またはT細胞の活性化。これらの応答は、感染性を中和し、そして/または抗体-補体依存性細胞傷害性または抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を媒介して、免疫された宿主に対して防御を提供するように作用し得る。そのような応答は、当該分野で周知である、標準的免疫アッセイおよび中和アッセイを使用して、決定され得る。

10

#### 【0042】

「免疫原性組成物」は、被験体へのその組成物の投与が、目的の抗原性分子に対する体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答の発生を被験体において生じる、抗原性分子を含む組成物である。この免疫原性組成物は、レシピエント被験体中に直接(例えば、注射によって、吸入によって、経口投与経路によって、鼻内投与経路によって、または他の任意の非経口もしくは粘膜(例えば、直腸内もしくは腔内)投与経路によって)導入され得る。

20

#### 【0043】

「サブユニットワクチン」によって、目的の病原体(例えば、ウイルス、細菌、寄生生物、または真菌)に由来する抗原に由来するかまたはその抗原と相同である、選択された1つ以上の抗原(しかし、すべての抗原ではない)を含む、ワクチン組成物が意味される。そのような組成物は、インタクトな病原性細胞も病原性粒子も、またはそのような細胞もしくは粒子の溶解物も実質的に含まない。従って、「サブユニットワクチン」は、その病原体から少なくとも部分的に精製された(好ましくは、実質的に精製された)免疫原性ポリペプチド、またはそのアナログから調製され得る。従って、そのサブユニットワクチン中に含まれる抗原を得る方法としては、標準的精製技術、組換え生成、または合成生成が挙げられ得る。

30

#### 【0044】

「非経口」によって、消化器管外での(例えば、皮下投与、筋内投与、経皮(transcutaneous)投与、皮内(intradermal)投与または静脈内投与による)体内への導入が意味される。これは、粘膜表面(例えば、口腔粘膜表面、鼻腔粘膜表面、腔粘膜表面または直腸粘膜表面)への送達と対照的である。従って、「粘膜」とは、任意の粘膜表面を介した(例えば、経鼻腔的、経口的、経腔的、経直腸的などの)体内への導入を意味する。

40

#### 【0045】

「同時投与」によって、身体または標的細胞への2つ以上の組成物の導入が意味される。この用語は、任意の順序での投与または同時の投与を含む。

#### 【0046】

本明細書中で使用される場合、用語「微粒子」とは、直径約100nm~約150μmの粒子、より好ましくは直径約200nm~約30μm、最も好ましくは直径約500nm~約10μmの粒子をいう。好ましくは、この微粒子は、針およびキャピラリーをふさぐことなく非経口投与を可能とする直径のものである。微粒子の大きさは、当該分野において周知の技術(例えば、光子衝突分光法、レーザーディフラクトメトリー、および/または走査型電子顕微鏡)によって容易に決定される。

50

## 【0047】

本明細書における使用のための微粒子は、滅菌可能であり、非毒性であり、そして生分解性の材料から形成される。そのような材料としては、限定せず、ポリ( - ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物が挙げられる。好ましくは、本発明での使用のための微粒子は、ポリ( - ヒドロキシ酸)、特にポリ(ラクチド)(「PLA」)またはD, L-ラクチドおよびグリコリドもしくはグリコール酸のコポリマー(例えば、ポリ(D, L-ラクチド-コ-グリコリド)(「PLG」または「PLGA」))、またはD, L-ラクチドおよびカプロラクトンのコポリマーから誘導される。これらの微粒子は、種々の分子量を有し、そしてコポリマー(例えば、PLG)の場合、種々のラクチド：グリコリド比を有する種々の重合出発物質のいずれからも誘導され得、これらの選択は、主として、同時投与される抗原に一部依存する選択である。これらのパラメーターは、以下でより詳細に議論される。

10

## 【0048】

「免疫調節因子」とは、免疫応答を調節(特に増強)し得る分子(例えば、タンパク質)をいう。免疫調節因子の非限定的例としては、リンホカイン(サイトカインとしても公知)(例えば、IL-6、TGF-、IL-1、IL-2、IL-3など);およびケモカイン(例えば、分泌タンパク質(例えば、マクロファージ阻害因子))が、挙げられる。特定のサイトカイン(例えば、TRANCE、flt-3L、および分泌形態のCD40L)は、APCの免疫刺激能力を増強し得る。本発明の実施において単独でかまたは組み合わせて使用され得るサイトカインの非限定的例としては、インターロイキン-2(IL-2)、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン12(IL-12)、G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-11(IL-11)、MIP-1、白血球阻害因子(LIF)、c-kitリガンド、トロンボポエチン(TPO)、CD40リガンド(CD40L)、腫瘍壊死因子関連活性化誘導性サイトカイン(TRANCE)およびflt3リガンド(flt-3L)が、挙げられる。サイトカインは、いくつかの供給業者(例えば、Genzyme(Framingham, MA)、Amgen(Thousand Oaks, CA)、R&D Systems and Immunex(Seattle, WA))から市販されている。これらの分子の多くの配列はまた、例えば、GenBankデータベースから入手可能である。通に明示的に記載されるわけではないが、野生型サイトカインまたは精製サイトカイン(例えば、組換え生成されたサイトカインまたはその変異体)と類似する生物学的活性を有する分子、およびこれらの分子をコードする核酸が、本発明の趣旨および範囲内で使用されるように意図されることが意図される。免疫調節因子は、本明細書中に記載される組成物の1つ、いくつかまたは全てと共に含まれ得るか、あるいは別個の処方物として使用され得る。

20

30

## 【0049】

「被験体」とは、脊椎動物亜門の任意のメンバーを意味し、脊椎動物亜門としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：チンパンジー、および他のサル、およびサル種のような非ヒト霊長類を含む、ヒトおよび他の霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマのような家畜；イヌおよびネコのような家庭用哺乳類；マウス、ラット、およびモルモットのようなげっ歯類を含む実験動物；家庭用鳥類、野生の鳥類、およびニワトリ、七面鳥、他のキジ鳥、アヒル、ガチョウのような狩猟鳥類を含む鳥類等を含む。この用語は、特定の年齢を示さない。従って、成体の個体および新生の個体の両方が、網羅されることが意図される。これらの脊椎動物の全ての免疫系は、類似して機能するので、前述の系は、前述の脊椎動物種のいずれかにおいて使用することが意図される。

40

## 【0050】

「脊椎動物の被験体」とは、脊椎動物亜門の任意のメンバーを意味する。脊椎動物としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマ、およびヒトのような哺乳類；イヌおよびネコのような家庭用動物；ならびに家庭用鳥

50

類、野生の鳥類、およびニワトリ、七面鳥および他のキジ鳥を含む雄鳥および雌鳥のような狩猟鳥類を含む鳥類。この用語は、特定の年齢を示さない。従って、成体の動物および新生の動物の両方が、網羅されることが意図される。

【0051】

「薬学的に受容可能」または「薬理的に受容可能」とは、生物学的ではない物質か、またはさもなければ望ましくない物質を意味する。すなわち、この物質は、望ましくない生物学的影響を起こすことがないか、または含まれる組成物の成分のいずれかと有害な様式で相互作用することのない処方物または組成物で個体に投与され得る。

【0052】

高分子および/または微粒子の用語「有効な量」、または用語「薬学的に有効な量」とは、本明細書中で提供される場合、非毒性であるが、所望の応答（例えば、免疫学的応答、および対応する治療効果、または治療タンパク質の送達の場合、以下に定義される被験体に対する処置を効果的なものにするのに十分な量）を提供する、高分子および/または微粒子の十分な量をいう。以下に示されるように、必要とされる正確な量は、被験体の種、年齢、および一般条件、処置される状態の重症度、および目的の特定の高分子、投与様式等に依存して、被験体ごとに変えられる。任意の個体の場合における適切な「有効な」量は、慣用的実験を使用して当業者によって決定され得る。

10

【0053】

「薬学的に受容可能」または「薬理的に受容可能」とは、生物学的でないか、またはさもなければ望ましくない材料を意味する。すなわち、この材料は、望ましくない生物学的影響を起こすことがないか、または含まれる組成物の成分のいずれかと有害な様式で相互作用することのない微粒子処方物と共に、個体に投与され得る。

20

【0054】

「生理学的pH」または「生理学的な範囲内のpH」とは、約7.2~8.0の範囲内に含まれるpH、より代表的には約7.2~7.6の範囲内に含まれるpHを意味する。

【0055】

本明細書で使用される場合、「処置」とは、任意の(i)伝統的ワクチンのように、感染予防または再感染予防、(ii)症状の軽減またはその除去、および(iii)問題となる病原体または障害の実質的除去または完全な除去をいう。処置は予防的に(感染前に)、または治療的に(感染後に)もたらされ得る。

30

【0056】

(A. 抗原)

本明細書に記載される非経口初回抗原刺激粘膜追加免疫(parenteral prime-mucosal boost)法は、1つ以上の抗原(または、これらの抗原をコードするポリヌクレオチド)の非経口投与、および粘膜投与を含み得る。本発明の目的のために、実質的に任意のポリペプチド、またはポリヌクレオチドが使用され得る。抗原は、いくつかの公知のウイルス、細菌、寄生生物および真菌類のいずれか、ならびに種々の腫瘍抗原のいずれか、または免疫応答が所望される任意の他の抗原に由来し得る。さらに、本発明の目的のために、「抗原」とは、タンパク質が、免疫学的応答を惹起する能力を維持する限り、ネイティブの配列に対する欠失、付加、および置換(天然において、一般的に保存的である)のような、改変を含むタンパク質をいう。これらの改変は、あたかも部位特異的変異誘発のように意図的であり得るか、またはあたかも抗原を産生する宿主の突然変異のように偶発的であり得る。本発明の実行において、特に有用である抗原は、感染するか、または粘膜表面を通して伝達される病原体由来のポリペプチド抗原を含む。粘膜表面を通して伝達される病原体、およびそれら由来の抗原の限定されない代表的な例としては、以下が挙げられる:細菌病原体に由来する抗原(例えば、Neisseria meningitidis、Streptococcus agalactia、Haemophilus influenzae、Streptococcus pneumoniae、クラミジア、淋病、および梅毒)、ウイルス病原体(例えば、ヒト免疫不全症ウイルス(「HIV」)、B型肝炎ウイルス、およびC型肝炎ウイルス(それぞれ、「H

40

50

BV」および「HCV」)、ヒト乳頭腫(Papilloma)ウイルス(「HPV」)、単純ヘルペスウイルス(「HSV」)等に由来する抗原、ならびに寄生生物抗原、真菌類抗原、および癌抗原。Chlamydia pneumoniaeおよびChlamydia trachomatisの考察については、Kalménら(1999)Nature Genetics 21:385-389; Readら(2000)Nucleic Acids Research 28:1397-1406; Shiraiら(2000)J. Infect. Dis. 181(補遺3):S524-S527; WO 99/27105; WO 00/27994; WO 00/37494; WO 99/28457を参照のこと。

【0057】

10

本発明の状況において利用される場合、「免疫学的部分」とは、適切な条件下で、免疫応答(例えば、細胞媒介性または体液性)を惹起し得る、各々の抗原の一部をいう。「部分」は、変わり得る大きさであり得るが、好ましくは、少なくとも9個のアミノ酸の長さであり、そして抗原全体を含み得る。細胞媒介性免疫応答は、主要組織適合遺伝子複合体(「MHC」)クラスIの提示、MHCクラスIIの提示、または両方の提示によって媒介され得る。当業者には明らかであるが、本明細書中で記載されるこれらの抗原の種々の免疫原性の部分は、本明細書中で記載されるように投与される場合、免疫応答を誘導するために合わされ得る。

【0058】

20

さらに、免疫原性の部分は、少なくとも9個のアミノ酸の長さであり、そして抗原全体を含み得ることが、一般的に好ましいが、これらの免疫原性の部分は、変化し得る長さであり得る。T細胞のエピトープは、潜在的なTヘルパー部位およびCTL部位についてのコードする領域を走査するために、TSITES(MedImmune, Maryland)のようなコンピュータアルゴリズムを利用して予測され得るが、特定の配列の免疫原性は、しばしば予測することが難しい。この分析から、ペプチドが合成され、そしてインビトロでの細胞傷害性アッセイにおける標的として使用される。しかし、他のアッセイもまた、利用され得、例えば、新たに導入されるベクターに対する抗体の存在を検出するELISA、ならびにインターフェロンのアッセイ、IL-2産生のアッセイ、および増殖のアッセイのような、Tヘルパー細胞を試験するアッセイを含む。

【0059】

30

任意の抗原のうちの免疫原性の部分はまた、他の方法によっても選択され得る。例えば、HLA A2.1トランスジェニックマウスは、ウイルス抗原のヒトT細胞認識についてのモデルとして、有用であることが示されている。簡単にいえば、インフルエンザウイルスの系、およびB型肝炎ウイルスの系では、マウスT細胞レセプターのレパートリーが、ヒトT細胞によって認識される同一の抗原決定基を認識する。両方の系では、HLA A2.1トランスジェニックマウスにおいて発生するCTL反応は、HLA A2.1ハプロタイプのヒトCTLによって認識されるエピトープと実質的に同一のエピトープに対して指向される。(Vitielloら(1991)J. Exp. Med. 173:1007-1015; Vitielloら(1992)Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia)。

40

【0060】

さらなる免疫原性の部分は、例えば、種々の領域(例えば、HIVゲノムか、または1つ以上のMenBエピトープ)に由来する1つ以上のエピトープを含む、種々の部位においてコード配列を短縮化することによって得られ得る。上記のように、このようなドメインは、Gag、Gag-ポリメラーゼ、Gag-プロテアーゼ、逆転写酵素(RT)、インテグラーゼ(IN)およびEnvのような、構造的ドメインを含む。この構造的ドメインは、しばしば、以下のポリペプチドにさらに細分化される:例えば、p55、p24、p6(Gag); p160、p10、p15、p31、p65(pol, prot, RTおよびIN)およびgp160, gp120, およびgp41(Env.)。HIV、およ

50

び他の性感染症のさらなる、エピトープは、公知であるか、または当業者に公知の方法を使用して、簡単に決定され得る。また、本発明に含まれるものは、例えば、PCT/US 99/31245、PCT/US 99/31273、およびPCT/US 99/31272に記載されているような、ポリペプチドの分子改変体である。

#### 【0061】

抗原は、単独で使用され得るか、または任意の組み合わせで使用され得る。(例えば、細菌抗原の組み合わせの使用を記載しているWO 02/00249を参照のこと)。この組み合わせは、同一の病原体に由来する複数の抗原、異なる病原体に由来する複数の抗原、または同一および異なる病原体に由来する複数の抗原を含み得る。従って、細菌、ウイルス、腫瘍および/または他の抗原が、同一の組成物に含まれ得るか、または別々に同一の被験体に投与され得る。免疫応答を惹起するのに使用される抗原の組み合わせが、組み合わせて使用されることは、一般的に好ましい。複数の病原体、または抗原に対する免疫化は、非経口送達について(投与回数が減少される)両方とも有利であるが、粘膜ワクチン(例えば、鼻腔内ワクチン)および粘膜送達にとってはあまり重要ではない。なぜならば、患者のコンプライアンスが改善され、そして、薬剤の輸送/貯蔵が促進されるからである。さらに、本明細書中で記載される場合、免疫化は、予防的または治療的のいずれかが使用され得る。

10

#### 【0062】

##### (1. 細菌に由来する抗原)

本明細書中に記載される本発明は、以下を引き起こす生物体に由来するような、多数の細菌抗原を共に使用することもまた見出す：ジフテリア(例えば、Vaccinesの第3章, 1998年、PlotkinおよびMortimer編(ISBN 0-7216-1946-0)を参照のこと)、スタフィロコッカス(例えば、Kurodara(2001) Lancet 357:1225-1240に記載されているStaphylococcus aureus)、コレラ、結核、破傷風としてもまた公知のC. tetani(例えば、Vaccinesの第4章, 1998年、PlotkinおよびMortimer編(ISBN 0-7216-1946-0)を参照のこと)、ストレプトコッカスのA群およびB群(Streptococcus pneumoniae、Streptococcus agalactiae、およびStreptococcus pyogenesを含み、例えば、以下に記載されている：Watsonら(2000) Pediatr. Infect. Dis. J. 19:331-332; Rubinら(2000) Pediatr. Clin. North Am. 47:269-284; Jedrzejaskaら(2001) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:187-207; Schuchat(1999) Lancet 353:51-56; 英国特許出願第0026333.5号; 同第0028727.6号; 同第015640.7号; Daleら(1999) Infect. Dis. Clin. North Am. 13:227-1243; Ferrettiら(2001) PNAS USA 98:4658-4663)、百日咳(例えば、Gustafssonら(1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355; Rappuoliら(1991) TIBTECH 9:232-238を参照のこと)、髄膜炎、Moraxella catarrhalis(例えば、McMichael(2000) Vaccine 19 補遺1:S101-107を参照のこと)および以下のものを含むが、これらに限定されない他の病原性状態：Neisseria meningitides(A, B, C, Y)、Neisseria gonorrhoeae(例えば、WO 99/24578; WO 99/36544; およびWO 99/57280を参照のこと)、ヘリコバクター ピロリ(例えば、CagA、VacA、NAP、HopX、HopYおよび/またはウレアーゼ(例えば、WO 93/18150; WO 99/53310; WO 98/04702に記載されている))およびインフルエンザ(Haemophilus influenza)。B型インフルエンザ(HIB)(例えば、Constantinoら(1999) Vaccine 17:1251-1263を参照のこと)、Porphyromonas gin

20

30

40

50

givalis (Rossら (2001) Vaccine 19:4135-4132)、およびそれらの組み合わせ。

【0063】

Neisseria Meningitides A、Neisseria Meningitides B、およびNeisseria Meningitides Cに由来する抗原の例は、以下の共同所有する特許出願に開示されている。PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; PCT IB99/00103; WO 00/66791; WO 99/24578; WO 00/71574; WO 99/36544; WO 01/04316; WO 99/57280; WO 01/31019; WO 00/22430; WO 00/66741; WO 00/71725; WO 01/37863; WO 01/38350; WO 01/52885; WO 01/64922; WO 01/64920; WO 96/29412; WO 00/50075。

【0064】

MenBのMC58株の完全なゲノム配列は、Tettelinら Science (2000) 287:1809に記載されている。血清の殺菌性抗体応答が惹起したいくつかのタンパク質は、全ゲノム配列決定によって同定されている。例えば、免疫原性組成物としては、以下に由来する外膜小胞(OMV)調製物を挙げられ得る: N. meningitidis血清型のB型(例えば、以下に開示されている: Bjuneら(1991) Lancet 338:1093-1096; Fukasawaら(1999) Vaccine 17:2951-2958; Rosenqvistら(1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333)、またはサッカリド抗原N. meningitidis血清型のA型、C型、W135型および/またはY型(例えば、Constantinoら(1992) Vaccine 10:691-698; Constantinoら(1992) Vaccine 10:1251-1263を参照のこと)。これらの病原体に由来する多くのタンパク質は、保存された配列を有しており、そしてカプセル化されたMenB株上で表面曝露されるようである。Pizzaら Science (2000) 287:1816。これらのタンパク質のうちの1つは、GNA33(ゲノム由来抗原)である。GNA33は、リポタンパク質であり、そしてこの予測されるアミノ酸配列は、E. coliおよびSynecocystis sp. に由来する膜結合溶解性ムレイントランスグリコシラゼ(MltA)との相同性を示す。Lommatzschら J. Bacteriol. (1997) 179:5465-5470。GNA33は、Neisseria meningitidis間で高度に保存される。Pizzaら Science (2000) 287:1816。組み換えGNA33を用いて、免疫されたマウスは、カプセル化されたMenB株2996に対して測定される高い血清殺菌性の力価を生じた。この抗体応答の強さは、株2996から調製されたOMP小胞を用いて免疫された、コントロール動物の抗体応答の強さに類似した。しかし、防御抗体を惹起するGNA33による機構は、同定されなかったが、異なるMenB株に対する防御応答の大きさでもなかった。

【0065】

特定の実施形態においては、カプセルのサッカリドに由来する1つ以上の抗原は、使用される。このような適切なサッカリド抗原の限定されない例としては、S. pneumoniae、H. influenzae、およびN. meningitidisに由来する抗原が挙げられる。キャリアタンパク質に結合体化されたMenCオリゴ糖抗原は、例えば、以下に記載されている: 米国特許第6,252,401号; 国際公開WO 00/71725、および同WO 01/37863。これらの病原体に由来するサッカリド抗原、および他の病原体に由来するサッカリド抗原は公知であり、一般的にポリサッカリド結合体の調製物である。この結合体のサッカリド部分は、オリゴ糖(例えば、MW約1kDa~約5kDa)を形成するために、ポリサッカリド(例えば、全長のポリリボシルリピトールホスフェート(PRPP))、または加水分解されたポリサッカリド(例えば、酸加水分解による)であり得る。加水分解が行われる場合、この加水分解産物は、短すぎて、有

効な免疫原性がないオリゴ糖を除去するために、大きさによって分類され得る。大きさで分別されたオリゴ糖は、好ましいサッカリド抗原である。CRMのようなキャリアに対するサッカリドの結合体は、例えば、Constantinoら(1992) Vaccine 10:691-698に記載されている。

【0066】

1つより多い病原体に由来する抗原、および/または特定の細菌の1つより多い血清型に由来する抗原が免疫原性組成物の調製に使用され得ることは、理解されるべきである。Prevnar<sup>TM</sup>は、例えば、S.pneumoniaeの約23の血清型に由来する7つの抗原(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19Fおよび23F)を含む。

【0067】

10

(2. ウイルスに由来する抗原)

粘膜表面を通して伝達され得るウイルスの限定されない例としては、髄膜炎、ライノウイルス、インフルエンザ、RSウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)等が挙げられる。例えば、本発明は、以下を含むヘルペスウイルスファミリーに由来する、広範な種々のタンパク質に対する免疫応答を刺激するための使用を見出す: HSV-1糖タンパク質およびHSV-2糖タンパク質 gB, gD, gHのような、単純ヘルペスウイルス(HSV)1型、および(HSV)2型に由来するタンパク質; 帯状ヘルペスウイルス(VZV)、EBウイルス(EBV)、CMV gBおよびgHを含むサイトメガロウイルス(CMV)に由来する抗原; ならびにHHV6およびHHV7のような、他のヒトヘルペスウイルスに由来する抗原。(例えば、サイトメガロウイルスのタンパク質コード量の総説については、Cheerら Cytomegaloviruses (J. K. McDougall編 Springer-Verlag 1990) pp. 125-169; 種々のHSV-1をコードするタンパク質の考察については、McGeochら J. Gen. Virol. (1988) 69:1531-1574; HSV-1、およびHSV-2のgBタンパク質およびgDタンパク質、およびこれらをコードする遺伝子の考察については、米国特許第5,171,568号; EBVゲノム配列のタンパク質コード配列の同定については、Baerら Nature (1984) 310:207-211; そしてVZVの総説については、DavisonおよびScott J. Gen. Virol. (1986) 67:1759-1816を参照のこと)。

20

【0068】

30

肝炎ファミリーのウイルスに由来する抗原は、以下のものが挙げられる: A型肝炎ウイルス(HAV)(例えば、Bellら(2000) Pediatr Infect Dis. J. 19:1187-1188; Iwarson(1995) APMIS 103:321-326を参照のこと)、B型肝炎ウイルス(HBV)(例えば、Gerlichら(1990) Vaccine 8 補遺: S63-68および79-80を参照のこと) C型肝炎ウイルス(HCV)、デルタ型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、およびG型肝炎ウイルス(HGV)もまた、本明細書中に記載される技術において、簡便に使用され得る。例として、HCVウイルスのゲノム配列は、公知であり、この配列を得る方法も公知である。例えば、国際出願WO 89/04669; 同WO 90/11089; および同WO 90/14436を参照のこと。このHCVゲノムは、以下を含むいくつかのウイルスのタンパク質をコードする: E1(Eとしてもまた公知)、およびE2(E2/NSIとしても公知)およびN 末端ヌクレオカプシドタンパク質(「コア」と命名された)(E1およびE2を含む、HCVタンパク質の考察については、Houghtonら Hepatology (1991) 14:381-388を参照のこと)。これらのタンパク質の各々、ならびにこれらの抗原フラグメント、および/またはこれらのタンパク質をコードする核酸は、本発明における用途を見出す。

40

【0069】

同様に、HDV由来の抗原の配列は公知であり(例えば、米国特許第5,378,814号を参照のこと)、そしてこの抗原はまた、本発明において都合よく使用され得る。さらに、HBV由来抗原(例えば、コア抗原、表面抗原、sAg)ならびにプレ表面配列、

50

プレ - S 1 およびプレ - S 2 (プレ - S と以前に呼ばれていた)、ならびに上記の組み合わせ (例えば、s A g / プレ - S 1、s A g / プレ - S 2、s A g / プレ - S I / プレ - S 2 およびプレ - S I / プレ - S 2) は、本発明における使用が見出されている。例えば、HBV 構造の議論については、「HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study」Mackett, M. および Williamson, J. D., Human Vaccines and Vaccination, pp. 159 - 176, ; および米国特許第 4, 722, 840 号、同第 5, 098, 704 号、同第 5, 324, 513 号; Beamesら、J. Virol. (1995) 69: 6833 - 6838, Birnbaumら、J. Virol. (1990) 64: 3319 - 3330; ならびに Zhouら、J. Virol. (1991) 65: 5457 - 5464 を参照のこと。 10

#### 【0070】

より詳細には、上記のいずれかの HIV 単離物 (HIV の種々の遺伝的サブタイプのメンバーを含む) 由来の gp120 エンベロープタンパク質は、公知であり、報告されている (種々の HIV 単離物のエンベロープ配列の比較については、例えば、Myersら、Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myersら、Human Retroviruses および、Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; ならびに Modrowら、J. Virol. (1987) 61: 570 - 578 を参照のこと)。そして任意のこれらの単離物に由来する抗原は、本発明の方法において使用が見出される。さらに、本発明は、任意の種々の HIV 単離物 (任意の種々のエンベロープタンパク質 (例えば、gp160 および gp41)、gag 抗原 (例えば、p24 gag および p55 gag) ならびに pol 領域由来タンパク質を含む) に由来する他の免疫原性タンパク質に等しく適応可能である。 20

#### 【0071】

さらに、異なる地理的地域に見出される HIV のオープンリーディングフレーム大きな免疫学的多様性に起因して、抗原の特定の組み合わせは、特定の地理的地域における投与が好ましくあり得る。手短かに言えば、HIV の少なくとも 8 つの異なるサブタイプが同定され、そしてこの 8 つのうちサブタイプ B ウイルスは、北アメリカ、ラテンアメリカおよびカリブ海、ヨーロッパ、日本およびオーストラリアでより流行している。ほとんど全てのサブタイプは、サブサハラアフリカに存在し、サブタイプ A および D は中央アフリカおよび東アフリカを占め、そしてサブタイプ C は、南アフリカを占める。サブタイプ C はまた、インドで流行しており、そして近年、南ブラジルで同定された。サブタイプ E は、タイで初めに同定され、そしてまた中央アフリカ共和国に存在する。サブタイプ F は、ブラジルおよびローマで示された。多くの近年の示されたサブタイプは、G でありロシアおよびガボンで見出され、そしてサブタイプ H は、ザールおよびカメルーンで見出される。グループ O ウイルスは、カメルーンまたガボンで同定されている。従って、当業者に明らかのように、一般的に、投与の地理的地域において流行性である特定の HIV サブタイプに適切である投与のためのベクターを構築することが好ましい。特定の地域のサブタイプは、二次元の二重免疫拡散によってか、またはその地域内の個体から単離された HIV ゲノム (またはそのフラグメント) をスクリーニングすることによって決定され得る。 30 40

#### 【0072】

上記のように、多様な Gag 抗原および Env 抗原はまた、HIV によって提示される。HIV - 1 Gag タンパク質は、ウイルスのライフサイクル (アセンブリ、粒子放出後のウイルス粒子成熟およびウイルス複製の初期侵入後段階を含む) の多くの段階に参与する。HIV - 1 Gag タンパク質の規定は、多数であり、そして複雑である (Freeed, E. O. (1998) Virology 251: 1 - 15)。

#### 【0073】

本発明の配列をコードする Env としては、限定されないが以下が挙げられる: 以下の H 50

IVコードポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列：gp160、gp140およびgp120（例えば、HIV-1<sub>SF2</sub>（「SF2」）Envポリペプチドの記述については、米国特許第5,792,459号を参照のこと）。HIV-1のエンベロープタンパク質は、約160kD（gp160）の糖タンパク質である。宿主細胞へのウイルス感染の間、gp160は、宿主細胞のプロテアーゼによって切断されて、gp120および内在性膜タンパク質（gp41）を形成する。gp41部分は、ウイルス粒子の膜二重層に結合（架橋）するが、gp120セグメントは、周囲の環境へと突出する。gp120とgp41との間に共有結合が存在しないので、遊離のgp120は、ウイルス粒子の表面から放出され、細胞に感染する。従って、gp160は、gp120およびgp41のコード配列を含む。ポリペプチドgp41は、オリゴマー化ドメイン（OD）および膜貫通架橋ドメイン（TM）を含む様々なドメインからなる。ネイティブなエンベロープにおいて、オリゴマー化ドメインは、3つのgp41ポリペプチドの非共有結合性の会合に必要とされ、三量体構造を形成する：gp41三量体（およびそれ自体）との非共有結合性相互作用を介して、gp120ポリペプチドはまた、三量体構造に組織化される。切断部位（単数または複数）は、gp120のポリペプチド配列とgp41に対応するポリペプチド配列との間におそらく存在する。この切断部位（単数または複数）は、その部位での切断を防止するように変異され得る。gp41の膜貫通スパニングドメインが欠落する場合、この得られたgp140ポリペプチドは、gp160の短縮型形態に対応する。このgp140ポリペプチドは、gp41部分におけるオリゴマー化ドメインの存在によって、モノマー形態およびオリゴマー形態（すなわち三量体）の両方に存在し得、そしてオリゴマー形態は、「o」で示され得、例えば、「ogp140」はオリゴマーgp140をいう。切断部位が切断を防止するように変異され、そしてgp140の膜貫通部分が欠損する状況において、ポリペプチド産物は、「変異された」gp140を示し得る。これらの分野で明らかかなように、切断部位は様々な方法で変異され得る（WO00/39302をまた参照のこと）。

#### 【0074】

インフルエンザウイルスは、本発明が特に有用であるウイルスの別の例である。特に、インフルエンザAのエンベロープ糖タンパク質HAおよびエンベロープ糖タンパク質NAは、免疫応答を生成するために特に意図されるタンパク質である。インフルエンザAの多数のHAサブタイプが同定されている（（Kawaokaら、*Virology*（1990）179：759-767；Websterら、「Antigenic variation among type A influenza viruses」, p. 127-168.；P. PaleseおよびD. W. Kingsbury（編）, *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, New York）。従って、任意のこれらの単離物由来タンパク質はまた、本明細書中に記載される組成物および方法で使用され得る。

#### 【0075】

他のウイルス由来抗原はまた、限定しないが、本発明における用途（例えば、とりわけ、以下のメンバー由来のタンパク質における用途）が見出される：Picomaviridae科（例えば、ポリオウイルスなど（例えば、Sutterら（2000）*Pediatric Clin North Am* 47：287-308；Zimmerman & Spann（1999）*Am Fam Physician* 59：113-118；125-126）に記載されるような）；カルシウイルス科；トガウイルス科（例えば、風疹ウイルス、デング熱ウイルスなど）；フラビウイルス科（フラビウイルス属（例えば、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスの血清型、ダニ媒介性脳炎ウイルス、西ナイルウイルス）を含む）；ペスチウイルス属（例えば、古典的ブタ熱ウイルス、ウシウイルス性下痢性ウイルス、ポーター病ウイルス）；およびヘパシウイルス（例えば、米国特許第4,702,909号；同第5,011,915号；同第5,698,390号；同第6,027,729号；および同第6,297,048号に記載されるようなA型肝炎、B型肝炎およびC型肝炎）；パルボウイルス科（例えば、パルボウイルスB

19) ; コロナウイルス科 ; レオウイルス科 ; ビマウイルス科 ( *Bimaviridae* ) ; ラボドウイルス科 ( *Rhabdoviridae* ) ( 例えば、 *Dressenら* ( 1997 ) *Vaccine* 15 *Suppl* : s2 - 6 ; *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* . 1998 Jan 16 : 47 ( 1 ) : 12 , 19 に記載される狂犬病ウイルスなど) ; フィロウイルス科 ; パラミクソウイルス科 ( *Vaccines* ( 1998 , *Plotkin & Mortimer* 編 ( ISBN 0 - 7216 - 1946 - 0 ) ) の 9 章 ~ 11 章に記載されるような例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹、RSウイルスなど ; オルトミクソウイルス科 ( 例えば、インフルエンザウイルス A、B および C ( 例えば、 *Vaccines* ( 1998 , *Plotkin & Mortimer* 編 ( ISBN 0 - 7216 - 1946 - 0 ) ) の 19 章に記載されるような) ; プンヤウイルス科 ; アレナウイルス科 ; レトロウイルス科 ( 例えば、HTLV - 1 ; HTLV - 11 ; HIV - 1 ( HTLV - III、LAV、ARV、HTI、R などとしてもまた公知) )、( 限定されないが、単離物 HIV I I I b、HIV SF 2、HIV LAV、HIV I - AL、I - I I V M N 由来の抗原を含む) ; HIV - I C M 235、HIV - I I J S 4 ; HIV - 2 ; サル免疫欠損ウイルス ( *SIV* ) の膜由来タンパク質。さらに、抗原はまた、ヒトパピローマウイルス ( *HPV* ) およびダニ媒介性脳炎ウイルスに由来し得る。例えば、これらおよび他のウイルスの詳細については、*Virology* , 第 3 版 ( *W.K. Joklik* 編、1988 ) ; *Fundamental Virology* , 第 2 版 ( *B.N. Fields* および *D.M. Knipe* , 編、1991 ) を参照のこと。

#### 【0076】

特定の実施形態において、1つ以上の抗原は、HIVに由来する。HIVの遺伝子は、プロウイルスDNAの中央領域に位置し、そして3つの主要なクラス : ( 1 ) 主要構造タンパク質、Gag、Pol および Env ; ( 2 ) 調節タンパク質、Tat および Rev、ならびに ( 3 ) アクセサリータンパク質、Vpu、Vpr、Vif および Nef に分類される少なくとも9つのタンパク質をコードする。HIV<sub>SF2</sub> から得られる抗原に関して本明細書中で例証されるが、他のHIV改変体から得られる配列は、本明細書の教示に従って同様の様式で操作され得る。このような他の改変体としては、限定されないが以下が挙げられる : HIV I I I b、HIV SF 2、HIV - 1<sub>SF162</sub>、HIV - 1<sub>SF170</sub>、HIV LAV、HIV LAI、HIV<sub>MN</sub>、HIV - 1<sub>CM235</sub>、HIV - 1<sub>US4</sub>、多様なサブタイプ由来の他のHIV - 1 株 ( 例えば、サブタイプ A ~ G、および O )、多様なサブタイプ由来の他のHIV - 2 ( 例えば、HIV - 2<sub>UC1</sub> および HIV - 2<sub>UC2</sub> ) およびサル免疫欠損ウイルス ( *SIV* ) の単離物から得られた配列をコードするGagタンパク質。( 例えば、これらおよび他の関連ウイルスの詳細については、*Virology* , 第 3 版 ( *W.K. Joklik* 編、1988 ) ; *Fundamental Virology* , 第 2 版 ( *B.N. Fields* および *D.M. Knipe* 編、1991 ) ; *Virology* , 第 3 版 ( *Fields, BN, DM Knipe, PM Howley* , 編者、1996 , *Lippincott Raven, Philadelphia, PA* ; を参照のこと)。

#### 【0077】

寄生抗原の例としては、マラリアおよびライム病を生じる生物に由来する抗原が挙げられる。

#### 【0078】

##### ( 3 . 腫瘍抗原 )

腫瘍抗原に対する変種は、同定されている。例えば、*Moingeon*、前出および *Rosenberg*、前出を参照のこと。腫瘍抗原の非限定的な例としては、以下が挙げられる : CD<sup>8+</sup> リンパ球によって認識される抗原 ( 例えば、黒色腫 - メラノサイト分化抗原 ( たとえば、MART - 1、gp100、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 - 1、チロシナーゼ関連タンパク質 - 2、メラノサイト刺激ホルモンレセプター) ; 変異抗原 ( 例えば、 - カテニン、MUM - 1、CDK - 4、カスパーゼ - 8、KIA 020

5、HLA-A2-R1701)；精巢癌抗原(例えば、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-12、BAGE、GAGEおよびNY-ESO-1；および癌において過剰発現した変異していない共通抗原(例えば、フェトプロテイン、テロメラゼ触媒タンパク質、G-250、MUC-1、癌胎児性抗原、p53、Her-2-neu))、ならびにCD<sup>4+</sup>リンパ球に認識される抗原(例えば、gp100、MAGE-1、MAGE-3、チロシナーゼ、NY-ESO-1、トリオースホスフェートイソメラゼ、CDC-27およびLDLR-FUT)。例えば、WO91/02062、米国特許第6,015,567号、WO01/08636、WO96/30514、米国特許第5,846,538号、米国特許第5,869,445号もまた参照のこと。

#### 【0079】

特定の実施形態において、腫瘍抗原は、変異された細胞内成分または改変された細胞内成分から誘導される。改変後、細胞内成分は、これらの調節機能をもはや発揮せず、それ故、細胞は、制御されない増殖を経験する。改変される細胞内成分の代表的な例としては、以下が挙げられる：ras、p53、Rb、ウイリアムズ腫瘍遺伝子によってコードされた改変されたタンパク質、ユビキチン、ムチン、DCC、APCおよびMCCによってコードされたタンパク質、ならびにレセプターまたはレセプター様構造(例えば、neu、甲状腺ホルモンレセプター、血小板誘導増殖因子(PDGF)レセプター、インシュリンレセプター、表皮増殖因子(EGF)レセプター、およびコロニー刺激因子(CSF)レセプター。これらならびに他の細胞内成分は、例えば、米国特許第5,693,522号およびその本文中に引用される参考文献において記載される。

#### 【0080】

##### (4. ポリペプチドの調製)

免疫原性組成物中の抗原は、代表的にタンパク質の形態である。タンパク質に基づく予防接種の代替として、免疫原性組成物中の抗原は、核酸分子またはポリヌクレオチドの形態である。

#### 【0081】

従って、ポリペプチド抗原は、固相タンパク質合成によって構築され得る。所望の場合、ポリペプチドはまた、アミノ酸リンカーまたはシグナル配列ならびにタンパク質の精製に有用なリガンド(例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびブドウ球菌プロテインA)のような他のアミノ酸配列を含み得る。あるいは、目的の抗原は、商業的な供給源から購入され得る。

#### 【0082】

ポリペプチドはまた、所望のポリペプチドをコードする核酸から作製され得る。目的のポリペプチドをコードする配列は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって生成され得る。Mullisら(1987)Methods Enzymol. 155:335-350; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innisら(編)Harcourt Brace Jovanovich Publishers, NY(1994)。この技術は、DNAの所望の領域を複製するために、DNAポリメラーゼ(通常、熱安定性のDNAポリメラーゼ)を使用する。複製されるべきDNA領域は、複製反応を開始するための所望のDNAの反対の末端および反対の鎖に相補的な特定の配列のオリゴヌクレオチドによって同定される。繰り返される連続的な複製のサイクルは、使用されるプライマー対によって定められたDNAフラグメントの増幅を生じる。多数のパラメータが、反応の成功に影響する。これらのパラメータの中には、アニーリング温度およびアニーリング時間、伸長時間、Mg<sup>2+</sup>およびATP濃度、pH、ならびにプライマー、テンプレートおよびデオキシリボヌクレオチドとの相対濃度がある。

#### 【0083】

一旦、所望のタンパク質についてのコード配列が、調製されるかまたは単離されると、そのような配列は、任意の適切なベクターまたはレプリコンの中にクローン化され得る。多数のクローニングベクターが、当業者に既知であり、そして適切なクローニングベクター

10

20

30

40

50

の選択は、設計事項である。他の配列への連結は、当該分野で公知の標準的な手順を用いて行なわれる。

【0084】

同様に、選択されたコード配列は、発現のための任意の適切な発現ベクターの中にクローン化され得る。この発現産物は、必要に応じて、粘膜投与前に精製され得る。手短に言えば、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、適切な発現系において発現され得る発現ベクターの中に導入され得る。種々の細菌、酵母、哺乳動物、昆虫および植物の発現系が、当該分野で利用可能であり、そして任意のそのような発現系が、使用され得る。必要に応じて、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、無細胞翻訳系において翻訳され得る。このような方法は、当該分野で周知である。

10

【0085】

(B. 送達)

本明細書中に記載される組成物(例えば、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド)は、任意の適切な手段(例えば、非経口的初回抗原刺激のために静脈内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、経皮的に、および粘膜の追加免疫のために経口的に、直腸に、眼内に、または鼻腔内に)または種々の物理的な方法(例えば、リポフェクション(Felgnerら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、直接的なDNA注入(Acsadiら(1991)Nature 352:815-818); 微粒子銃(Williamsら(1991)PNAS 88:2726-2730); いくつかの型のリポソーム(例えば、Wangら(1987)PNAS 84:7851-7855を参照のこと);  $CaPO_4$  (Dubenskyら(1984)PNAS 81:7529-7533); DNAリガンド(Wuら(1989)J. of Biol. Chem. 264:16985-16987); ポリペプチド単独での投与; 核酸単独での投与(WO90/11092); または死滅したアデノウイルスに連結したDNAの投与(Curieら(1992)、Hum. Gene Ther. 3:147-154); ポリリジンのようなポリカチオン化合物を介して、レセプター特異的リガンドを利用して; ならびにセンダイウイルスまたはアデノウイルスのようなソラレン不活性化ウイルスを用いて)を使用して送達され得る。経皮投与は、浸透性エンハンサー、バリア崩壊剤またはその組み合わせを含み得る。例えば、WO99/43350を参照のこと。さらに、投与は、直接的に(すなわち、インピボで)投与されてもよく、または取り出された細胞に投与され(エキソピボで)、そして続いて戻されてもよい。

20

30

【0086】

好ましい実施形態において、本発明は、少なくとも1つの第1の免疫原性組成物の非経口投与、そしてその後の少なくとも1つの第2の免疫原性組成物の粘膜投与によって、哺乳動物の免疫応答を増加する方法を提供する。言い換えれば、本発明は、非経口初回抗原刺激、それに続く粘膜の追加免疫を提供する。

【0087】

ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの非経口投与の方法は、周知であり、例えば、以下が挙げられる:(1)血流への直接的な注入(例えば、静脈内投与); (2)特定の組織または腫瘍への直接的な注入; (3)皮下投与; (4)経皮的上皮投与; (5)皮内投与(6)腹腔内投与; および/または(7)筋内投与。非経口投与の他の方法は、肺投与、坐薬、針のない(needle-less)注射、経皮的適用および経皮性適用が挙げられる。投薬処置は、単一用量スケジュールまたは複数用量スケジュールであり得る。上記のように、核酸の投与はまた、ペプチドまたは他の物質の投与と組み合わせられ得る。

40

【0088】

同様に、粘膜送達方法は、例えば、Remington(前出)に記載されるように当該分野で公知であり、そして経鼻送達、直腸送達、経口送達および膺送達を含む。直腸および膺を介する組成物の送達は、性的に伝達された病原体の場合、特に好ましく、このような投与方法は、病原体に最初に曝露された細胞へのアクセスを提供する。同様に、鼻腔内

50

投与は、ライノウイルスのように、鼻粘膜を介して感染する疾患において好ましくあり得る。いくつかの例において、鼻腔内投与は、腔粘膜の免疫を誘導し得、そして経口免疫化は、直腸粘膜の免疫を誘導し得る。さらに、種々の粘膜投与経路および/または全身投与経路の組み合わせが、(病原体が侵入する部位と粘膜病原体が広がる全身部位の両方での)適切な免疫および保護を誘導するために使用され得る。さらに、粘膜投与は、注射器または他の投与デバイスを必要としない。投薬処置は、単一回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールであり得る。

#### 【0089】

本明細書中に開示される組成物は、単一で投与され得るかまたは1つ以上のさらなる高分子(例えば、遺伝子送達ビヒクル、免疫調節因子、アジュバント、および/または1つ以上のタンパク質)と共に投与され得る。このような実施形態において、複数の組成物が、例えば、遺伝子送達ビヒクルに続いてタンパク質;複数の遺伝子送達ビヒクルに続いて複数のタンパク質投与;タンパク質投与に続いて単一または複数の遺伝子送達ビヒクル投与;併用投与などの任意の順序で投与され得る。従って、タンパク質および核酸の混合物が、同じであるかまたは異なるビヒクル、および同じであるかまたは異なる投与方法を使用して投与され得る。

10

#### 【0090】

初回抗原刺激と追加免疫との間隔は、患者の年齢および組成物の性質のような因子に従って変化し、そしてこれらの因子は、医師によって評価され得る。最初の初回抗原刺激用量と追加免疫用量の投与は、一般的には少なくとも2週間、典型的には少なくとも4週間あけられる。本発明の方法は、1回より多い非経口的な初回抗原刺激用量および/または1回より多い追加免疫用量(例えば、2回以上の初回抗原刺激用量に続く2回以上の粘膜追加免疫用量)を含み得る(例えば、最初の初回抗原刺激-追加免疫の18ヶ月後の「記憶(memory)」追加免疫を記載する、以下の実施例4を参照のこと)。用語「記憶」追加免疫は、最初の追加免疫後に与えられる任意の追加免疫用量をいう。「記憶」追加免疫が投与される時間は、最初の追加免疫後、数時間(例えば、1時間~72時間またはその間の任意の時点)または数日(例えば、1日~90日またはその間の任意の時点)から数ヶ月(例えば、1ヶ月~36ヶ月またはその間の任意の時点)あるいは数年にわたってさえ変化し得る。1回より多い記憶追加免疫は、互いに関連して、同じかまたは変化する時間間隔で投与され得る。同一であるかまたは異なる免疫原性組成物が、互いの初回抗原刺激用量のために使用され得る。従って、初回抗原刺激および追加免疫用量は、そのタイミングよりもむしろ投与の経路によって区別され得る。

20

30

#### 【0091】

組成物が投与される哺乳類は、典型的にはヒトのような霊長類である。ヒトは、子供であっても成人であってもよい。適切な下等哺乳類としては、マウスが挙げられ得る。

#### 【0092】

特定の実施形態において、直接送達は、一般的には、上記のようにAccell(登録商標)遺伝子送達システム(Powderject Technologies, Inc., Oxford, England)のような従来注射器または遺伝子銃のいずれかを用いる注入によってウイルスベクターを伴ってかまたは伴わずに、達成され得る。

40

#### 【0093】

##### (1. 微粒子)

特定の実施形態において、1つ以上の選択された抗原が、引き続き送達のために微粒子中に包括されるかまたは微粒子に吸収される。本発明に有用な微粒子を製造するための生分解性ポリマーは、例えば、Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, ALから簡単に入手可能である。例えば、本明細書中の微粒子を形成するのに有用なポリマーとしては、ポリヒドロキシ酪酸から誘導されたポリマー;ポリカプロラクトン;ポリオルソエステル;ポリ無水物;ならびにポリ(L-ラクチド)、ポリ(D, L-ラクチド)(これら両方は、本明細書中で「PLA」として公知である)、ポリ(ヒドロキシ酪

50

酸塩)のようなポリ( -ヒドロキシ酸)、ポリ(D, L-ラクチド-co-グリコリド) (本明細書中で「PLG」または「PLGA」と表される)のようなD, L-ラクチドとグリコリドのコポリマーまたはD, L-ラクチドとカプロラク톤のコポリマーが挙げられる。本明細書中で使用するのに特に好ましいポリマーは、PLAポリマーおよびPLGポリマーである。これらのポリマーは、様々な分子量で入手可能であり、そして所定の抗原についての適切な分子量は、当業者によって容易に決定される。従って、例えば、PLAについて、適切な分子量は、約2000~250,000のオーダーである。PLGについて、適切な分子量は、一般的には約10,000~約200,000、好ましくは、約15,000~約150,000、そして最も好ましくは約50,000~約100,000の範囲である。

10

## 【0094】

PLGのようなコポリマーが微粒子を形成するのに使用される場合、種々のラクチド：グリコリド比が、本明細書中で使用を見出され、そしてその比は、同時に投与される抗原の一部および所望の分解速度依存して、大部分が選択される。例えば、50%のD, L-ラクチドと50%のグリコリドを含有する50：50PLGポリマーは、早い再吸収コポリマーを提供するが、75：25PLGは、より遅く分解し、そして85：15および90：10は、増加したラクチド成分に起因してさらにより遅い。ラクチド：グリコリドの適切な比が、抗原の性質および問題の障害に基づいて当業者によって容易に決定されることは、容易に明らかである。さらに、ラクチド：グリコリド比を変化させた微粒子の混合物は、所定の抗原についての所望の放出動力学を達成するためおよび1次免疫応答と2次免疫応答の両方を提供するために処方物中での使用を見出される。本発明の微粒子の分解速度はまた、ポリマー分子量およびポリマー結晶化度のような因子によって制御され得る。ラクチド：グリコリド比および分子量を変化させたPLGコポリマーは、Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, ALを含む多くの販売元から容易に入手可能である。これらのポリマーはまた、Tabataら、J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22：837-858に記載されるような当該分野において周知の技術を使用して乳酸成分の単純な重縮合によって合成され得る。

20

## 【0095】

抗原/微粒子は、当該分野で周知の任意のいくつかの方法を使用して調製される。例えば、米国特許第3,523,907号およびOgawaら、Chem. Pharm. Bull. (1988) 36：1095-1103に記載されるような2重エマルジョン/溶媒蒸発技術が、微粒子を形成するために本明細書中で使用され得る。これらの技術は、抗原(抗原が、微粒子中に包括されるべき場合)を含むポリマー溶液の液滴から成る1次エマルジョンの形成を含み、このエマルジョンは続いて、粒子安定剤/界面活性剤を含む連続的な水相と混合される。

30

## 【0096】

より詳細には、水中油中水(w/o/w)溶媒蒸発システムは、O'Haganら、Vaccine (1993) 11：965-969; Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10：362およびPCT/US99/17308 (WO00/06133)によって記載されるように、微粒子を形成するのに使用され得る。この技術において、特定のポリマーは、酢酸エチル、ジメチルクロライド(塩化メチレンおよびジクロロメタンとも呼ばれる)、アセトニトリル、アセトン、クロロホルムなどのような有機溶媒と合わせられる。このポリマーは、有機溶媒中、約2~15%、より好ましくは、約4~10%および最も好ましくは6%の溶液で提供される。ほとんど等量の抗原溶液(例えば、水溶液)が加えられ、そしてポリマー/抗原溶液は、例えば、ホモジナイザーを使用して乳化される。次いで、このエマルジョンは、ポリビニルアルコール(PVA)またはポリビニルピロリドンのような乳化安定剤の大量の水溶液と合わせられる。この乳化安定剤は、典型的には、約2~15%溶液、より典型的には、約4~10%溶液で提供される。次いで、この混合物は、安定なw/o/w 2重エマルジョン(double emulsi

40

50

on) を作製するためにホモジナイズされる。次いで、有機溶媒が、蒸発される。

【0097】

この処方パラメータは、小さい ( $< 5 \mu\text{m}$ ) 微粒子および大きい ( $> 30 \mu\text{m}$ ) 微粒子の調製を可能にするために操作され得る。例えば、Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10: 362 - 368; McGeeら、J. Microencap. (1996) を参照のこと。例えば、攪拌を減らすと、内相体積が増加するために大きい微粒子を生じる。小さい微粒子は、高濃度のPVAを含む低い水相体積によって生成される。

【0098】

微粒子はまた、例えば、Thomasinら、J. Controlled Release (1996) 41: 131; 米国特許第2,800,457号; Masters, K. (1976) Spray Drying 第2版. Wiley, New Yorkに記載されるような噴霧乾燥およびコアセルベーション; Hallら、(1980) The「Wurster Process」in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, (編)), Vol. 2, 133 - 154頁 CRC Press, Boca Raton, Florida and Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) 5(2): 99 - 139に記載されるようなパン・コーティングおよびWursterコーティングなどのエア・サスペンションコーティング技術; および例えば、Limら、Science (1980) 210: 908 - 910によって記載されるようなイオン性のゲル化を使用して形成され得る。

【0099】

上記の技術はまた、吸収された抗原を含む微粒子の生成に適用可能である。この実施形態において、微粒子は、上記のように形成されるが、抗原は、以下の構成で微粒子と混合される。

【0100】

粒径は、例えば、レーザー光散乱 (例えば、ヘリウム - ネオンレーザーを組み込む分光計を使用して) によって決定され得る。一般的には、粒径は、室温で決定され、そして粒子直径の平均値を得るために問題のサンプルの複数回の分析 (例えば、5 ~ 10回) を含む。粒径はまた、走査型電子顕微鏡 (SEM) を使用して容易に決定される。

【0101】

微粒子の使用の前に、抗原含有量が、一般的に決定され、その結果適切な量の微粒子が適切な免疫応答を刺激するために被験体に送達され得る。

【0102】

微粒子の抗原含有量は、微粒子の分裂および包括された抗原の抽出によるような当該分野で公知の方法に従って決定され得る。例えば、微粒子は、例えば、Cohenら、Pharm. Res. (1991) 8: 713; Eldridgeら、Infect. Immun. (1991) 59: 2978; およびEldridgeら、J. Controlled Release (1990) 11: 205に記載されるように、ジメチルクロライドおよび蒸留水に抽出されたタンパク質に溶解され得る。あるいは、微粒子は、5% (w/v) のSDSを含有する0.1M NaOH中に分散され得る。このサンプルは、攪拌され、遠心分離され、そしてその上清は、適切なアッセイを使用して目的の抗原についてアッセイされる。例えば、O'Haganら、Int. J. Pharm. (1994) 103: 37 - 45を参照のこと。

【0103】

調製した微粒子上に高分子を吸収する1つの方法は、以下のとおりである。微粒子を、再水和し、そして再透析可能な陰イオン性界面活性剤または陽イオン性界面活性剤を使用して、基本的に微粒子の単量体懸濁液に分散する。有用な界面活性剤としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ヘプタノイル - N - メチルグルカミド (MEGA - 7)、オクタノイル - N - メチルグルカミド (MEGA - 8)、ノナノイル - N - メチルグル

カミド (MEGA-9)、およびデカノイル-N-メチル-グルカミド (MEGA-10) のような任意の種々のN-メチルグルカミド (MEGAとして公知である); コール酸; 塩化ナトリウム; デオキシコール酸; デオキシコール酸ナトリウム; タウロコール酸; タウロコール酸ナトリウム; タウロデオキシコール酸; タウロデオキシコール酸ナトリウム; 3-[ (3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパン - スルホネート (CHAPS); 3-[ (3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパン - スルホネート (CHAPSO); N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパン-スルホネート (ZWITTERGENT 3-12); N,N-ビス-(3-D-グルコネアミドプロピル (gluconeamidopropyl)) - デオキシコラミド (DEOXY-BIGCHAP); N-オクチルグルコシド; スクロースモノラウレート; グリココール酸/グリココール酸ナトリウム; ラウロサルコシン (ナトリウム塩); グリコデオキシコール酸/グリコデオキシコール酸ナトリウム; ドデシル硫酸ナトリウム (SDS); およびヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB); ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド; ヘキサデシルトリメチル-アンモニウムブロミド; テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド; ベンジルジメチルドデシルアンモニウムブロミド; ベンジルジメチル-ヘキサデシルアンモニウムクロライド; ベンジルジメチルテトラ-デシルアンモニウムブロミド。上記の界面活性剤は、例えば、Sigma Chemical Co., St. Louis, MOから市販されている。当該分野で公知の種々の陽イオン性脂質もまた、界面活性剤として使用され得る。Balasubramanianら, 1996, Gene Ther., 3: 163-72 および Gao, X., および L. Huang. 1995, Gene Ther., 2: 7110-722 を参照のこと。

10

20

30

40

50

#### 【0104】

次いで、微粒子/界面活性剤混合物を、例えば、セラミック乳鉢および乳棒を使用して、滑らかなスラリーが形成されるまで物理的に挽く。次いで、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または Tris 緩衝生理食塩水のような適切な水性緩衝液を加え、得られた混合物を、微粒子が十分に懸濁されるまで超音波処理またはホモジナイズする。次いで、目的の高分子を微粒子懸濁液に加え、その系を透析して界面活性剤を除去する。このポリマー微粒子と界面活性剤の系は、好ましくは、目的の高分子が、高分子の活性を維持したまま微粒子の表面に吸収されるように選択される。表面に吸収された高分子を含む得られた微粒子を、未結合の高分子がないように洗浄し得、そして適切な緩衝液処方物中で懸濁液として保存し得るかまたは以下にさらに記載するように適切な賦形剤で凍結乾燥し得る。

#### 【0105】

##### (2. さらなる粒子キャリア)

微粒子に加えて、組成物もまた、粒子キャリアに包括され得るか、吸収され得るか、また結合され得る。このようなキャリアは、免疫に対して選択された抗原の複数コピーを示し、局所的なリンパ節における抗原の移動、トラップおよび保持を促進する。この粒子は、マクロファージおよび樹状細胞のような特殊な (profession) 抗原提示細胞によって取りこまれ得、そして/またはサイトカイン放出の刺激のような他の機構を介して抗原提示を増強し得る。

#### 【0106】

特定の実施形態において、組成物は、ポリメチルメタクリレートポリマーから誘導される粒子キャリアを使用して送達される。例えば、Jefferysら, Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JPら, J Microencapsul. 14(2): 197-210, 1997; O'Hagan DTら, Vaccine 11(2): 149-54, 1993 を参照のこと。

#### 【0107】

さらに、他の粒子系およびポリマーが目的の遺伝子のインビボまたはエキソビボ送達のために使用され得る。例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジンのようなポリマー、ならびにこれらの分子の結合体が、目的の核酸を送達

するのに有用である。同様に、D E A E デキストラン - 媒介トランスフェクション、リン酸ストロンチウム、ベントナイトおよびカオリンを含有するケイ酸アルミニウム、酸化クロム、ケイ酸マグネシウム、タルクなどのような他の不溶性無機塩を使用するリン酸カルシウム沈殿が、本発明の方法と共に使用される。例えば、遺伝子送達に有用な送達系の総説については、Felgner, P. L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5: 163 - 187を参照のこと。ペプトイド (Zuckerman, R. N., ら, 米国特許第5, 831, 005号, 1998年11月3日発行) もまた、本発明の構成物の送達のために使用され得る。

#### 【0108】

さらに、金およびタングステンのような粒子キャリアを使用するビオチン送達システムは、本発明の合成発現カセットの送達に特に有用である。この粒子は、送達されるべき合成発現カセットでコーティングされ、そして「遺伝子銃」から発射される黒色火薬 (gun powder) を使用して、一般的に低気圧下で高速度に加速される。このような技術の記載およびそのために有用な装置については、米国特許第4, 945, 050号; 同第5, 036, 006号; 同第5, 100, 792号; 同第5, 179, 022号; 同第5, 371, 015号; および同第5, 478, 744号を参照のこと。また、ニードルレス (needle-less) 注射システムもまた、使用され得る (Davis, H. L., ら, *Vaccine* 12: 1503 - 1509, 1994; *Bioject, Inc., Portland, OR*)。

#### 【0109】

##### (3. リポソーム / 脂質送達ビヒクル)

目的の抗原 (またはこれらの抗原をコードするポリヌクレオチド) はまた、リポソームを使用して送達され得る。例えば、目的の抗原は、被験体または被験体由来の細胞への送達の前にリポソーム中にDNAまたはRNAとしてパッケージングされる。脂質封入は、一般的には、核酸を安定に結合または包括し得、そして保持し得るリポソームを使用して達成される。凝集されたDNA対脂質調製物の比は、変化し得るが、一般的には約1:1 (mg DNA: マイクロモル脂質) であるか、または脂質がさらに多いかである。核酸の送達のためのキャリアとしてのリポソームの使用の総説については、HugおよびSleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097: 1-17; Straubinger ら, *in Methods of Enzymology* (1983), Vol. 101, 512 - 527頁を参照のこと。

#### 【0110】

陽イオン性リポソームを含む、陽イオン性 (正に荷電している) 調製物、陰イオン性 (負に荷電している) 調製物および中性調製物を含む本発明に使用するためのリポソーム調製物が、特に好ましい。陽イオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドDNA (Felgner ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 7413 - 7416); mRNA (Malone ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 6077 - 6081); および精製された転写因子 (Debs ら, *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 10189 - 10192) の細胞内送達を媒介することが示されている。

#### 【0111】

カチオン性リポソームは、容易に入手可能である。例えば、N [1 - 2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリエチルアンモニウム (DOTMA) リポソームは、GIBCO BRL, Grand Island, NYからのLipofectin (登録商標) に基づいて入手可能である (Felgner ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 7413 ~ 7416もまた参照のこと)。他の市販の脂質としては、(DDAB / DOPE) およびDOTAP / DOPE (Boerhinger) が挙げられる。他のカチオン性リポソームは、当該分野で周知の技術を使用して、容易に入手可能な材料から調製され得る。例えば、Szoka ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75: 4194 ~ 4198; DOTAP (1

10

20

30

40

50

、2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記載について、PCT出願番号WO90/11092を参照のこと。カチオン性微粒子は、当該分野で周知の技術を使用して、容易に入手可能な材料から調製され得る。例えば、共有に係るWO01/136599を参照のこと。

【0112】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL)から容易に入手可能であるか、または、容易に入手可能な材料を使用して、容易に調製され得る。このような物質としては、特に、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジル(di oleoyl phosphatidyl)エタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの材料はまた、適切な比率で、DOTMA出発物質およびDOTAP出発物質と混合され得る。これらの材料を使用してリポソームを作製するための方法は、当該分野で周知である。

【0113】

リポソームは、多重層小胞(MLV)、小単層小胞(SUV)または巨大単層小胞(LUV)を含み得る。様々なリポソーム核酸複合体は、当該分野で公知の方法を使用して調製される。例えば、Straubingerら、METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), Vol. 101 pp. 512-527; Szokaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilsonら、Cell (1979) 17:77; Deamer and Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348; Enoch and Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145; Fraleyら、J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; および Schaefer-Ridderら、Science (1982) 215:166を参照のこと。

【0114】

DNAおよび/またはタンパク質抗原はまた、Papahadjopoulosら、Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394:483~491により記載されるものと類似した渦巻形のcochleateの脂質組成物中に送達され得る。米国特許第4,663,161号および同第4,871,488号をまた参照のこと。

【0115】

(4. 遺伝子送達ビヒクル)

特定の実施形態において、本明細書中に記載される1つ以上の抗原は、標準的遺伝子送達プロトコルを使用する、核酸免疫化などを介して投与される1つ以上の遺伝子ベクターを使用して送達され得る。遺伝子送達のための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号;同第5,580,859号;同第5,589,466号を参照のこと。この構築物は、皮下、表皮の、皮内の、筋内の、静脈内の、粘膜的(例えば、鼻腔的、直腸的、および膣的)、腹腔内の、経口的またはこれらの組合せのいずれかで送達、例えば注入され得る。

【0116】

本発明の実施で使用され得る、例示的な複製欠損遺伝子送達ビヒクルは、ウイルスベクターのいずれかであり、例えば、共有に係る米国特許第6,342,372号;同第6,329,201号および国際公開WO01/92552に記載される。

【0117】

多数のウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子移送のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための簡便なプラットフォームを提供する。選択された配列は、当該分野で公知の技術を使用して、ベクター中に挿入され得、そして、レトロウイルス粒子中にパッケージされ得る。次いで、組換えウイルスは、単離され得、そして、インビボまたはエキソビボのいずれかで被験体の細胞に送達され得る。多数のレトロウイルス系が記載されている（米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman, *BioTechniques* (1989) 7:980-990；Miller, A.D., *Human Gene Therapy* (1990) 1:5-14；Scarpaら、*Virology* (1991) 180:849-852；Burnsら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:8033-8037；ならびにBoris-LawrieおよびTemin, *Cur. Opin. Gene t. Develop.* (1993) 3:102-109)。

#### 【0118】

多数のアデノウイルスベクターもまた記載されている。宿主ゲノムへ組込むレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外に存続し、したがって、挿入的突然変異誘発に関連する危険を最小にする（Haj-Ahmad and Graham, *J. Virol.* (1986) 57:267-274；Bettrら、*J. Virol.* (1993) 67:5911-5921；Mitterederら、*Human Gene Therapy* (1994) 5:717-729；Sethら、*J. Virol.* (1994) 68:933-940；Barrら、*Gene Therapy* (1994) 1:51-58；Berkner, K.L. *BioTechniques* (1988) 6:616-629；およびRichら、*Human Gene Therapy* (1993) 4:461-476)。

#### 【0119】

さらに、様々なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター系は、遺伝子送達のために開発された。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を使用して容易に構築され得る。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号；国際公開番号WO92/01070(1992年1月23日公開)およびWO93/03769(1993年3月4日公開)；Lebkowskiら、*Molec. Cell. Biol.* (1988) 8:3988-3996；Vincentら、*Vaccines* 90(1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B.J. *Current Opinion in Biotechnology* (1992) 3:533-539；Muzyczka, N. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* (1992) 158:97-129；Kotin, R.M. *Human Gene Therapy* (1994) 5:793-801；Shelling and Smith, *Gene Therapy* (1994) 1:165-169；ならびにZhouら、*J. Exp. Med.* (1994) 179:1867-1875を参照のこと。

#### 【0120】

ポリヌクレオチドを、粘膜的およびその他で送達するために有用な別のベクター系は、Small, Jr., P.A.ら、(米国特許第5,676,950号(1997年10月14日))によって記載された、腸投与された組換えポックスウイルスワクチン、ならびに、ワクシニアウイルスおよびトリポックスウイルスである。一例として、遺伝子を発現するワクシニアウイルス組換え体は、第一に、以下のように構築され得る。特定の合成Gag/抗原コード配列をコードするDNAは、ワクシニアプロモーターおよび側方のワクシニアDNA配列(例えば、チミジンキナーゼ(TK)をコードする配列)に隣接するように、適切なベクターに最初に挿入される。次いで、このベクターを使用して、ワクシニアで同時感染された細胞をトランスフェクトする。相同組み換えは、ワクシニアプロモーターおよび目的のコード配列をコードする遺伝子をウイルスゲノム中に挿入するのに役立つ。得られたTK組換え体は、5-プロモデオキシウリジンの存在下で細胞を培養するこ

と、および、それらに対するウイルスブランク耐性を選択することで、選択され得る。

【0121】

あるいは、アピボックスウイルス（例えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルス）をまた使用して、遺伝子を送達し得る。哺乳動物病原体から免疫源を発現する組換え体アピボックスウイルスは、非トリ種に投与された場合、防御免疫を付与することが知られている。アピボックスベクターの使用は、アピボックス属のメンバーが、感受性のあるトリ種において生産的に複製されるのみであり得、従って、哺乳動物細胞中で感染性でないので、ヒトおよび他の哺乳動物種において特に所望される。組換えアピボックスウイルスを生成する方法は、当該分野で公知であり、そして、ワクシニアウイルスの生成に関して上記のような遺伝的組み換えを使用する。例えば、WO 91 / 12882 ; WO 89 / 03429 ; および WO 92 / 03545 を参照のこと。ピコナウイルス由来のベクターもまた、使用され得る（例えば、米国特許第5,614,413号および同第6,063,384号を参照のこと）。

10

【0122】

分子結合体化ベクター（例えば、Michaelら *J. Biol. Chem.* (1993) 268:6866~6869 および Wagnerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:6099~6103 に記載されたアデノウイルスキメラベクター）もまた、遺伝子送達に使用され得る。

【0123】

ワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系は、宿主細胞で目的のコード配列（例えば、合成 Gag / HCV コア発現カセット）の誘導性の一過的発現を提供するために、簡便に使用され得る。この系において、細胞は、第一に、バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体を用いて、インビトロで感染される。このポリメラーゼは、これが、T7 プロモーターを有する鋳型を転写するのみという点で、感受性の強い特異性を示す。感染後、細胞は、T7 プロモーターによって促進された目的のポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトされる。ワクシニアウイルス組換え体から細胞質中で発現されたポリメラーゼは、感染された DNA を、宿主の翻訳機構によって次いでタンパク質に翻訳される RNA に転写する。この方法は、高レベルで一過性の、大量の RNA およびその翻訳産物の細胞質性生成物を提供する。例えば、Elroy-Stein および Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6743~6747 ; Fuerstら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:8122~8126 を参照のこと。

20

30

【0124】

ワクシニアウイルス組換え体もしくはアピボックスウイルス組換え体での感染、または、他のウイルスベクターを使用した遺伝子の送達に対する代替のアプローチとして、宿主細胞への導入後に高レベルの発現を導く増幅系が使用され得る。詳細には、T7 RNA ポリメラーゼについてのコード領域に先立つ T7 RNA ポリメラーゼプロモーターが、操作され得る。この鋳型由来の RNA の翻訳は、次にはそれ以上の鋳型を転写する T7 RNA ポリメラーゼを生成する。同時に、発現が T7 プロモーターの制御下にある cDNA が存在する。従って、増幅した鋳型 RNA の翻訳から生成した T7 RNA ポリメラーゼのいくつかは、所望の遺伝子の転写を導く。いくつかの T7 RNA ポリメラーゼは、増幅を開始するために必要とされるので、T7 RNA ポリメラーゼは、転写反応を初回抗原刺激するために、鋳型とともに細胞に導入され得る。このポリメラーゼは、タンパク質としてか、または、RNA ポリメラーゼをコードするプラスミド上で導入され得る。T7 系のさらなる討論および形質転換細胞についてのそれらの使用について、例えば、国際公開番号 WO 94 / 26911 ; Studier および Moffatt, *J. Mol. Biol.* (1986) 189:113~130 ; Deng および Wolff, *Gene* (1994) 143:245~249 ; Gaoら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994) 200:1201~1206 ; Gao および Huang, *Nuc. Acids Res.* (1993) 21:2867~2872 ; Chenら、

40

50

Nuc. Acid. Res. (1994) 22: 2114 ~ 2120 ; ならびに米国特許第5, 135, 855号を参照のこと。

【0125】

(D. 薬学的組成物)

本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤またはレシピエントと組合せたポリペプチド抗原またはポリヌクレオチド抗原を含む薬学的組成物を含む。さらに、他の成分(例えば、アジュバント)もまた、存在し得る。米国特許第6, 015, 694号により完全に記載されるように、保存安定でかつ容易に投与可能な免疫原性組成物は、冷蔵および/または従来の投与手段(シリンジなど)が容易に利用可能でない第三世界の国々で特に必要とされる。

10

【0126】

特定の実施形態において、この組成物は、1つ以上のポリペプチドを含む。活性成分として免疫原性ポリペプチドを含む免疫原性組成物の調製は、当業者に公知である。代表的には、このような免疫原性化合物は、液体かまたは懸濁液のいずれかとして注入可能に調製され; 注入の前の液体中の溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた調製され得る。この調製物はまた、乳化されても、リポソーム中にカプセル化されたタンパク質でもよい。

【0127】

本発明の組成物は、好ましくは、薬学的に受容可能なキャリアを含む。このキャリアは、宿主に対して有害な抗体の生成を、それ自身が誘導すべきでない。薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に周知である。適切なキャリアは、代表的には、巨大で、ゆっくり代謝される高分子であり、例えば、以下のようなものである: タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体(例えば、油滴またはリポソーム)および不活性ウイルス粒子。粒子状キャリアの例としては、ポリメチルメタクリレートポリマーから誘導されるキャリア、ならびに、ポリ(ラクチド)およびポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGとして知られる)から誘導される微粒子が挙げられる。例えば、Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10: 362 ~ 368 ; McGeeら(1997) J Microencapsul. 14(2): 197 ~ 210 ; O'Haganら(1993) Vaccine 11(2): 149 ~ 54を参照のこと。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、これらのキャリアは、免疫賦活剤(「アジュバント」として機能し得る。さらに、抗原は、細菌性トキシソイド(例えば、ジフテリア由来のトキシソイド、破傷風由来のトキシソイド、コレラ由来のトキシソイドなど、ならびにE. coli由来の毒素)に結合体化され得る。

20

30

【0128】

薬学的に受容可能な塩はまた、本発明の組成物中で使用され得、例えば、ヒドロクロリド、ヒドロプロミド、ホスフェートまたはサルフェートのような無機塩類、ならびに、アセテート、プロピオネート、マロネートまたはベンゾエートのような有機酸の塩である。特に有用なタンパク質基質は、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、破傷風トキシソイド、および、当業者に周知の他のタンパク質である。本発明の組成物はまた、液体または賦形剤(例えば、水、生理食塩水、グリセロール、デキストロース、エタノールなど、単一でかまたは組合せて)、ならびに、物質(例えば、湿潤剤、乳化剤またはpH緩衝剤)を含み得る。リポソームはまた、本発明の組成物のためのキャリアとして使用され得、このようなりポソームは、上記されている。

40

【0129】

さらに、本明細書中で記載される組成物は、種々の賦形剤、アジュバント、キャリア、補助物質、調節剤などを含み得る。好ましくは、この組成物は、免疫応答をマウントするのに十分な量の抗原を含む。適切な有効量は、当業者によって決定され得る。このような量は、日常的な試験を介して決定され得る比較的広い範囲であり、一般に、粒子/抗原の約0.1 μgから約1000 μg、より好ましくは約1 μg ~ 約300 μg程度の量であり得る。

50

## 【0130】

このようなアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(1) アルミニウム塩(ミョウバン)(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど)；(2) (他の特定の免疫賦活剤(例えば、ムラミルペプチド(以下を参照のこと)または細菌細胞壁成分)を含むか、または含まない)例えば、以下のような水中油乳濁処方物：(a) MF59(国際公開番号WO90/14837)、これは、Model 110Yマイクロフリューダイザー(Microfluidics, Newton, MA)のようなマイクロフリューダイザーを使用してサブミクロン粒子に処方された、5%のSqualane、0.5%のTween 80および5%のSpan 85(必要に応じて、必要とはされないが、種々の量のMTP-PE(以下を参照のこと)を含む)を含む(b) SAF、これは、より巨大な粒子サイズ乳化剤を生成するためにサブミクロン乳化剤にマイクロフリューダイズかまたはボルテックスのいずれかなをされた、10%のSqualene、0.4%のTween 80、0.5%のプルロニックブロック化ポリマーL 121およびthr-MDP(以下を参照のこと)を含む、ならびに(c) RibiT<sup>M</sup>アジュバントシステム(RAS)、(Ribi Immunochem, Hamilton, MT)これは、2%のSqualene、0.2%のTween 80、ならびに、モノホスホリピドA(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)および細胞壁骨格(CWS)(好ましくは、MPL+CWS(Detox<sup>T M</sup>))からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分を含む；(3) 使用され得るサポニンアジュバント(例えば、Stimulon<sup>T M</sup>(Cambridge Bioscience, Worcester, MA))、またはISCOM(免疫賦活複合体)のような、それから生成される粒子(例えば、国際公開番号WO00/00249を参照のこと)；(4) 完全フロイントアジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFA)；(5) サイトカイン(例えば、インターロイキン(IL-1、IL-2など)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、ケモカイン(MIP、1-ランテス、1-ランテスなど)；(6) 細菌ADP-リボシル化毒素(例えば、コレラ毒素(CT)、百日咳毒素(PT)、またはE.coli熱不安定毒素(LT)の解毒変異体(特に、LT-K63(リジンが、野生型アミノ酸の63位で置換される)、LT-R72(アルギニンが野生型アミノ酸の72位で置換されている)、CT-S109(セリンが、野生型アミノ酸の109位で置換されている)、PT-K9/G129(リジンが、野生型アミノ酸の9位で置換され、そして、グリシンが129位で置換される)) (例えば、国際公開番号WO93/13202；WO92/19265；WO95/17211；WO98/18928；およびWO01/22993を参照のこと)；(7) オリゴで生物接着性のポリマーを含むCpG(WO99/62546およびWO00/50078を参照のこと)；ならびに(8) この組成物の有効性を増強するために免疫賦活剤として作用する他の物質。

10

20

30

40

## 【0131】

ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ(hydroxyphosphoryloxy)-エチルアミン(MTP-PE)など)が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0132】

ムラミルペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)など。

50

## 【0133】

サッカリド抗原または糖質抗原が使用される場合、その抗原は、キャリアタンパク質に結合体化され得る。(例えば、米国特許第5,306,492号、EP 0 477 508; WO 98/42721; Ramsayら、(2001) Lancet 357:195~196; 「Conjugate Vaccines」Cruseら編、ISBN 3805549326を参照のこと)。好ましいキャリアタンパク質としては、細菌毒素または細菌トキソイド(例えば、ジフテリア(例えば、CRM<sub>197</sub>)トキソイドまたは破傷風トキソイド)が挙げられる。他の適切なキャリアタンパク質としては、以下が挙げられる: N. meningitidis 外膜タンパク質 (EP 0372501); 合成ペプチド (EP 0378881およびEP 0427347); 熱ショックタンパク質 (WO 93/17712); サイトカイン、リンホカイン、ホルモン、増殖因子、百日咳タンパク質 (WO 98/58668; EP 0471177); H. influenza 由来のプロテインD (WO 00/56360); C. difficile 由来の毒素Aまたは毒素B (WO 00/61761)など。キャリアタンパク質の混合物を使用することは、可能である。混合物が、血清型Aおよび血清型Cの両方に由来する莢膜サッカリドを含む場合、MenAサッカリド: MenCサッカリドの比率(w/w)は、1より大きい(例えば、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1以上)ことが好ましい。異なる血清型(例えば、N. meningitidisの異なる血清型)または異なる病原体由来のサッカリドは、同一のキャリアタンパク質または異なるキャリアタンパク質に結合体化され得る。

10

## 【0134】

薬学的組成物はまた、凍結乾燥され得るか、または他の方法で貯蔵安定性にされ得る。

20

## 【0135】

本明細書中に記載される薬学的組成物の投与は、任意の適切な経路(例えば、上記を参照のこと)によってなされ得る。非経口初回抗原刺激(または複数の初回抗原刺激)およびそれに続く粘膜追加免疫(または複数の粘膜追加免疫)が、特に好ましい。さらに、この投与は、複数回初回抗原刺激追加免疫投与の形態を取り得る。従って、投薬処置は、単回初回抗原刺激/追加免疫投与スケジュールまたは複数回初回抗原刺激/追加免疫投与スケジュールであり得る。複数の投与スケジュールは、ワクチン接種の主な治療単位が、1~10の別々の投与であり得、その後、免疫応答を維持および/または強化するために選択された引き続く時間間隔で与えられる他の用量(例えば、第2の投与について1~4ヶ月、および必要に応じて、数ヶ月後の引き続く用量)であり得るスケジュールである。投薬レジメンはまた、少なくとも部分的には、様式の効力、使用するワクチン送達、被験体の必要性により決定され、そして実施者の判断に依存する。

30

## 【0136】

複数投与(例えば、初回抗原刺激追加免疫型投与)は、有利に使用される。例えば、目的の抗原を発現する組換えアルファウイルス粒子が、投与される(例えば、IVAGまたはIR)。続いて、抗原は、例えば、ポリペプチド抗原および適切なアジュバントを含む組成物で投与される。あるいは、抗原は、遺伝子送達ビヒクルより先に投与される。複数のポリペプチド投与および複数の遺伝子送達ビヒクルの投与(任意の順序)もまた、使用され得る。

40

## 【0137】

この組成物は、好ましくは、「治療的有効量」の目的の高分子を含有し得る。すなわち、症状を予防、減少、除去または診断するために、十分な応答を被験体に生成させる量の高分子/微粒子が組成物中に含まれる。正確な必要量は、他にも因子はあるが、処置される被験体; 処置される被験体の年齢および全身状態; 処置される状態の重症度; 免疫学的応答の場合、被験体の免疫系が抗体を合成する能力; 所望される保護の程度および選択される特定の抗原、ならびにその投与の様式に依存して変動する。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。従って、「治療的有効量」は、慣用的な試行を通じて決定され得る比較的広範囲に落ち着く。例えば、本発明の目的について、高分子がポリヌクレオチドである場合、有効用量は、代表的には、1用量あたり約1ng~約1mg、より好ま

50

しくは、約 10 ng ~ 約 1 µg、そして最も好ましくは、約 50 ng ~ 約 500 ng の送達される高分子範囲であり；高分子が抗原である場合、有効用量は、代表的には、1 用量あたり約 1 µg ~ 約 100 mg、より好ましくは、約 10 µg ~ 約 1 mg、そして最も好ましくは、約 50 µg ~ 約 500 µg の送達される高分子範囲である。

【0138】

以下の実施例は、例証の目的で提供され、そして限定の目的では提供されない。

【実施例】

【0139】

(実施例 1)

( HIV 抗原を用いる非経口初回抗原刺激粘膜追加免疫後の血清 IgG 力価および腔洗浄物 IgA 力価 )

マウスを、アニオン性 PLG DSS 微粒子上に吸着させた gp120 タンパク質を用いて、筋肉内に 2 回初回抗原刺激した。10 µg の gp120 / PLG を、0 日目および 14 日目に与えた。この動物を、10 日間で 3 回、粘膜追加免疫した。この粘膜追加免疫は、ACP、生体接着ポリマー ( Fidia )、LTR72 ( Chiron S.p.A ) またはオリゴ含有 CPG といった粘膜アジュバントを用いて、腔内、直腸内または鼻腔内で行った ( 1826 H.C. Davisら、J. Immunology ( 1998 ) 160 : 870 ~ 876 )。

【0140】

非経口初回抗原刺激後の粘膜追加免疫の効果を研究した。そして結果を表 1 に示す。

【0141】

【表 1】

表 1

群	経路	初回抗原刺激	経路	追加免疫	腔洗浄物 IgA 力価	血清 IgG 力価
1	IMx2	gp120/PLG 10 µg	-	追加免疫なし	22 ± 11	15790 ± 7578
2	IMx2	gp120/PLG 10 µg	IVagx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	1055 ± 979	38091 ± 18525
3	IMx2	gp120/PLG 10 µg	IRx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	7716 ± 8175	420134 ± 269530
4	IMx2	gp120/PLG 10 µg	INx3	gp120 30 ug + LTR72 10 ug + CPG 50 ug	12421 ± 10156	136137 ± 92334

IMx2 - 2 回の筋肉内投与  
IVagx3 - 3 回の腔内投与  
IRx3 - 3 回の直腸内投与  
INx3 - 3 回の鼻腔内投与。

【0142】

表 1 および図 1 に示されるように、腔洗浄物によって決定されるような粘膜 IgA 力価および血清 IgG 力価は、粘膜追加免疫していない動物と比較して、粘膜追加免疫された動物において増加した。

【0143】

(実施例 2)

( HIV 抗原を用いる非経口初回抗原刺激および粘膜追加免疫後の血清力価 )

以下の実施例は、IM 初回抗原刺激後の粘膜追加免疫後の増加した血清 IgG 力価を示す。

。

## 【0144】

マウスを、実施例1に記載されるように、10 $\mu$ gのgp120/PLGを用いて筋肉内で免疫した。3回の粘膜（鼻腔内または直腸内）追加免疫を、上記されるように、粘膜アジュバントLTR72、ACPまたはCPG（1826）を用いて与えた。

## 【0145】

## 【表2】

表2

Proj. #99-01414						
群	経路	初回抗原刺激	経路	追加免疫	初回抗原刺激後 血清 IgG力価 平均 ( $\pm$ SD;N=5)	追加免疫後 血清 IgG力価 平均 ( $\pm$ SD;N=5)
1	IMx2	gp120/PLG 10 $\mu$ g	-	追加免疫なし	913 (976)	400 (303)
2	IMx2	gp120/PLG 10 $\mu$ g	IVagx3	gp120/PLG100 ug + LTR72	505 (393)	1385 (816)
3	IMx2	gp120/PLG 10 $\mu$ g	IRx3	gp120 100 ug + LTR72	620 (238)	3475 (2322)
5	IMx2	gp120/PLG 10 $\mu$ g	IRx3	gp120/ACP100 ug + LTR72	555 (429)	6364 (4831)
5	IMx2	gp120/PLG 10 $\mu$ g	INx3	gp120 30 ug + LTR72 + CPG 50 ug	587 (565)	2662 (2382)

10

20

IMx2 - 2回の筋肉内投与；IVagx3 - 3回の腔内投与；IRx3 - 3回の直腸内投与；INx3 - 3回の鼻腔内投与。

## 【0146】

表2は、平均血清IgG力価が、粘膜追加免疫を受けた動物について増加されることを示す。

## 【0147】

（実施例3）

（非経口初回抗原刺激および粘膜追加免疫後の腔洗浄物IgA力価）

以下の実施例は、IM初回抗原刺激後の粘膜追加免疫後の増加した粘膜（腔洗浄物）IgA力価を示す。マウスを、実施例1および実施例2に記載されるように免疫した。結果を、表3に示す。

## 【0148】

## 【表3】

30

表3

群	経路	初回抗原刺激	経路	追加免疫	動物番号	正規化した力価
1	IMx2	gp120/PLG 10 μg	-	追加免疫 なし	1	27
					2	10
					3	<10
					4	40
					5	27
					6	21
					7	39
					8	<10
					9	21
					10	25
9	IMx2	gp120/PLG 10 μg	IVagx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	81	2,128
					82	1,465
					83	1,939
					84	260
					85	34
					86	16
					87	1,662
					88	2,716
					89	52
					90	279
10	IMx2	gp120/PLG 10 μg	IRx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	91	3,068
					92	H
					93	2,976
					94	1,909
					95	5,260
					96	23,528
					97	19,137
					98	888
					99	16,853
					100	473
11	IMx2	gp120/PLG 10 μg	INx3	gp120 30 ug + LTR72 10 ug + CPG 50 ug	101	4,133
					102	7,929
					103	1,691
					104	H
					105	27,872
					106	2,517
					107	25,121
					108	6,825
					109	5,183
					110	15,070

表3に示される結果は、膺洗浄物 I g A 力価によって測定されるような粘膜力価が、非経口ポリペプチド投与および粘膜追加免疫後に増加されることを示す。

【0149】

(実施例4)

(記憶追加免疫後の血清力価)

以下の実施例は、非経口(筋肉内)初回抗原刺激後の記憶(memory)粘膜(鼻腔内)追加免疫後の増加した血清 I g G 力価を示す。記憶追加免疫を、最初の初回抗原刺激の18ヶ月後に行ったことを除いて、マウスを、基本的に上記されるように免疫した。結果を、表4および図2に示す。

【0150】

【表4】

10

20

30

40

表4

群	初回抗原刺激 / アジュバント	追加免疫 / アジュバント	記憶追加免疫 / アジュバント	血清 IgG 力価
1	IMx2 Ogp140可溶性 10 µg / MF59	なし	IM Ogp140可溶性10µg / MF59	2037±1897
2	IMx2 Ogp140可溶性 10 µg / MF59	INx3 Ogp140/PLG	IN Og140 30 µg/LTR72 10µg + CpG 50 µg	4062±2291
3	IM gp140DNA	INx3 Ogp140 30µg/ LTR72 10µg + CpG 50µg	IN Ogp140 30µg/LTR72 10 µg + CpG 50 µg	7897±4742

10

IM x 2 - 2回の筋肉内投与  
 IM - 1回の筋肉内投与  
 IN - 1回の鼻腔内投与  
 IN x 3 - 3回の鼻腔内投与。

20

## 【0151】

これらの結果は、ELISAによって測定されるような血清力価が、18ヵ月目での粘膜記憶追加免疫後に増加されることを示す。力価はまた、非経口初回抗原刺激がDNAを用いる場合、タンパク質と比較して増加される。

## 【0152】

(実施例5)

(Neisseria Meningitidis B (MemB) - PLGを用いる非経口初回抗原刺激粘膜追加免疫後の力価)

マウスを、上記されるように、MenB287抗原(WO/00/66791を参照のこと)を用いて、初回抗原刺激および追加免疫する。このMenB287抗原は、PLG微粒子および/またはCpGとともに処方される。結果を、以下の表5に示す。「IM」とは、筋肉内投与をいい、「IN」とは、鼻腔内投与をいう。「Imm数(#)」とは、免疫の数をいう。免疫1を、0日目に与え；免疫2を、28日目に与え；免疫3を、84日目に与え；そして免疫4を、98日目に与えた。「2wp2」とは、免疫数2の2週間後(42日目)に採取した血から得られた力価をいい；「2wp3」とは、免疫数3の2週間後(98日目)に採取した血から得られた力価をいい；そして「2wp4」とは、免疫数4の2週間後(112日目)に採取した血から得られた力価をいう。

30

## 【0153】

【表5】

表5

群	処方物	経路	免疫数	2wp2	2wp3	2wp4
1	PLG/287 + PLG/CpG, 20 ug	IM	1, 2, 3	15,673	4,163	NA
2	PLG/287, 20 ug	IM	1, 2, 3	10,729	2,853	NA
3	PLG/287 + PLG/CpG, 20 ug	IM	1, 2	34,891	15,167	16,556
	287 + LTK63, 20 ug	IN	3, 4			
4	PLG/287, 20 ug	IM	1, 2	9,064	7,948	9,412
	287 + LTK63, 20 ug	IN	3, 4			

10

表5に示されるように、力価は、3度目の免疫が鼻腔内である場合、筋肉内と比較して有意に増加する。力価はまた、2度目の粘膜追加免疫（免疫数4）後に、上昇したままである（かまたは増加される）。

【0154】

(実施例6)

(*Neisseria meningitidis* 抗原または *Hemophilus influenzae* (HIB) 抗原を用いる非経口初回抗原刺激粘膜追加免疫後の血清 IgG 力価および腔洗浄物 IgA 力価)

20

マウスを、以下のスケジュール：

【0155】

【表6】

免疫スケジュール

群	日数	経路	ワクチン	アジュバント	ワクチンの用量
1	0	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
	14	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
	28	SC	MenC または HIB	ミョウバン	ヒト用量の1/4
2	0	SC	MenC または HIB	ミョウバン	ヒト用量の1/4
	14	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
	28	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
3	0	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
	14	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
	28	IN	MenC または HIB	LTK63 または 72	ヒト用量の1/4
4	0	SC	MenC または HIB	ミョウバン	ヒト用量の1/4
	14	SC	MenC または HIB	ミョウバン	ヒト用量の1/4
	28	SC	MenC または HIB	ミョウバン	ヒト用量の1/4

30

40

に従って、MenC 抗原または HIB 抗原を用いて、初回抗原刺激および追加免疫する。

【0156】

IN - 鼻腔内投与

SC - 皮下投与

全ての群について、ELISA を、最初の投与の前（すなわち、0日目の前）および各々の免疫後に、標準的な手順に従って実施する。MenC について、殺菌性抗体力価アッセイもまた、免疫応答を評価するために使用し得る。群2は、他の群と比較して大きな全身性免疫応答および/または粘膜免疫応答を示す。

【図面の簡単な説明】

【0157】

50

【図1】図1は、全身性初回抗原刺激および粘膜追加免疫後のHIVエンベロープペプチドに対する血清抗体および腔の抗体の応答の増強を示すグラフを示す。グレーのバーは、腔洗浄液からの力価を示し、一方で斜線のストライプのバーは、血清抗体を示す。種々の様式の送達およびアジュバントが、この水平軸上のバーの下に示される。

【図2】図2は、元の初回抗原刺激追加免疫の18ヶ月後の1回の筋肉内(IM)記憶追加免疫または鼻腔内(IN)記憶追加免疫によるHIVエンベロープ特異的血清IgG力価(ELISAによって測定される)を示すのグラフである。種々の様式の送達およびアジュバントが、この水平軸上のバーの下に示される。

【図1】

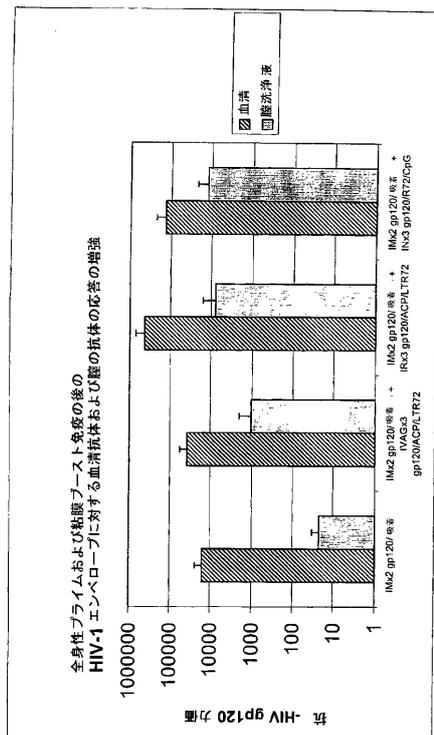


FIGURE 1

【図2】

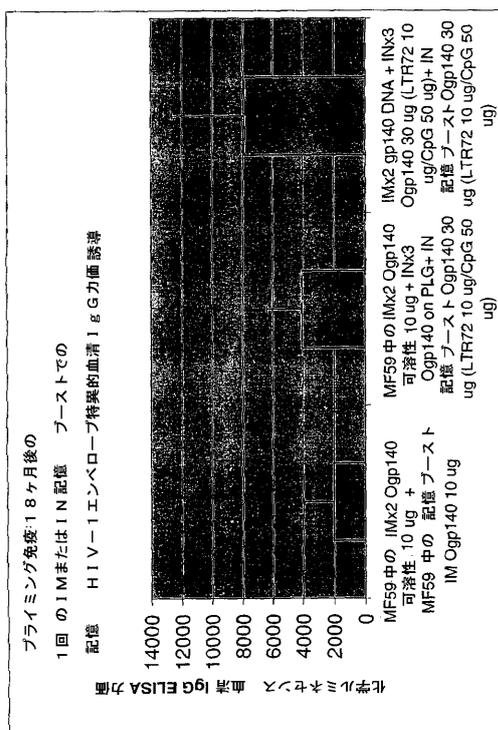


FIGURE 2

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/080648 A2**

- (51) International Patent Classification: Not classified (74) Agents: HALE, Rebecca, M.; Chiron Corporation, Intellectual Property - R440, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 et al. (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/10869
- (22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002) (81) Designated States (national): CA, JP.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/282,389 5 April 2001 (05.04.2001) US Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (71) Applicant: CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).
- (72) Inventor: O'HAGAN, Derek; Chiron Corporation, 4560 Horton Street, R-440, Emeryville, CA 94608 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/080648 A2

(54) Title: MUCOSAL BOOSTING FOLLOWING PARENTERAL PRIMING

(57) Abstract: Mucosal immunization using one or more antigens following parenteral administration of the same or different antigens is described.

WO 02/080648

PCT/US02/10869

**MUCOSAL BOOSTING FOLLOWING PARENTERAL PRIMING**Technical Field

The present invention relates generally to mucosal immunization of one or more antigens following parenteral administration of the same or different antigens. Use of these mucosal boosting systems for inducing immune responses following is also described.

Background of the Invention

Development of vaccines that invoke immunity, particularly mucosal immunity, against various pathogens would be desirable. Many disease-causing pathogens, such as bacteria, viruses, parasites and other microbes, are transmitted through mucosal surfaces.

One example of a virus thought to be transmitted through mucosal surfaces is acquired immune deficiency syndrome (AIDS). AIDS is recognized as one of the greatest health threats facing modern medicine and worldwide sexual transmission of HIV is the leading cause of AIDS. There are, as yet, no cures or vaccines for AIDS.

In 1983-1984, three groups independently identified the suspected etiological agent of AIDS. See, e.g., Barre-Sinoussi et al. (1983) *Science* 220:868-871; Montagnier et al., in *Human T-Cell Leukemia Viruses* (Gallo, Essex & Gross, eds., 1984); Vilmer et al. (1984) *The Lancet* 1:753; Popovic et al. (1984) *Science* 224:497-500; Levy et al. (1984) *Science* 225:840-842. These isolates were variously called lymphadenopathy-associated virus (LAV), human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III), or AIDS-associated retrovirus (ARV). All of these isolates are strains of the same virus, and were later collectively named Human Immunodeficiency Virus (HIV). With the isolation of a related AIDS-causing virus, the strains originally called HIV are now termed HIV-1 and the related virus is called HIV-2. See, e.g., Guyader et al. (1987) *Nature* 326:662-669; Brun-Vezinet et al. (1986) *Science* 233:343-346; Clavel et al. (1986) *Nature* 324:691-695. Consequently, there is a need in the art for compositions and methods suitable for treating and/or preventing HIV infection worldwide.

WO 02/080648  
2300-1001-40

PCT/US02/10869

A great deal of information has been gathered about the HIV virus, and several targets for vaccine development have been examined including the *env*, *Gag*, *pol* and *tat* gene products encoded by HIV. Immunization with native and synthetic HIV-encoding polynucleotides has also been described, as described for example, in co-owned

5 PCT/US99/31245 and references cited therein. In addition, polynucleotides encoding HIV have been administered in various attempts to identify a vaccine. (See, e.g., Bagarazzi et al. (1999) *J. Infect. Dis.* 180:1351-1355; Wang et al. (1997) *Vaccine* 15:821-825). A replication-competent Venezuelan equine encephalitis (VEE) alphavirus vector carrying the matrix/capsid domain of HIV could elicit CTL responses has been

10 administered subcutaneously in animals (Caley et al. (1997) *J. Virol.* 71:3031-3038). In addition, alphavirus vectors derived from Sindbis virus has also been shown to elicit HIV gag-specific responses in animals (Gardner et al. (2000) *J. Virol.* 74:11849-11857). Similarly, HIV peptides have also been administered to animal subjects. (Staats et al. (1997) *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:945-952; Belyakov (1998) *J.Clin.Invest.* 102:

15 2072).

One example of a bacteria that may be transmitted through mucosal surfaces is *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis* or N.men.). *Neisseria meningitidis* a causative agent of bacterial meningitis and sepsis. Meningococci are divided into serological groups based on the immunological characteristics of capsular and cell wall antigens.

20 Currently recognized serogroups include A, B, C, W-135, X, Y, Z and 29E. The polysaccharides responsible for the serogroup specificity have been purified from several of these groups, including A, B, C, W-135 and Y. See, also, WO 00/66791; WO 99/24578; WO 00/71574; WO 99/36544; WO 01/04316; WO 99/57280; WO 01/31019; WO 00/22430; WO 00/66741; WO 00/71725; WO 01/37863; WO 01/38350;

25 WO 01/52885; WO 01/64922; WO 01/64920; WO 96/29412; and WO 00/50075.

*N. meningitidis* serogroup B (termed "MenB" or "NmB" herein) accounts for a large percentage of bacterial meningitis in infants and children residing in the U.S. and Europe. The organism also causes fatal sepsis in young adults. In adolescents, experimental MenB vaccines consisting of outer membrane protein (OMP) vesicles are

30 somewhat protective. However, no protection has been observed in vaccinated infants, the age group at greatest risk of disease. Additionally, OMP vaccines are serotype- and

WO 02/080648  
2000-1007-49

PCT/US02/10869

subtype-specific, and the dominant MenB strains are subject to both geographic and temporal variation, limiting the usefulness of such vaccines.

Effective capsular polysaccharide-based vaccines have been developed against meningococcal disease caused by serogroups A, C, Y and W135. In addition, a  
5 combination MenB/MenC vaccine has been described. See, WO 99/61053. However, similar attempts to develop a MenB polysaccharide vaccine have failed due to the poor immunogenicity of the capsular MenB polysaccharide (termed "MenB PS" herein). MenB PS is a homopolymer of (N-acetyl ( $\alpha$  2->8) neuraminic acid. *Escherichia coli* K1 has the identical capsular polysaccharide. Antibodies elicited by MenB PS cross-  
10 react with host polysialic acid (PSA). PSA is abundantly expressed in fetal and newborn tissue, especially on neural cell adhesion molecules ("NCAMs") found in brain tissue. PSA is also found to a lesser extent in adult tissues including in kidney, heart and the olfactory nerve. Thus, most anti-MenB PS antibodies are also autoantibodies. Such antibodies therefore have the potential to adversely affect fetal development, or to  
15 lead to autoimmune disease.

MenB PS derivatives have been prepared in an attempt to circumvent the poor immunogenicity of MenB PS. For example, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> N-acyl-substituted MenB PS derivatives have been described. See, EP Publication No. 504,202 B, to Jennings et al. Similarly, U.S. Patent No. 4,727,136 to Jennings et al. describes an N-propionylated  
20 MenB PS molecule, termed "NPr-MenB PS" herein. Mice immunized with NPr-MenB PS glycoconjugates were reported to elicit high titers of IgG antibodies. Jennings et al. (1986) *J. Immunol.* 137:1708. In rabbits, two distinct populations of antibodies, purportedly associated with two different epitopes, one shared by native MenB PS and one unshared, were produced using the derivative. Bactericidal activity was found in  
25 the antibody population that did not cross react with MenB PS. Jennings et al. (1987) *J. Exp. Med.* 165:1207. The identity of the bacterial surface epitope(s) reacting with the protective antibodies elicited by this conjugate remains unknown. Also, because a subset of antibodies elicited by this vaccine has autoreactivity with host polysialic acid (Granoff et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5028) the safety of this vaccine in humans  
30 remains uncertain. Thus, it is readily apparent that the production of a safe and effective vaccine against MenB would be particularly desirable.

WO 02/080648  
2300-1/001/40

PCT/US02/10869

Cancer (tumor) antigens form yet another broad class of antigens for which it would be desirable to have safe and effective vaccines. (See, e.g., Moingeon (2000) *Vaccine* 19:1305-1326; Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384). Various tumor-specific antigens have been identified and attempts have been made to develop vaccines  
5 based on whole cells or uncharacterized tumor lysates. Moingeon, *supra*. However, there are currently no proven vaccines for various cancers.

Certain prime-boost methods of immunization have been described. In particular, genetic immunizations involving polynucleotides as have been described. (See, e.g., WO 01/81609; WO 00/11140; Cooney et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5):1882-1886, describing induction of an immune response by intramuscular  
10 priming with a recombinant vaccinia (vac/env) virus expressing HIV-1 envelope and intramuscular boosting with a gp160 glycoprotein derived from a recombinant baculovirus (rgp160); Bruhl et al. (1998) *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:401-407, describing mucosal priming with recombinant vaccinia followed by parenteral priming;  
15 and Eo et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5473-5479, describing mucosal prime and mucosal boost with recombinant vaccinia virus expressing the gB protein of HSV). Lee et al. (1999) *Vaccine* 17:3072-3082, describes mucosal prime and parenteral boosting regimes using recombinant *Helicobacter pylori* urease vaccine.

However, despite these and other studies, there remains a need for compositions  
20 and methods of enhancing mucosal and systemic immunity to various antigens, including to pathogens or cancers for which there are currently few or no effective vaccines and/or treatments.

#### Summary of the Invention

25 The present invention provides methods for generating an immune response in a mammal by parenteral priming followed by mucosal boosting.

In one aspect, a method of generating an immune response in a subject is described. The method comprises (a) parenterally administering a first immunogenic composition comprising one or more polypeptide antigens and; (b) mucosally  
30 administering a second immunogenic composition comprising one or more antigens, thereby inducing an immune response in the subject.

WO 02/080648  
2000-1/06/99

PCT/US02/10869

In another aspect, a method of generating an immune response against a tumor antigen is described, the method comprising the steps of (a) parenterally administering a first immunogenic composition comprising one or more tumor antigens and; (b) mucosally administering a second immunogenic composition comprising one or more tumor antigens.

The mucosal administration can be, for example, intrarectal, intravaginal or intranasal. Further, in any of the methods described herein, parenteral administration can be, for example, transcutaneous. The first and/or second immunogenic compositions can further comprise one or more additional agents such as adjuvants and/or delivery vehicles, for example microparticles such as PLG.

In certain embodiments, at least one antigen is derived from a bacteria, for example, *Neisseria meningitidis*, subgroups A, B and or C (e.g., capsular oligosaccharide antigens alone or conjugated to CRM197); *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*. In other embodiments, at least one antigen is derived from a virus, for example, hepatitis A virus (HAV), human immunodeficiency virus (HIV), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus (PIV), influenza, hepatitis B virus (HBV), herpes simplex virus (HSV), hepatitis C virus (HCV) and/or human papilloma virus (HPV). In yet other embodiments, at least one antigen is derived from a tumor.

In any of the methods described herein, the immune response can be humoral and/or cellular and, furthermore, can be a systemic immune response (e.g., IgG production), a mucosal immune response (e.g., IgA production) or a combination of systemic and mucosal responses. The methods described herein can be used to generate an immune response to one or more pathogens (e.g., bacteria, viruses, tumors, etc.).

In any of the methods described herein the first and second immunogenic compositions can comprise antigens from the same pathogen (e.g., bacteria, virus and/or tumor). In certain embodiments, the first and second immunogenic compositions are the same. In other embodiments, the first and second immunogenic compositions are different, for example by having different antigens from the same pathogen, different forms of the antigens, antigens from different pathogens and/or different adjuvants.

In any of the methods described herein, the immunogenic compositions comprise, entirely or partially, one or more polynucleotides encoding one or more

WO 02/080648  
2000-1007-00

PCT/US02/10869

antigens. In certain embodiments, the first immunogenic composition further comprises at least one polynucleotide encoding one or more antigens. In other embodiments, all or some of the antigens of the second immunogenic are encoded by one or more polynucleotides.

5 Further, in any of the methods described herein, the methods described herein further comprise repeating step (a) and/or step(b) one or more times. In certain aspects, step (b) is performed two or more times. The time interval between the mucosal administrations of step (b) can be hours, days, months or years. Further, in certain  
10 different, immunogenic compositions.

Thus, it is an object of the invention to provide alternative and improved methods for mucosal boosting following parenteral priming of an immune response. The invention provides a method for raising an immune response in a mammal, the method comprising the parenteral administration of a first immunogenic composition  
15 followed by the mucosal administration of a second immunogenic composition. The mucosal administration further comprises the use of a mucosal adjuvant, for example, CpG containing oligos, bioadhesive polymers, or *E. coli* heat-labile enterotoxin ("LT") or detoxified mutants thereof or cholera toxin ("CT") or detoxified mutant thereof or microparticles that are formed from materials that are biodegradable and non-toxic.  
20 The parenteral administration preferably further comprises the use of a parenteral adjuvant, for example alum, and the like. In certain embodiments, microparticles are used for the delivery of the immunogenic composition(s).

The first immunogenic composition is given parenterally. Suitable routes of parenteral administration include intramuscular, subcutaneous, intravenous,  
25 intraperitoneal, intradermal, transcutaneous, or transdermal routes as well as delivery to the interstitial space of a tissue. In one embodiment, parenteral priming is via the intramuscular route. The first immunogenic composition is preferably adapted for parenteral administration in the form of an injectable that will typically be sterile and pyrogen-free. (See, e.g., WO 99/43350). In certain embodiments, the first  
30 immunogenic composition comprises a parenteral or immunological adjuvant. In addition, the first immunogenic composition may be adsorbed onto microparticles that are biodegradable and non-toxic. The second immunogenic composition is given

WO 02/080648  
2000-11007-40

PCT/US02/10869

mucosally. Suitable routes of mucosal administration include oral, intranasal, intragastric, pulmonary, intestinal, rectal, ocular and vaginal routes. Intranasal or oral administration is preferred.

In certain aspects, the second immunogenic composition is preferably adaptable  
5 for mucosal administration. Where the composition is for oral administration, it may be in the form of tablets or capsules, optionally enteric-coated, liquid, transgenic plants etc. Where the composition is for intranasal administration, it may be in the form of a nasal spray, nasal drops, gel or powder. In certain embodiments, the second immunogenic composition further comprises a mucosal adjuvant. Suitable adjuvants include: CpG  
10 containing oligo, bioadhesive polymers, see WO 99/62546 and WO 00/50078; *E. coli* heat-labile enterotoxin ("LT") or detoxified mutants thereof or cholera toxin ("CT") or detoxified mutant thereof or microparticles that are formed from materials that are biodegradable and non-toxic. Preferred LT mutants include K63 or R72. See e.g., PCT EP92/03016; PCT IB94/00068; PCT IB96/00703 and PCT IB97/00183.

15 In other aspects the first and/or second immunogenic compositions are adsorbed to microparticles. In certain embodiments, the microparticles used in the first and/or second immunogenic composition are 100 nm to 150 nm in diameter, more preferably 200 nm to 30  $\mu$ m in diameter and most preferably 500 nm to 10  $\mu$ m in diameter and are made from for example, poly(alpha-hydroxy acid), a polyhydroxybutyric acid, a  
20 polyorthoester, a polyanhydride a polycaprolactone etc. See e.g., WO 00/06123 and WO 98/33487.

Immunogenic compositions suitable for use in the present invention include proteins of, and/or polynucleotides encoding, viral, bacterial, parasitic, fungal and/or cancer antigens.

25 These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached drawings. In addition, various references are set forth below which describe in more detail certain procedures or compositions (e.g., plasmids, etc.).

#### Brief Description of the Drawings

30 Figure 1 is a graph depicting enhancement of serum and vaginal antibody responses against HIV envelope peptides following systemic prime and mucosal boost immunizations. The diagonal stripes bars show serum antibody while the gray bars

WO 02/080648  
2500-1/00/40

PCT/US02/10869

show titers from vaginal washes. The various modes of delivery and adjuvants are indicated on below the bars on the horizontal axis.

Figure 2 is a graph depicting HIV envelope-specific serum IgG titers (as measured by ELISA) with a single intramuscular (IM) or intranasal (IN) memory boost  
5 18 months after original prime-boost. The various modes of delivery and adjuvants are indicated below the bars on the horizontal axis.

#### Detailed Description of the Invention

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated,  
10 conventional methods of chemistry, biochemistry, molecular biology, immunology and pharmacology, within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); and *Handbook of Experimental*  
15 *Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed. (Ausubel et al. eds., 1999, John Wiley & Sons); *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory*  
20 *Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press); *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, *Fields Virology* (2d ed), Fields et al. (eds.), B.N. Raven Press, New York, NY.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a,"  
25 "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an antigen" includes a mixture of two or more such agents.

Prior to setting forth the invention definitions of certain terms that will be used hereinafter are set forth.

30 A "polynucleotide" is a nucleic acid molecule that encodes a biologically active (e.g., immunogenic or therapeutic) protein or polypeptide. Depending on the nature of the polypeptide encoded by the polynucleotide, a polynucleotide can include as little as

WO 02/080648  
2300-1 1001-40

PCT/US02/10869

10 nucleotides, e.g., where the polynucleotide encodes an antigen. Furthermore, a "polynucleotide" can include both double- and single-stranded sequences and refers to, but is not limited to, cDNA from viral, prokaryotic or eukaryotic mRNA, genomic RNA and DNA sequences from viral (e.g. RNA and DNA viruses and retroviruses) or  
5 prokaryotic DNA, and especially synthetic DNA sequences. The term also captures sequences that include any of the known base analogs of DNA and RNA, and includes modifications such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature), to the native sequence, so long as the nucleic acid molecule encodes a therapeutic or antigenic protein. These modifications may be deliberate, as through  
10 site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts that produce the antigens. Modifications of polynucleotides may have any number of effects including, for example, facilitating expression of the polypeptide product in a host cell.

The terms "polypeptide" and "protein" refer to a polymer of amino acid residues  
15 and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The terms also include postexpression modifications of the polypeptide, for example, glycosylation, acetylation, phosphorylation and the like. Furthermore, for purposes of the present  
20 invention, a "polypeptide" refers to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature), to the native sequence, so long as the protein maintains the desired activity. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts that produce the proteins or errors due to PCR amplification.  
25 Furthermore, modifications may be made that have one or more of the following effects: reducing toxicity; facilitating cell processing (*e.g.*, secretion, antigen presentation, etc.); and facilitating presentation to B-cells and/or T-cells.

A "fusion molecule" is a molecule in which two or more subunit molecules are linked, preferably covalently. The subunit molecules can be the same chemical type of  
30 molecule, or can be different chemical types of molecules. Examples of the fusion molecules include, but are not limited to, fusion polypeptides (for example, a fusion between two or more antigens) and fusion nucleic acids (for example, a nucleic acid encoding the

WO 02/080648  
2300-1/06/40

PCT/US02/10869

fusion polypeptides described herein). See, also, Sambrook et al., *supra* and Ausubel et al., *supra* for methods of making fusion molecules.

An "antigen" refers to a molecule containing one or more epitopes (either linear, conformational or both) that will stimulate a host's immune system to make a humoral and/or cellular antigen-specific response. The term is used interchangeably with the term "immunogen." Normally, an epitope will include between about 3-15, generally about 5-15 amino acids. A B-cell epitope is normally about 5 amino acids but can be as small as 3-4 amino acids. A T-cell epitope, such as a CTL epitope, will include at least about 7-9 amino acids, and a helper T-cell epitope at least about 12-20 amino acids.

5 Normally, an epitope will include between about 7 and 15 amino acids, such as, 9, 10, 12 or 15 amino acids. The term "antigen" denotes both subunit antigens, (i.e., antigens which are separate and discrete from a whole organism with which the antigen is associated in nature), as well as, killed, attenuated or inactivated bacteria, viruses, fungi, parasites or other microbes as well as tumor antigens, including extracellular domains

10 of cell surface receptors and intracellular portions that may contain T-cell epitopes. Antibodies such as anti-idiotypic antibodies, or fragments thereof, and synthetic peptide mimotopes, which can mimic an antigen or antigenic determinant, are also captured under the definition of antigen as used herein. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide that expresses an antigen or antigenic determinant *in vivo*, such as in

15 gene therapy and DNA immunization applications, is also included in the definition of antigen herein.

20

Epitopes of a given protein can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols* in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. For example, linear epitopes may be determined by e.g.,

25 concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, e.g., U.S. Patent No. 4,708,871; Geysen et al. (1984)

30 *Proc. Nat'l Acad Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol* 23:709-715.

WO 02/080648  
2300-1/007/40

PCT/US02/10869

Similarly, conformational epitopes are readily identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, e.g., x-ray crystallography and nuclear magnetic resonance. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols*, supra.

For purposes of the present invention, antigens can be derived from tumors  
5 and/or any of several known viruses, bacteria, parasites and fungi, as described more fully below. The term also intends any of the various tumor antigens or any other antigen to which an immune response is desired. Furthermore, for purposes of the present invention, an "antigen" refers to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature), to the native  
10 sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response, as defined herein. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts that produce the antigens.

An "immunological response" to an antigen or composition is the development  
15 in a subject of a humoral and/or a cellular immune response to an antigen present in the composition of interest. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" refers to an immune response mediated by antibody molecules, including secretory (IgA) or IgG molecules, while a "cellular immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells. One important aspect of cellular  
20 immunity involves an antigen-specific response by cytolytic T-cells ("CTL"s). CTLs have specificity for peptide antigens that are presented in association with proteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC) and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the destruction of intracellular microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity  
25 involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide antigens in association with MHC molecules on their surface. A "cellular immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells,  
30 including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. In addition, a chemokine response may be induced by various white blood or endothelial cells in response to an administered antigen.

WO 02/080648  
2500-1/00/1.40

PCT/US02/10869

A composition or vaccine that elicits a cellular immune response may serve to sensitize a vertebrate subject by the presentation of antigen in association with MHC molecules at the cell surface. The cell-mediated immune response is directed at, or near, cells presenting antigen at their surface. In addition, antigen-specific T-lymphocytes can be generated to allow for the future protection of an immunized host.

The ability of a particular antigen to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, or by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized subject. Such assays are well known in the art. See, e.g., Erickson et al., *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376. Recent methods of measuring cell-mediated immune response include measurement of intracellular cytokines or cytokine secretion by T-cell populations (e.g., by ELISPOT technique), or by measurement of epitope specific T-cells (e.g., by the tetramer technique)(reviewed by McMichael, A.J., and O'Callaghan, C.A., *J. Exp. Med.* 187(9):1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M.G., et al, *Immunol. Rev.* 150:5-21, 1996; Lalvani, A., et al, *J. Exp. Med.* 186:859-865, 1997).

Thus, an immunological response as used herein may be one that stimulates CTLs, and/or the production or activation of helper T- cells. The production of chemokines and/or cytokines may also be stimulated. The antigen of interest may also elicit an antibody-mediated immune response. Hence, an immunological response may include one or more of the following effects: the production of antibodies (e.g., IgA or IgG) by B-cells ; and/or the activation of suppressor, cytotoxic, or helper T-cells and/or  $\gamma\delta$  T-cells directed specifically to an antigen or antigens present in the composition or vaccine of interest. These responses may serve to neutralize infectivity, and/or mediate antibody-complement, or antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) to provide protection to an immunized host. Such responses can be determined using standard immunoassays and neutralization assays, well known in the art.

An "immunogenic composition" is a composition that comprises an antigenic molecule where administration of the composition to a subject results in the development in the subject of a humoral and/or a cellular immune response to the antigenic molecule of interest. The immunogenic composition can be introduced

WO 02/080648  
2000-1-001-40

PCT/US02/10869

directly into a recipient subject, such as by injection, inhalation, oral, intranasal or any other parenteral or mucosal (e.g. intra-rectally or intra-vaginally) route of administration.

By "subunit vaccine" is meant a vaccine composition that includes one or more selected antigens but not all antigens, derived from or homologous to, an antigen from a pathogen of interest such as from a virus, bacterium, parasite or fungus. Such a composition is substantially free of intact pathogen cells or pathogenic particles, or the lysate of such cells or particles. Thus, a "subunit vaccine" can be prepared from at least partially purified (preferably substantially purified) immunogenic polypeptides from the pathogen, or analogs thereof. The method of obtaining an antigen included in the subunit vaccine can thus include standard purification techniques, recombinant production, or synthetic production.

By "parenteral" is meant introduction into the body outside the digestive tract, such as by subcutaneous, intramuscular, transcutaneous, intradermal or intravenous administration. This is to be contrasted with delivery to a mucosal surface, such as oral, intranasal, vaginal or rectal. Thus, "mucosal" is meant introduction into the body via any mucosal surface, such as intranasally, orally, vaginally, rectally or the like.

By "co-administration" is meant introduction into a body or target cell of two or more compositions. The term includes administration in any order or concurrently.

The term "microparticle" as used herein, refers to a particle of about 100 nm to about 150  $\mu\text{m}$  in diameter, more preferably about 200 nm to about 30  $\mu\text{m}$  in diameter, and most preferably about 500 nm to about 10  $\mu\text{m}$  in diameter. Preferably, the microparticle will be of a diameter that permits parenteral administration without occluding needles and capillaries. Microparticle size is readily determined by techniques well known in the art, such as photon correlation spectroscopy, laser diffractometry and/or scanning electron microscopy.

Microparticles for use herein will be formed from materials that are sterilizable, non-toxic and biodegradable. Such materials include, without limitation, poly( $\alpha$ -hydroxy acid), polyhydroxybutyric acid, polycaprolactone, polyorthoester, polyanhydride. Preferably, microparticles for use with the present invention are derived from a poly( $\alpha$ -hydroxy acid), in particular, from a poly(lactide) ("PLA") or a copolymer of D,L-lactide and glycolide or glycolic acid, such as a poly(D,L-lactide-co-glycolide)

WO 02/080648  
2000-1-05/49

PCT/US02/10869

("PLG" or "PLGA"), or a copolymer of D,L-lactide and caprolactone. The microparticles may be derived from any of various polymeric starting materials that have a variety of molecular weights and, in the case of the copolymers such as PLG, a variety of lactide:glycolide ratios, the selection of which will be largely a matter of choice, depending in part on the co administered antigen. These parameters are discussed more fully below.

An "immuno-modulatory factor" refers to a molecule, for example a protein that is capable of modulating (particularly enhancing) an immune response. Non-limiting examples of immunomodulatory factors include lymphokines (also known as cytokines), such as IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-3, etc.); and chemokines (e.g., secreted proteins such as macrophage inhibiting factor). Certain cytokines, for example TRANCE, flt-3L, and a secreted form of CD40L are capable of enhancing the immunostimulatory capacity of APCs. Non-limiting examples of cytokines which may be used alone or in combination in the practice of the present invention include, interleukin-2 (IL-2), stem cell factor (SCF), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), G-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), interleukin-11 (IL-11), MIP-1 $\gamma$ , leukemia inhibitory factor (LIF), c-kit ligand, thrombopoietin (TPO), CD40 ligand (CD40L), tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE) and flt3 ligand (flt-3L). Cytokines are commercially available from several vendors such as, for example, Genzyme (Framingham, MA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems and Immunex (Seattle, WA). The sequences of many of these molecules are also available, for example, from the GenBank database. It is intended, although not always explicitly stated, that molecules having similar biological activity as wild-type or purified cytokines (e.g., recombinantly produced or mutants thereof) and nucleic acid encoding these molecules are intended to be used within the spirit and scope of the invention. Immunomodulatory factors can be included with one, some or all of the compositions described herein or can be employed as separate formulations.

By "subject" is meant any member of the subphylum chordata, including, without limitation, humans and other primates, including non-human primates such as chimpanzees and other apes and monkey species; farm animals such as cattle, sheep, pigs, goats and horses; domestic mammals such as dogs and cats; laboratory animals

WO 02/080648  
2,500-1,766/40

PCT/US02/10869

including rodents such as mice, rats and guinea pigs; birds, including domestic, wild and game birds such as chickens, turkeys and other gallinaceous birds, ducks, geese, and the like. The term does not denote a particular age. Thus, both adult and newborn individuals are intended to be covered. The system described above is intended for use in any of the above vertebrate species, since the immune systems of all of these vertebrates operate similarly.

By "vertebrate subject" is meant any member of the subphylum cordata, including, without limitation, mammals such as cattle, sheep, pigs, goats, horses, and humans; domestic animals such as dogs and cats; and birds, including domestic, wild and game birds such as cocks and hens including chickens, turkeys and other gallinaceous birds. The term does not denote a particular age. Thus, both adult and newborn animals are intended to be covered.

By "pharmaceutically acceptable" or "pharmacologically acceptable" is meant a material which is not biologically or otherwise undesirable, i.e., the material may be administered to an individual in a formulation or composition without causing any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the components of the composition in which it is contained.

The terms "effective amount" or "pharmaceutically effective amount" of a macromolecule and/or microparticle, as provided herein, refer to a nontoxic but sufficient amount of the macromolecule and/or microparticle to provide the desired response, such as an immunological response, and corresponding therapeutic effect, or in the case of delivery of a therapeutic protein, an amount sufficient to effect treatment of the subject, as defined below. As will be pointed out below, the exact amount required will vary from subject to subject, depending on the species, age, and general condition of the subject, the severity of the condition being treated, and the particular macromolecule of interest, mode of administration, and the like. An appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

By "pharmaceutically acceptable" or "pharmacologically acceptable" is meant a material which is not biologically or otherwise undesirable, i.e., the material may be administered to an individual along with the microparticle formulation without causing

WO 02/080648  
2300-17667.40

PCT/US02/10869

any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the components of the composition in which it is contained.

By "physiological pH" or a "pH in the physiological range" is meant a pH in the range of approximately 7.2 to 8.0 inclusive, more typically in the range of  
5 approximately 7.2 to 7.6 inclusive.

As used herein, "treatment" refers to any of (i) the prevention of infection or reinfection, as in a traditional vaccine, (ii) the reduction or elimination of symptoms, and (iii) the substantial or complete elimination of the pathogen or disorder in question. Treatment may be effected prophylactically (prior to infection) or therapeutically  
10 (following infection).

#### A. ANTIGENS

The parenteral prime-mucosal boost methods described herein can involve parenteral and mucosal administration of one or more antigens (or polynucleotides  
15 encoding these antigens). For purposes of the present invention, virtually any polypeptide or polynucleotide can be used. Antigens can be derived from any of several known viruses, bacteria, parasites and fungi, as well as any of the various tumor antigens or any other antigen to which an immune response is desired. Furthermore, for purposes of the present invention, an "antigen" refers to a protein that includes  
20 modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts that produce the antigens. Antigens that are particularly useful in the practice of the present  
25 invention include polypeptide antigens derived from pathogens that infect or are transmitted through mucosal surfaces. Non-limiting representative examples of pathogens transmitted through mucosal surfaces and antigens derived therefrom include antigens derived from bacterial pathogens (e.g., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactia*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, chlamydia, gonorrhea and syphilis), viral pathogens (e.g., Human Immunodeficiency Virus ("HIV"), Hepatitis  
30 B and C Virus ("HBV" and "HCV", respectively), Human Papiloma Virus ("HPV"), Herpes Simplex Virus ("HSV"), and the like), as well as parasitic, fungal and cancer

WO 02/080648  
2300-1/001-40

PCT/US02/10869

antigens. For a discussion of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*, see Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389; Read et al. (2000) *Nucleic Acids Research* 28:1397-1406; Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl.3):S524-S527; WO 99/27105; WO 00/27994; WO 00/37494; WO 99/28457.

5 As utilized within the context of the present invention, "immunogenic portion" refers to a portion of the respective antigen that is capable, under the appropriate conditions, of causing an immune response (*i.e.*, cell-mediated or humoral). "Portions" may be of variable size, but are preferably at least 9 amino acids long, and may include the entire antigen. Cell-mediated immune responses may be mediated through Major  
10 Histocompatibility Complex ("MHC") class I presentation, MHC Class II presentation, or both. As will be evident to one of ordinary skill in the art, various immunogenic portions of the antigens described herein may be combined in order to induce an immune response when administered as described herein.

Furthermore, the immunogenic portion(s) may be of varying length, although it  
15 is generally preferred that the portions be at least 9 amino acids long and may include the entire antigen. Immunogenicity of a particular sequence is often difficult to predict, although T cell epitopes may be predicted utilizing computer algorithms such as TSITES (MedImmune, Maryland), in order to scan coding regions for potential T-helper sites and CTL sites. From this analysis, peptides are synthesized and used as  
20 targets in an *in vitro* cytotoxic assay. Other assays, however, may also be utilized, including, for example, ELISA, which detects the presence of antibodies against the newly introduced vector, as well as assays which test for T helper cells, such as gamma-interferon assays, IL-2 production assays and proliferation assays.

Immunogenic portions of any antigen may also be selected by other methods.  
25 For example, the HLA A2.1 transgenic mouse has been shown to be useful as a model for human T-cell recognition of viral antigens. Briefly, in the influenza and hepatitis B viral systems, the murine T cell receptor repertoire recognizes the same antigenic determinants recognized by human T cells. In both systems, the CTL response generated in the HLA A2.1 transgenic mouse is directed toward virtually the same  
30 epitope as those recognized by human CTLs of the HLA A2.1 haplotype (Vitiello et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:1007-1015; Vitiello et al. (1992) *Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia*).

WO 02/080648  
2300-1/007.40

PCT/US02/10869

Additional immunogenic portions may be obtained by truncating the coding sequence at various locations including, for example, to include one or more epitopes from the various regions, for example, of the HIV genome or one or more MenB epitopes. As noted above, such domains include structural domains such as *Gag*, *Gag-polymerase*, *Gag-protease*, *reverse transcriptase (RT)*, *integrase (IN)* and *Env*. The structural domains are often further subdivided into polypeptides, for example, p55, p24, p6 (*Gag*); p160, p10, p15, p31, p65 (*pol*, *prot*, *RT and IN*); and gp160, gp120 and gp41 (*Env*). Additional epitopes of HIV and other sexually transmitted diseases are known or can be readily determined using methods known in the art. Also included in the invention are molecular variants of such polypeptides, for example as described in PCT/US99/31245; PCT/US99/31273 and PCT/US99/31272.

Antigens may be used alone or in any combination. (See, e.g., WO 02/00249 describing the use of combinations of bacterial antigens). The combinations may include multiple antigens from the same pathogen, multiple antigens from different pathogens or multiple antigens from the same and from different pathogens. Thus, bacterial, viral, tumor and/or other antigens may be included in the same composition or may be administered to the same subject separately. It is generally preferred that combinations of antigens be used to raise an immune response be used in combinations. Immunization against multiple pathogens or antigens is advantageous, both for parenteral delivery (where the number of administrations is reduced) but it is less important in mucosal vaccines (e.g. intranasal vaccines) and for mucosal delivery because patient compliance is improved and transport/storage of medicines is facilitated. Furthermore, the immunization(s) as described herein can be used either prophylactically or therapeutically.

25

#### 1. Antigens derived from Bacteria

The invention described herein will also find use with numerous bacterial antigens, such as those derived from organisms that cause diphtheria (See, e.g., Chapter 3 of *Vaccines*, 1998, eds. Plotkin & Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0), staphylococcus (e.g., *Staphylococcus aureus* as described in Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357:1225-1240), cholera, tuberculosis, *C. tetani*, also known as tetanus (See, e.g., Chapter 4 of *Vaccines*, 1998, eds. Plotkin & Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0), Group A and Group B

30

WO 02/080648  
2000-1007-20

PCT/US02/10869

streptococcus (including *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pyogenes* as described, for example, in Watson et al. (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:331-332; Rubin et al. (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:269-284; Jedrzejewski et al. (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:187-207; Schuchat (1999) *Lancet* 5 353:51-56; GB patent applications 0026333.5; 0028727.6; 015640.7; Dale et al. (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:227-243; Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98:4658-4663), pertussis (See, e.g., Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355; Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238), meningitis, *Moraxella catarrhalis* (See, e.g., McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl. 1:S101-107) and other pathogenic states, 10 including, without limitation, *Neisseria meningitidis* (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae* (See, e.g., WO 99/24578; WO 99/36544; and WO 99/57280), *Helicobacter pylori* (e.g., CagA, VacA, NAP, HopX, HopY and/or urease as described, for example, WO 93/18150; WO 99/53310; WO 98/04702) and *Haemophilus influenzae*. *Haemophilus influenzae* type B (HIB) (See, e.g., Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263), 15 *Porphyromonas gingivalis* (Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4132) and combinations thereof.

Examples of antigens from *Neisseria Meningitidis* A, B and C are disclosed in the following co-owned patent applications: PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; PCT IB99/00103; WO 00/66791; WO 99/24578; WO 00/71574; WO 99/36544; WO 20 01/04316; WO 99/57280; WO 01/31019; WO 00/22430; WO 00/66741; WO 00/71725; WO 01/37863; WO 01/38350; WO 01/52885; WO 01/64922; WO 01/64920; WO 96/29412; and WO 00/50075.

The complete genomic sequence of MenB, strain MC58, has been described. Tettelin et al., *Science* (2000) 287:1809. Several proteins that elicited serum 25 bactericidal antibody responses have been identified by whole genome sequencing. For example, immunogenic compositions can include an outer-membrane vesicle (OMV) preparation from *N. meningitidis* serogroup B, such as those disclosed in Bjune et al. (1991) *Lancet* 338:1093-1096; Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958; Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333) or a saccharide antigen *N. meningitidis* serogroup A, C, W135 and/or Y (See, e.g., Costantino et al. (1992) *Vaccine* 30 10:691-698; Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:1251-1263. Many proteins from these pathogens have conserved sequences and appear to be surface-exposed on encapsulated

WO 02/080648  
2000-1-19/1-99

PCT/US02/10869

MenB strains. Pizza et al., *Science* (2000) 287:1816. One of these proteins is GNA33 (genome derived antigen). GNA33 is a lipoprotein and the predicted amino acid sequence shows homology with a membrane-bound lytic murein transglycosylase (MltA) from *E. coli* and *Synechocystis* sp. Lommatsch et al., *J. Bacteriol.* (1997) 179:5465-5470. GNA33 is highly conserved among *Neisseria meningitidis*. Pizza et al., *Science* (2000) 287:1816. Mice immunized with recombinant GNA33 developed high serum bactericidal antibody titers measured against encapsulated MenB strain 2996. The magnitude of the antibody response was similar to that of control animals immunized with OMP vesicles prepared from strain 2996. However, the mechanism by which GNA33 elicits protective antibody was not identified, nor was the breadth of the protective response to different MenB strains.

In certain embodiments, one or more antigens derived from a capsular saccharide are used. Non-limiting examples of such suitable saccharide antigens include those derived from *S.pneumoniae*, *H.influenzae* and *N.meningitidis*. MenC oligosaccharide antigens conjugated to carrier proteins are described, for example, in U.S. Patent No. 6,251,401; International Publications WO 00/71725 and WO 01/37863. Saccharide antigens from these and other pathogens are known, as is the preparation of polysaccharide conjugates in general. The saccharide moiety of the conjugate may be a polysaccharide (e.g. full-length polyribosylribitol phosphate (PRP)) or hydrolysed polysaccharides (e.g. by acid hydrolysis) in order to form oligosaccharides (e.g. MW from ~1 to ~5 kDa). If hydrolysis is performed, the hydrolysate may be sorted by size in order to remove oligosaccharides that are too short to be usefully immunogenic. Size-separated oligosaccharides are preferred saccharide antigens. Conjugation of saccharides to carriers such as CRM is described, for example, in Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698

It is to be understood that antigens derived from more than one pathogen and/or more than one serotype of a particular bacterium can be used in the preparation of immunogenic compositions. Prevnar™, for example, includes seven antigens (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) derived from approximately 23 serotypes of *S. pneumoniae*.

WO 02/080648  
2000-1007-40

PCT/US02/10869

## 2. Antigen derived from Viruses

Non-limiting examples of viruses that may be transmitted via mucosal surfaces include meningitis, rhinovirus, influenza, respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus (PIV), and the like. For example, the present invention will find use for stimulating an immune response against a wide variety of proteins from the herpesvirus family, including proteins derived from herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2, such as HSV-1 and HSV-2 glycoproteins gB, gD and gH; antigens derived from varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) including CMV gB and gH; and antigens derived from other human herpesviruses such as HHV6 and HHV7. (See, e.g. Chee et al., *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, for a review of the protein coding content of cytomegalovirus; McGeoch et al., *J Gen. Virol.* (1988) 69:1531-1574, for a discussion of the various HSV-1 encoded proteins; U.S. Patent No. 5,171,568 for a discussion of HSV-1 and HSV-2 gB and gD proteins and the genes encoding therefor; Baer et al., *Nature* (1984) 310:207-211, for the identification of protein coding sequences in an EBV genome; and Davison and Scott, *J Gen. Virol.* (1986) 67:1759-1816, for a review of VZV.)

Antigens from the hepatitis family of viruses, including hepatitis A virus (HAV) (See, e.g., Bell et al. (2000) *Pediatr Infect Dis. J.* 19:1187-1188; Ivarson (1995) *APMIS* 103:321-326), hepatitis B virus (HBV) (See, e.g., Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80), hepatitis C virus (HCV), the delta hepatitis virus (HDV), hepatitis E virus (HEV) and hepatitis G virus (HGV), can also be conveniently used in the techniques described herein. By way of example, the viral genomic sequence of HCV is known, as are methods for obtaining the sequence. See, e.g., International Publication Nos. WO 89/04669; WO 90/11089; and WO 90/14436. The HCV genome encodes several viral proteins, including E1 (also known as E) and E2 (also known as E2/NSI) and an N-terminal nucleocapsid protein (termed "core") (see, Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14:381-388, for a discussion of HCV proteins, including E1 and E2). Each of these proteins, as well as antigenic fragments thereof and/or nucleic acids encoding the proteins, will find use in the present invention.

Similarly, the sequence for the  $\delta$ -antigen from HDV is known (see, e.g., U.S. Patent No. 5,378,814) and this antigen can also be conveniently used in the present

WO 02/080648  
2300-1/00/40

PCT/US02/10869

invention. Additionally, antigens derived from HBV, such as the core antigen, the surface antigen, sAg, as well as the presurface sequences, pre-S1 and pre-S2 (formerly called pre-S), as well as combinations of the above, such as sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2, and pre-S1/pre-S2, will find use herein. See, e.g., "HBV

- 5 Vaccines—from the laboratory to license: a case study" in Mackett, M. and Williamson, J.D., *Human Vaccines and Vaccination*, pp. 159-176, for a discussion of HBV structure; and U.S. Patent Nos. 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513; Beames et al., *J. Virol.* (1995) 69:6833-6838, Birnbaum et al., *J. Virol.* (1990) 64:3319-3330; and Zhou et al., *J. Virol.* (1991) 65:5457-5464.
- 10 More particularly, the gp120 envelope proteins from any of the above HIV isolates, including members of the various genetic subtypes of HIV, are known and reported (see, e.g., Myers et al., *Los Alamos Database*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers et al., *Human Retroviruses and Aids*, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; and
- 15 Modrow et al., *J. Virol.* (1987) 61:570-578, for a comparison of the envelope sequences of a variety of HIV isolates) and antigens derived from any of these isolates will find use in the present methods. Furthermore, the invention is equally applicable to other immunogenic proteins derived from any of the various HIV isolates, including any of the various envelope proteins such as gp160 and gp41, gag antigens such as p24gag and
- 20 p55gag, as well as proteins derived from the pol region.

In addition, due to the large immunological variability that is found in different geographic regions for the open reading frame of HIV, particular combinations of antigens may be preferred for administration in particular geographic regions. Briefly, at least eight different subtypes of HIV have been identified and, of these, subtype B

25 viruses are more prevalent in North America, Latin America and the Caribbean, Europe, Japan and Australia. Almost every subtype is present in sub-Saharan Africa, with subtypes A and D predominating in central and eastern Africa, and subtype C in southern Africa. Subtype C is also prevalent in India and it has been recently identified in southern Brazil. Subtype E was initially identified in Thailand, and is also present in

30 the Central African Republic. Subtype F was initially described in Brazil and in Romania. The most recent subtypes described are G, found in Russia and Gabon, and subtype H, found in Zaire and in Cameroon. Group O viruses have been identified in

WO 02/080648  
2000-11-09/11-09

PCT/US02/10869

Cameroon and also in Gabon. Thus, as will be evident to one of ordinary skill in the art, it is generally preferred to construct a vector for administration that is appropriate to the particular HIV subtype that is prevalent in the geographical region of administration. Subtypes of a particular region may be determined by two-dimensional  
5 double immunodiffusion or, by sequencing the HIV genome (or fragments thereof) isolated from individuals within that region.

As described above, also presented by HIV are various *Gag* and *Env* antigens. HIV-1 *Gag* proteins are involved in many stages of the life cycle of the virus including, assembly, virion maturation after particle release, and early post-entry steps in virus  
10 replication. The roles of HIV-1 *Gag* proteins are numerous and complex (Freed, E.O. (1998) *Virology* 251:1-15).

*Env* coding sequences of the present invention include, but are not limited to, polynucleotide sequences encoding the following HIV-encoded polypeptides: gp160, gp140, and gp120 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,792,459 for a description of the HIV-1<sub>SP2</sub>  
15 ("SF2") Env polypeptide). The envelope protein of HIV-1 is a glycoprotein of about 160 kD (gp160). During virus infection of the host cell, gp160 is cleaved by host cell proteases to form gp120 and the integral membrane protein, gp41. The gp41 portion is anchored in (and spans) the membrane bilayer of virion, while the gp120 segment protrudes into the surrounding environment. As there is no covalent attachment  
20 between gp120 and gp41, free gp120 is released from the surface of virions and infected cells. Thus, gp160 includes the coding sequences for gp120 and gp41. The polypeptide gp41 is comprised of several domains including an oligomerization domain (OD) and a transmembrane spanning domain (TM). In the native envelope, the oligomerization domain is required for the non-covalent association of three gp41 polypeptides to form  
25 a trimeric structure: through non-covalent interactions with the gp41 trimer (and itself), the gp120 polypeptides are also organized in a trimeric structure. A cleavage site (or cleavage sites) exists approximately between the polypeptide sequences for gp120 and the polypeptide sequences corresponding to gp41. This cleavage site(s) can be mutated to prevent cleavage at the site. The resulting gp140 polypeptide corresponds to a  
30 truncated form of gp160 where the transmembrane spanning domain of gp41 has been deleted. This gp140 polypeptide can exist in both monomeric and oligomeric (*i.e.* trimeric) forms by virtue of the presence of the oligomerization domain in the gp41

WO 02/080648  
2002-1001-90

PCT/US02/10869

moiety and oligomeric form may be designed "o," for example "ogp140" refers to oligomeric gp140. In the situation where the cleavage site has been mutated to prevent cleavage and the transmembrane portion of gp41 has been deleted the resulting polypeptide product can be designated "mutated" gp140. As will be apparent to those  
5 in the field, the cleavage site can be mutated in a variety of ways. (See, also, WO 00/39302).

Influenza virus is another example of a virus for which the present invention will be particularly useful. Specifically, the envelope glycoproteins HA and NA of influenza A are of particular interest for generating an immune response. Numerous  
10 HA subtypes of influenza A have been identified (Kawaoka et al., *Virology* (1990) 179:759-767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168. In: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, New York). Thus, proteins derived from any of these isolates can also be used in the compositions and methods described herein.

15 Antigen derived from other viruses will also find use in the present invention, such as without limitation, proteins from members of the families Picornaviridae (e.g., polioviruses, etc. as described, for example, in Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308; Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118; 125-126); Caliciviridae; Togaviridae (e.g., rubella virus, dengue virus, etc.); the family  
20 Flaviviridae, including the genera flavivirus (e.g., yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, serotypes of Dengue virus, tick borne encephalitis virus, West Nile virus); pestivirus (e.g., classical porcine fever virus, bovine viral diarrhea virus, border disease virus); and hepacivirus (e.g., hepatitis A, B and C as described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,702,909; 5,011,915; 5,698,390; 6,027,729; and 6,297,048);  
25 Parvovirus (e.g., parvovirus B19); Coronaviridae; Reoviridae; Bimaviridae; Rhabdoviridae (e.g., rabies virus, etc. as described for example in Dressen et al. (1997) *Vaccine* 15 Suppl:s2-6; MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1998 Jan 16:47(1):12, 19); Filoviridae; Paramyxoviridae (e.g., mumps virus, measles virus, rubella, respiratory syncytial virus, etc. as described in Chapters 9 to 11 of *Vaccines*, 1998, eds. Plotkin &  
30 Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0); Orthomyxoviridae (e.g., influenza virus types A, B and C, etc. as described in Chapter 19 of *Vaccines*, 1998, eds. Plotkin & Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0),); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (e.g., HTLV-1;

WO 02/080648  
2000-1-09/00

PCT/US02/10869

HTLV-11; HIV-1 (also known as HTLV-III, LAV, ARV, HTLR, etc.), including but not limited to antigens from the isolates HIV<sub>IIIb</sub>, HIVSF2, HIVLAV, HIV-AL, I-IIVMN); HIV-1 CM235, HIV-1 IJS4; HIV-2; simian immunodeficiency virus (SIV) among others. Additionally, antigens may also be derived from human papilloma virus (HPV) and the tick-borne encephalitis viruses. See, e.g. *Virology*, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds, 1991), for a description of these and other viruses.

In certain embodiments, one or more of the antigens are derived from HIV. The genes of HIV are located in the central region of the proviral DNA and encode at least nine proteins divided into three major classes: (1) the major structural proteins, Gag, Pol, and Env; (2) the regulatory proteins, Tat and Rev and (3) the accessory proteins, Vpu, Vpr, Vif, and Nef. Although exemplified herein with relation to antigens obtained from HIV<sub>SF2</sub>, sequence obtained from other HIV variants may be manipulated in similar fashion following the teachings of the present specification. Such other variants include, but are not limited to, Gag protein encoding sequences obtained from the isolates HIV<sub>IIIb</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV-1<sub>SF102</sub>, HIV-1<sub>SF170</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>LA1</sub>, HIV<sub>MN</sub>, HIV-1<sub>CM235</sub>, HIV-1<sub>USA</sub>, other HIV-1 strains from diverse subtypes (e.g., subtypes, A through G, and O), HIV-2 strains and diverse subtypes (e.g., HIV-2<sub>UC1</sub> and HIV-2<sub>UC2</sub>), and simian immunodeficiency virus (SIV). (See, e.g., *Virology*, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991); *Virology*, 3rd Edition (Fields, BN, DM Knipe, PM Howley, Editors, 1996, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA; for a description of these and other related viruses).

Examples of parasitic antigens include those derived from organisms causing malaria and Lyme disease.

25

### 3. Tumor Antigens

A variety to tumor antigens have been identified. See, e.g., Moingeon, *supra* and Rosenberg, *supra*. Non-limiting examples of tumor antigens include antigens recognized by CD8+ lymphocytes (e.g., melanoma-melanocyte differentiation antigens such as MART-1, gp100, tyrosinase, tyrosinase related protein-1, tyrosinase related protein-2, melanocyte-stimulating hormone receptor; mutated antigens such as beta-catenin, MUM-1, CDK-4, caspase-8, KTA 0205, HLA-A2-R1701; cancer-testes

WO 02/080648  
2300-1/06/00

PCT/US02/10869

antigens such as MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE and NY-ESO-1; and non-mutated shared antigens over expressed on cancer such as alpha-fetoprotein, telomerase catalytic protein, G-250, MUC-1, carcinoembryonic antigen, p53, Her-2-neu) as well as antigens recognized by CD4+ lymphocytes (e.g., gp100, MAGE-1, MAGE-3, tyrosinase, NY-ESO-1, triosephosphate isomerase, CDC-27, and LDLR-FUT). See, also, WO 91/02062, U.S. Patent No. 6,015,567, WO 01/08636, WO 96/30514, U.S. Patent No. 5,846,538 and U.S. Patent No. 5,869,445.

In certain embodiments, the tumor antigen(s) are derived from mutated or altered cellular components. After alteration, the cellular components no longer perform their regulatory functions, and hence the cell may experience uncontrolled growth. Representative examples of altered cellular components include ras, p53, Rb, altered protein encoded by the Wilms' tumor gene, ubiquitin, mucin, protein encoded by the DCC, APC, and MCC genes, as well as receptors or receptor-like structures such as neu, thyroid hormone receptor, platelet derived growth factor (PDGF) receptor, insulin receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor, and the colony stimulating factor (CSF) receptor. These as well as other cellular components are described for example in U.S. Patent No. 5,693,522 and references cited therein.

#### 4. Polypeptide Preparation

The antigens in the immunogenic compositions will typically be in the form of proteins. As an alternative to protein-based vaccination, the antigens in the immunogenic compositions may be in the form of nucleic acid molecules or polynucleotides.

Thus, polypeptide antigens can be constructed by solid phase protein synthesis. If desired, the polypeptides also can contain other amino acid sequences, such as amino acid linkers or signal sequences, as well as ligands useful in protein purification, such as glutathione-S-transferase and staphylococcal protein A. Alternatively, antigens of interest can be purchased from commercial sources.

Polypeptides can also be produced from nucleic acids encoding the desired polypeptide. Sequences encoding the polypeptide of interest can be generated by the polymerase chain reaction (PCR). Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350; *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis et al (eds) Harcourt Brace

WO 02/080648  
2002-1007-49

PCT/US02/10869

Jovanovich Publishers, NY (1994)). This technique uses DNA polymerase, usually a thermostable DNA polymerase, to replicate a desired region of DNA. The region of DNA to be replicated is identified by oligonucleotides of specified sequence complementary to opposite ends and opposite strands of the desired DNA to prime the replication reaction. Repeated successive cycles of replication result in amplification of the DNA fragment delimited by the primer pair used. A number of parameters influence the success of a reaction. Among them are annealing temperature and time, extension time, Mg<sup>2+</sup> and ATP concentration, pH, and the relative concentration of primers, templates, and deoxyribonucleotides.

Once coding sequences for desired proteins have been prepared or isolated, such sequences can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Ligations to other sequences are performed using standard procedures, known in the art.

Similarly, the selected coding sequences can be cloned into any suitable expression vector for expression. The expressed product can optionally be purified prior to mucosal administration. Briefly, a polynucleotide encoding these proteins can be introduced into an expression vector that can be expressed in a suitable expression system. A variety of bacterial, yeast, mammalian, insect and plant expression systems are available in the art and any such expression system can be used. Optionally, a polynucleotide encoding these proteins can be translated in a cell-free translation system. Such methods are well known in the art.

#### B. DELIVERY

The compositions (*e.g.*, polynucleotides and/or polypeptides) described herein can be delivered using any suitable means (*e.g.*, intravenously, intramuscularly, intraperitoneally, subcutaneously, transcutaneously for parenteral priming and orally, rectally, intraocularly, or intranasally for mucosal boosting), or by various physical methods such as lipofection (Felgner et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417), direct DNA injection (Acsadi et al. (1991) *Nature* 352:815-818); microprojectile bombardment (Williams et al. (1991) *PNAS* 88:2726-2730); liposomes of several types (*see, e.g.*, Wang et al. (1987) *PNAS* 84:7851-7855); CaPO<sub>4</sub> (Dubensky et al. (1984)

WO 02/080648  
2300-1/007.40

PCT/US02/10869

- PNAS 81:7529-7533); DNA ligand (Wu et al (1989) *J. of Biol. Chem.* 264:16985-16987); administration of polypeptides alone; administration of nucleic acids alone (WO 90/11092); or administration of DNA linked to killed adenovirus (Curiel et al. (1992), *Hum. Gene Ther.* 3:147-154); via polycation compounds such as polylysine, 5 utilizing receptor specific ligands; as well as with psoralen inactivated viruses such as Sendai or Adenovirus. Transcutaneous administration may include the use of a penetration enhancer, a barrier disruption agent or combinations thereof. See, e.g., WO 99/43350. In addition, the administration may either be administered directly (*i.e.*, *in vivo*), or to cells that have been removed (*ex vivo*), and subsequently returned.
- 10 In a preferred embodiment, the invention provides a method for raising an immune response in a mammal by parenterally administering at least one first immunogenic composition and subsequently administering at least one second immunogenic composition mucosally. In other words, the invention includes a parenteral prime followed by a mucosal boost.
- 15 Methods of parenteral administration of polynucleotides and/or polypeptides are well known and include, for example, (1) direct injection into the blood stream (*e.g.*, intravenous administration); (2) direct injection into a specific tissue or tumor; (3) subcutaneous administration; (4) transcutaneous epidermal administration; (5) intradermal administration; (6) intraperitoneal administration; and/or (7) intramuscular 20 administration. Other modes of parenteral administration include pulmonary administration, suppositories, needle-less injection, transcutaneous and transdermal applications. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule. As noted above, administration of nucleic acids may also be combined with administration of peptides or other substances.
- 25 Similarly, methods of mucosal delivery are known in the art, for example as described in *Remington's, supra* and includes nasal, rectal, oral and vaginal delivery. Delivery of the compositions rectally and vaginally is particularly preferred in the case of sexually transmitted pathogens, as this mode of administration provides access to the cells first exposed to the pathogens. Similarly, intranasal administration may be 30 preferred in diseases, like rhinovirus, that infect through nasal mucosa. In some instances, intranasal administration may induce immunity in the vaginal mucosa and oral immunization may induce immunity in the rectal mucosa. Moreover, combinations

WO 02/080648  
2300-1/06/40

PCT/US02/10869

of various routes of mucosal administration and/or various routes of systemic administration can be used in order to induce optimal immunity and protection (both at the site the pathogen enters as well as at systemic sites where a mucosal pathogen has spread to. Additionally, mucosal administration eliminates the need for syringes or other administration devices. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule.

The compositions disclosed herein can be administered alone or can be administered with one or more additional macromolecules (e.g., gene delivery vehicles, immunomodulatory factors, adjuvants, and/or one or more proteins). In such embodiments, the multiple compositions can be administered in any order, for example gene delivery vehicle followed by protein; multiple gene delivery vehicles followed by multiple protein administrations; protein administration(s) followed by single or multiple gene delivery vehicle administration; concurrent administration; and the like. Thus, a mixture of protein and nucleic acid can be administered, using the same or different vehicles and the same or different modes of administration.

The interval between priming and boosting will vary according to factors such as the age of the patient and the nature of the composition and these factors can be assessed by a physician. Administration of the first priming and boosting doses is generally separated by at least 2 weeks, typically at least 4 weeks. The methods of the invention may comprise more than one parenteral priming dose and/or more than one boosting dose, e.g., two or more priming doses followed by two or more mucosal booster doses. (see, Example 4 below, describing a "memory" boost 18 months after the initial prime-boost). The term "memory" boost refers to any boosting dose given after the initial boost. The time at which the "memory" boost is administered can vary from hours (e.g., 1 to 72 hours or any timepoint therebetween) or days (e.g., 1 to 90 days or any timepoint therebetween) to months (e.g., 1 to 36 months or any timepoint therebetween) or even years after the initial boost. More than one memory boost may be administered at the same or varying time intervals with respect to each other. Identical or different immunogenic compositions may be used for each priming dose. Priming and boosting doses may be therefore distinguished by the route of administration, rather than by their timing.

WO 02/080648  
2300-1/06/40

PCT/US02/10869

The mammal to whom the compositions are administered is typically primate, such as a human. The human may be a child or an adult. Suitable lower mammals may include mice.

In certain embodiments, direct delivery will generally be accomplished with or without viral vectors, as described above, by injection using either a conventional syringe or a gene gun, such as the Accell® gene delivery system (Powderject Technologies, Inc., Oxford, England).

10

#### 1. Microparticles

In certain embodiments, one or more of the selected antigens are entrapped in, or adsorbed to, a microparticle for subsequent delivery. Biodegradable polymers for manufacturing microparticles useful in the present invention are readily commercially available from, e.g., Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. For example, useful polymers for forming the microparticles herein include those derived from polyhydroxybutyric acid; polycaprolactone; polyorthoester; polyanhydride; as well as a poly( $\alpha$ -hydroxy acid), such as poly(L-lactide), poly(D,L-lactide) (both known as "PLA" herein), poly(hydroxybutyrate), copolymers of D,L-lactide and glycolide, such as poly(D,L-lactide-co-glycolide) (designated as "PLG" or "PLGA" herein) or a copolymer of D,L-lactide and caprolactone. Particularly preferred polymers for use herein are PLA and PLG polymers. These polymers are available in a variety of molecular weights, and the appropriate molecular weight for a given antigen is readily determined by one of skill in the art. Thus, e.g., for PLA, a suitable molecular weight will be on the order of about 2000 to 250,000. For PLG, suitable molecular weights will generally range from about 10,000 to about 200,000, preferably about 15,000 to about 150,000, and most preferably about 50,000 to about 100,000.

If a copolymer such as PLG is used to form the microparticles, a variety of lactide:glycolide ratios will find use herein and the ratio is largely a matter of choice, depending in part on the co administered antigen and the rate of degradation desired. For example, a 50:50 PLG polymer, containing 50% D,L-lactide and 50% glycolide, will provide a fast resorbing copolymer while 75:25 PLG degrades more slowly, and

WO 02/080648  
2300-17667/40

PCT/US02/10869

85:15 and 90:10, even more slowly, due to the increased lactide component. It is readily apparent that a suitable ratio of lactide:glycolide is easily determined by one of skill in the art based on the nature of the antigen and disorder in question. Moreover, mixtures of microparticles with varying lactide:glycolide ratios will find use in the formulations in order to achieve the desired release kinetics for a given antigen and to provide for both a primary and secondary immune response. Degradation rate of the microparticles of the present invention can also be controlled by such factors as polymer molecular weight and polymer crystallinity. PLG copolymers with varying lactide:glycolide ratios and molecular weights are readily available commercially from a number of sources including from Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. These polymers can also be synthesized by simple polycondensation of the lactic acid component using techniques well known in the art, such as described in Tabata et al., *J. Biomed. Mater. Res.* (1988) 22:837-858.

The antigen/microparticles are prepared using any of several methods well known in the art. For example, double emulsion/solvent evaporation techniques, such as described in U.S. Patent No. 3,523,907 and Ogawa et al., *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103, can be used herein to form the microparticles. These techniques involve the formation of a primary emulsion consisting of droplets of polymer solution containing the antigen (if antigen is to be entrapped in the microparticle), which is subsequently mixed with a continuous aqueous phase containing a particle stabilizer/surfactant.

More particularly, a water-in-oil-in-water (w/o/w) solvent evaporation system can be used to form the microparticles, as described by O'Hagan et al., *Vaccine* (1993) 11:965-969; Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362 and PCT/US99/17308 (WO 00/06133). In this technique, the particular polymer is combined with an organic solvent, such as ethyl acetate, dimethylchloride (also called methylene chloride and dichloromethane), acetonitrile, acetone, chloroform, and the like. The polymer will be provided in about a 2-15%, more preferably about a 4-10% and most preferably, a 6% solution, in organic solvent. An approximately equal amount of an antigen solution, e.g., in water, is added and the polymer/antigen solution emulsified using e.g., an homogenizer. The emulsion is then combined with a larger volume of an aqueous solution of an emulsion stabilizer such as polyvinyl alcohol (PVA) or polyvinyl

WO 02/080648  
2000-1007-40

PCT/US02/10869

pyrrolidone. The emulsion stabilizer is typically provided in about a 2-15% solution, more typically about a 4-10% solution. The mixture is then homogenized to produce a stable w/o/w double emulsion. Organic solvents are then evaporated.

The formulation parameters can be manipulated to allow the preparation of  
5 small (<5 $\mu$ m) and large (>30 $\mu$ m) microparticles. See, e.g., Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362-368; McGee et al., *J. Microencap.* (1996). For example, reduced agitation results in larger microparticles, as does an increase in internal phase volume. Small particles are produced by low aqueous phase volumes with high concentrations of PVA.

10 Microparticles can also be formed using spray-drying and coacervation as described in, e.g., Thomasin et al., *J. Controlled Release* (1996) 41:131; U.S. Patent No. 2,800,457; Masters, K. (1976) *Spray Drying* 2nd Ed. Wiley, New York; air-suspension coating techniques, such as pan coating and Wurster coating, as described by Hall et al., (1980) The "Wurster Process" in *Controlled Release Technologies: Methods, Theory,*  
15 *and Applications* (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida and Deasy, P.B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) 5(2):99-139; and ionic gelation as described by, e.g., Lim et al., *Science* (1980) 210:908-910.

The above techniques are also applicable to the production of microparticles with adsorbed antigens. In this embodiment, microparticles are formed as described  
20 above, however, antigens are mixed with the microparticles following formation.

Particle size can be determined by, e.g., laser light scattering, using for example, a spectrometer incorporating a helium-neon laser. Generally, particle size is determined at room temperature and involves multiple analyses of the sample in question (e.g., 5-10  
25 times) to yield an average value for the particle diameter. Particle size is also readily determined using scanning electron microscopy (SEM).

Prior to use of the microparticles, antigen content is generally determined so that an appropriate amount of the microparticles may be delivered to the subject in order to elicit an adequate immune response.

Antigen content of the microparticles can be determined according to methods  
30 known in the art, such as by disrupting the microparticles and extracting the entrapped antigen. For example, microparticles can be dissolved in dimethylchloride and the protein extracted into distilled water, as described in, e.g., Cohen et al., *Pharm. Res.*

WO 02/080648  
2000-1-09/1-99

PCT/US02/10869

(1991) 8:713; Eldridge et al., *Infect. Immun.* (1991) 59:2978; and Eldridge et al., *J. Controlled Release* (1990) 11:205. Alternatively, microparticles can be dispersed in 0.1 M NaOH containing 5% (w/v) SDS. The sample is agitated, centrifuged and the supernatant assayed for the antigen of interest using an appropriate assay. See, e.g.,

5 O'Hagan et al., *Int. J. Pharm.* (1994) 103:37-45.

One method for adsorbing macromolecules onto prepared microparticles is as follows. Microparticles are rehydrated and dispersed to an essentially monomeric suspension of microparticles using dialyzable anionic or cationic detergents. Useful detergents include, but are not limited to, any of the various N-methylglucamides

10 (known as MEGAs), such as heptanoyl-N-methylglucamide (MEGA-7), octanoyl-N-methylglucamide (MEGA-8), nonanoyl-N-methylglucamide (MEGA-9), and decanoyl-N-methyl-glucamide (MEGA-10); cholic acid; sodium cholate; deoxycholic acid; sodium deoxycholate; taurocholic acid; sodium taurocholate; taurodeoxycholic acid; sodium taurodeoxycholate; 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-

15 sulfonate (CHAPS); 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonate (CHAPSO); N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate (ZWITTERGENT 3-12); N,N-bis-(3-D-gluconeamidopropyl)-deoxycholamide (DEOXY-BIGCHAP); N-octylglucoside; sucrose monolaurate; glycocholic acid/sodium glycocholate; laurosarcosine (sodium salt); glycodeoxycholic acid/sodium

20 glycodeoxycholate; sodium dodecyl sulfate (SDS); and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB); dodecyltrimethylammonium bromide; hexadecyltrimethyl-ammonium bromide; tetradecyltrimethylammonium bromide; benzyl dimethyldodecylammonium bromide; benzyl dimethyl-hexadecylammonium chloride; benzyl dimethyltetra-decylammonium bromide. The above detergents are

25 commercially available from e.g., Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Various cationic lipids known in the art can also be used as detergents. See Balasubramaniam et al., 1996, *Gene Ther.*, 3:163-72 and Gao, X., and L. Huang. 1995, *Gene Ther.*, 2:7110-722.

The microparticle/detergent mixture is then physically ground, e.g., using a

30 ceramic mortar and pestle, until a smooth slurry is formed. An appropriate aqueous buffer, such as phosphate buffered saline (PBS) or Tris buffered saline, is then added and the resulting mixture sonicated or homogenized until the microparticles are fully

WO 02/080648  
2002100159

PCT/US02/10869

suspended. The macromolecule of interest is then added to the microparticle suspension and the system dialyzed to remove detergent. The polymer microparticles and detergent system are preferably chosen such that the macromolecule of interest will adsorb to the microparticle surface while still maintaining activity of the macromolecule. The resulting microparticles containing surface adsorbed macromolecule may be washed free of unbound macromolecule and stored as a suspension in an appropriate buffer formulation, or lyophilized with the appropriate excipients, as described further below.

## 10           2.    Additional Particulate Carriers

In addition to microparticles, the compositions may also be encapsulated, adsorbed to, or associated with, particulate carriers. Such carriers present multiple copies of a selected antigen to the immune system and promote migration, trapping and retention of antigens in local lymph nodes. The particles can be taken up by profession antigen presenting cells such as macrophages and dendritic cells, and/or can enhance antigen presentation through other mechanisms such as stimulation of cytokine release.

In certain embodiments, the compositions are delivered using particulate carriers derived from polymethyl methacrylate polymers. See, e.g., Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362-368; McGee JP, et al., *J Microencapsul.* 14(2):197-210, 1997; O'Hagan DT, et al., *Vaccine* 11(2):149-54, 1993.

Furthermore, other particulate systems and polymers can be used for the *in vivo* or *ex vivo* delivery of the gene of interest. For example, polymers such as polylysine, polyarginine, polyornithine, spermine, spermidine, as well as conjugates of these molecules, are useful for transferring a nucleic acid of interest. Similarly, DEAE dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation or precipitation using other insoluble inorganic salts, such as strontium phosphate, aluminum silicates including bentonite and kaolin, chromic oxide, magnesium silicate, talc, and the like, will find use with the present methods. See, e.g., Felgner, P.L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5:163-187, for a review of delivery systems useful for gene transfer. Peptoids (Zuckerman, R.N., et al., U.S. Patent No. 5,831,005, issued November 3, 1998) may also be used for delivery of a construct of the present invention.

WO 02/080648  
2000-11-01/2002-09-10

PCT/US02/10869

Additionally, biolistic delivery systems employing particulate carriers such as gold and tungsten, are especially useful for delivering synthetic expression cassettes of the present invention. The particles are coated with the synthetic expression cassette(s) to be delivered and accelerated to high velocity, generally under a reduced atmosphere, using a gun powder discharge from a "gene gun." For a description of such techniques, and apparatuses useful therefore, see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,945,050; 5,036,006; 5,100,792; 5,179,022; 5,371,015; and 5,478,744. Also, needle-less injection systems can be used (Davis, H.L., et al, *Vaccine* 12:1503-1509, 1994; Bioject, Inc., Portland, OR).

10

### 3. Liposomal/Lipid Delivery Vehicles

The antigens of interest (or polynucleotides encoding these antigens) can also be delivered using liposomes. For example, packaged as DNA or RNA in liposomes prior to delivery to the subject or to cells derived therefrom. Lipid encapsulation is generally accomplished using liposomes that are able to stably bind or entrap and retain nucleic acid. The ratio of condensed DNA to lipid preparation can vary but will generally be around 1:1 (mg DNA:micromoles lipid), or more of lipid. For a review of the use of liposomes as carriers for delivery of nucleic acids, see, Hug and Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097:1-17; Straubinger et al., in *Methods of Enzymology* (1983), Vol. 101, pp. 512-527.

Liposomal preparations for use in the present invention include cationic (positively charged), anionic (negatively charged) and neutral preparations, with cationic liposomes particularly preferred. Cationic liposomes have been shown to mediate intracellular delivery of plasmid DNA (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:7413-7416); mRNA (Malone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86:6077-6081); and purified transcription factors (Debs et al., *J. Biol. Chem.* (1990) 265:10189-10192), in functional form.

Cationic liposomes are readily available. For example, N[1-2,3-dioleilyoxy]propyl]-N,N,N-triethylammonium (DOTMA) liposomes are available under the trademark Lipofectin, from GIBCO BRL, Grand Island, NY. (See, also, Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:7413-7416). Other commercially available lipids include (DDAB/DOPE) and DOTAP/DOPE (Boehringer). Other cationic

30

WO 02/080648  
2000-1106/40

PCT/US02/10869

liposomes can be prepared from readily available materials using techniques well known in the art. See, e.g., Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75:4194-4198; PCT Publication No. WO 90/11092 for a description of the synthesis of DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane) liposomes. Cationic microparticles can be prepared from readily available materials using techniques known in the art. See, e.g., co-owned WO 01/136599.

Similarly, anionic and neutral liposomes are readily available, such as, from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), or can be easily prepared using readily available materials. Such materials include phosphatidyl choline, cholesterol, phosphatidyl ethanolamine, dioleoylphosphatidyl choline (DOPC), dioleoylphosphatidyl glycerol (DOPG), dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE), among others. These materials can also be mixed with the DOTMA and DOTAP starting materials in appropriate ratios. Methods for making liposomes using these materials are well known in the art.

The liposomes can comprise multilamellar vesicles (MLVs), small unilamellar vesicles (SUVs), or large unilamellar vesicles (LUVs). The various liposome-nucleic acid complexes are prepared using methods known in the art. See, e.g., Straubinger et al., in *METHODS OF IMMUNOLOGY* (1983), Vol. 101, pp. 512-527; Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulos et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1975) 394:483; Wilson et al., *Cell* (1979) 17:77; Deamer and Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 443:629; Ostro et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) 76:836; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76:3348; Enoch and Strittmatter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76:145; Fraley et al., *J. Biol. Chem.* (1980) 255:10431; Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75:145; and Schaefer-Ridder et al., *Science* (1982) 215:166.

The DNA and/or protein antigen(s) can also be delivered in cochleate lipid compositions similar to those described by Papahadjopoulos et al., *Biochem. Biophys. Acta*. (1975) 394:483-491. See, also, U.S. Patent Nos. 4,663,161 and 4,871,488.

#### 4. Gene Delivery Vehicles

In certain embodiments, one or more antigens as described herein are delivered using one or more gene vectors are administered via nucleic acid immunization or the

WO 02/080648  
2000-11007-40

PCT/US02/10869

like using standard gene delivery protocols. Methods for gene delivery are known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,399,346; 5,580,859; 5,589,466. The constructs can be delivered (e.g., injected) either subcutaneously, epidermally, intradermally, intramuscularly, intravenous, mucosally (such as nasally, rectally and vaginally),  
5 intraperitoneally, orally or combinations thereof.

An exemplary replication-deficient gene delivery vehicle that may be used in the practice of the present invention is any of the alphavirus vectors, described in, for example, co-owned U.S. Patent Nos. 6,342,372; 6,329,201 and International Publication WO 01/92552.

10 A number of viral based systems have been developed for gene transfer into mammalian cells. For example, retroviruses provide a convenient platform for gene delivery systems. Selected sequences can be inserted into a vector and packaged in retroviral particles using techniques known in the art. The recombinant virus can then be isolated and delivered to cells of the subject either *in vivo* or *ex vivo*. A number of  
15 retroviral systems have been described (U.S. Patent No. 5,219,740; Miller and Rosman, *BioTechniques* (1989) 7:980-990; Miller, A.D., *Human Gene Therapy* (1990) 1:5-14; Scarpa et al., *Virology* (1991) 180:849-852; Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* (1993) 3:102-109.

20 A number of adenovirus vectors have also been described. Unlike retroviruses which integrate into the host genome, adenoviruses persist extrachromosomally thus minimizing the risks associated with insertional mutagenesis (Haj-Ahmad and Graham, *J. Virol.* (1986) 57:267-274; Bett et al., *J. Virol.* (1993) 67:5911-5921; Mittereder et al., *Human Gene Therapy* (1994) 5:717-729; Seth et al., *J. Virol.* (1994) 68:933-940; Barr  
25 et al., *Gene Therapy* (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. *BioTechniques* (1988) 6:616-629; and Rich et al., *Human Gene Therapy* (1993) 4:461-476).

Additionally, various adeno-associated virus (AAV) vector systems have been developed for gene delivery. AAV vectors can be readily constructed using techniques well known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International  
30 Publication Nos. WO 92/01070 (published 23 January 1992) and WO 93/03769 (published 4 March 1993); Lebkowski et al., *Molec. Cell. Biol.* (1988) 8:3988-3996; Vincent et al., *Vaccines 90* (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J.

WO 02/080648  
2000-11-01/99

PCT/US02/10869

*Current Opinion in Biotechnology* (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* (1992) 158:97-129; Kotin, R.M. *Human Gene Therapy* (1994) 5:793-801; Shelling and Smith, *Gene Therapy* (1994) 1:165-169; and Zhou et al., *J. Exp. Med.* (1994) 179:1867-1875.

5 Another vector system useful for delivering polynucleotides, mucosally and otherwise, is the enterically administered recombinant poxvirus vaccines described by Small, Jr., P.A., et al. (U.S. Patent No. 5,676,950, issued October 14, 1997) as well as the vaccinia virus and avian poxviruses. By way of example, vaccinia virus recombinants expressing the genes can be constructed as follows. The DNA encoding  
10 the particular synthetic Gag/antigen coding sequence is first inserted into an appropriate vector so that it is adjacent to a vaccinia promoter and flanking vaccinia DNA sequences, such as the sequence encoding thymidine kinase (TK). This vector is then used to transfect cells that are simultaneously infected with vaccinia. Homologous recombination serves to insert the vaccinia promoter plus the gene encoding the coding  
15 sequences of interest into the viral genome. The resulting TK recombinant can be selected by culturing the cells in the presence of 5-bromodeoxyuridine and picking viral plaques resistant thereto.

Alternatively, avipoxviruses, such as the fowlpox and canarypox viruses, can also be used to deliver the genes. Recombinant avipox viruses, expressing immunogens  
20 from mammalian pathogens, are known to confer protective immunity when administered to non-avian species. The use of an avipox vector is particularly desirable in human and other mammalian species since members of the avipox genus can only productively replicate in susceptible avian species and therefore are not infective in mammalian cells. Methods for producing recombinant avipoxviruses are known in the  
25 art and employ genetic recombination, as described above with respect to the production of vaccinia viruses. See, e.g., WO 91/12882; WO 89/03429; and WO 92/03545. Picornavirus-derived vectors can also be used. (See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,614,413 and 6,063,384).

Molecular conjugate vectors, such as the adenovirus chimeric vectors described  
30 in Michael et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 268:6866-6869 and Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:6099-6103, can also be used for gene delivery.

WO 02/080648  
2000-1-09/1-99

PCT/US02/10869

A vaccinia based infection/transfection system can be conveniently used to provide for inducible, transient expression of the coding sequences of interest (for example, a synthetic Gag/HCV-core expression cassette) in a host cell. In this system, cells are first infected *in vitro* with a vaccinia virus recombinant that encodes the bacteriophage T7 RNA polymerase. This polymerase displays exquisite specificity in that it only transcribes templates bearing T7 promoters. Following infection, cells are transfected with the polynucleotide of interest, driven by a T7 promoter. The polymerase expressed in the cytoplasm from the vaccinia virus recombinant transcribes the transfected DNA into RNA that is then translated into protein by the host translational machinery. The method provides for high level, transient, cytoplasmic production of large quantities of RNA and its translation products. See, e.g., Elroy-Stein and Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:8122-8126.

As an alternative approach to infection with vaccinia or avipox virus recombinants, or to the delivery of genes using other viral vectors, an amplification system can be used that will lead to high level expression following introduction into host cells. Specifically, a T7 RNA polymerase promoter preceding the coding region for T7 RNA polymerase can be engineered. Translation of RNA derived from this template will generate T7 RNA polymerase that in turn will transcribe more template. Concomitantly, there will be a cDNA whose expression is under the control of the T7 promoter. Thus, some of the T7 RNA polymerase generated from translation of the amplification template RNA will lead to transcription of the desired gene. Because some T7 RNA polymerase is required to initiate the amplification, T7 RNA polymerase can be introduced into cells along with the template(s) to prime the transcription reaction. The polymerase can be introduced as a protein or on a plasmid encoding the RNA polymerase. For a further discussion of T7 systems and their use for transforming cells, see, e.g., International Publication No. WO 94/26911; Studier and Moffatt, *J. Mol. Biol.* (1986) 189:113-130; Deng and Wolff, *Gene* (1994) 143:245-249; Gao et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994) 200:1201-1206; Gao and Huang, *Nuc. Acids Res.* (1993) 21:2867-2872; Chen et al., *Nuc. Acids Res.* (1994) 22:2114-2120; and U.S. Patent No. 5,135,855.

WO 02/080648  
2002-1-09/1-09

PCT/US02/10869

## D. PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also includes pharmaceutical compositions comprising polypeptide or polynucleotide antigens in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or recipient. Further, other ingredients, such as adjuvants, may also be present. As described more fully in U.S. Patent No. 6,015,694, storage stable and easy administerable immunogenic compositions are particularly needed in Third World countries where refrigeration and/or traditional administration means (syringes, etc.) are not readily available.

In certain embodiments, the compositions include one or more polypeptides. The preparation of immunogenic compounds that contain immunogenic polypeptide(s) as active ingredients is known to those skilled in the art. Typically, such immunogenic compounds are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified, or the protein encapsulated in liposomes.

Compositions of the invention preferably comprise a pharmaceutically acceptable carrier. The carrier should not itself induce the production of antibodies harmful to the host. Pharmaceutically acceptable carriers are well known to those in the art. Suitable carriers are typically large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes), and inactive virus particles. Examples of particulate carriers include those derived from polymethyl methacrylate polymers, as well as microparticles derived from poly(lactides) and poly(lactide-co-glycolides), known as PLG. See, e.g., Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362-368; McGee et al. (1997) *J Microencapsul.* 14(2):197-210; O'Hagan et al. (1993) *Vaccine* 11(2):149-54. Such carriers are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, these carriers may function as immunostimulating agents ("adjuvants"). Furthermore, the antigen may be conjugated to a bacterial toxoid, such as toxoid from diphtheria, tetanus, cholera, etc., as well as toxins derived from *E. coli*.

WO 02/080648  
2,000-1,766/40

PCT/US02/10869

Pharmaceutically acceptable salts can also be used in compositions of the invention, for example, mineral salts such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, or sulfates, as well as salts of organic acids such as acetates, propionates, malonates, or benzoates. Especially useful protein substrates are serum albumins, keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, tetanus toxoid, and other proteins well known to those of skill in the art. Compositions of the invention can also contain liquids or excipients, such as water, saline, glycerol, dextrose, ethanol, or the like, singly or in combination, as well as substances such as wetting agents, emulsifying agents, or pH buffering agents. Liposomes can also be used as a carrier for a composition of the invention, such liposomes are described above.

Further, the compositions described herein can include various excipients, adjuvants, carriers, auxiliary substances, modulating agents, and the like. Preferably, the compositions will include an amount of the antigen sufficient to mount an immunological response. An appropriate effective amount can be determined by one of skill in the art. Such an amount will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials and will generally be an amount on the order of about 0.1  $\mu\text{g}$  to about 1000  $\mu\text{g}$ , more preferably about 1  $\mu\text{g}$  to about 300  $\mu\text{g}$ , of particle/antigen.

Such adjuvants include, but are not limited to: (1) aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate, etc.; (2) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (see below) or bacterial cell wall components), such as for example (a) MF59 (International Publication No. WO 90/14837), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE (see below), although not required) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP (see below) either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, and (c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of monophosphorylipid A (MPL), trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL.

WO 02/080648  
2002-11-07

PCT/US02/10869

- + CWS (Detox™); (3) saponin adjuvants, such as Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) may be used or particle generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes) (see, e.g., International Publication WO 00/00249); (4) Complete Freund's Adjuvant (CFA) and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA); (5) cytokines, such as interleukins (IL-1, IL-2, etc.), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF), beta chemokines (MIP, 1-alpha, 1-beta Rantes, etc.); (6) detoxified mutants of a bacterial ADP-ribosylating toxin such as a cholera toxin (CT), a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63 (where lysine is substituted for the wild-type amino acid at position 63) LT-R72 (where arginine is substituted for the wild-type amino acid at position 72), CT-S109 (where serine is substituted for the wild-type amino acid at position 109), and PT-K9/G129 (where lysine is substituted for the wild-type amino acid at position 9 and glycine substituted at position 129) (see, e.g., International Publication Nos. W093/13202; W092/19265; WO 95/17211; WO 98/18928 and WO 01/22993); (7) CpG containing oligo, bioadhesive polymers, see WO 99/62546 and WO 00/50078; and (8) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the effectiveness of the composition.

- Muramyl peptides include, but are not limited to, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamate (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE), etc.

- Where a saccharide or carbohydrate antigen is used, it may be conjugated to a carrier protein. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,306,492; EP 0 477 508; WO 98/42721; Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357:195-196; "Conjugate Vaccines" eds. Cruse et al., ISBN 3805549326). Preferred carrier proteins include bacterial toxins or toxoids, such as diphtheria (e.g., CRM<sub>197</sub>) or tetanus toxoids. Other suitable carrier proteins include the *N. meningitidis* outer member protein (EP 0372501); synthetic peptides (EP 0378881 and EP 0427347); heat shock proteins (WO 93/17712); cytokines, lymphokines, hormones, growth factors, pertussis proteins (WO 98/58668; EP 0471177); protein D from *H. influenza* (WO 00/56360); toxin A or B from *C. difficile* (WO 00/61761) and the like. It is possible to use mixtures of carrier proteins. Where a mixture comprises capsular saccharides from both serogroups A and C, it is preferred

WO 02/080648  
2000-11-01/2002-09-01

PCT/US02/10869

that the ratio (w/w) of MenA saccharide:MenC saccharide is greater than 1 (e.g., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 or higher). Saccharides from different serogroups or different pathogens (e.g., different serogroups of *N. meningitidis*) may be conjugated to the same or different carrier proteins.

5 The pharmaceutical compositions may also be lyophilized or otherwise made storage-stable.

Administration of the pharmaceutical compositions described herein may be by any suitable route (see, e.g., above). Particularly preferred is a parenteral prime (or multiple primes) following by a mucosal boost (or multiple mucosal boosts). In addition, the administration may take the form of multiple prime-boost administrations. Thus, dosage treatment may be a single prime/boost dose schedule or a multiple prime/boost dose schedule. A multiple dose schedule is one in which a primary course of vaccination may be with 1-10 separate doses, followed by other doses given at subsequent time intervals, chosen to maintain and/or reinforce the immune response, for example at 1-4 months for a second dose, and if needed, a subsequent dose(s) after several months. The dosage regimen will also, at least in part, be determined by the potency of the modality, the vaccine delivery employed, the need of the subject and be dependent on the judgment of the practitioner.

Multiple administrations (e.g., prime-boost type administration) are advantageously employed. For example, recombinant alphavirus particles expressing the antigen(s) of interest are administered (e.g., IVAG or IR). Subsequently, the antigen(s) are administered, for example in compositions comprising the polypeptide antigen(s) and a suitable adjuvant. Alternatively, antigens are administered prior to gene delivery vehicles. Multiple polypeptide and multiple gene delivery vehicle administrations (in any order) may also be employed.

The compositions may preferably comprise a "therapeutically effective amount" of the macromolecule of interest. That is, an amount of macromolecule/microparticle will be included in the compositions that will cause the subject to produce a sufficient response, in order to prevent, reduce, eliminate or diagnose symptoms. The exact amount necessary will vary, depending on the subject being treated; the age and general condition of the subject to be treated; the severity of the condition being treated; in the case of an immunological response, the capacity of the subject's immune system to

WO 02/080648  
2000-1/007,49

PCT/US02/10869

synthesize antibodies; the degree of protection desired and the particular antigen selected and its mode of administration, among other factors. An appropriate effective amount can be readily determined by one of skill in the art. Thus, a "therapeutically effective amount" will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials. For example, for purposes of the present invention, where the macromolecule is a polynucleotide, an effective dose will typically range from about 1 ng to about 1 mg, more preferably from about 10 ng to about 1 µg, and most preferably about 50 ng to about 500 ng of the macromolecule delivered per dose; where the macromolecule is an antigen, an effective dose will typically range from about 1 µg to about 100 mg, more preferably from about 10 µg to about 1 mg, and most preferably about 50 µg to about 500 µg of the macromolecule delivered per dose.

The following examples are offered by way of illustration, and not by way of limitation.

15

EXAMPLE 1

SERUM IGG AND VAGINAL WASH IGA TITERS FOLLOWING PARENTERAL PRIME-  
MUCOSAL BOOST WITH HIV ANTIGENS

Mice were primed 2 times intramuscularly with gp120 protein adsorbed onto anionic PLG DSS microparticles. 10 micrograms of the gp120/PLG was given at days 0 and 14. The animals were mucosally boosted 3 times at 10-day intervals. The mucosal boosting was intravaginally, intrarectally or intranasally, with mucosal adjuvants of ACP a bioadhesive polymer (Fidia), LTR72 (Chiron S.p.A.) or CpG containing oligos, 1826 H.C. Davis et al., J. Immunology (1998) 160:870-876.

The effect of mucosal boosting after parenteral priming was investigated and results are shown in Table 1.

25

WO 02/080648  
2000-11007-90

PCT/US02/10869

Table 1

Grp	Route	Prime	Route	Boost	Vaginal Wash IgA titer	Serum IgG titer
1	IMx2	gp120/PLG 10 µg	-	No boost	22 ± 11	15790 ± 7578
2	IMx2	gp120/PLG 10 µg	IVagx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	1055 ± 979	38091±18525
3	IMx2	gp120/PLG 10 µg	IRx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	7716±8175	420134±269530
4	IMx2	gp120/PLG 10 µg	INx3	gp120 30 ug + LTR72 10 ug + CPG 50 ug	12421±10156	136137±92334

IMx2- two intramuscular administrations  
 IVagx3 - three intravaginal administrations  
 IRx3- three intrarectal administrations  
 INx3 - three intranasal administrations

5

As is shown in Table 1 and Figure 1, the mucosal IgA titers as determined by a vaginal wash, and serum IgG titers were increased in the animals that were mucosally boosted as compared to those with no mucosal boost.

10

EXAMPLE 2SERUM TITERS AFTER PARENTERAL PRIMING AND MUCOSAL BOOSTING WITH HIV ANTIGENS

The following example shows increased serum IgG titer following mucosal boosting after IM priming.

Mice were immunized intramuscularly with 10 micrograms of gp120/PLG, as described in Example 1. Three mucosal (intranasally or intrarectally) boosts were given with mucosal adjuvants LTR72, ACP or CpG (1826), as described above.

20

WO 02/080648  
2300-1/007/40

PCT/US02/10869

Table 2

Proj. #99-01414							
Grp	route	Prime	route	Boost	Post prime Serum IgG titer	Post Boost Serum IgG titer	
					Mean ( $\pm$ SD;N=5)	Mean ( $\pm$ SD;N=5)	
1	IMx2	gp120/PLG $\mu$ g	10	-	No boost	913 (976)	400 (303)
2	IMx2	gp120/PLG $\mu$ g	10	IVagx3	gp120/PLG100 ug + LTR72	505 (393)	1385 (816)
3	IMx2	gp120/PLG $\mu$ g	10	IRx3	gp120 100 ug + LTR72	620 (238)	3475 (2322)
5	IMx2	gp120/PLG $\mu$ g	10	IRx3	gp120/ACP100 ug + LTR72	555 (429)	6364 (4831)
5	IMx2	gp120/PLG $\mu$ g	10	INx3	gp120 30 ug + LTR72 + CPG 50 ug	587 (565)	2662 (2382)

IMx2- two intramuscular administrations; IVagx3 - three intravaginal administrations; IRx3- three intrarectal administrations; INx3 - three intranasal administrations

5

Table 2 shows that mean serum IgG titer is increased for those animals receiving the mucosal boost.

EXAMPLE 3

10 VAGINAL WASH IgA TITERS AFTER PARENTERAL PRIMING AND MUCOSAL BOOSTING

The following example shows increased mucosal (vaginal wash) IgA titer following mucosal boosting after IM priming. Mice were immunized as described in Examples 1 and 2. Results are shown in Table 3.

15

WO 02/080648  
2300-1/001/40

PCT/US02/10869

Table 3

Grp	Route	Prime	Route	Boost	Animal #	Normalized Titers	
1	IMx2	gp120/PLG µg	10	-	No boost	1	27
						2	10
						3	<10
						4	40
						5	27
						6	21
						7	39
						8	<10
						9	21
						10	25
9	IMx2	gp120/PLG µg	10	IVagx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	81	2,128
						82	1,465
						83	1,939
						84	260
						85	34
						86	16
						87	1,662
						88	2,716
						89	52
						90	279
10	IMx2	gp120/PLG µg	10	IRx3	gp120/ACP 100 ug + LTR72 10 ug	91	3,068
						92	H
						93	2,976
						94	1,909
						95	5,260
						96	23,528
						97	19,137
						98	888
						99	16,853
						100	473
11	IMx2	gp120/PLG µg	10	INx3	gp120 30 ug + LTR72 10 ug + CPG 50 ug	101	4,133
						102	7,929
						103	1,691
						104	H
						105	27,872
						106	2,517
						107	25,121
						108	6,825
						109	5,183
						110	15,070

WO 02/080648  
2300-1/05/00

PCT/US02/10869

The results shown in Table 3 demonstrate that mucosal titers, as measured by vaginal wash IgA titers, are increased following parenteral polypeptide administration and mucosal boosting.

5

EXAMPLE 4

SERUM TITERS FOLLOWING MEMORY BOOSTING

The following example shows increased serum IgG titers following memory mucosal (intranasal) boosting after parenteral (intramuscular) priming. Mice were immunized essentially as described above except memory boosting was conducted 18 months after the first prime. Results are shown in Table 4 and Figure 2.

10

Table 4

Grp	Prime/adjuvant	Boost/adjuvant	Memory Boost/ adjuvant	Serum IgG titer
1	IMx2 Ogp140soluble 10 µg / MF59	none	IM Ogp140soluble 10µg / MF59	2037±1897
2	IMx2 Ogp140soluble 10 µg /MF59	INx3 Ogp140/PLG	IN Og140 30 µg/LTR72 10µg + CpG 50 µg	4062±2291
3	IM gp140DNA	INx3 Ogp140 30µg/ LTR72 10µg + CpG 50µg	IN Ogp140 30µg/LTR72 10 µg + CpG 50 µg	7897±4742

IMx2- two intramuscular administrations  
IM - one intramuscular administration  
IN - one intranasal administration  
INx3 - three intranasal administrations

15

These results demonstrate that serum titers, as measured by ELISA, are increased following mucosal memory boosting at 18 months. Titers are also increased when the parenteral priming is with DNA as compared to protein.

20

WO 02/080648  
2000-1007-00

PCT/US02/10869

EXAMPLE 5

TITERS FOLLOWING PARENTERAL PRIME - MUCOSAL BOOST WITH *NEISSERIA*  
*MENINGITIDIS B (MENB)-PLG*

- Mice are primed and boosted with MenB 287 antigen (see, WO 00/66791) as described above. The MenB287 antigen is formulated with PLG microparticles and/or CpG. Results are shown below in Table 5. "IM" refers to intramuscular administration, "IN" refers to intranasal administration. "Imm #" refers to the number of immunizations. Immunization 1 was given on day 0; immunization 2 was given on day 28; immunization 3 was given on day 84; and immunization 4 was given on day 98.
- "2wp2" refers to titers obtained from bleeds taken 2 weeks after immunization #2 (day 42); "2wp3" refers to titers obtained from bleeds taken 2 weeks after immunization #3 (day 98); and "2wp4" refers to titers obtained from bleeds taken 2 weeks after immunization #4 (day 112).

Table 5

Group	Formulation	Route	Imm #	2wp2	2wp3	2wp4
1	PLG/287 + PLG/CpG, 20 ug	IM	1, 2, 3	15,673	4,163	NA
2	PLG/287, 20 ug	IM	1, 2, 3	10,729	2,853	NA
3	PLG/287 + PLG/CpG, 20 ug	IM	1, 2	34,891	15,167	16,556
	287 + LTK63, 20 ug	IN	3, 4			
4	PLG/287, 20 ug	IM	1, 2	9,064	7,948	9,412
	287 + LTK63, 20 ug	IN	3, 4			

- As shown in Table 5, titers are significantly increased when the 3rd immunization is intranasal as compared to intramuscular. Titer also remains elevated (or are increased) following a second mucosal boost (immunization #4).

20

WO 02/080648  
2002-1007-00

PCT/US02/10869

EXAMPLE 6

SERUM IGG AND VAGINAL WASH IGA TITERS FOLLOWING PARENTERAL PRIME -  
MUCOSAL BOOST WITH *NEISSERIA MENINGITIDIS* OR *HEMOPHILUS INFLUENZA* (HIB)

ANTIGENS

- 5 Mice are primed and boosted with MenC or HIB antigens according to the following schedule:

Immunization Schedule

Grp	Day	Route	Vaccine	Adjuvant	Dose of Vaccine
1	0	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
	14	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
	28	SC	MenC or HIB	alum	one-fourth the human dose
2	0	SC	MenC or HIB	alum	one-fourth the human dose
	14	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
	28	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
3	0	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
	14	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
	28	IN	MenC or HIB	LTK63 or 72	one-fourth the human dose
4	0	SC	MenC or HIB	alum	one-fourth the human dose
	14	SC	MenC or HIB	alum	one-fourth the human dose
	28	SC	MenC or HIB	alum	one-fourth the human dose

IN- intranasal administration

SC-subcutaneous administration

10

For all groups, ELISAs are performed according to standard procedures before the first dose (i.e. prior to day 0) and after each immunization. For MenC, bactericidal antibody titer assays can also be used to evaluate immune response. Group 2 exhibits greater systemic and/or mucosal immune responses as compared to the other groups.

WO 02/080648  
2000-1/001/40

PCT/US02/10869

Claims

What is claimed is:

1. A method of generating an immune response in a subject, comprising
- 5 (a) parenterally administering a first immunogenic composition comprising one or more polypeptide antigens and;  
(b) mucosally administering a second immunogenic composition comprising one or more antigens, thereby inducing an immune response in the subject.
- 10 2. The method of claim 1, wherein the mucosal administration is intranasal.
3. The method of claim 1, wherein the mucosal administration is intrarectal.
4. The method of claim 1, wherein the mucosal administration is intravaginal.
- 15 5. The method of claim 1, where in the parenteral administration is transcutaneous.
6. The method of any of claims 1 to 5, wherein the first immunogenic composition further comprises a microparticle.
- 20 7. The method of any of claims 1 to 5, wherein the second immunogenic composition is delivered using a microparticle.
8. The method of claim 6 or 7, wherein the microparticle comprises PLG.
- 25 9. The method of any of claims 1 to 8, wherein the immune response is a systemic immune response.
10. The method of any of claims 1 to 9, wherein the immune response is a mucosal
- 30 immune response.

WO 02/080648  
2002.10.07.40

PCT/US02/10869

11. The method of any of claims 1 to 10, wherein the immune response is generated to an antigen from one or more pathogens.
12. The method of claim 11, wherein the pathogen is a bacteria.
- 5 13. The method of claim 12, wherein the bacteria is *Neisseria meningitidis*.
14. The method of claim 13, wherein the bacteria is *Neisseria meningitidis*, subgroup B.
- 10 15. The method of claim 13, wherein the bacteria is *Neisseria meningitidis*, subgroup C.
16. The method of claim 15, wherein the antigens capsular oligosaccharides.
- 15 17. The method of claim 16, wherein the saccharides are conjugated to CRM197.
18. The method of claim 12, wherein the bacteria is *Haemophilus influenzae* type B (HIB).
- 20 19. The method of claim 12, wherein the bacteria is *Streptococcus pneumoniae*.
20. The method of claim 12, wherein the bacteria is *Streptococcus agalactiae*.
- 25 21. The method of claim 11, wherein the pathogen is a virus.
22. The method of claim 21, wherein the virus is selected from the group consisting of a hepatitis A virus (HAV), human immunodeficiency virus (HIV), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus (PIV), influenza, hepatitis B virus (HBV), herpes simplex virus (HSV), hepatitis C virus (HCV) and human papilloma virus (HPV).
- 30

WO 02/080648  
2002-10-07

PCT/US02/10869

23. The method of claim 22, wherein the virus is HIV-1.
24. The method of claim 22, wherein the virus is RSV.
- 5 25. The method of claim 22, wherein the virus is PIV.
26. The method of claim 22, wherein the virus is HCV.
27. The method of any of claims 1 to 10, wherein one or more of the antigens are  
10 tumor antigens.
28. The method of any of claims 1 to 27, wherein the first and second immunogenic  
compositions comprise antigens from the same pathogen.
- 15 29. The method of claim 28, wherein the first and second immunogenic  
compositions are the same.
30. The method of claim 28, wherein the second immunogenic composition  
comprises at least one antigen that is different than the antigens of the first  
20 immunogenic composition.
31. The method of any of claims 1 to 27, wherein the first and second immunogenic  
compositions comprise antigens from different pathogens.
- 25 32. The method of any of claims 1 to 31, wherein the first immunogenic  
composition further comprises at least one polynucleotide encoding one or more  
antigens.
33. The method of any of claims 1 to 32, wherein one or more of the antigens of the  
30 second immunogenic are encoded by one or more polynucleotides.

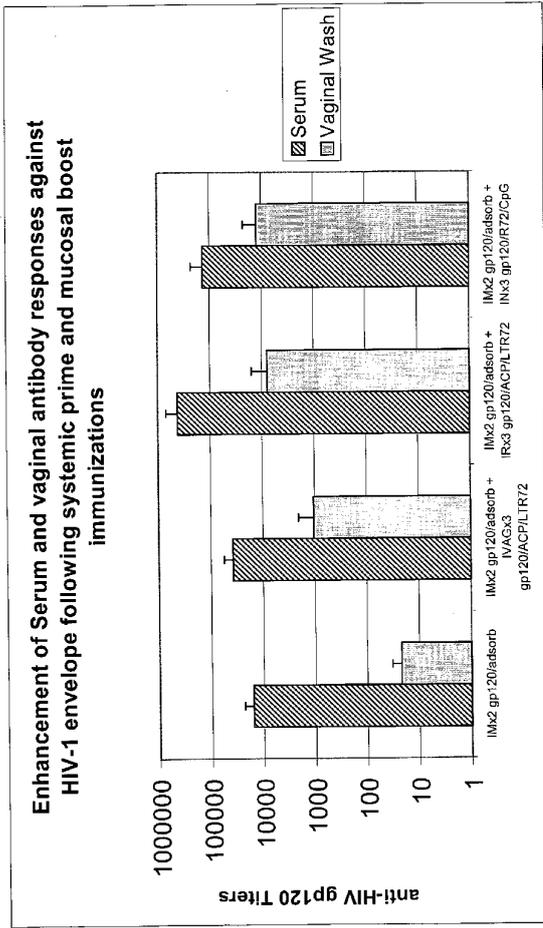
WO 02/080648  
2002-11-07

PCT/US02/10869

34. The method of any of claims 1 to 33, wherein the antigens of the second immunogenic composition comprise polypeptides.
35. The method of any of claims 1 to 34, wherein step (a) is performed two or more  
5 times.
36. The method of claim any of claims 1 to 35, wherein step (b) is performed two or more times.
- 10 37. A method of generating an immune response against a tumor antigen in a subject comprising  
parenterally administering a first immunogenic composition comprising one or more tumor antigens and;  
mucosally administering a second immunogenic composition comprising one or  
15 more tumor antigens.
38. The method of claim 37, wherein the first immunogenic composition comprises one or more polynucleotides encoding said tumor antigens.

20

1/2



**FIGURE 1**

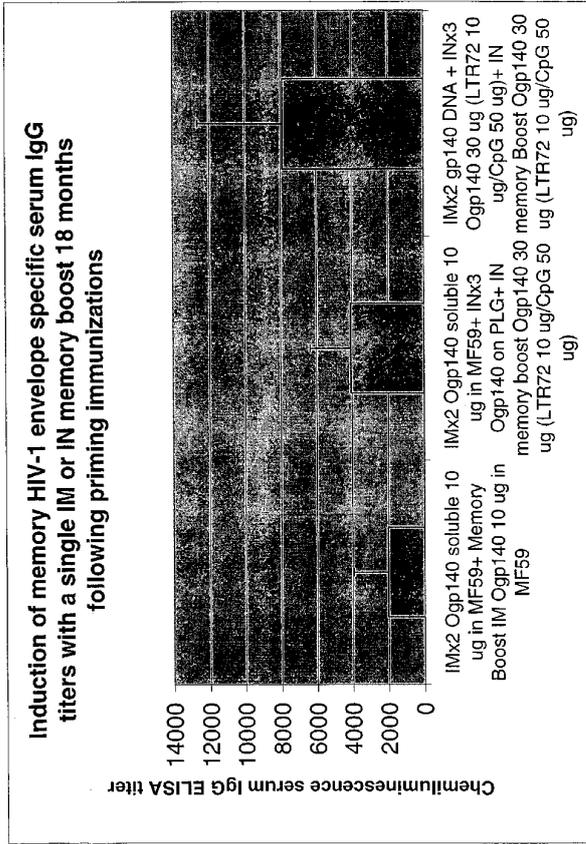


FIGURE 2

## 【 国際公開パンフレット ( コレクション ) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/080648 A3**

- (51) International Patent Classification: A61F 2/02. (74) Agents: HALE, Rebecca, M.: Chiron Corporation, Intellectual Property - R440, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 et al. (US).  
6/06, 9/02, 13/02
- (21) International Application Number: PCT/US02/10869 (81) Designated States (national): CA, JP.
- (22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002) (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CIL, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/282,389 5 April 2001 (05.04.2001) US  
Published: with international search report
- (71) Applicant: CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Herton Street, Emeryville, CA 94608 (US). (88) Date of publication of the international search report: 28 November 2002
- (72) Inventor: O'HAGAN, Derek; Chiron Corporation, 4560 Herton Street, R-440, Emeryville, CA 94608 (US).  
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/080648 A3

(54) Title: MUCOSAL BOOSTING FOLLOWING PARENTERAL PRIMING

(57) Abstract: Mucosal immunization using one or more antigens following parenteral administration of the same or different antigens is described.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/10869										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61F 2/02, 6/06, 9/02, 13/02 US CL : 424/425, 427, 430, 434, 436, 437 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/423, 427, 430, 434, 436, 437 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	US 6,004,534 A (LANGER et al) 21 December 1999, see entire document.	1-38										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"I" 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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"G" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier document published on or after the international filing date	"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	"I" 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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"G" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier document published on or after the international filing date	"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											
"I" 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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"G" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 17 JUNE 2002	Date of mailing of the international search report 13 SEP 2002											
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-8230	Authorized officer: <i>Valerie Bell-Harris for</i> CARLOS ALPARRA Telephone No. (703) 805-1255											

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/116	A 6 1 K 39/102	
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/116	
A 6 1 K 39/155	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/21	
A 6 1 K 39/29	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 K 39/295	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 39/295	
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 47/48	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 48/00	
	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 オーヘイガン, デレック

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, R - 4 4 0, ホートン ストリー  
ト 4 5 6 0, カイロン コーポレーション

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA50 BA51 CA01 EA02 GA11  
 4C076 AA30 AA64 AA95 BB21 BB25 BB29 BB30 BB31 CC07 CC27  
 CC32 CC35 CC41 DD63 EE24 EE41 EE48 EE59 FF02 FF27  
 FF32 FF68  
 4C084 AA13 MA02 MA05 MA31 MA37 MA43 MA55 MA56 MA59 MA60  
 MA63 MA66 NA05 NA10 NA13 NA14 ZB09 ZB26 ZB33 ZB35  
 ZC75  
 4C085 AA03 AA38 BA07 BA14 BA16 BA18 BA51 BA55 BA57 BA69  
 BA78 BA79 BA87 BA88 BA89 BA92 BB01 CC07 CC08 CC31  
 DD62 EE01 EE03 EE06 FF13 FF19 FF24 GG01 GG02 GG03