

(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2005-510478

(P2005-510478A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/14	A 6 1 K 9/14	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/155	A 6 1 K 31/155	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	4 C 2 0 6
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-533966 (P2003-533966)	(71) 出願人	397009934
(86) (22) 出願日	平成14年9月26日 (2002. 9. 26)		グラクソ グループ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月2日 (2004. 4. 2)		GLAXO GROUP LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/004365		イギリス ミドルセックス ユービー6
(87) 国際公開番号	W02003/030935		0エヌエヌ グリーンフォード パークレ
(87) 国際公開日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)		ー アベニュー グラクソ ウェルカム
(31) 優先権主張番号	0124022.5		ハウス (番地なし)
(32) 優先日	平成13年10月5日 (2001. 10. 5)		Glaxo Wellcome Hous
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		e, Berkeley Avenue G
			reenford, Middlesex
			UB6 ONN, Great Brita
			in
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】

本発明はワクチンアジュバントとしての誘導性酸化窒素シンターゼ (iNOS) 阻害薬の使用に関し、そして本発明の好ましい1態様において、核酸ワクチンを補佐するためにこれらを使用する。本発明はさらに、抗原およびこの阻害薬を含む医薬組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

誘導性酸化窒素シンターゼ(iNOS)阻害薬と同時にまたは順次投与するワクチン抗原に対する免疫応答を増加させるための医薬の製造における、該誘導性酸化窒素シンターゼ(iNOS)阻害薬の使用。

【請求項 2】

免疫応答がTh1偏向性である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

CD 4+ および / または CD8+ T細胞の増加がある、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

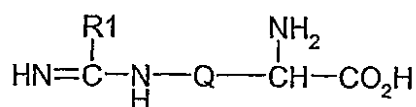
iNOS阻害薬が誘導性酸化窒素シンターゼについて50倍より大きい選択性を持つ、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

【請求項 5】

iNOS阻害薬が式(1)の化合物、その塩ならびに薬学上許容されるそのエステルおよびアミド化物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【化 1】



20

[式中、

R₁ はC₁₋₆ 直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、C₂₋₆ アルケニル基、C₂₋₆ アルキニル基、C₃₋₆ シクロアルキル基またはC₃₋₆ シクロアルキルC₁₋₆アルキル基；

Q は3~6個の炭素原子を持ち、場合によって1個以上のC₁₋₃アルキル基で置換されていても良い、アルキレン、アルケニレンまたはアルキニレン基であるか；

式 -(CH₂)_pX(CH₂)_q- (式中、p は2または3、q は1または2であり、X はS(O)_x (xは0、1もしくは2)、O またはNR² (R² はH もしくはC₁₋₆アルキル)) の基であるか；あるいは

式 -(CH₂)_rA(CH₂)_s- (式中、r は0、1または2、sは0、1または2であり、A は3~6員環の炭素環またはヘテロ環であって、場合によって以下のような1以上の好適な置換基で置換されていても良い：C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、ヒドロキシ、ハロ、ニトロ、シアノ、トリフルオロC₁₋₆アルキル、アミノ、C₁₋₆アルキルアミノまたはジC₁₋₆アルキルアミノ)の基である。]

30

【請求項 6】

iNOS阻害薬が以下の群：

1400W N-[3-(アミノメチル)ベンジル]アセトアミジン、GW 273629 2-(R)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサン酸、GW 274150, S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン、および GW 432042, S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン、

40

から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

ワクチン抗原が以下の群：

ペプチド、タンパク質、多糖類、タンパク質-多糖類コンジュゲート、核酸または脂質抗原、

から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

抗原がプラスミドDNAによって送達され、これにコードされる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

50

プラスミドが微小発射体 (microprojectile) 上にコーティングされ、弾道送達用器具 (ballistic delivery device) によって投与される、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

微小発射体が金ビーズである、請求項 9 に記載の使用。

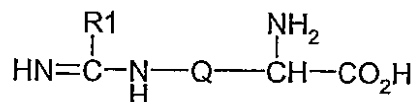
【請求項 11】

抗原および誘導性酸化窒素シンターゼ (iNOS) 阻害薬を含有する医薬組成物。

【請求項 12】

抗原および次式の化合物、その塩ならびに薬学上許容されるそのエステルおよびアミド化合物を含有する、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【化 2】



10

[式中、

R_1 は C_{1-6} 直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-6} シクロアルキル基または C_{3-6} シクロアルキル C_{1-6} アルキル基；

Q は 3~6 個の炭素原子を持ち、場合によって 1 個以上の C_{1-3} アルキル基で置換されていても良い、アルキレン、アルケニレンまたはアルキニレン基であるか；

20

式 $-(\text{CH}_2)_p\text{X}(\text{CH}_2)_q-$ (式中、 p は 2 または 3、 q は 1 または 2 であり、 X は $\text{S}(\text{O})_x$ (x は 0、1 もしくは 2)、 O または NR^2 (R^2 は H もしくは C_{1-6} アルキル)) の基であるか；あるいは

式 $-(\text{CH}_2)_r\text{A}(\text{CH}_2)_s-$ (式中、 r は 0、1 または 2、 s は 0、1 または 2 であり、 A は 3~6 員環の炭素環またはヘテロ環であって、場合によって以下のような 1 以上の好適な置換基で置換されていても良い： C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、ヒドロキシ、ハロ、ニトロ、シアノ、トリフルオロ C_{1-6} アルキル、アミノ、 C_{1-6} アルキルアミノまたはジ C_{1-6} アルキルアミノ) の基である。]

【請求項 13】

化合物が以下の群：

30

1400W N-[3-(アミノメチル)ベンジル] アセトアミジン、GW 273629 2-(R)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサ酸、GW 274150, S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン、および GW 432042, S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン、

から選択される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

ワクチン抗原が以下の群：

ペプチド、タンパク質、多糖類、核酸または脂質抗原、

から選択される、請求項 10、11、12 または 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 15】

抗原が該抗原をコードするプラスミド DNA である、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

プラスミドが微小発射体上にコーティングされ、弾道送達用器具によって投与される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

微小発射体が金ビーズである、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

抗原に対する免疫応答を増加させる方法であって、これを必要とする患者に該抗原およ

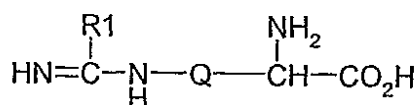
50

び誘導性酸化窒素シンターゼ (iNOS) 阻害薬を順次または同時に投与することを含む、上記方法。

【請求項 19】

抗原および次式の化合物、その塩ならびに薬学上許容されるそのエステルおよびアミド化合物を含む、請求項 18 に記載の方法。

【化 3】



10

[式中、

R₁ は C₁₋₆ 直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、C₂₋₆ アルケニル基、C₂₋₆ アルキニル基、C₃₋₆ シクロアルキル基または C₃₋₆ シクロアルキル C₁₋₆ アルキル基；

Q は 3~6 個の炭素原子を持ち、場合によって 1 個以上の C₁₋₃ アルキル基で置換されていても良い、アルキレン、アルケニレンまたはアルキニレン基であるか；

式 -(CH₂)_pX(CH₂)_q- (式中、p は 2 または 3、q は 1 または 2 であり、X は S(O)_x (x は 0、1 もしくは 2)、O または NR² (R² は H もしくは C₁₋₆ アルキル)) の基であるか；あるいは

式 -(CH₂)_rA(CH₂)_s- (式中、r は 0、1 または 2、s は 0、1 または 2 であり、A は 3~6 員環の炭素環またはヘテロ環であって、場合によって以下のような 1 以上の好適な置換基で置換されていても良い：C₁₋₆ アルキル、C₁₋₆ アルコキシ、ヒドロキシ、ハロ、ニトロ、シアノ、トリフルオロ C₁₋₆ アルキル、アミノ、C₁₋₆ アルキルアミノまたはジ C₁₋₆ アルキルアミノ) の基である。]

20

【請求項 20】

iNOS 化合物が以下の群：

1400W N-[3-(アミノメチル)ベンジル] アセトアミジン、GW 273629 2-(R)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサ酸、GW 274150, S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン、および GW 432042, S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン、

30

から選択される、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ワクチン抗原が以下の群：

ペプチド、タンパク質、多糖類、核酸または脂質抗原、から選択される、請求項 18、19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

抗原が該抗原をコードするプラスミド DNA である、請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

プラスミドが微小発射体上にコーティングされ、弾道送達用器具によって投与される、請求項 18 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 24】

微小発射体が金ビーズである、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はワクチンアジュバントとしての誘導性酸化窒素シンターゼ (iNOS) 阻害薬の使用に関し、そして本発明の好ましい 1 態様において、核酸ワクチンを補佐するためにこれらを使用する。本発明はさらに、抗原およびこの阻害薬を含む医薬組成物を提供する。

【背景技術】

50

【0002】

酸化窒素(NO)は可溶性グアニル酸シクラーゼ酵素の内因性刺激剤であり、多数の生物学的作用に参与する。過剰のNO産生は、敗血性ショックおよび多くの炎症性疾患などの、多数の状態に参与するとも考えられている。NOのL-アルギニンからの生化学的合成は酵素NOSによって触媒される。多くのNOS阻害薬が記載されており、治療上の用途について提案されている。

【0003】

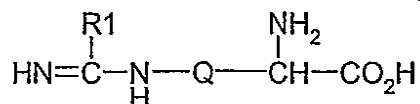
現状では3つの型のNOS、誘導性NOS (iNOS)、神経型NOS (nNOS)、および内皮型NOS (eNOS)が記載されている。さらに最近になって、iNOS、nNOSまたはeNOSのいずれかに選択性を示すNOS阻害薬が開示された。選択性は生理学的範囲内の同一の条件下での関連するその能力に基づいて定義され、以下の3つのカテゴリーに分けられる；非選択性、部分選択性および高選択性(W. Alderton, C. Cooper, R. Knowles, 「酸化窒素シンターゼ：構造、機能および阻害 (Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition)」、Biochem J. (2001) 357, 593-615)。Dawson および Knowlesが記載した技法 (1998, Methods Mol. Biol., 100, 237-242)では、NOS型によるin vitroでのNOの産生を50%低下させるのに必要な阻害薬濃度(μMで表現されることが多い)(IC50)を測定する。特定の1NOS型について10倍未満の選択性を持つ阻害薬(1NOS型についてのIC50が同一の阻害薬の別のNOS型についてのIC50よりも小さいが、10倍未満である)は非選択性とみなされる。10~50倍の選択性を持つ阻害薬は部分選択性阻害薬とみなされ、一方50倍を超える選択性を持つ阻害薬は高選択性とみなされる。

10

20

例えば、W093/13055に次式(I)、その塩ならびに薬学上許容されるエステルおよびアミドの選択性iNOS阻害薬が記載されている：

【化1】



【0004】

[式中、

R₁ はC₁₋₆直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基またはC₃₋₆シクロアルキルC₁₋₆アルキル基；

Q は3~6個の炭素原子を持ち、場合によって1個以上のC₁₋₃アルキル基で置換されていても良い、アルキレン、アルケニレンまたはアルキニレン基であるか；

式 -(CH₂)_pX(CH₂)_q- (式中、p は2または3、q は1または2であり、X はS(O)_x (xは0、1もしくは2)、O またはNR² (R² はH もしくはC₁₋₆アルキル))の基であるか；あるいは

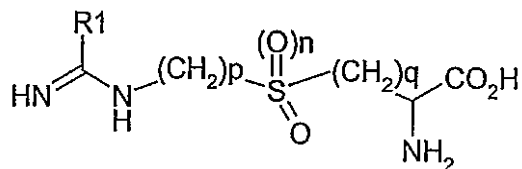
式 -(CH₂)_rA(CH₂)_s- (式中、r は0、1または2、sは0、1または2であり、A は3~6員環の炭素環またはヘテロ環であって、場合によって以下のような1以上の好適な置換基で置換されていても良い：C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、ヒドロキシ、ハロ、ニトロ、シアノ、トリフルオロC₁₋₆アルキル、アミノ、C₁₋₆アルキルアミノまたはジC₁₋₆アルキルアミノ)の基である。]

30

40

W095/34534には次式(II)の化合物、及びそのすべての塩、エステル、アミドおよび生理学的に許容されるプロドラッグであるiNOS阻害薬が記載されている：

【化2】



【0005】

[式中、

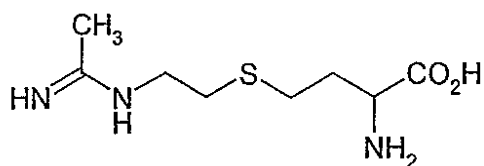
R_1 は C_{1-6} 直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-6} シクロアルキル基または C_{3-6} シクロアルキル C_{1-6} アルキル基であって、それぞれが場合によって以下の群から独立して選択される1~3個の基によって置換されているもよい: $-CN$; $-NO_2$; 基 $-COR^2$ [R^2 は水素、 C_{1-6} アルキル、 $-OR^3$ (R^3 は水素もしくは C_{1-6} アルキル)、または NR^4R^5 (R^4 および R^5 は独立して水素もしくは C_{1-6} アルキルから選択される)]; 基 $-S(O)_mR^6$ (m は0、1もしくは2、 R^6 は水素、 C_{1-6} アルキル、ヒドロキシまたは NR^7R^8 (R^7 および R^8 は独立して水素もしくは C_{1-6} アルキル)); 基 $PO(OR^9)_2$ (R^9 は水素または C_{1-6} アルキル); 基 $NR^{10}R^{11}$ (R^{10} および R^{11} は独立して水素、 C_{1-6} アルキル、 $-COR^{12}$ (R^{12} は水素もしくは C_{1-6} アルキル)、または $-S(O)_mR^{13}$ (m' は0、1もしくは2、および R^{13} は水素もしくは C_{1-6} アルキル)); ハロ; あるいは基 $-OR^{14}$ [R^{14} は水素、 C_{1-6} アルキル(場合によって1~3個のハロ原子で置換されている)、 C_{6-10} アリールまたは $-COR^{15}$ (R^{15} は水素もしくは C_{1-6} アルキル)、 p は2または3、 q は1または2、 n は0または1である。]

10

20

W098/30537 に、選択性 iNOS 阻害薬であると同時に、*in vivo* 投与したときに長期の半減期を持ち、経口によって生体利用性であるなどの利点を提示する、式 I の範疇にある化合物が開示されている。特に、次式(III)の化合物またはその塩、溶媒和物、あるいは生理学的に機能的な誘導体である。

【化3】



30

【0006】

NO は免疫系において多数の役割を持ち、エフェクター機能と調節機能の両方を持つことが知られている。これらの機能として直接の殺細菌効果(K-D Kroncke, K Fehsel, V Kolb-Bachofen. 「酸化窒素:細胞毒性対細胞保護-どのように、なぜ、いつ、およびどこで?」 Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when, and where?」 Nitric Oxide: Biology and Chemistry 1997, 1(2), 107-120)、ならびに以下の調節作用が含まれる: カスパーゼ活性が介在するサイトカイン発現中(YM Kim, RV Talanian, J Li, TR Billiar, 「酸化窒素はカスパーゼ-1(IL-1ベータ変換酵素)を阻害することによってIL-1ベータおよびIFN-ガンマ誘導因子(IL-18)のマクロファージからの放出を抑制する(Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme))」. J. Immunology 1998, 161(8), 4122-8)、アポトーシス中(HT Chung, HO Pae, BM Choi, TR Billier, YM Kim. 「アポトーシスのバイオレギュレーターとしての酸化窒素(Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis)」. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001, 282(5), 1075-9)、ならびに免疫療法についてのアジュバント作用中(D

40

50

A Kahn, DC Archer, DP Gold, CJ Kelly, 「アジュバント免疫療法は誘導性酸化窒素シンターゼに依存性である (Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase)」. J Exp. Med. 2001, 193(11), 1261-1267; MM Gherardi, JC Ramirez, M Estaban. 「DNA初回/ワクシニア追加ワクチン投薬方式中のヒト免疫不全ウイルスI型env抗原に対する細胞免疫応答のインターロイキン-12(IL-12)強化は時間および用量依存性である: IL-12追加の抑制効果は酸化窒素によって仲介される (Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type I env antigen in a DNA prime/vaccinia boost vaccine regimen is time and dose dependent: Suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide)」. J Virology 2000, 74(14), 6278-6286。

10

【発明の開示】**【0007】**

本発明者らはiNOSを阻害するNOS阻害薬がワクチン抗原に対する免疫応答を増加させることができることを発見した。本発明の組成物、方法および使用はiNOS阻害薬を含み、これは高選択性、部分選択性または非選択性iNOS阻害薬である。

【0008】

これをもとに、ワクチン抗原およびiNOS阻害薬を順次または同時投与することを含む、ワクチン抗原に対する免疫応答、特に細胞免疫応答を増加させる方法を提供する。したがって、医薬の製造におけるiNOS阻害薬の使用であって、該阻害薬と同時もしくは順次、または配合して投与するワクチン抗原に対する細胞免疫を増加させるための使用を提供する。

20

【0009】

抗原およびiNOS阻害薬を医薬組成物中に共に製剤化してもよいと解釈すべきであり、これは本発明の1態様を形成する。したがって、iNOSおよび免疫応答を産生させることが所望される抗原を含むワクチン組成物が提供される。

【0010】

また、個体の抗原(DNAもしくはタンパク質または類似のもの)に対する免疫応答を強化する方法であって、該個体に抗原をiNOS阻害薬と併用して、2つの要素の配合の形態とするか、またはNOS阻害薬の投与前もしくは投与後に別に投与することを含む方法をも提供する。

30

【0011】

iNOS阻害薬は、その他のNOS型に対する活性に比較して、非選択性、部分選択性または高選択性のiNOS阻害薬とすることができる。好ましくは、NOS阻害薬は部分選択性、または高選択性iNOS阻害薬のいずれかである。最も好ましくは、本発明で使用するiNOS阻害薬は高選択性iNOS阻害薬である。

【0012】

本発明で使用する部分または高選択性iNOS阻害薬の「選択性」は、好ましくはnNOSまたはeNOSのいずれかよりも選択性であり、最も好ましくはnNOSおよびeNOSの両方よりも選択性である。

【0013】

従って、iNOS阻害薬はL-NMMAなどの非選択性、またはL-NILなどの部分選択性、またはGW274150などの高選択性である(W. Alderton, C. Cooper, R. Knowles, 「酸化窒素シンターゼ: 機能および阻害 (Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition)」, Biochem J. (2001) 357, 593-615)。

40

【0014】

本発明のワクチンおよび用途中での使用に好適なiNOSの阻害薬は典型的にはin vitroで一定の条件下で、iNOSについて30 μ M未満、好ましくは3 μ M未満のIC₅₀を持つ(DawsonおよびKnowles (上記)ならびにAldertonら (上記)に記載された技法によって測定、これらの内容を参照として本明細書中に組み入れる)。

【0015】

50

本発明のワクチン中に使用することができるその他のiNOS阻害薬が以下に記載されている：WO 00/63195, WO 00/44731, WO 00/26195, WO 99/64426, WO 99/46240, WO 99/05131, WO 98/30220, WO 97/32844, WO 97/10204, WO 96/36639, WO 96/35677, WO 96/33175, WO 96/15120, WO 95/25717, WO 95/24382, WO 95/11231, WO 95/11014.

【0016】

iNOS阻害薬は好ましくは抗原特異的CD4+ および/またはCD8+ T細胞の増加をもたらす。最も好ましくは、本発明のiNOS阻害薬を含有するワクチンはCD4+ およびCD8+ 抗原特異的T細胞応答の両方の増加を提供する。本発明で使用する化合物は好ましくは、Th1サイトカイン、特にインターフェロンの産生の相対的増加によって測定して、Th1偏向性免疫応答を誘導する。

10

【0017】

Th1型の免疫応答の優先的誘導剤は細胞介在応答の産生を促進する。高レベルのTh1型サイトカインは所定の抗原に対する細胞介在免疫応答の誘導を優先する傾向があり、他方、高レベルのTh2型サイトカインは抗原に対する液性免疫応答の誘導を優先する傾向がある。

【0018】

Th1およびTh2型免疫応答の区別は絶対的なものではないことを念頭に置くことが重要である。実際に、人によっては主としてTh1であるか主としてTh2であるとして記載された免疫応答を支持するであろう。しかし、サイトカインのファミリーは、Mosmann およびCoffmanによってマウスCD4 +ve T細胞クローンについて記載されたものによって考慮するのが便宜的であることが多い(Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) 「Th1およびTh2細胞：別種のパターンのリンパ球分泌は別種の機能的特性をもたらす (Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties)」、Annual Review of Immunology, 7, p145-173)。従来から、Th1型応答はTリンパ球によるIFN- およびIL-2 サイトカインの産生と関係している。Th1型免疫応答の誘導と直接関係することが多いその他のサイトカインは、IL-12などのように、T細胞によって産生されない。対照的に、Th2型応答はIL-4、IL-5、IL-6、IL-10の分泌と関係している。したがって、本発明は、ワクチン中に主としてTh1型免疫応答を誘導する組成物および方法を提供する。

20

【0019】

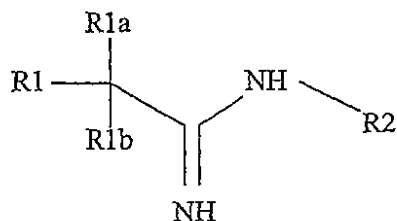
本発明での使用に好ましい化合物は式(I), (II), (III)の化合物である。

30

【0020】

その他の好ましい化合物のクラスはWO 96/19440に記載されている、式(IV)またはその塩である：

【化4】



40

【0021】

[式中、

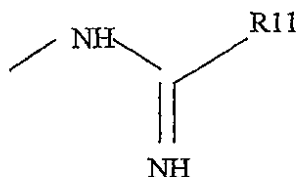
R¹ は水素、C₁₋₆ 炭化水素基、これは場合によってハロ、ニトロ、シアノまたはXR₃ 基で置換されていてもよく、X は酸素、C(O)_m (mは1もしくは2)、S(O)_n (nは0、1もしくは2)、またはNR⁴ (R⁴ は水素もしくはC₁₋₆ アルキル); R³ は水素、C₁₋₆ アルキル、またはNR⁵R⁶ 基 (R⁵ およびR⁶ は独立して水素またはC₁₋₆ アルキル)、ただしXが酸素またはS(O)_n の場合はR³ はNR⁵R⁶ でない;

R1a およびR1b は独立して水素またはハロから選択される;

50

R^2 は C_{1-14} 炭化水素基であって、これは場合によって1または2個のヘテロ原子を持っていてもよく、基 R^2 は場合によって独立して以下の群から選択される1以上の基によって置換されている：ハロ； N_3 ；ニトロ； CF_3 ； ZR^7 、ここでZは酸素、 $C(O)_m$ 、(m' は1または2)、 $S(O)_n$ 、(n' は0、1または2)、または基 NR^8 (R^8 は水素または C_{1-6} アルキル)であり、 R^7 は水素、 C_{1-6} アルキルまたは基 NR^9R^{10} (R^9 および R^{10} は独立して水素または C_{1-6} アルキル)；あるいは R^2 は次式の基で置換されている：

【化5】



10

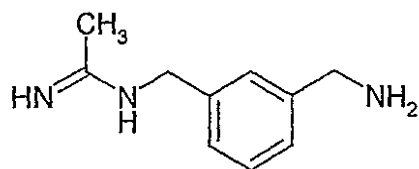
【0022】

(式中、 R^{11} は R^1 と同一の定義である。)

ただし、 R^1 が C_{1-6} アルキル基で、 R^2 が2つの基 ZR^7 (1つの基 ZR^7 が CO_2H)で置換されている C_{1-14} 炭化水素基の場合、他方の基 ZR^7 は NH_2 でない。]

また、以下の構造を持つ式(V)の化合物：1400W N-[3-(アミノメチル)ベンジル]アセトアミジンを含む、特定の化合物も好ましい：

【化6】



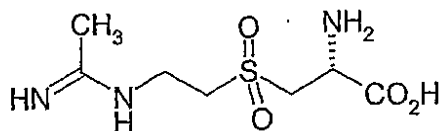
20

【0023】

好ましい化合物として以下のような硫黄アセトアミド置換されたアミノ酸も含まれる：

以下の構造を持つ式(VI)のGW 273629 2-(R)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4ジオキソ-4-チアヘキサン酸：

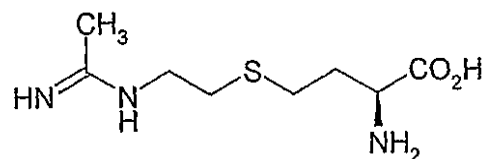
【化7】



【0024】

および以下の構造を持つ式(VII)のGW 274150, S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン：

【化8】



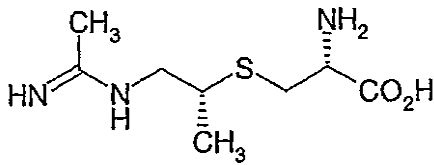
40

【0025】

および以下の構造を持つ式(VIII)のGW 432042, S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン。

50

【化9】



【0026】

式(II)はアミノ酸基に不斉中心を含み、またアルギニンの天然Lまたは(S)コンフィギュレーションが好ましいが、式(I)は(S)および(R)鏡像体を実質的に純粋な形態または任意の比率での混合体としてのいずれかで含むことを想定している。同様に、本発明では、GW273629、GW274150 および GW432042のラセミ混合体、または実質的に純粋な(S)および(R)もしくはこれらの混合物を使用することができることを意図している。

【0027】

こうして、別法として、本発明は以下から選択される化合物、およびそれらの塩、溶媒和物、ならびに生理学的に機能性の誘導体を提供する：

2-(R)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサン酸

2-(S)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサン酸

2-(R/S)-アミノ-6-(1-イミノ-エチルアミノ)-4,4 ジオキソ-4-チアヘキサン酸

S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-DL-ホモシステイン

S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン；および

S-[2-(1-イミノエチルアミノ)エチル]-L-ホモシステイン

S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン

S-[(S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン

S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D-システイン

S-[(S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D-システイン

S-[(R/S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D/L-システイン

S-[(R/S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-L-システイン

S-[(R/S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D-システイン

S-[(R)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D/L-システイン

S-[(S)-2-(1-イミノエチルアミノ)プロピル]-D/L-システイン

本発明での使用のためのiNOS阻害薬は好ましくは式(I)の化合物、さらに好ましくは式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)または式(VIII)の選択性誘導型NOS阻害薬である。

【0028】

アジュバントとして使用するのに好適な式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)または(VIII)の化合物の塩および溶媒和物は、その対イオンまたは結合した溶媒が薬学上許容される場合のものである。しかし、薬学上許容されない対イオンまたは結合した溶媒を持つ塩および溶媒和物は、例えば式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)または(VIII)のその他の化合物ならびにそれらの薬学上許容される塩、溶媒和物、および生理学上機能的な誘導体の調製の際の中間体としての使用について、本発明の範囲内である。

【0029】

用語「生理学上機能的な誘導体」とは、例えばそれが入る体内で変換可能であることなどによって、式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)または(VIII)の遊離化合物と同一の生理学的機能を持つ、式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)または(VIII)の化合物の化学誘導体を意味する。本発明については、生理学上機能的な誘導体として、エステル、アミドおよびカルバメート、好ましくはエステルおよびアミドが含まれる。

【0030】

本発明に従う好適な塩として、有機および無機の両方の酸または塩基によって形成されるものが含まれる。薬学上許容される酸付加塩として、以下の酸から形成されるものが含

まれる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、リン酸、乳酸、ピルビン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、コハク酸、シュウ酸、フマル酸、マレイン酸、オギザロ酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、pトルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸およびイセチオン酸。薬学上許容される塩基塩として、以下のものが含まれる：アンモニウム塩、アルカリ金属塩、例えばナトリウムおよびカリウムの塩、アルカリ土類金属塩、例えばカルシウムおよびマグネシウムの塩、ならびに有機塩基、例えばジシクロヘキシルアミンおよびN-メチル-D-グルカミンとの塩。

【0031】

式(1)の化合物の薬学上許容されるエステルおよびアミンは、 C_{1-6} アルキル、アリール、アリール C_{1-6} アルキル、またはアミノ酸エステルもしくはアミドに変換される酸を持っていてもよい。式(1)の化合物の薬学上許容されるアミドおよびカルバメートは、 C_{1-6} アルキル、アリール、アリール C_{1-16} アルキル、またはアミノ酸アミドもしくはカルバメートに変換されるアミノ基を持っていてもよい。

10

【0032】

本発明のワクチンは常套的な液体形態で個体の組織中に投与することができる。この場合、iNOS阻害薬をワクチン抗原、そして存在させるならばその他のワクチンアジュバントとともに製剤化する。しかし、ワクチンをキットの形態で提供して、この中でワクチンおよびiNOS阻害薬を別々に投与することができる。例えば、ワクチン抗原を筋肉内投与して、一方iNOS阻害薬を経口投与することができる。あるいは、粒状化固形ワクチン抗原の皮膚内への弾道送達用にこの粒子に組み合わせたiNOS阻害薬を含ませるか、あるいはワクチン投与の部位に局所送達するか、または経口送達することができる。

20

【0033】

本発明の特に好ましい1実施形態中、ワクチンを弾道送達法によって皮膚内に送達し、iNOS阻害薬を錠剤の形態で経口送達する。この実施形態中、ワクチンは好ましくはDNAワクチンである。錠剤の製剤化は当業者によって容易に決定される。

【0034】

したがって、本発明のワクチン投与および処置方法は、ワクチン抗原の1部位への投与とiNOS阻害薬の別の部位への別々の投与を包含する。

【0035】

本発明のワクチンで使用する抗原はペプチド、タンパク質、多糖類、タンパク質-多糖類コンジュゲート、核酸または脂質抗原とすることができるが、好ましくは核酸、好ましくはタンパク質の*in vivo*発現のための、DNAワクチンを投与する。

30

【0036】

DNAワクチンは通常、強力ウイルスプロモーター、抗原性ペプチドをコードする目的の遺伝子、およびポリアデニル化/転写終結配列が挿入された細菌プラスミドベクターで構成される。目的の遺伝子は全タンパク質、または単純に、病原体、腫瘍または対抗して保護することを意図するその他の物質に関係する1抗原性ペプチド配列をコードするものでもよい。プラスミドは例えば大腸菌などの細菌中で増殖させ、次に単離して、宿主に投与する前に、想定する投与経路に応じて、適切な媒体中で調製する。投与後、プラスミドは宿主の細胞に取り込まれて、そこでコードされたペプチドが産生される。哺乳動物宿主中のプラスミドの複製および関係する動物の染色体DNA内への組み込みを防止するために、プラスミドベクターは好ましくは真核細胞中で機能する複製起源を含ませないで作製する。

40

【0037】

従来からのワクチン投与技術に比較して、DNAワクチン投与には多数の利点がある。第1に、DNA配列にコードされたタンパク質が宿主中で合成されるので、そのタンパク質の構造またはコンホメーションは疾病状態に関係する天然のタンパク質と同様であることが予測される。またおそらく、DNAワクチン投与は、保存タンパク質からのエピトープを認識する細胞傷害性Tリンパ球応答を産生することによって、あるウイルスの別異株に対する保護を提供することとなるものと見られる。さらに、プラスミドは宿主細胞によって取

50

り込まれて、そこで抗原性タンパク質を産生することができるので、長期間続く細胞および液性免疫応答が誘導されることとなる。またこの技法は単一の調製品中に多様な免疫原を配合する可能性を提供して、多数の疾病状態に関係した共免疫を促進することができる。

【0038】

DNAワクチン投与に関連する有用な背景情報が、Donnellyら、「DNAワクチン (DNA vaccines)」 Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648、に提供されており、この開示の全部を参照として本明細書中に含ませる。

【0039】

従来のワクチン投与治療法に比較してDNAワクチン投与には数々の利点があるにもかかわらず、1動物に投与されたDNAプラスミドがコードするタンパク質によって誘導される免疫応答を増加させるのに役立つ改良を開発することへの要望がなおある。本発明はこれらの事項を目的とする。同様に、本発明は従来のタンパク質に基づく手法について多大な効果を伴って使用することができる。

10

【0040】

1実施形態中、本発明の組成物を粒子射撃法によって送達することができる。これらの多くが記載されている(WO 91/07487)。説明のための1例として、Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) およびPowderject Vaccines Inc. (Madison, WI)によって製造されたものなどの器具によって、ガス駆動粒子加速を達成することができる。これらの数例が以下に記載されている：米国特許第5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; および5,584,807号;ならびに英国特許第0500 799号。この手法は針無しの送達手法を提供する。この場合、ポリヌクレオチドなどの顕微鏡的粒子の乾燥粉末製剤を手持式器具によって生成させたヘリウムガス中で高速に加速し、対象とする標的組織、典型的には皮膚中に粒子を推進させる。粒子は好ましくは0.4 - 4.0 μm 、より好ましくは0.6 - 2.0 μm の直径の金ビーズであり、DNAコンジュゲートをこれらにコーティングし、次に「遺伝子銃」中に入れるためのカートリッジまたはカセットに装填する。

20

【0041】

関連する1実施形態中、本発明の組成物のガス駆動無針注入のために有用なその他の器具および方法としてBioject, Inc. (Portland, OR)が提供するものがある。これらのいくつかの例が以下に記載されている：米国特許第4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 および5,993,412号。

30

【0042】

皮膚内への微粒子弾道送達法によるタンパク質またはDNAワクチン投与との関連において、iNOS阻害薬をワクチン投与の前、同時または後のいずれかに、(直接注射または経口送達などによって)全身適用することができる。あるいは、NOS阻害薬をワクチン投与実行の前または後に、ワクチン投与の部位に局所適用することができる。

【0043】

本発明の別の実施形態中、iNOS阻害薬それ自体を送達用固形投与粒子とともに製剤化することができる。ワクチンはDNAワクチンが好ましく、したがってiNOS阻害薬を金もしくはタングステンビーズ上にDNAとともに製剤化し、この固形組成物を皮膚内に弾道送達することができる。したがって、ワクチン抗原およびiNOS阻害薬を含む、皮膚内への弾道送達用に好適な固形組成物が提供される。好ましくは、組成物はワクチン抗原およびiNOS阻害薬(さらに好ましくは部分選択性iNOS阻害薬、最も好ましくは高選択性iNOS阻害薬)、ならびに金もしくはタングステンビーズを含む。また、この段落に記載した固形組成物を含む、本発明の微粒子ワクチンの個体の皮膚内への弾道送達用の器具も提供される。

40

【0044】

iNOS化合物は全身的に(経口または注入によって)1日について0.001~200mg/kg、好ましくは0.01~20mg/kgの用量をワクチン投与の時間またはその前後に投与することができる。成人についての用量範囲は一般的に0.1mg~10g/日、そして好ましくは1mg~1g/日である。錠剤または個別の単位で提供されるの別の供給形態には、こうした投与法に十分な

50

量、またはその量の複数倍の本発明の化合物を含ませるのが好都合である。例えば0.1mg ~ 500mg、通常はおよそ1mg ~ 200mgを含有する単位である。

【0045】

iNOS阻害薬をワクチン用剤の注入部位への局所投与のため、またはワクチン用剤との製剤化のため、あるいは固形ワクチン送達用剤上に製剤化する場合は、iNOS阻害薬の用量はそれらの全身投与量よりも実質的に少なくてもよい。これらの適用に好適な用量は当業者が容易に決定することができる。これとの関連において、iNOS阻害薬を局所クリーム製剤中に製剤化し、これを注入またはその部位への弾道送達用の直前に注入部位にこすり付けるか、あるいは当業者によって適宜決定されたその後の時期に適用することができる。

【0046】

好ましい1実施形態中、抗原はヒト病原体に対する免疫応答を誘導する能力があり、その抗原または抗原性組成物は以下のものから誘導される：HIV-1、(tat、nef、gp120もしくはgp160、gp40、p24、gag、env、vif、vpr、vpu、revなど)、ヒトヘルペスウイルス(gH、gL、gM、gB、gC、gK、gEもしくはgDなど)もしくはこれらの誘導體、または即時型タンパク質、例えばHSV1もしくはHSV2からのICP27、ICP 47、ICP 4、ICP36、サイトメガロウイルス、特にヒトのもの(gBなど、もしくはその誘導體)、エプスタイン・パールウイルス(gp350など、もしくはその誘導體)、水痘(Varicella Zoster)ウイルス(gpI、II、IIIおよびIE63など)、または肝炎ウイルス、例えばB型肝炎ウイルス(例えばB型肝炎表面抗原または肝炎コア抗原もしくはpol)、C型肝炎ウイルス抗原およびE型肝炎ウイルス抗原、あるいはその他のウイルス病原体、例えばパラミクソウイルス：呼吸器合胞体ウイルス(FおよびGタンパク質またはその誘導體など)、あるいはパラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス類(例えばHPV6、11、16、18、egL1、L2、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7)、フラビウイルス類、(例えば黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、だに媒介脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス)またはインフルエンザウイルス細胞(HA、NP、NA、もしくはMタンパク質またはこれらの組み合わせ)、または以下のような細菌病原体由来の抗原：Neisseria(ナイセリア)属の種、例えばN. gonorrhoea(ゴノレア)およびN. meningitidis(メニンギティジス)(例えばトランスフェリン結合性タンパク質、ラクトフェリン結合性タンパク質、PilC、アドヘシン(adhesin)); S. pyogenes(ピオゲンズ)(例えばMタンパク質もしくはその断片、C5Aプロテアーゼ)、S. agalactiae(アガラクティアエ)、S. mutans(ムタンズ); H. ducreyi(デユクレイ); Moraxella(モラキセラ)属の種、例えばM. catarrhalis(カタラリス)、Branhamella catarrhalis(ブラナメラ・カタラリス)としても知られている(例えば高および低分子量アドヘシンおよびインペーシン); Bordetella(ボルデテラ)属の種、例えばB. pertussis(ベルツシス)(例えばベルタクチン、ベルツシストキシンもしくはその誘導體、繊維状ヘマグルチニン、アデニル酸サイクラゼ、フィンプリエ)、B. parapertussis(パラベルツシス)およびB. bronchiseptica(ブロンキセプティカ); Mycobacterium(マイコバクテリウム)属の種、例えばM. tuberculosis(ツベルクロシス)(例えばESAT6、抗原85A、-Bもしくは-C、MPT 44、MPT59、MPT45、HSP10、HSP65、HSP70、HSP 75、HSP90、PPD 19kDa [Rv3763]、PPD 38kDa [Rv0934])、M. bovis(ボビス)、M. leprae(レプラエ)、M. avium(アビウム)、M. paratuberculosis(パラツベルクロシス)、M. smegmatis(スメグマチス); Legionella(レジオネラ)属の種、例えばL. pneumophila(ニューモフィラ); Escherichia(エシェリチア)属の種、例えば腸内毒性大腸菌(例えばコロニー化因子、熱不安定性トキシンもしくはその誘導體、熱安定性トキシンもしくはその誘導體)、腸出血性大腸菌、腸病原性大腸菌(例えばシガトキシン様トキシンもしくはその誘導體); Vibrio(ビブリオ)属の種、例えばV. cholera(コレラ)(例えばコレラトキシンもしくはその誘導體); Shigella(シゲラ)属の種、例えばS. sonnei(ソネイ)、S. dysenteriae(ディセンテリアエ)、S. flexnerii(フレクスネリ); Yersinia(イエエルシニア)属の種、例えばY. enterocolitica(エンテロコリティカ)(例えばYopタンパク質)、Y. pestis(ペスティス)、Y. pseudotuberculosis(シュードツベルクロシス); Campylobacter(カンピロバクター)属の種、例えばC. jejuni(ジェジュニ)(例えばトキシン、アドヘシンおよびインペーシン)およびC. coli(コリ); Salmonella(サルモネラ)属の種、例

10

20

30

40

50

えば *S. typhi*(ティフィ)、*S. paratyphi*(パラティフィ)、*S. choleraesuis*(コレラエスイス)、*S. enteritidis*(エンテリティディス); *Listeria*(リステリア)属の種、例えば *L. monocytogenes*(モノサイトゲネス); *Helicobacter*(ヘリコバクター)属の種、例えば *H. pylori*(ピロリ)(例えばウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化トキシン); *Pseudomonas*(シュードモナス)属の種、例えば *P. aeruginosa*(アエルギノーサ); *Staphylococcus*(スタフィロコッカス)属の種、例えば *S. aureus*(アウレウス)、*S. epidermidis*(エピデルミディス); *Enterococcus*(エンテロコッカス)属の種、例えば *E. faecalis*(ファエカリス)、*E. faecium*(ファエシウム); *Clostridium*(クロストリジウム)属の種、例えば *C. tetani*(テタニ)(例えば破傷風トキシンおよびその誘導体)、*C. botulinum*(ボツリヌム)(例えばボツリヌストキシンおよびその誘導体)、*C. difficile*(ディフィシレ)(例えばクロストリジウムトキシンA 10
 もしくは B およびそれらの誘導体); *Bacillus*(バチルス)属の種、例えば *B. anthracis*(アントラシス)(例えばボツリヌストキシンおよびその誘導体); *Corynebacterium*(コリネバクテリウム)属の種、例えば *C. diphtheriae*(ジフテリアエ)(例えばジフテリアトキシンおよびその誘導体); *Borrelia*(ボレリア)属の種、例えば *B. burgdorferi*(ブルグドルフェリ)(例えば *OspA*、*OspC*、*DbpA*、*DbpB*)、*B. garinii*(ガリニイ)(例えば *OspA*、*OspC*、*DbpA*、*DbpB*)、*B. afzelii*(アフゼリイ)(例えば *OspA*、*OspC*、*DbpA*、*DbpB*)、*B. andersonii*(アンデルソニイ)(例えば *OspA*、*OspC*、*DbpA*、*DbpB*)、*B. hermsii*(ヘルムシイ); *Ehrlichia*(エールリヒア)属の種、例えば *E. equi*(エクイ)およびヒト顆粒球エールリヒア症病原体; *Rickettsia*(リケッチア)属の種、例えば *R. rickettsii*(リケッチイ); *Chlamydia*(クラミジア)属の種、例えば *C. trachomatis*(トラコマティス)(例えば MOMP、ヘパリン結合性タンパク質)、*C. pneumoniae*(ニューモニアエ)(例えば MOMP、ヘパリン結合性タンパク質)、*C. psittaci*(プシタシ); *Leptospira*(レプトスピラ)属の種、例えば *L. interrogans*(インテロガンズ); *Treponema*(トレポネマ)属の種、例えば *T. pallidum*(パリヅム)(例えば希少外膜タンパク質)、*T. denticola*(デンチコラ)、*T. hyodysenteriae*(ヒオディセンテリアエ);
 あるいは以下のような寄生生物由来のもの; *Plasmodium*(プラスモジウム)属の種、例えば *P. falciparum*(ファルシパルム); *Toxoplasma*(トキソプラズマ)属の種、例えば *T. gondii*(ゴンディイ)(例えば SAG2、SAG3、Tg34); *Entamoeba*(エンタモエバ)属の種、例えば *E. histolytica*(ヒストリティカ); *Babesia*(バベシア)属の種、例えば *B. microti*(ミクロティ); *Trypanosoma*(トリパノゾマ)属の種、例えば *T. cruzi*(クルジ); *Giardia*(ギアルディア)属の種、例えば *G. lamblia*(ランブリア); *Leshmania*(レシマニア)属の種、例えば *L. major*(マジョア) 30
); *Pneumocystis*(ニューモシスティス)属の種、例えば *P. carinii*(カリニイ); *Trichomonas*(トリコモナス)属の種、例えば *T. vaginalis*(バギナリス); *Schistosoma*(シソストマ)属の種、例えば *S. mansoni*(マンソニ)、または以下のような酵母由来のもの; *Candida*(カンジダ)属の種、例えば *C. albicans*(アルビカンス); *Cryptococcus*(クリプトコッカス)属の種、例えば *C. neoformans*(ネオフォルマンズ)。

【 0 0 4 7 】

M. tuberculosis(ツベルクロシス)についてのその他の好ましい特異的抗原は例えば以下のものである: *Rv2557*、*Rv2558*、*RPFs: Rv0837c*、*Rv1884c*、*Rv2389c*、*Rv2450*、*Rv1009*、*aceA (Rv0467)*、*PstS1*、(*Rv0932*)、*SodA (Rv3846)*、*Rv2031c 16kDa*、*Tb Ra12*、*Tb H9*、*Tb Ra35*、*Tb38-1*、*Erd 14*、*DPV*、*MTI*、*MSL*、*mTTC2* および *hTCC1 (WO 99/51748)*。*M. tuberculosis*についてのタンパク質として、融合タンパク質およびそれらの変異体も含まれる。この場合、*M. tuberculosis*の少なくとも2つ、好ましくは3つのポリペプチドが融合してより大きいタンパク質となる。好ましい融合体として以下のものが含まれる: *Ra12-TbH9-Ra35*、*Erd14-DPV-MTI*、*DPV-MTI-MSL*、*Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2*、*Erd14-DPV-MTI-MSL*、*DPV-MTI-MSL-mTCC2*、*TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748)*。 40

【 0 0 4 8 】

クラミジアについて最も好ましい抗原として例えば高分子量タンパク質(HWMP)(WO 99/17741)、ORF3 (英国特許第366 412号)、および推定上の膜タンパク質(Pmp)が含まれる。ワクチン製剤のその他のクラミジア抗原はWO 99/28475に記載された群から選択することができる。

【 0 0 4 9 】

好ましい細菌ワクチンはStreptococcus(ストレプトコッカス)属の種、例えばS. pneumoniae(ニューモニアエ)由来の抗原(PsaA、PspA、ストレプトリシン、コリン結合性タンパク質)およびタンパク質抗原 Pneumolysin (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubinsら、Microbial Pathogenesis(微生物病因学), 25, 337-342)、ならびにこれらの無毒化突然変異体(WO 90/06951; WO 99/03884)を含む。その他の好ましい細菌ワクチンは以下のものを含む: Haemophilus(ヘモフィルス)属の種由来のもの、例えばH. influenzae(インフルエンザエ)タイプB由来の抗原(例えばPRPおよびそのコンジュゲート)、分類不能H. influenzae、例えばOMP26、高分子量アドヘシン、P5、P6、プロテインD およびリポプロテインD、ならびにフィンブリンおよびフィンブリン由来ペプチド(US 5,843,464)または多数の複製変異体もしくはそれらの融合タンパク質。

10

【 0 0 5 0 】

本発明で使用することができる抗原はさらにマラリアの原因となる寄生生物由来の抗原を含む。例えばPlasmodia falciparum(プラスモディア・ファルシパルム)からの好ましい抗原としてRTS,S およびTRAPが含まれる。RTSは、B型肝炎ウイルスの表面(S)抗原に、B型肝炎表面抗原のpreS2部分4アミノ酸を介して連結した、P.falciparumの周縁胞子小体(CS)タンパク質の実質的に全C末端を含む、ハイブリッドタンパク質である。その全構造が以下に開示されている: 国際特許出願番号 PCT/EP92/02591(公開番号 WO 93/10152、英国特許出願番号 No.9124390.7の優先権を主張)。酵母中で発現させたとき、RTSはリポタンパク質粒子として産生され、HBVからのS抗原とともに同時発現させたときは、RTS,Sとして知られている混合粒子が産生される。TRAP抗原は以下に記載されている: 国際特許出願番号 PCT/GB89/00895(公開番号 WO 90/01496)。本発明の好ましい1実施形態はマラリアワクチンで、この場合抗原性調製物はRTS,S およびTRAP抗原の配合物を含む。多段階マラリアワクチンの成分の候補と考えられるその他のプラスモディア抗原には以下のものがある: P. faciparum MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、Sequestrin、PfEMP1、Pf32、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230およびPlasmodium属の種中のこれらの類似体。

20

【 0 0 5 1 】

本発明は抗腫瘍抗原の使用を想定しており、がんの免疫治療法に有用となる。例えば、以下のようながんについての腫瘍拒絶抗原である: 前立腺、乳房、結直腸、肺、すい臓、腎臓およびメラノーマ。代表的な抗原として以下のものが含まれる: MAGE 1、3 およびMAGE 4またはその他のMAGE抗原(例えばWO99/40188に開示されているもの)、PRAME、BAGE、Lage(NY Eos 1としても知られている)、SAGE およびHAGE (WO 99/53061)あるいはGAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde ら、International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997年提出); Correale ら(1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293)。実際に、これらの抗原はメラノーマ、肺がん腫、肉腫および膀胱がん腫などの広範囲の腫瘍タイプ中で発現する。

30

【 0 0 5 2 】

本発明で使用するためのMAGE抗原は発現エンハンサーまたは免疫学的融合相手との融合タンパク質として発現させることもできる。特に、MAGE タンパク質はHaemophilus influenzae BからのプロテインDに融合させることができる。特に、この融合相手にはプロテインDの最初の1/3を含ませることができる。こうした構築物はWO 99/40188に開示されている。がん特異的エピトープを含む融合タンパク質のその他の例として、bcr / abl融合タンパク質がある。

40

【 0 0 5 3 】

好ましい1実施形態中、以下のような前立腺抗原が利用される: 前立腺特異的抗原(PSA)、PAP、PSCA (PNAS 95(4) 1735-1740 1998)、PSMAまたはプロスターゼとして知られている抗原。

【 0 0 5 4 】

50

プロスターゼは前立腺特異的セリンプロテアーゼ(トリプシン様)であり、長さが254アミノ酸で、保存セリンプロテアーゼ触媒性三連のH-D-S、およびアミノ末端プレ-プロペプチド配列を持ち、潜在的分泌機能があることを示している(P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood & K. Wand, 「プロスターゼ、前立腺限定発現をするアンドロゲン調節セリンプロテアーゼの分子クローニングおよび特性決定 (Molecular cloning and characterisation of prostatic serine protease, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114-3119)。推定上のグリコシル化部位が記載されている。予測される構造はその他の既知のセリンプロテアーゼに非常に類似しており、成熟ポリペプチドが単一のドメイン中に折り込まれていることを示している。成熟タンパク質は長さが224アミノ酸で、天然にプロセシされたことを示す1個のA2エピトープを持っている。

10

【0055】

プロスターゼヌクレオチド配列ならびに演繹されたポリペプチドおよび相同体が以下に開示されている：Fergusonら、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)および国際特許出願番号 WO 98/12302 (また、これに対応する米国特許第5,955,306号)、WO 98/20117 (また、これに対応する米国特許第5,840,871 および5,786,148号) (前立腺特異的カリクレイン)およびWO 00/04149 (P703P)。

【0056】

本発明はプロスターゼタンパク質ならびにその断片および相同体に基づくプロスターゼタンパク質融合体(「誘導體」)を含む抗原を提供する。こうした誘導體は前立腺腫瘍の治療に好適な治療用ワクチン製剤における使用に好適である。典型的には、断片は上記の引用特許および特許出願中に開示されているように、少なくとも20、好ましくは50、さらに好ましくは100の連続アミノ酸を含むこととする。

20

【0057】

さらに別の好ましい前立腺抗原はP501S(WO98/37814の配列番号113)として知られている。上記の引用特許出願中に開示されているように、その遺伝子にコードされた、少なくとも20、好ましくは50、さらに好ましくは100の連続アミノ酸を含む、免疫原性断片および部分を想定している。特記すべき断片はPS108 (WO 98/50567)である。

【0058】

その他の前立腺特異的抗原がWO98/37418 および WO/004149から知られている。その外、STEAP PNAS 96 14523 14528 7-12 1999 中にもある。

30

【0059】

本発明に関して有用なその他の腫瘍関連抗原として以下のものが含まれる：Plu-1 J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999, HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomonら、Bioessays 199, 21 61-70、米国特許第5654140号)、Criptin (米国特許第5 981 215号)。その外、がんの治療におけるワクチンに特に関係する抗原にはチロシナーゼおよびスルビピンも含まれる。

【0060】

本発明は以下のような乳がん抗原と組み合わせることも有用である：Muc-1、Muc-2、EpCAM、her 2/ Neu、マンマグロビン(mammaglobin)(米国特許第5668267号)またはWO/00 521 65、WO99/33869、WO99/19479、WO 98/45328に開示されたもの。Her 2 neu 抗原は中でも米国特許第5,801,005号に開示されている。好ましくは、Her 2 neuは全細胞外ドメイン(ほぼアミノ酸1-645を含む)もしくはその断片およびおよそ580アミノ酸のC末端の少なくとも免疫原性部分もしくは全細胞内ドメインを含む。特に、細胞内部分はリン酸化ドメインまたはその断片を含むべきである。こうした構築物はWO00/44899中に開示されている。特に好ましい構築物はECD PDとして知られ、第2はECD PDとして知られている(WO/00/44899参照)。

40

【0061】

本明細書で使用するher 2 neuはラット、マウスまたはヒトから誘導することができる。

50

【0062】

ワクチンは腫瘍支持機構(例えば血管形成、腫瘍浸潤)に関係する抗原、例えばtie 2, VEGFをも含んでいてもよい。

【0063】

本発明のワクチンは、アレルギー、がんまたは感染性疾患のほかに、慢性疾患の予防または治療にも使用することができる。こうした慢性疾患とは、喘息、アテローム性動脈硬化症およびアルツハイマー症などの疾病ならびにその他の自己免疫疾患である。避妊薬として使用するためのワクチンも考慮に入れられる。

【0064】

アルツハイマー性神経退行疾病傾向があるか罹患した患者の予防もしくは治療に関する抗原は、特にアミロイド前駆体タンパク質のN末端39-43アミノ酸断片およびさらに小さい断片である。この抗原が国際特許出願番号 WO 99/27944 (Athena Neurosciences)に開示されている。

【0065】

自己免疫疾患のためのワクチンまたは避妊ワクチンに含まれる潜在的自己抗原の例として以下ものがある：サイトカイン、ホルモン、成長因子または細胞外タンパク質、さらに好ましくは4-ヘリクスサイトカイン、最も好ましくはIL13。サイトカインとして例えば以下のものが含まれる：IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL20、IL21、TNF、TGF、GMCSF、MCSFおよびOSM。4-ヘリクスサイトカインとして以下のものが含まれる：IL2、IL3、IL4、IL5、IL13、GMCSFおよびMCSF。ホルモンとして例えば以下のものが含まれる：黄体形成ホルモン(LH)、濾胞刺激ホルモン(FSH)、コリオゴナドトロピン(CG)、VGF、GHrelin、アグーチ(agouti)、アグーチ関連タンパク質および神経ペプチドY。成長因子として例えばVEGFが含まれる。

【0066】

本発明のワクチンは慢性症状およびがんなどの疾病の免疫治療法に特に好適であるが、持続感染の治療にも適している。したがって、本発明のワクチンは以下のような感染性疾患の免疫治療に特に好適である：結核(TB)、HIV感染症、AIDSなど、およびB型肝炎(HepB)ウイルス感染症。

【0067】

したがって、TB、AIDSおよびHepBなどの感染性疾患の免疫治療のための本発明に関わるワクチン、ならびにTB、AIDSおよびHepBなどの感染性疾患の免疫治療のための医薬の製造におけるその使用、が提供される。TBに関しては、TB感染症に罹患した個体の治療法が提供され、これは本発明のワクチンの個体への投与、およびそれによるその個体の細菌の負荷の低下を含む。肺喀痰中に見られるTBの量の低下からなる細菌負荷の低下は、TB疾病の改善および治癒をもたらす。

【0068】

また、AIDSに関しては、AIDSに罹患しやすいかまたは罹患した個体の治療方法が提供される。この方法は、本発明のワクチンの個体への投与と、それによるその後のHIV感染に起因するCD4+ T細胞の減退量の縮小、またはすでにHIVに感染した個体中のCD4+ T細胞の減退の遅延もしくは停止、を含む。

【0069】

その上、持続性B型肝炎ウイルス感染に関しては、HepBに感染しやすいかまたは罹患した個体の治療法が提供される。したがって、本発明のワクチンの個体への投与と、それによる血清中のHepB負荷レベル(DNAクリアランスによって測定)の低下と、さらに肝臓の損傷の減少(酵素アラニントランスフェラーゼ(ALT)の血清レベルの低下もしくは安定化によって検出)を含む、方法が提供される。

【0070】

本発明の1実施形態中、抗原はポリヌクレオチドで、「裸の」DNAとして投与される。これは例えばUlmerら、Science 259:1745-1749, 1993に記載されており、またCohen, Sci 50

ence 259:1691-1692, 1993に概説されている。ここでは、DNAが緩衝化生理食塩水中で製剤化される。裸のDNAの取り込みはDNAを生分解性ビーズ上にコーティングして細胞内に効果的に輸送することによって増加させることができるが、あるいはその他の周知のトランスフェクトを促進する薬剤を使用することもよい。抗原をコードするDNAを例えばリポソームなどの担体と結合させて投与してもよい。典型的には、こうしたリポソームはカチオン性で、例えばイミダゾリウム誘導體 (W095/14380)、グアニジン誘導體 (W095/14381)、ホスファチジルコリン誘導體 (W095/35301)、ピペラジン誘導體 (W095/14651)およびピグアニド誘導體などである。

【0071】

本発明は限定するわけではないが、以下の実施例によって例示される。これらの特定の
10 実施例中に記載されている各パラメーターは発明全体の好ましい1態様として適用し得る、一般的な様相として解釈すべきである。

【実施例】

【0072】

1. 誘導性酸化窒素シンターゼ阻害薬は核酸ワクチンに対するCD4+ T細胞応答の程度を増加させる

1.1. プラスミドの構築およびDNA調製

使用したプラスミドはpVAC1に基づくもので、Michelle Young, GlaxoSmithKline, UKから取得した。これは哺乳動物発現ベクター pCI (Promega)の修飾物であり、この際、その多重クローニング部位のEcoRIからBst ZIを、5'側で特異的Nhe I、Rsr IIおよびXho I、
20 ならびに3'側で特異的Pac I、Asc IおよびNot I制限酵素部位に隣接しているEMCV IRES配列で置換している。ニワトリオボアルブミン発現プラスミド、pVAC1.OVAを、pUGOVA (Dr. F. Carboneより寄贈)からのニワトリオボアルブミンをコードするcDNAをPCR増幅して発現ベクター pVAC1中に連結することによって、構築した。

【0073】

プラスミドDNAをE. coli中で増殖させ、プラスミド精製キット(QIAGEN Ltd, Crawley, UK)を使用して調製し、10 mM Tris/EDTAバッファー中、約 1 mg プラスミド DNA/mlで、
20 で保存した。

【0074】

1.2. 粒子媒介免疫治療用送達 (PMID)のためのカートリッジの調製

Accell遺伝子転移器具を使用するPMIDのためのカートリッジの調製は既述にしたがった (Eisenbraunら、DNA and Cell Biology, 1993 Vol 12 No 9 pp 791-797; Pertnerら)。簡単に記載すると、プラスミドDNAを2 μm 金粒子 (DeGussa Corp., South Plainfield, N.J., USA)上にコーティングし、Tefzelチューブ中に入れ、続いて長さ1.27 cmに切断し、カートリッジとして供し、使用まで4 で乾燥下で保存した。典型的なワクチン投与では、各カートリッジに ~0.5 μg pVAC1.OVAまたは空のベクター (pVAC1)をコーティングした金 0.5 mgを含ませた。

【0075】

1.3. in vivoミニポンプ送達のための1400Wの調製

1400Wを滅菌水中に溶解し、ミニポンプ (ALZET Scientific Products, Charles River, UKより購入)中に入れた。各ミニポンプは1.0 μl/時間で化合物の連続注入を供給した。対照ポンプには滅菌水のみを含ませた。

【0076】

1.4. マウスおよび免疫化

雄および雌 DO.11.10 トランスジェニックマウス (6-10 週齢)を、Bury Green Farmで我々の特別の無病原体動物飼育設備で飼育した。これらのマウスが発現するトランスジーンは、MHC-II分子 (I-Ad)に結合したニワトリオボアルブミンペプチド残基 (残基 323-339; OVA ペプチド)に特異的なT細胞受容体 (TCR)である。このTCRを特異的に認識するモノクローナル抗体、KJ1.26を、TCR-トランスジェニックT細胞の同定のために使用した。

【0077】

10

20

30

40

50

Balb/c マウスはCharles River United Kingdom Ltd. (Margate, UK)から購入した。

【0078】

CD4+ T細胞応答は、測定する免疫パラメーターの感受性を強化する、養子免疫移入モデルを使用して、試験した。ここでは、オポアルブミンタンパク質からのペプチド配列を特異的に認識するT細胞を、トランスジェニックからナイーブ野生型マウスに免疫化前に養子免疫移入した。簡単に記載すると、免疫化の24時間前に、D0.11.10脾細胞を6-8週齢のBalb/cマウス中に養子免疫移入した。脾細胞の調製のために、頸椎脱臼によってマウスを絶命させ、脾臓を氷冷OBS中に回収した。脾細胞をリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)中に取り出し、その後赤血球細胞を溶解させた(155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1mM EDTAで構成されるバッファー中で1分間)。PBS中で2回洗浄して粒子物質を除去した後、単一細胞懸濁液を、外側尾部静脈中に100 μl (すなわち25 × 10⁶ 脾細胞/マウス)の注入によって、養子免疫移入した。

10

【0079】

24時間後、1400W (10 mg/kg/時間、を送達)、または滅菌水(対照)を含有するミニポンプを麻酔したマウスの皮下にインプラントした。次に、pVAC1.0VAまたは空のベクターのいずれかの2つのカートリッジによるPMIDによって、即座にマウスを免疫化した(1 μg プラスミド DNA/マウス)。

【0080】

ex vivo分析のためのCD4 T細胞の調製

5日後、脾細胞の場合(上記)のようにして、マウスを頸椎脱臼によって絶命させ、鼠径および動脈周囲リンパ節を回収して調製した。ただし、赤血球溶解ステップは除外した。免疫化によって誘導されたCD4+ T細胞のin vivoクローン増殖を測定するため、リンパ節細胞調製物中で、オポアルブミン特異的T細胞の割合をex vivo評価した。簡単に記載すると、各マウス個体からのリンパ節細胞のアリコート、KJ1.26 (0.2 μg, Caltag)および抗CD4 (0.5 μg, Sigma)を使用して、フローサイトメトリー分析(Coulter XL)のために加工した。リンパ球の前方および側方散乱(全リンパ節細胞の~90%)によって、1集団内のKJ1+ CD4+ 細胞の割合を測定した。残存するリンパ節細胞を実験グループ内でプールし、計数し、ELISPOT分析のために、10% FCSを含有する培地(RPMI、L-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン、2ME)中に再懸濁した(下記実施例2、参照)。

20

【0081】

図1は、pVAC1.0VA + ベヒクルでの処理が空ベクター(pVAC1.) + ベヒクルによるものに比較して、クローン増殖のわずかな増加を誘導することを示している。1400Wの添加によって観察されるクローン増殖の実質的増加が、この化合物のアジュバント効果を実証している。空ベクター + 1400Wまたはベヒクルグループ間では差異が見られず、1400Wの効果が抗原に制約されることを示している。

30

【0082】

2. 1400Wは核酸ワクチンに対してTh1およびTh2応答の両方を誘導する

CD4+ サブセットについて、IFN- (Th1)およびIL-4 (Th2)を産生するCD4+ T細胞のELISPOT分析によって、評価した。簡単に記載すると、リンパ節細胞懸濁液を、あらかじめ捕捉IFN- またはIL-4抗体でコーティングしたELISPOTプレート内に分注し、オポアルブミン同族ペプチドで刺激した。一晚培養後、抗マウスIFN- またはIL-4ビオチン標識抗体(P harmingen)、およびその後のストレプトアビジン-コンジュゲートアルカリホスファターゼの適用によって、IFN- またはIL-4 産生細胞を可視化し、イメージ分析を使用して定量した。

40

【0083】

pVAC1.0VA + ベヒクルでの免疫化は、対照グループに比較して、IL-4産生細胞の数の増加を誘導した。1400WとpVAC1.0VAの組み合わせで、効果無しからほぼ2倍の適度な効果までの範囲の多様な効果が観察された(図2)。

【0084】

対照グループに比較して、pVAC1.0VA + ベヒクルによって、IFN- 産生細胞の増加は変

50

動した(図3)。しかし、pVAC1.OVA + 1400Wの組み合わせはIFN- γ 産生細胞の数を実質的にかつ再現性を持って増加させた。IFN- γ 産生細胞への偏向性は、1400Wが核酸ワクチン投与のためのアジュバントとして作用するだけでなく、Th1型の応答を優先的に誘導することをも示している。

【0085】

3. 1400Wは核酸ワクチンに対するCD8+ T細胞応答の規模を増加させる

1.1 プラスミドおよびカートリッジの調製

細胞質に局在するニワトリオボアルブミンを発現するプラスミドを、pVAC1 (実施例1参照)に基づき、378bpの内部Sacl制限断片を欠損させることによって、構築した。この欠損はOVAをコードする領域内で、新たに発現するOVAcytタンパク質が非古典的分泌シグナルを含むOVAタンパク質のアミノ酸20-145を欠損しているようにしたものである(Boyleら、(1997), International Immunology 9: 1897-1906; Tabeら、(1984), J. Mol. Biol. 180: 645-666)。実施例1に記載したように、pVAC1.OVAcyt 0.05 μ g + pVAC1 0.45 μ g (すわち0.5 μ g プラスミドDNA/カートリッジ)を含むように、カートリッジを調製した。対照にはpVAC1 (0.5 μ g プラスミドDNA/カートリッジ)のみを含ませた。

【0086】

1.2 マウスおよび免疫化

C57Bl/6 マウスに、実施例1に記載したようにPMIDによって初回免疫した後、28日目に追加免疫した。追加の直前に、1400Wまたは滅菌水を含むミニポンプを皮下にインプラントした(方法論については実施例1参照)。12日後、T細胞アッセイのために脾臓を回収した。

【0087】

1.3 CD8 T細胞応答

細胞傷害性T細胞応答を、脾細胞のCD8+ T細胞制限IFN- γ ELISPOTアッセイによって評価した。マウスを頸椎脱臼によって絶命させ、脾臓を氷冷PBS中に回収した。脾細胞をリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)中に取り出し、その後赤血球細胞を溶解させた(155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1mM EDTAで構成されるバッファー中で1分間)。PBS中で2回洗浄して粒子物質を除去した後、あらかじめ捕捉IFN- γ またはIL-2抗体でコーティングしたELISPOTプレート内に分注し、CD-8制限同族ペプチドで刺激した。一晚培養後、抗マウスIFN- γ -ビオチン標識抗体(Pharmlingen)、およびその後のストレプトアビジン-コンジュゲートアルカリホスファターゼの適用によって、IFN- γ 産生細胞を可視化し、イメージ分析を使用して定量した。

【0088】

この実験の結果(図4)は、pVAC1.OVAcytおよび1400Wの組み合わせで処置したマウスの脾臓内のIFN- γ - または IL-2-産生 CD8+ T細胞の数が、pVAC1.OVAcyt + ベヒクルのみで処置したマウスからの場合の2倍であったことを示している。対照プラスミド(pVAC1) + 1400W またはベヒクル間での差異は観察されなかったため、1400Wの効果が抗原制限性であることを示している。これらの結果は1400Wが核酸ワクチン投与後の細胞傷害性T細胞応答を改善するための強力なアジュバントであることを明確に示している。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】誘導性酸化窒素シンターゼ阻害薬、1400WはオボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のオボアルブミン特異的CD4トランスジェニックT細胞のクローン増殖を増加させることを示す。

【図2】誘導性酸化窒素シンターゼ阻害薬、1400WはオボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のIL-4産生性オボアルブミン特異的CD4T細胞を再現性を持って増加させないことを示す。

【図3】誘導性酸化窒素シンターゼ阻害薬、1400WはオボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のIFN- γ 産生性オボアルブミン特異的CD4T細胞を実質的かつ再現性を持って増加させることを示す。

10

20

30

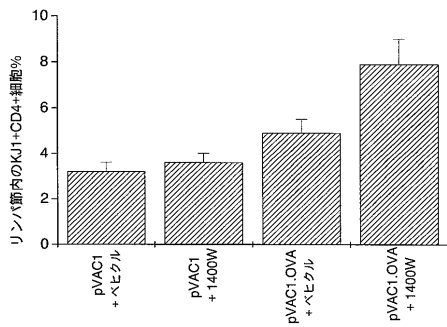
40

50

【図4】誘導性酸化窒素シターゼ阻害薬、1400WはオボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のIFN- γ 産生性オボアルブミン特異的CD8 $^{+}$ T細胞を実質的に増加させたことを示す。

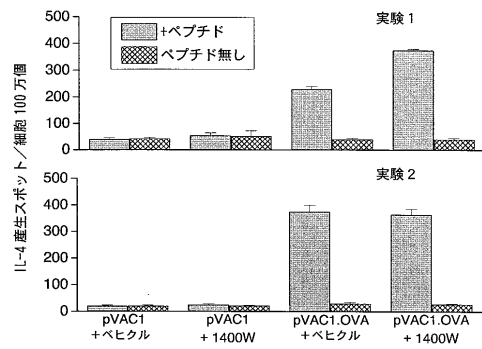
【図1】

誘導性酸化窒素シターゼ阻害薬1400Wは、オボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のオボアルブミン特異的CD4トランスジェニックT細胞のクローン増殖を増加させる。



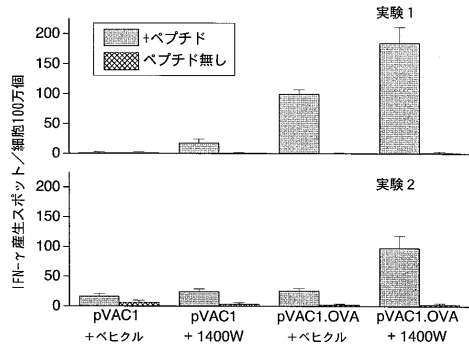
【図2】

誘導性酸化窒素シターゼ阻害薬1400Wは、オボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1.OVAによるPMID後のIL-4産生性オボアルブミン特異的CD4T細胞を再現性を持って増加させない。



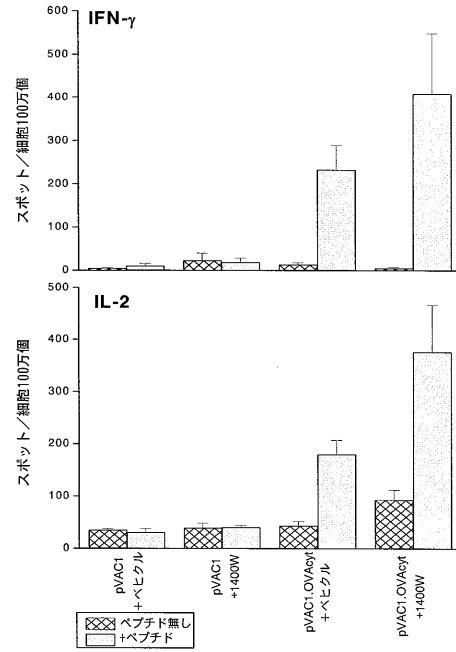
【 図 3 】

誘導性酸化窒素シターゼ阻害薬1400Wは、オボアルブミンをコードするプラスミドpVAC1. OVAによるPMID後のIFN-γ産生性オボアルブミン特異的CD4T細胞を実質的かつ再現性を持って増加させる。



【 図 4 】

誘導性酸化窒素シターゼ阻害薬1400Wは、プラスミドpVAC1. OVAcytによるPMID後のIFN-γ産生性オボアルブミン特異的CD8+ T細胞を実質的に増加させた。



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 02/04365
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39 A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THOMSEN LINDAY L ET AL: "Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: Studies with 1400W, a novel inhibitor." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 15, 1997, pages 3300-3304, XP002237342 ISSN: 0008-5472 the whole document --- -/--	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 April 2003		17/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/04365

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAHN DANIEL A ET AL: "Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 193, no. 11, 4 June 2001 (2001-06-04), pages 1261-1267, XP002237343 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document ---	1-24
A	GHERARDI M MAGDALENA ET AL: "Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 Env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: Suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 14, July 2000 (2000-07), pages 6278-6286, XP002237344 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document ---	1-24
P,X	US 6 375 944 B1 (TRINCHIERI GIORGIO ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23) the whole document -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GÉ 02/04365

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 18-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/GB 02/04365

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6375944	B1	US 2002081277 A1	27-06-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 47/02	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100112346
弁理士 内藤 由美

(72) 発明者 トムセン, リンディー, ルイーズ
イギリス国 ハートフォードシャー エスジ-1 2 エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクリン

F ターム(参考) 4C076 BB01 BB11 CC06 CC07 DD21
4C084 AA13 ZB09
4C085 AA03 DD86 EE06 FF12
4C206 AA01 FA53 HA10 JA26 KA17 MA02 MA04 MA63 MA72 MA86
NA14 ZB09 ZC20