

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4164361号
(P4164361)

(45) 発行日 平成20年10月15日(2008.10.15)

(24) 登録日 平成20年8月1日(2008.8.1)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 G

A 6 1 K 39/002 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/02 (2006.01)

A 6 1 K 39/002

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/02

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

請求項の数 54 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-540757 (P2002-540757)
 (86) (22) 出願日 平成13年10月31日(2001.10.31)
 (65) 公表番号 特表2004-512384 (P2004-512384A)
 (43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2001/001530
 (87) 国際公開番号 W02002/038175
 (87) 国際公開日 平成14年5月16日(2002.5.16)
 審査請求日 平成16年10月25日(2004.10.25)
 (31) 優先権主張番号 60/246,075
 (32) 優先日 平成12年11月7日(2000.11.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/307,159
 (32) 優先日 平成13年7月24日(2001.7.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503166816
 イムノワクチン テクノロジーズ インコ
 ーポレーテッド
 カナダ国 ビー3ジェイ 3アール1, ノ
 バ スコティア, ハリファックス, グラン
 ビル ストリート 1819, スィート
 303
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100112346
 弁理士 内藤 由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増強した免疫応答を有するワクチン、およびその調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 疎水性物質の連続相を含む担体；
 (b) リボソーム；
 (c) 抗原；および
 (d) 適切なアジュバント

を含有する、ワクチンとして使用するための組成物。

【請求項2】

前記疎水性物質が液体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記担体が、油、または油中水型エマルジョンである、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記油が、鉱油、植物油、スクアレンまたは木の実の(nut)油である、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記アジュバントが、ミョウバン(alum)、別のアルミニウム化合物、またはTiterMax(商標)である、請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

前記アジュバントがミョウバンである、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記抗原が、適切な天然型、非天然型、組換え型もしくは変性型のタンパク質またはペプチド、またはそれらの断片である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記抗原が、ウイルス、細菌、原生動物または哺乳動物抗原である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗原が、天然型エпитープを認識する抗体を引き出すことが可能である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記天然型エピトープが哺乳動物エピトープである、請求項 9 に記載の組成物。

10

【請求項 11】

前記哺乳動物が、ウマ、ウサギ、シカまたはネコである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗原が、透明帯糖タンパク質もしくはその断片、アルコールデヒドロゲナーゼ、B 型肝炎表面抗原、またはストレプトキナーゼである、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記リボソームが、非エステル化コレステロール、およびホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリンおよびホスホイノシトールからなる群より選択される少なくとも 1 つの頭部基を有するリン脂質を含む、請求項 3 に記載の組成物。

20

【請求項 14】

前記リボソームが、ホスホリポン90G(phospholipon90G)(商標)の脂質を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 15】

リピド A が実質的に入っていない、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記抗原が透明帯糖タンパク質またはその断片であり、アジュバントがミョウバンであり、ワクチンが哺乳動物において有効な長期免疫避妊をもたらす、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 17】

30

前記油が鉱油であり、前記組成物が本質的にリピド A を含まない、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

動物において免疫応答を増強するための医薬の製造における、
(a) 疎水性物質の連続相を含む担体；
(b) リボソーム；
(c) 抗原；および
(d) アジュバント
の使用。

【請求項 19】

40

前記疎水性物質が液体である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

前記担体が、油、または油中水型エマルジョンである、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 21】

前記油が、鉱油、植物油、スクアレンまたは木の実の油である、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

前記アジュバントがミョウバンである、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記抗原が、透明帯糖タンパク質もしくはその断片、アルコールデヒドロゲナーゼ、B

50

型肝炎表面抗原、またはストレプトキナーゼである、請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 4】

前記抗原が、天然型エピトープを認識する抗体を引き出すことが可能である、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記天然型エピトープが哺乳動物エピトープである、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

前記哺乳動物が、ウマ、ウサギ、シカ、またはネコである、請求項 2 5 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記医薬が実質的にリピド A を含まない、請求項 2 0 に記載の使用。

10

【請求項 2 8】

(a) 抗原または抗原/アジュバント複合体をリポソームに封入して、リポソーム封入抗原を形成するステップ；

(b) 該リポソーム封入抗原を、疎水性物質の連続相を含む担体と混合するステップ；および

(c) (a) において抗原/アジュバント複合体を使用しない場合にはアジュバントを添加するステップ

を含む、ワクチン組成物の調製方法。

【請求項 2 9】

前記リポソーム封入抗原を凍結乾燥する、請求項 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

アジュバントを添加する前に抗原をアジュバント無しでリポソームに封入し、該アジュバントを添加した後に該リポソーム封入抗原を凍結乾燥させて、アジュバントを外側に有する凍結乾燥リポソーム封入抗原を形成する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記アジュバントを、リポソーム封入抗原に添加する前に、発熱物質を含まない水に添加する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記アジュバントを外側に有する凍結乾燥リポソーム封入抗原を担体と混合し、水性媒体を該担体と混合して、疎水性物質中水型エマルジョンを形成する、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

次いで、前記アジュバントを外側に有する凍結乾燥リポソーム封入抗原を、担体と混合する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記リポソーム封入抗原が抗原/アジュバント複合体を含むものであり、前記凍結乾燥リポソーム封入抗原を担体と混合し、水性媒体を担体と混合して疎水性物質中水型エマルジョンを形成する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

(i) 前記リポソーム封入抗原を、前記担体と混合する前に水性媒体と混合し；

40

(ii) 該担体を該リポソーム封入抗原と混合する前に、前記アジュバントを該担体に添加し；および

(iii) 該担体を該リポソーム封入抗原と混合して、疎水性物質中水型エマルジョンを形成する、
請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 6】

(i) 前記リポソーム封入抗原が抗原/アジュバント複合体を含むものであり；

(ii) 該リポソーム封入抗原を、前記担体と混合する前に、水性媒体と混合し；および

(iii) 該リポソーム封入抗原を該担体と混合して、疎水性物質中水型エマルジョンを形成する、

50

請求項 28 に記載の方法。

【請求項 37】

前記疎水性物質が液体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 38】

前記液体が油である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記油が鉱油である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記アジュバントがミョウバンである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 41】

前記抗原が、透明帯糖タンパク質もしくはその断片、アルコールデヒドロゲナーゼ、B 型肝炎表面抗原、またはストレプトキナーゼである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 42】

前記アジュバントがミョウバンであり、前記担体が油または油中水型エマルジョンである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 43】

前記油が鉱油である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 44】

前記抗原が、ウイルス、細菌、菌類または酵母由来源に由来する抗原であり、疾患の予防に有用なものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 45】

前記抗原が、ウイルス、細菌、菌類または酵母由来源に由来する抗原であり、疾患の予防に有用なものである、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 46】

前記抗原が、ウイルス、細菌、菌類または酵母由来源に由来する抗原であり、疾患の予防に有用なものである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 47】

前記抗原が、癌に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記抗原が、癌に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 49】

前記抗原が、癌に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 50】

前記抗原が、癌以外の生物学的症状または避妊に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記抗原が、癌以外の生物学的症状または避妊に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 52】

前記抗原が、癌以外の生物学的症状または避妊に関連する免疫応答を引き出す抗原である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 53】

請求項 28 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の方法により調製された組成物。

【請求項 54】

前記抗原は前記リポソーム内に封入される、請求項 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、2000年11月7日に提出された米国特許仮出願USSN60/246,075号、および2001年7月24日に提出された同USSN60/307,159号(これらの開示は全体的に参照により本明細書に

10

20

30

40

50

援用される)の優先権の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、免疫学の分野、特にワクチンおよびその調製に関する。

【0003】

発明の背景

一般的に、ワクチンは少ない用量の特異的抗原を使用して、それよりも多い用量の抗原または同様の抗原化合物の効果を意図して、宿主において耐性を構築する。ワクチンに使用される抗原は、通常、抗体産生を誘導する、生物全体の一部または変性毒素(トキソイド)である。残念ながら、産生される抗体の一部しか、標的生物または毒素に結合しない。なぜなら、ほとんどの場合、ワクチンで使用される抗原は、標的と構造的に異なるからである。有用な抗原の利用可能性が限られていることから、過去のワクチン開発には限界があった。遺伝子操作の進歩により、組換え手段による抗原産生が可能になった。しかし、組換え手段により産生される抗原を使用しても、上記理由のために標的天然型抗原に対する親和性が乏しい抗体が低い量でしか産生されないことが多い。免疫化の効果は、標的に対して高い親和性を有する抗体がより多く産生された場合に、増強できる。当該技術では、ワクチン中で使用する抗原の量を増やすことなく、増強された免疫応答を生成するワクチンを開発する必要がある。特に、二次免疫化の必要を無くすかまたは軽減する単回投与ワクチンが必要とされている。

10

【0004】

多くの免疫化戦略が、このような開発により恩恵を受けられると思われる。哺乳動物、ウイルス、細菌、菌類または酵母由来源から誘導される抗原を使用するワクチンは、多くの用途を有する。例えば、ウイルス、細菌、菌類または酵母由来源由来の抗原は、疾患の予防のために有用である。哺乳動物由来の抗原は、癌治療または免疫避妊(immunocontraception)において使用され得る。免疫避妊ワクチンは、卵母細胞表面に対して親和性を有する抗原の産生を援助することで、宿主(特に哺乳動物宿主)の一過的な不妊症または不稔症をもたらす哺乳動物誘導型抗原を使用する。免疫避妊ワクチンは、野生動物の頭数(ネコなどの野生化した家畜の頭数を含む)を制御するために有用である。

20

【0005】

特に、野生化ネコの頭数は、制御することが難しく、多くの鳥や小動物が脅かされてきた。野生化した野良ネコはまた、ヒトおよび動物疾患のベクターとしても作用する。狩猟、捕獲および毒殺等の様々な方法が、野良ネコの頭数を制御するために使用されてきたが、これらの方法は、大した成果も無く、社会の反対を受けている。過去20年間で、野生化ネコの頭数を減らすために、野生化したネコの避妊手術が人道的な手段としてますます採用されている。この処置は広く容認されている；しかし、不利な点としては、費用、習性(behavior)の変化、ならびに感染および死亡の危険性が挙げられる。大規模な避妊手術が成功したにも関わらず、このようなプログラムは、多くの場所において経済的または論理的に実行可能ではない。なぜなら、動物の捕獲は時間がかかり、難しく、動物にとってもストレスになるからである。免疫避妊は、より費用が低く施行が簡単な代替的な処置を提供する。しかし、長期免疫避妊は、一般的に、二次ワクチン接種を必要とし、野生化し、自由に徘徊する種を制御するには実用的ではない。

30

【0006】

ワクチンは、通常、宿主において免疫応答を引き出す抗原、ならびに抗原を宿主に投与するのに有用な担体、賦形剤およびアジュバントを含む。

【0007】

抗原を封入するリポソームが徐々にワクチン送達に使用されてきている。変性抗原のリポソーム送達が、天然型エピトープを認識する抗体の産生を援助することが示されている(Muttillainen, S., I. Idanpaan-Heikkila, E. Wahlstrom, M. Nurminen, P.H. MakelaおよびM. Sarvas. 1995. "The Neisseria meningitidis outer membrane protein Pl produced in Bacillus subtilis and reconstituted into phospholipid vesicles elicits anti

40

50

bodies to native P1 epitopes." Microbial Pathogen. 18:423-436)。リポソームは有用なワクチン送達ビヒクルであるが、単独での使用により(特に免疫避妊ワクチンに関して)有効な単回用量ワクチンは提供されていない。

【0008】

ほとんどの免疫避妊ワクチンは、多数回注射において、フロイント完全アジュバント(FCA)、次いでフロイント不完全アジュバント(FIA)を使用して、十分な抗体が免疫避妊効果を有するように産生されるのを助ける(Ivanovaら, 1995. "Contraceptive potential of porcine zona pellucida in cats." Theriogenology. 43:969-981およびSaccoら, 1989. "Effect of varying dosage and adjuvants on antibody response in squirrel monkeys (Saimiri sciureus) immunized with the porcine zona pellucida Mr = 55,000 glycoprotein (ZP3)." Am. J. Reprod. Immunol. 21:1-8を参照)。Ribi (商標) およびTiterMax (商標) 等の他のアジュバントは、一部の研究者らに使用されてきた。ミョウバン(alum)(リン酸アルミニウムおよび/または水酸化アルミニウム)は、アジュバントとして長い間使用されてきた。ミョウバンは、食品医薬品局により安全であると認められた唯一のアジュバントである。ミョウバンを使用する多くの免疫避妊ワクチンは、免疫避妊効果のために十分な抗体を産生するために一次注射および数回の二次注射を必要とする(Bagavantら, 1994. "Antifertility effects of porcine zona pellucida-3 immunization using permissible adjuvants in female bonnet monkeys (Macaca radiata): reversibility, effect on follicular development and hormonal profiles." J. Reprod. Fertil. 102:17-25を参照)。一部の研究は、ミョウバンが、透明帯免疫避妊ワクチンに適したアジュバントではないことを示している(Saccoら, 1989. Am. J. Reprod. Immunol. 21:1-8、およびBagavantら, 1994. J. Reprod. Fertil. 102:17-25を参照)。

【0009】

従来技術は、全般的に、担体として、水性媒体、または水中油型エマルジョンの使用に依存してきた。例えば、Muttillainenら(Microbial Pathogen. 18:423-436(1995))は、水性媒体をリポソーム送達と組み合わせて使用して、免疫応答を引き出す。Popescu(1999年4月27日に発行された米国特許第5,897,873号および2000年7月18日に発行された同第6,090,406号)、Alving(2000年7月25日に発行された米国特許第6,093,406号および2000年8月29日に発行された同第6,110,492号)、ならびにMuderhwaら("Oil-in-water liposomal emulsions: Characterization and potential use in vaccine delivery", (December, 1999) J Pharm Sci. 88 (12):1332-9)も、ワクチン中で、リポソーム系を、送達系としての水中油型担体と共に使用する。Popescuは、コハク酸塩または他の有機酸でエステル化されたコレステロールからなるリポソームと共に、ミョウバンを使用する。米国特許第6,093,406号は、ミョウバン、および水中油型エマルジョンに入ったリピドAまたは非発熱リピドAを含むリポソームを使用して、マラリア抗原に基づくワクチンを送達することを教示している。米国特許第6,110,492号およびMuderhwaは、水中油型エマルジョンに入ったリピドAまたは非発熱リピドAを含むリポソームを使用して、前立腺(prostate)特異的抗原を送達することを教示する。

【0010】

1998年4月7日に発行された共同所有の米国特許第5,736,141号は、透明帯抗原から誘導される、アザラシ用の単回用量免疫避妊ワクチンを教示する。このワクチンから得られる結果は良好であるが、食品医薬局が承認したアジュバントを用いた、様々な種において有効な、単回用量の長時間効果のある免疫避妊ワクチンが今も必要とされている。

【0011】

また、食品医薬局が承認したアジュバントを用いて、様々な抗原を様々な種において使用することで、有効な、長期間効果のある免疫ワクチンの必要も概してある。

【0012】

発明の要旨

本発明によれば、

(a)疎水性物質の連続相を含む担体；

10

20

30

40

50

(b) リポソーム；
(c) 抗原；および
(d) 適切なアジュバント
を含有する、ワクチンとして使用するための組成物が提供される。

【0013】

さらに、(a) 疎水性物質の連続相を含む担体；
(b) リポソーム；
(c) 抗原；および
(d) 適切なアジュバント
を含有する有効量のワクチン組成物を動物に投与することを含む、動物における免疫応答
を増強する方法が提供される。

10

【0014】

さらに、
(a) 抗原または抗原/アジュバント複合体をリポソームに封入して、リポソーム封入抗原
を形成するステップ；
(b) 該リポソーム封入抗原を、疎水性物質の連続相を含む担体と混合するステップ；およ
び
(c) (a) において抗原/アジュバント複合体を使用しない場合には適切なアジュバントを
添加するステップ
を含む、ワクチン組成物の調製方法が提供される。

20

【0015】

予想外に、またこれまでになく、疎水性物質の連続相を、本発明のワクチン組成物の担体
として用いることで、免疫応答が増強されることが分かった。増強された応答は、単回ワ
クチン投与後に永続する高い抗体力価の特徴を有し、免疫応答の持続期間を向上させる。
これは、リポソーム封入抗原およびアジュバント(または抗原/アジュバントの混合物)も
含有するワクチンに関して特に当てはまる。本発明のワクチン組成物は、様々な種におい
て長期免疫応答を提供する単回用量(典型的に二次免疫を必要としない)として全般的に有
効である。

【0016】

発明の詳細な説明

30

特定の作用理論にとらわれるわけではないが、本発明のワクチン組成物が使用される場合
、IgG抗体産生が2期で生じ、各期で産生される抗体は、それらのエピトープ認識が異なる。
IgG産生の第2期で産生された抗体は、天然型タンパク質抗原に対してより親和性を
有し、つまりワクチンをより有効にする。一次および二次注射による従来のワクチンを使用
する場合、本発明のワクチン組成物を使用する場合と異なる結合特異性を抗原に対して
有する抗体が産生される。

【0017】

担体は、疎水性物質(好ましくは液体疎水性物質)の連続相を有する。連続相は、本質的に
純粋な疎水性物質、疎水性物質の混合液、疎水性物質中水型エマルジョン、または疎水性
物質混合液中水型エマルジョンであり得る。

40

【0018】

本発明において有用な疎水性物質は、製薬的および/または免疫学的に許容可能なもので
ある。理想的には、疎水性物質は、米国食品医薬局などの保健規制機関により使用が認可
されたものである。担体は、液体であることが好ましいが、大気温度において液体でない
特定の疎水性物質を(例えば加温により)液化してもよく、これも本発明において有用であ
る。

【0019】

油または油中水型エマルジョンは、本発明における使用に特に適した担体である。油は、
製薬的および/または免疫学的に許容可能でなければならない。油の好ましい例は、鉱油(
特に、軽いまたは低い粘性の鉱油)、植物油(例えば、トウモロコシまたはカノーラ油)、

50

木の実の油(例えば、ピーナッツ油)およびスクアレンである。低粘性鉱油が最も好ましい。動物脂肪および人工疎水性高分子物質(特に、大気温度にて液体であるか、または比較的簡単に液化できるもの)も使用できる。

【0020】

使用する疎水性物質の量は、重要ではないが、典型的に、動物の大きさおよび使用する抗原の量に応じて、1用量につき約0.1 ml～約1.5 mlである。小動物については、疎水性物質の量は、1用量につき約0.20 ml～約1.0 mlであることが好ましく、大動物については、量は、1用量につき約0.45 ml～約1.5 mlであることが好ましい。典型的に、小動物には1用量につき0.25 mlが使用され、大動物には1用量につき0.5 mlが使用される。

【0021】

適切な抗原は、宿主生物において免疫応答を生成可能な任意の化学物質である。抗原は、宿主生物において所望の免疫応答を生成可能な、適切な天然型、非天然型、組換えもしくは変性タンパク質もしくはペプチド、またはそれらの断片であることが好ましい。宿主生物は、好ましくは動物(哺乳動物を含む)であり、より好ましくはネコ、ウサギ、ウマおよび/またはシカである。抗原は、ウイルス、細菌、原生動物または哺乳動物由来のものであり得る。抗原は、宿主生物において免疫応答を引き出すことが可能な任意の化学物質(典型的にタンパク質または他のペプチド)であることが一般的に知られている。より具体的には、抗原が宿主生物に導入された場合、B細胞上の抗体に結合し、宿主により多くの抗体を産生させる。抗原および免疫応答の一般的な議論については、Kuby, J., *Immunology* 3rd Ed. W.H. Freeman and C. NY (1997)を参照のこと(その開示は全体的に参照により本明細書に援用される)。

【0022】

癌、避妊および他の生物学的症状に関連する免疫応答を引き出す抗原を、免疫ワクチンの調製に使用し得る。使用できる抗原の一部の典型的な限定しない例としては、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)、ストレプトキナーゼ、B型肝炎表面抗原、および透明帯(ZP)糖タンパク質が挙げられる。

【0023】

所望の免疫応答が、哺乳動物における避妊である場合、標的エピトープは、哺乳動物卵母細胞上で見とめられる。この場合には、透明帯(ZP)糖タンパク質もしくは組換えタンパク質、またはそれから誘導されるペプチド断片を使用してもよい。特に、熱抽出可溶化単離透明帯糖タンパク質(SIZP)を、免疫避妊ワクチン中の抗原として使用してもよい。より具体的には、可溶性無傷ブタ透明帯を使用してもよい。

【0024】

1用量のワクチン組成物において使用される抗原の量は、抗原の種類および宿主の大きさに応じて変化し得る。当業者は、過度な実験を必要とせずに、特定の用途に使用するための抗原の有効量を決定できるであろう。

【0025】

SIZPの場合、典型的に使用される量は、1用量につき約15 μ g～約2 mgの範囲にある。好ましくは1用量につき約20 μ g～約2 mgの範囲、より好ましくは約20 μ g～約200 μ g、およびさらにより好ましくは約40 μ g～約120 μ gである。典型的に、小動物用の量は、1用量につき約50 μ gであり、大動物については1用量につき約100 μ gである。

【0026】

本発明の組成物では、抗原は、標的タンパク質の天然型エピトープに結合する宿主抗体のレベルを増強する。これは、抗原が非天然型、組換えもしくは変性タンパク質もしくはペプチド、またはそれらの断片である場合でも同じである。任意の特定の理論にとらわれることを望まないが、これは、リポソーム中の天然型様三次元コンホメーションにおいて抗原が保持されるためかもしれない。

【0027】

リポソームは、トラップされた水性容量を含む完全に閉じられた脂質二層膜である。リポソームは、(単一の二層膜を有する)単膜小胞、または多重膜小胞(水性層により隣と隔た

10

20

30

40

50

れている多膜二重層を特徴とするタマネギ様構造)であり得る。リポソームの一般的な議論は、Gregoriadis G. (1990) Immunological adjuvants: A role for liposomes, Immunol. Today 11:89-97およびFrezard, F. (1999) Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. Braz. J. Med. Bio. Res 32:181-189(この開示は参照により本明細書に援用される)に記載されている。

【0028】

古細菌脂質からなるリポソームを含む任意のリポソームが本発明において使用され得るが、特に有用なリポソームは、リポソーム製剤にリン脂質および非エステル化コレステロールを入れて使用する。コレステロールはリポソームを安定化させるために使用され、リポソームを安定化させる任意の他の化合物をコレステロールと置き換えてもよい。他のリポソーム安定化化合物は当業者に公知である。特に好適なリポソームを使用することで、抗原とリポソームとの静電的会合を限定し得る。その結果、ほとんどの抗原がリポソームの内部に隔絶され得る。

10

【0029】

リポソームの調製に使用されることが好ましいリン脂質は、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリンおよびホスホイノシトールからなる群より選択される少なくとも1つの頭部基を有するものである。より好ましいのは、ホスホリポン(phospholipon) 90G中の脂質を含むリポソームである。

【0030】

リポソームを形成するために使用する脂質の量は、使用する抗原に依存するが、典型的に、1ワクチン用量につき約0.05グラム~0.5グラムの範囲にある。1用量につき約0.1グラムの量であることが好ましい。非エステル化コレステロールもリポソーム製剤に使用する場合、コレステロールは脂質の量の約10%と等しい量で使用される。コレステロールの好ましい量は、1ワクチン用量につき約0.01グラムである。コレステロール以外の化合物を使用して、リポソームを安定化させる場合、当業者は、製剤中で必要な量を容易に決定できる。

20

【0031】

より好適な態様では、本発明のワクチン組成物は、リピドA(非発熱リピドAを含む)を本質的に含まない。本明細書の目的において、リピドAという用語が使用された場合、非発熱リピドAも含まれることが理解される。リピドAは、従来技術のリポソーム製剤において見とめられることが多い。リピドAは、多くの望ましくない副作用を有し、これは、非発熱リピドAを使用して克服され得るが、それでも、リピドAは、発熱性のもの以外でも多くの製薬反応を有し、多くの不都合な反応を生じ得る。従って、本発明の組成物からリピドAを除くことが望ましい。

30

【0032】

適切なアジュバントは、ミョウバン、他のアルミニウム化合物、カルメット-ゲラン杆菌(BCG)、TiterMax(商標)、Ribi(商標)、フロイント完全アジュバント(FCA)、およびヨーネ(Johne)抗原に基づく、米国農務省(USDA)の野生動物研究センターがそのウェブサイト(<http://www.aphis.usda.gov/ws/nwrc/pzp.htm>)で開示する新しいアジュバントである。ミョウバン、他のアルミニウム化合物、TiterMax(商標)および新しいUSDAアジュバントが好ましい。増強した免疫応答は、アジュバントがミョウバンの場合でも見とめられ、これは従来技術を考慮すると驚くべきことである(Saccoら 1989. Am. J. Reprod. Immunol., 21:1-8)。ミョウバンは、特にアジュバントとして好ましい。

40

【0033】

一般的に、ミョウバンは、任意のアルミニウム塩、特に、無機酸の塩であると考えられる。水酸化塩およびリン酸塩は、アジュバントとして特に有用である。適切なミョウバンアジュバントは、水酸化アルミニウム(45 mg/ml)および水酸化マグネシウム(40 mg/ml)の水溶液、ならびに不活性安定剤からなるImjectAlum(商標)(Pierce Chemical Company)の商標名で売られている。ミョウバンは、規制承認を受けており、当該分野で広く認められていることから、特に都合の良いアジュバントである。

50

【0034】

使用するアジュバントの量は、抗原の量およびアジュバントの種類による。当業者は、特定の用途において必要なアジュバントの量を容易に決定できる。免疫避妊の場合、ウサギのために適したImjectAlum（商標）の量は0.1 ml/ワクチン用量であり、ウマのために適したImjectAlum（商標）の量は0.5 ml/用量である。

【0035】

ワクチン組成物は、一般的に、抗原または抗原/アジュバント複合体をリポソームに封入して、リポソーム封入抗原を形成し、該リポソーム封入抗原を、疎水性物質の連続相を含む担体と混合することにより製剤化される。抗原/アジュバント複合体を第1のステップで使用しない場合、適切なアジュバントを、リポソーム封入抗原に、リポソーム封入抗原および担体の混合物に、または担体をリポソーム封入抗原と混合する前に担体に、加えてもよい。プロセスの順番は、使用するアジュバントの種類による。典型的に、ミョウバンのようなアジュバントを使用する場合、アジュバントおよび抗原を混合してまず抗原/アジュバント複合体を形成し、その後、抗原/アジュバント複合体をリポソームで封入する。次いで、得られたリポソーム封入抗原を、担体と混合する。（「リポソーム封入抗原」という用語は、内容に応じて、単独の抗原の封入または抗原/アジュバント複合体の封入を指し得ることを付記しておく）。これにより、アジュバントと抗原との密接な接触を促し、ミョウバンがアジュバントとして使用される場合には、少なくとも部分的に、驚くほど良好な免疫応答を引き起こす。別のものが使用される場合、抗原は、リポソームに入れられてまず封入され、得られたリポソーム封入抗原を、疎水性物質においてアジュバントと混合する。

【0036】

水を実質的に含まないワクチン組成物を製剤化するために、抗原または抗原/アジュバント複合体を、リポソームで封入し、疎水性物質と混合する。ワクチンを、疎水性物質中水型エマルジョンに製剤化する場合、抗原または抗原/アジュバント複合体を、水性媒体中でリポソームで封入し、その後水性媒体と疎水性物質とを混合する。エマルジョンの場合、疎水性物質を連続相として維持するために、リポソームを含む水性媒体を、アリコートとして添加し、疎水性物質と混合する。

【0037】

全ての製剤化方法において、リポソーム封入抗原は、疎水性物質または水性媒体と混合する前に、場合によっては凍結乾燥されてもよい。場合によっては、抗原/アジュバント複合体は、リポソームで封入され、その後凍結乾燥されてもよい。別の場合では、抗原はリポソームで封入され、その後アジュバントを添加され、そして凍結乾燥されて、外側にアジュバントがある凍結乾燥リポソーム封入抗原を形成してもよい。さらに別の例では、抗原はリポソームで封入され、その後アジュバントを添加する前に凍結乾燥されてもよい。凍結乾燥は、アジュバントと抗原との良好な相互作用を促し、より効果的なワクチンをもたらし得る。

【0038】

リポソーム封入抗原を疎水性物質に入れて製剤化する場合も、乳化剤を使用して、疎水性物質でのリポソームのより均一な分布を促すことを伴う。典型的な乳化剤は、当該分野で周知であり、オレイン酸マンニド(mannide oleate)(Arlacel（商標）A)、レシチン、Tween（商標）80、Spans（商標）20、80、83および85が挙げられる。オレイン酸マンニドは、好ましい乳化剤である。乳化剤は、リポソームの均一な分布を促するのに有効な量で使用される。典型的に、疎水性物質対乳化剤の容量比(v/v)は、約5:1～約15:1の範囲にあり、約10:1の比が好ましい。

【0039】

ワクチン組成物の投与は、任意の都合の良い方法により実施でき、使用する抗原による。ワクチン組成物は、非経口(筋内、皮下投与を含む)、または直腸投与され得る。非経口投与が好ましい。

【0040】

非経口用途のために、特に都合の良い単位投薬量形態は、アンプルである。注射および遠隔送達(ダーツ、注射付き棒(jab sticks)を有するバネ充填シリンジ、空気/二酸化炭素推進ライフル、ウェスタ銃(Wester gun)および/またはBallistivet (商標) 生物弾を使用)によりワクチンを送達し、かつ生物学的活性を保持する技術が特に好ましい。

【0041】

宿主に投与されるワクチン組成物の量は、用量中で使用される抗原の量、および特定の用途のために必要とされる抗原の有効量に応じる。SIZPの場合、動物に投与される各用量の大きさは、動物の大きさに応じて、典型的に約0.25 ml～約2.0 mlである。より小さい動物(例えば、ネコ、ウサギ等)のためには、用量の大きさは典型的に約0.5 mlであり、より大きい動物(例えば、ウマ、ファロージカ、オジロジカ等)のためには、用量の大きさは典型的に約1.0 mlである。典型的に、SIZPの量が多様であっても、用量の大きさは適正に一定にされている。

10

【0042】

以下、本発明を、限定しない実施例により、添付の図面を参照しながら説明する。

【0043】

実施例

実施例1：ワクチン組成物の調製

ワクチン組成物は、水を含まないか、または様々な量の水を含むように(水性媒体、例えば、食塩水、リン酸緩衝化食塩水(PBS)もしくは非発熱物質含有水を用いて)、かつ連続油相を保ちながら製剤化できる。以下に記載する処置1は、ワクチン組成物の水を含まない製剤化に当てはまる。以下に記載する処置2は、ワクチン組成物の水含有製剤化(すなわち、油中水型エマルジョン)に当てはまる。2つの処置は、使用するアジュバントに応じて変化し得る。例として、方法Aは、ミョウバンを含むワクチン組成物の製剤化に当てはまり、方法Bは、フロイント完全アジュバント(FCA)を含む製剤に当てはまる。方法Aまたは方法Bのいずれかを探りいれることにより、他のアジュバントを適応してもよい。以下に記載する処置は、ブタ可溶性無傷透明帯(SIZP)を抗原として取り入れるが、製剤化において他の抗原にSIZPを置き換えてもよい。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)、ストレプトキナーゼまたはB型肝炎表面抗原も抗原として使用できる。

20

【0044】

処置1：水を含まない製剤

30

方法A. ミョウバンアジュバント

SIZPを先に記載されているように調製する(Brown, R.G., W.D. Bowen, J.D. Eddington, W.C.Kimmins, M. Mezei, J.L. Parsons, B. Pohajdak. (1997) Temporal trends in antibody production in captive grey seals, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. J. Reproductive Immunology 35:53-64)。調製するワクチンの用量数に必要なSIZPの量を量る(免疫化のために使用するSIZPの通常量は、小動物については50 µg、そして大動物については100 µgである)。SIZPを、非発熱物質含有蒸留水に溶解し、2 mg/mlの最終濃度を得た。等容量のImjectAlum (商標) (Pierce Chemical Co., カタログ番号77161のミョウバン製品)を添加し、懸濁液を混合し、凍結乾燥させる。

40

【0045】

リポソームを形成するために、ホスホリポン90G(または、トラップされた抗原を含む閉じた脂質二層を形成する、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリン、ホスホイノシトール、古細菌脂質(これらに限定されない)から選択される他の脂質)を量る(0.1 g/ワクチン組成物用量)。ホスホリポン90Gをコレステロール(0.01 g/ワクチン組成物用量)と混合し、混合物をクロロホルム：メタノール(1/1；v/v；1.5/ワクチン組成物用量)に溶解させる。コレステロールは、当業者に決定される濃度にてリポソームを安定化させる他の化合物と置き換えられる。洗浄したガラスビーズ(直径約3 mm；10ワクチン用量について15 ml)を添加し、ロータリー・エバポレーターを用いて、減圧下で、クロロホルム：メタノールが無くなるまで混合液を蒸発させる。全てのクロロホル

50

ム:メタノールの除去を確実にするために、混合液を、減圧下で一晩室温にてデシケータに入れる。

【0046】

凍結乾燥させたSIZP/ミョウバン複合体を、非発熱物質含有蒸留水(5 ml/mg SIZP)に懸濁させ、該懸濁液を、フラスコを被覆するホスホリボン90G/コレステロールおよびガラスビーズの混合物を含むフラスコに添加する。フラスコの内容物を攪拌すること無く30分間静置させる。30分後、フラスコを、35～40℃の水浴に入れ、スパチュラで緩やかにかき混ぜて、リポソームを形成する。顕微鏡を使用して、リポソーム形成を評価し、振とうを大きくして、混合物が、多層リポソームを主に含むと当業者が見とめるまでかき混ぜ続けた。リポソームを凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥リポソームを、オレイン酸マンニドを乳化剤として含む低粘性鉱油(10:1:油:乳化剤:v/v)に懸濁させた(小動物には0.25 ml油/用量、大動物には0.5 ml油/用量)。リポソームは溶液ではなく油に懸濁させるので、使用する処置が、各用量においてSIZPの均一な分布を生じるか否かを決定する必要がある。SIZPを含む凍結乾燥リポソームが油中で均等に分布されているか否かを決定するために、還元的メチル化によりSIZPを¹⁴Cで標識化し(Jentoft, N.およびD.G.Dearborn, 1979. Labelling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride. J. Biol. Chem. 254:4359-4365、この開示は参照により全体的に本明細書に援用される)、放射能SIZPを使用して、2つのワクチン調製物を調製した。ワクチンの個別の用量を調製し、各用量中の放射能を決定して、各ワクチン用量中のSIZPの内容量を決定した(表1)。各用量中のSIZPの分布は、高度に再現可能である(標準偏差(SD)は+/- 10%未満であった)。

【0047】

【表1】

表1

2つの調製物由来のワクチン用量中での¹⁴C標識化SIZPの分布

サンプル番号	調製物 1 μg SIZP/用量	調製物 2 μg SIZP/用量
1	68	55
2	66	53
3	57	53
4	65	62
5	56	59
6	51	57
7	62	58
8	55	60
9	69	51
10	54	59
11	52	57
12	61	61
13	64	61
14	61	60
15	-	56
平均	60	57
標準偏差	5.9	3.2

方法B. FCAアジュバント

ミョウバンの代わりにFCAをアジュバントとして含むようにワクチン組成物を調製することは、SIZP/ミョウバン複合体としてではなく、SIZP自体が上述したようにリポソームに封入されること以外は、方法Aと同様である。SIZPを含むリポソームを凍結乾燥させ、凍結乾燥させたリポソームをアリコートとしてFCAに添加し、混合して、油中でのリポソーム

ムの均等な分布を促す。その結果得られた、FCAにSIZPを含む凍結乾燥リポソームの懸濁液を、ワクチン化される動物に投与する。

【0048】

処置2. 水含有製剤

方法A. ミョウバンアジュバント

SIZPを先に記載されているように調製する(Brown, R.G., W.D. Bowen, J.D. Eddington, W.C. Kimmins, M. Mezei, J.L. Parsons, B. Pohajdak. (1997) Temporal trends in antibody production in captive grey seals, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. J. Reproductive Immunology 35:53-64、この開示は参照により本明細書に援用する)。調製するワクチンの用量数に必要なSIZPの量を量る(免疫化のために使用するSIZPの通常量は、小動物については50 µg、そして大動物については100 µgである)。SIZPを、非発熱物質含有蒸留水に溶解し、2 mg/mlの最終濃度を得た。等容量のImjectAlum (商標) (Pierce Chemical Co., カタログ番号77161のミョウバン製品)を添加し、懸濁液を混合し、そして凍結乾燥させる。

10

【0049】

リポソームを形成するために、ホスホリポン90G(または、トラップされた水性容量を含む閉じた脂質二層を形成する、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリン、ホスホイノシトール等から選択される他の脂質)を量る(0.1 g/ワクチン組成物用量)。ホスホリポン90Gをコレステロール(0.01 g/ワクチン組成物用量)と混合し、混合物をクロロホルム:メタノール(1/1; v/v; 1.5/ワクチン組成物用量)に溶解させる。コレステロールは、当業者が決定した濃度にてリポソームを安定化させる他の化合物と置き換えられる。洗浄したガラスビーズ(直径約3 mm; 10ワクチン用量のために15 ml)を添加し、ロータリー・エバポレーターを用いて、減圧下で、クロロホルム:メタノールが無くなるまで混合液を蒸発させる。全てのクロロホルム:メタノールの除去を確実にするために、混合液を、減圧下で一晩室温にてデシケーターに入れる。

20

【0050】

凍結乾燥させたSIZP/ミョウバン複合体を、食塩水(5 ml/mg SIZP)に懸濁させ、該懸濁液を、フラスコを被覆するホスホリポン90G/コレステロールおよびガラスビーズの混合物を含むフラスコに添加する。フラスコの内容物を攪拌すること無く30分間静置させる。30分後、フラスコを、35~40℃の水浴に入れ、スパチュラで緩やかにかき混ぜて、リポソームを形成する。顕微鏡を使用して、リポソーム形成を評価し、振とうを大きくして、多層リポソームを主に含む混合物を当業者が見とめるまでかき混ぜ続けた。リポソームの水性懸濁液(小動物には0.25 ml油/用量、大動物には0.5 ml油/用量)を、オレイン酸マンニドを乳化剤として含む低粘性鉱油(10:1:油:乳化剤:v/v)に添加した(小動物には0.25 ml油/用量、大動物には0.5 ml油/用量)。リポソームの水性懸濁液を、アリコートとして低鉱油相に添加して、アリコート間で混合して、連続油相を維持する。

30

【0051】

方法B. FCAアジュバント

ミョウバンの代わりにFCAをアジュバントとして含むようにワクチン組成物を調製することは、SIZP/ミョウバン複合体としてではなく、SIZP自体が上述したようにリポソームに封入されること以外は、方法Aと同様である。リポソームの水性懸濁液をアリコートとしてFCAに添加し、アリコート間で混合して、連続油相を維持する。その結果得られた、FCAにSIZPを含むリポソームの水性懸濁液を、ワクチン化される動物に投与する。

40

【0052】

付記：一部の治験において、SIZPの量を変えて、異なる量の抗原に対する免疫化動物の応答を調査した。このような実験では、小動物(ネコ、ウサギ等)に投与したワクチンの容量は0.5 mlで、大動物(ウマ、ファロージカ、オジロジカ等)に投与した容量は1.0 mlであった。このような場合、各ワクチン用量中のリポソームの量は一定に維持され、リポソーム中に封入される抗原の量を変える。

【0053】

50

実施例 2：天然型および変性型酵母アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) に対するウサギの免疫化

ワクチン組成物は、単回投与後長時間持続する高い力価の抗SIZP抗体を産生する点で他とは異なる。ワクチン組成物が、他の抗原(特に細胞膜に結合していないタンパク質)で高い抗体力価を産生するか否かを決定するために、ウサギを酵母アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) で免疫化する。2つの形態のADH(すなわち、天然型ADH、およびタンパク質を変性するように処理されたADH)を抗原として使用する。ADHを変性するために、ADHをメルカプトエタノール(Tris緩衝液中10% v/v、0.1 M(pH 7.5)、30分、100°C)で処置する。溶液を蒸留水に透析し、凍結乾燥させた。4匹のウサギ(各処置に2匹)を、フロイント完全アジュバント(FCA)での一次注射、その1ヵ月後のフロイント不完全アジュバントでの二次注射により、野生型または変性型ADH(40 µg)で免疫化する。免疫化後期間は、二次免疫注射後から開始すると考える。二次免疫注射を投与すると同時に4匹のウサギ(各処置につき2匹)を、ワクチン組成物を用いた天然型または変性型ADH(40 µg)のいずれかでの単回の投与により免疫化する(つまり、ADHは、食塩水(0.5 ml)に懸濁され、FCA(0.5 ml)に乳化されたりリボソームに封入される)。抗ADH力価を、天然型および変性型ADHの両方を用いてELISAで測定する(表2)。

10

【0054】

ウサギを天然型ADHで免疫化した場合、得られた血清は、ワクチン組成物と共に天然型ADHを送達した場合、または一次注射を一次免疫化に使用した場合と同量の抗ADH抗体を含んでいた。対照的に、ワクチン組成物で送達された変性型ADHで免疫化されたウサギ由来の血清は、一次注射および1回の二次免疫により変性型ADHで免疫化されたウサギ由来の血清よりも、天然型ADHに結合する2.7倍の抗体を含む($P < 0.01$; $T = 4.14$; $df = 6$)。いずれの場合も、力価は、変性型ADHで免疫化されたウサギよりも、天然型ADHで免疫化されたウサギにおいて高い。これは、天然型ADHが、変性型ADHよりも良い抗原であることを示す。多くのタンパク質抗原は、抽出および単離の間、または組換え手段により産生される場合にある程度変性されているため、天然型タンパク質により良く結合する抗体がより多く産生されることで、本発明のワクチン組成物を使用したSIZPでの多様な哺乳動物の免疫避妊により実証されるワクチン化の結果が有意に改善される。

20

【0055】

さらに、ウサギ237および238由来の抗ADH血清は、ウサギ235および236由来の抗ADH血清の強度の約4～5倍でウェスタンブロットにおいて変性型ADHを認識する。これは、力価測定の結果を裏付け、ワクチン組成物によるウサギの免疫化が、天然型ADHにより良く結合する抗ADH抗体の産生を支持することを示す。なぜなら、多くのタンパク質は、ウェスタンブロットコールの間に再折り畳みしてより天然型の状態になることが知られているからである。この結論は、髄膜炎菌外膜タンパク質P1の研究においてMuttillainenら(1995)により支持されており、彼らは、天然P1に対する抗体が、リン脂質小胞(リボソーム)に入れられて構成された変性P1でワクチン化されたマウスにおいて引き出されたことを発見した。しかし、Muttillainenら(1995)は、ワクチン製剤中で油を使用しなかった。従って、彼らの免疫化プロトコールは本発明と異なる。

30

【0056】

【表2】

40

表 2

リポソームに封入されまたはされずに送達された天然型または変性型ADHで
免疫化されたウサギによる抗ADH抗体の産生

免疫化			抗ADH力価 (参照血清の%) ¹			
ウサギ ID番号	抗原	送達 ²	天然型ADH ³		変性型ADH ³	
			4 ⁴	5 ⁴	4 ⁴	5 ⁴
231	天然型ADH	-リポソーム	187	148	19	23
232	天然型ADH	-リポソーム	200	161	17	15
233	天然型ADH	+リポソーム	239	156	21	14
234	天然型ADH	+リポソーム	100	100	19	11
235	変性型ADH	-リポソーム	41	37	7	3
236	変性型ADH	-リポソーム	30	18	7	4
237	変性型ADH	+リポソーム	101	71	8	3
238	変性型ADH	+リポソーム	101	63	12	7

¹ウサギ231由来の抗ADH血清を参照血清として使用。

²天然型および変性型ADHを、単一筋内注射としてFCAと共にリポソームに封入する(+リポソーム)か、または1ヵ月後にFIAを用いたブースター注射を伴うFCAに懸濁した(-リポソーム)ワクチン組成物と共に投与する。ウサギは、各投与のたびに40 μg ADHを受ける。

³ADHは、Sigma Chemical Co. から購入した。変性型ADHは、天然型ADHをメルカプトエタノールで処置し、100℃まで30分間加熱することにより産生した。得られた変性型ADHは、26、33および40 kDaの分子量を有する3つの主要タンパク質を有する。力価は、個別の測定において天然型および変性型ADHを抗原としてELISAプレートを被覆して、ELISAにより測定する。

⁴免疫化後の月数

付記：表2に示す参照血清は、ウサギ血清ID No. 234である。

実施例3：ウサギの免疫避妊

抗原(ブタSIZP)以外のワクチン組成物の全成分を含むプラシーボワクチンで免疫化されたウサギ由来の血清は、抗ブタSIZP抗体を含まない(表3Aを参照)。FCAアジュバント(0.5 ml)に乳化された、ホスホリボン90G(0.1 g)、食塩水(0.5 ml)中コレステロール(0.01 g)を含むリポソームに封入されたブタSIZP(40 μg)でのウサギの免疫化は、ワクチンの単回投与後の免疫化後12ヶ月モニター期間の間に高い力価の抗SIZP抗体を産生する。MF 59アジュバント(0.5 ml)と共にリポソームで封入されたブタSIZP(40 μg)でのウサギの免疫化は、低い抗SIZP力価を産生する。対照的に、ミョウバンアジュバント(100 μl, Pierce InjectAlum (商標))とリポソームに封入されたブタSIZPウサギの免疫化は、免疫化後初期にFCAを用いて産生される力価未満の抗ブタSIZP力価を産生するが、力価は免疫化後12ヶ月目にはミョウバンとFCA作用(run)とは大差がない。ウサギの育種により、FCAまたはミョウバンを使用した単回のワクチン投与が、ウサギの受精率をそれぞれ79および74%低下させることを明らかにした(表3B)。ゲルブ(Gerbu)アジュバントと共にリポソームに封入されていないSIZP(40 μg)の単回注射によるウサギの免疫化は、低い抗ブタSIZP力価を生じる(表3A)。抗SIZP力価に基づき予想されるように、ゲルブアジュバントと共にリポソームに封入されていないSIZPで免疫化されたウサギは、プラシーボワクチンを受けたウサギと同じ受精率を有する(表3B)。これらの結果は、リポソーム封入抗原を含むワクチンが良好な結果を生じ、FCAおよびミョウバン(特にミョウバン)が良いアジュバントであることを示す。

【0057】

【表3】

表 3 A

ウサギ¹による抗ブタSIZP抗体の産生に対するアジュバントの影響

免疫化後抗ブタSIZP力価(参照%)										
ID 番号	時間(月)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	11	12
ブラシーボ										
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FCA										
3	0	145	112	94	82	45	23	24	20	20
15	0	100	71	68	83	19	29	26	18	25
16	0	125	111	122	128	111	74	92	75	63
MF 59										
1	0	3	1	1	1	2	0	ND	ND	ND
7	0	10	9	3	3	5	2	ND	ND	ND
19	0	12	6	3	3	3	3	ND	ND	ND
20	0	37	21	13	15	13	10	ND	ND	ND
ミョウバン										
11	0	19	12	12	11	14	18	7	8	10
12	0	20	10	10	8	6	11	5	2	4
23	0	31	16	40	22	20	33	28	37	28
24	0	36	21	40	27	24	40	36	34	34
ゲルブ(SIZPのリボソーム封入無し)										
9	0	5	2	1	1	1	1	1	ND	ND
10	0	11	3	3	2	2	3	1	ND	ND
21	0	17	4	6	19	5	6	2	ND	ND
22	0	24	3	6	3	4	4	7	ND	ND

¹ウサギは、ブラシーボワクチン、FCA、MF 59もしくはミョウバンアジュバント(0.25 ml)のいずれかと共にリボソーム(0.25 ml)に封入されたブタSIZP(40 μg)を含むワクチン、またはゲルブアジュバント(0.25 ml)と共に食塩水(0.25 ml)に溶解したブタSIZP(40 μg)を含むワクチンの単回投与を受ける。ND=測定されず。

使用する参照血清は、フロイント完全アジュバントでの一次注射、およびフロイント不完全アジュバントでの2回の二次免疫注射を用いて、ブタ透明帯で免疫化されたウサギから得た。

【0058】

【表4】

表 3 B

ブタSIZPに対して免疫化されたウサギの受精率に対するアジュバントの影響

ID番号	生存出生/交配 ¹			平均生存出生/交配	受精率の減少%
	1	2	3		
プラシーボ					
2	6	0	4	5.1	0
13	7	1	10		
14	6	7	5		
FCA					
3	0	0	0	1.1	79
15	0	8	5		
16	0	NM	0		
MF 59					
1	11	NM	10	6.1	0
7	0	0	NM		
19	5	11	11		
20	6	0	7		
ミョウバン					
11	0	0	6	1.3	74
12	0	0	0		
23	0	0	0		
24	3	5	2		
ゲルブ(リボソーム封入無し)					
9	0	0	11	5.3	0
10	0	0	0		
21	8	9	11		
22	10	7	11		

NM = オスと繰返し組み合わせたが交配が上手くいかなかった

¹ 交配成功後の生存出生。交配 1、2 および 3 についてそれぞれの交配間隔は、免疫化後、65±10、141±14、および 216±14 日間であった。

実施例 4：ネコにおける免疫避妊

29匹の特定の無病原菌短毛家畜ネコを、University of Floridaの特定の無病原菌施設で、Julie Levy博士およびShawn Gorman氏の監視の下で収容する。毎日の観察および膣細胞診(vaginal cytology)から発情周期をモニターする。本発明のワクチン組成物、プラシーボワクチン、および血清サンプルを、二重盲検調査の一環として符号化する。ネコをランダムに9~10匹ずつの3つのグループに分ける。1つのグループは、抗原(ブタSIZP)以外のワクチン組成物の全成分を含むプラシーボワクチンを筋肉注射により受ける。このグループのネコはそれぞれ、抗原を含まない食塩水(0.25 ml)がFCA(0.25 ml)に懸濁されたりリボソームを受取る。第2グループの9匹のネコはそれぞれ、食塩水(0.25 ml)中リボソームに封入され、FCA(0.25 ml)に懸濁されたSIZP(135 µg)を含むワクチン組成物で筋肉注射により免疫化される。第3グループの9匹のネコはそれぞれ、食塩水(0.12 ml)中のリボソームに封入され、適切な製薬担体に懸濁された、ミョウバン(0.12 ml、Pierce Chemical Co., カタログ番号77161)と共にブタSIZP(200 µg)を含むワクチン組成物で筋肉注射により免疫化される。ネコにおける抗SIZP抗体の産生は、プロテインA/アルカリホスファターゼを用いてELISAにより測定される(Brown, R.G., W.D.Bowen, J.D.Eddington, W.C.Kimmins, M.Mezei, J.L.Parsons, B.Pohajdak. (1997) Temporal trends in antibody production in captive grey seals, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. J. Reproductive Immunology 35:53-64)。

【0059】

FCAを用いたワクチン組成物の単回投与により、2ヶ月以内に最大力価に到達する抗SIZP抗体力価が生じる(表4)。免疫化後2ヶ月の平均力価は、参照血清の $58 \pm 2\%$ で、これは、検査済みの(proven)オスネコをコロニーに導入した場合に、免疫化後4ヶ月で参照血清の $41 \pm 4\%$ に低下した。ミョウバンをアジュバントとして用いたワクチン組成物の単回投与を受けるネコは、免疫後2ヶ月目に参照血清の平均力価 $67 \pm 2\%$ の抗SIZP抗体を産生する。

【0060】

抗原以外のワクチン組成物の全ワクチン成分を含むプラシーボワクチンにより免疫化したネコから得る毎月の血清サンプルは、免疫化後モニター期間の間に参照血清の $0.6 \pm 0.2\%$ の平均抗SIZP力価を有する。従って、プラシーボワクチンを受けたネコが、免疫後期間に仔ネコを産むことは明らかである。

【0061】

【表5】

表 4

本発明のワクチン組成物で免疫化されたネコによる抗SIZP抗体の産生

ネコ ID 番号	抗SIZP力価(参照血清の%)											
	免疫化後(月)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
プラシーボ												
3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7	4	2
4	0	0	0	0	2	0	0	3	1	2	2	0
8	0	3	0	1	0	0	0	1	1	2	2	0
15	1	0	1	0	0	0	0	2	1	ND	ND	ND
A	0	0	3	0	1	0	0	0	0	2	2	0
B	0	0	0	1	1	1	0	ND	2	2	0	0
E	0	1	1	1	0	0	0	2	5	ND	ND	ND
F	0	1	1	0	0	0	0	2	0	ND	ND	ND
I	0	1	0	1	1	0	0	0	2	0	0	ND
N	0	1	0	0	1	1	1	2	1	ND	ND	ND
FCAを用いたワクチン												
1	0	60	57	68	46	56	23	46	15	40	23	23
2	0	60	53	58	44	25	23	69	46	68	70	62
9	0	47	56	41	56	20	58	78	103	74	86	ND
13	0	42	64	53	66	55	47	29	33	12	16	ND
14	0	48	51	30	45	40	10	20	9	10	12	7
C	0	56	54	49	34	21	16	12	14	24	14	16
D	0	58	60	67	59	52	32	19	48	ND	ND	ND
L	0	47	61	40	28	16	46	37	59	70	59	72
G	0	59	65	79	85	81	92	94	96	115	152	79
O	0	48	42	53	42	24	26	28	25	31	16	10
ミョウバンを用いたワクチン												
1P	1	60	60	70	46	47	25	18	41	26	6	ND
1S	0	73	56	43	24	42	19	18	18	14	4	ND
1T	0	62	62	58	30	34	14	12	8	11	4	ND
1V	2	70	68	60	40	36	12	12	ND	ND	ND	ND
1Y	1	84	82	84	81	80	67	34	44	28	ND	ND
1Z	0	77	75	71	54	72	54	26	35	21	9	ND
Z1	0	61	74	95	83	100	98	92	70	42	ND	ND
Z2	0	77	79	63	34	50	41	28	18	11	ND	ND
Z3	0	65	72	61	55	30	35	18	20	6	ND	ND
Z4	0	73	ND	68	53	29	32	17	12	13	ND	ND

ND = 測定されず

実施例 5：シカの免疫避妊

James Island(南ブリティッシュコロンビア州の沖にある360ヘクタールの島)にいる41匹のファロージカ(Dama dama)のメスを、FCAをアジュバントとして用いたワクチン組成物で免疫化した。別の40匹のファロージカのメスのグループを、ミョウバンをアジュバントとして用いたワクチン組成物で免疫化した。捕獲のために、小さい建物に続く一連のフェンスで囲まれた囲いおよび走路に連結した大きい(200×200メートル)檻にシカをおびき寄せる。免疫化の前に、各シカを物理的に拘束し、番号のついた耳標、色付きプラスチックカラー、または死亡センサー付きの無線カラー、および独自のコードの付いたPIT(永久識別応答機)タグを付けた。従って、処置するシカが全ての外部マークを失った場合でも、耳

標を無くした際の傷から処置動物であること、またPITタグから特定のシカであることが認められる。各捕獲メスは、FCAまたはミョウバンアジュバントと共にリポソーム中に封入されたSIZP(100 μ g)を尻に筋肉注射される。未処置のメスは対照としての役割を果たす。

【0062】

プロテインA/アルカリホスファターゼをプロテインG/アルカリホスファターゼに置き換えたこと(ファロージカの免疫グロブリンに対してはプロテインGの方がプロテインAよりも高い親和性を有するため)以外は、先に記載されているように、抗SIZP力価を測定する(Brown, R.G., W.D. Bowen, J.D. Eddington, W.C. Kimmins, M. Mezei, J.L.Parsons, B. Pohjajdak. (1997) Temporal trends in antibody production in captive grey sea ls, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine . J. Reproductive Immunology 35:53-64)。ウサギ免疫グロブリン(参照血清)に対するプロテインAおよびプロテインGの親和性に関して、ファロージカ免疫グロブリンに対するプロテインAおよびプロテインGの親和性はそれぞれ8および89%である。ファロージカ抗SIZP力価は、プロテインGの相対親和性について修正していない(表5A)。発情の2ヶ月以上、およびFCAを含むワクチンで免疫化した8～9ヶ月後に検査したメスはいずれも妊娠しておらず、96%(192/200)の未処置のメスは妊娠していた。妊娠は、妊娠の徴候について生殖器官を検査することにより、または生存捕獲メスから得た血液を妊娠特異的プロテインB(PSPB)についてBioTracking, Inc. of Moscow, Idaho (Willardら、"Pregnancy detection and the effects of age, body weight, and previous reproductive performance on pregnancy status and weaning rates of farmed fallow deer (Dama dama). J. Animal Science. 77:32-38 (1999)"(この開示は参照により本明細書に援用する))により分析することで判断した。免疫化および非免疫化メスの妊娠率の対比は、FCAを含むワクチン組成物が明らかに受精を抑制するのに有効であることを示す。これは、数年にわたる調査のため、可能な限り多くのメスが生きのまま捕獲される。

【0063】

【表6】

表 5 A

FCAアジュバントを含む本発明のワクチン組成物で免疫化されたファロージカによる
抗SIZP抗体の産生

ファロージカID番号	免疫化後抗SIZP力価 (参照血清の%)		
	時間(月)		
	0	1~2	7~10
対照			
99023	0	0	0
99024	0	0	0
99025	0	0	0
99027	0	0	0
99028	0	0	0
99029	0	0	0
FCAを用いたワクチン			
99026	0	117	ND
99025	0	72	ND
2000-06	0	96	ND
2000-08	0	94	ND
99007	0	ND	36
99008	0	ND	60
99009	0	ND	94
99016	0	ND	60
99017	0	ND	66
99019	0	ND	133
99020	0	ND	56

ND = 測定されず

他の実験を、オジロジカに対して行った。FCAを含むワクチン組成物で免疫化したオジロジカのいずれも、免疫化1年後に妊娠しなかった。ミョウバンを含むワクチン組成物で免疫化した1匹のオジロジカだけ、免疫化1年後に妊娠しなかった。抗SIZP力価レベルの結果を表5Bに示す。

【0064】

【表7】

10

20

30

表 5 B

本発明の組成物により免疫化されたオジロジカによる抗SIZP抗体の産生

オジロジカ ID番号	抗SIZP(参照血清の%)					
	免疫化後(月)					
	0	2	4	5	8	12
フロイント完全アジュバント(FCA)						
19	0	ND	ND	85	ND	
21	0	ND	ND	139	ND	
33	0	ND	ND	125	ND	
ミョウバン						
949	1	12	11	ND	48	27
916	1	6	4	ND	5	2
744	3	105	111	ND	123	75
694	0	7	7	ND	5	4
956	0	5	4	ND	2	2
9	0	ND	ND	3	ND	ND
14	0	ND	ND	8	ND	ND
17	0	ND	ND	4	ND	ND
27	0	ND	ND	4	ND	ND

ND = 測定されず

実施例 6：抗SIZP抗体の産生における油含量の影響

ワクチン組成物は、抗原の単回投与後に良好な抗体力価を産出し、従って、特に明記しない限り、以下の実施例で報告する全ての力価は、ワクチン製剤および他の免疫化プロトコール中の抗原の単回投与から生じるものである。

【0065】

良い免疫応答を得るために、水相がワクチン組成物に必要な成分であるか否かを決定するために、3グループのウサギ(2または3匹のウサギ/グループ)を、食塩水(0.5 ml)に懸濁され、フロイント完全アジュバント(0.5 ml)に乳化されたリポソーム中に封入されたSIZP(50 µg SIZP/ウサギ)を含むワクチンの3つの異なる調製物で免疫化した。これらの調製物における油相および水相の割合は等しい(表 6 A)。

【0066】

【表 8】

10

20

30

表 6 A

ウサギによる抗SIZP抗体の産生に対するワクチン組成物の油含量の影響

油含量 (%, v/v)	抗SIZP力価(参照血清の%) ¹				
	免疫化後(月)				
	0	1	2	3	4
50 ²	0	120	131	103	24
	0	38	38	24	17
50 ²	0	91	91	54	67
	0	46	112	143	112
50 ²	0	54	65	51	ND
	0	95	94	81	ND
	0	47	49	32	ND
100 ³	0	61	75	136	34
	0	14	24	100	95
100 ⁴	0	159	149	215	27
	0	50	196	244	128
100 ⁴	0	11	30	48	29
	0	15	28	40	41
100 ⁴	0	54	54	90	91
	0	14	2	19	19
	0	47	49	67	76

¹各行(line)は同じウサギから採取した血液サンプルの力価を表す。²SIZP(50 μg/ウサギ)を含むリポソームを、食塩水(0.5 ml)に懸濁し、この水相をフロイント完全アジュバント(0.5 ml)に乳化した。³SIZP(50 μg/ウサギ)を含むリポソームを凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥リポソームをフロイント完全アジュバント(0.5 ml)に懸濁させた。⁴SIZP(50 μg/ウサギ)を含むリポソームを凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥リポソームをフロイント完全アジュバント(0.2 ml)に懸濁させた。

ND=測定されず。

水を含まないように製剤化されたワクチンを使用して、4つのグループのウサギ(2または3匹のウサギ/グループ)を、フロイント完全アジュバント(0.2 mlまたは0.5 ml)に懸濁した凍結乾燥リポソームに封入されたSIZP(50 μg SIZP/ウサギ)を含む4つの異なるワクチン調製物で免疫化した。フロイント完全アジュバントは、水を含まないため、これらの調製物は、水を含まず、油相のみを含んだ。免疫化4ヵ月後の平均抗SIZP力価は、50%の油を含む組成物で免疫化されたウサギについては55±44%(変動係数、cv 80%)、100%油を含むワクチンで免疫化されたウサギについては59±41%(cv 69%)である。100%油のワクチンを受けたメスウサギと、50%油を含むワクチンで免疫化されたメスウサギの応答には差はない(P = 0.87; F(1,45) = 0.03; 平均力価は、50%油については71±7%、100%油については72±12%であった)。これらの結果は、水相の存在が、ワクチンに対する良好な免疫応答のために必要でないことを示す。

【0067】

50%および100%油を有するワクチン組成物で免疫化されたウサギにおいて抗SIZP力価の持続期間に違いがあるか否かを判断するために、抗SIZP力価を12ヶ月測定した(表6B)。免疫化後12ヶ月期間の間の抗SIZP力価は、50%油製剤で免疫化されたウサギと、100%油製剤で免疫化されたウサギとで同様である。SIZPでの免疫化の生物学的効果を検証するために、両方のワクチン製剤で免疫化された検査済みのメスウサギを、検査済みのオスと、免疫化後12ヶ月期間の間に3回交配させた。50%油を含むワクチンで免疫化されたウサギについて受精率の低下は80%であり、100%油を含むワクチンで免疫化されたメスウサギ

は子供を産まず、受精率の低下の生物学的効果が両方のワクチン製剤で類似することを示す。

【0068】

【表9】

表6B

ウサギにおける抗SIZP抗体の持続期間に対するワクチン組成物の油含量の影響

ウサギID 番号	抗SIZP力価(参照血清の%)									
	免疫化後(月)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	11	12
50%油含量										
3	0	145	112	94	82	45	23	24	20	20
15	0	100	71	68	83	19	29	26	18	25
16	0	125	111	122	128	111	74	92	75	63
100%油含量										
1	0	127	138	ND	ND	ND	33	51	17	27

ND==測定されず

リポソームは、親油性の物質からなるため、油中でリポソームを保存すると、リポソームの構成物質が油に溶けて、リポソームが崩壊するかもしれない。この問題を調査するために、ウサギ(各グループに2匹のウサギ)を、5℃および-20℃にて5ヶ月間保存したワクチン(100%油製剤)で免疫化する。ワクチンを5℃にて5ヶ月間保存した場合には、ウサギの抗SIZP力価は28%しか低下しなかった(表6C; $P=0.002$; $F(5,33)=4.9$)。ワクチンを-20℃にて5ヶ月間保存した場合には、ウサギの抗SIZP力価は14%しか低下しなかった(表6D; $P<0.001$; $F(5,35)=23.7$)。これらの結果は、ほとんどのリポソームが、油中で無傷のままでいることを示す。なぜなら、リポソーム封入無しに、フロイント完全アジュバント中に懸濁されたSIZPの単回注射によるウサギの免疫化では、力価が低いからである(表6E)。

【0069】

【表10】

表 6 C

ウサギによる抗SIZP抗体の産生に対する100%油製剤でのワクチン組成物の保存の影響

保存 ² (月)	抗SIZP力価 ¹ (参照血清の%)								
	免疫化後(月)							平均	SE
	0	1	2	3	4	5	6		
0	0	60	123	112	163	109	119	114	11.2
	0	26	108	112	163	131	141		
1	0	26	112	183	121	122	100	113	11.9
	0	77	133	142	117	70	153		
2	0	63	176	128	70	127	57	98	13.9
	0	50	110	100	ND	ND	ND		
3	0	23	138	168	104	117	143	94	13.3
	0	35	100	113	76	63	42		
4	0	17	39	104	63	73	100	68	10.1
	0	47	136	73	26	45	85		
5	0	22	127	69	66	140	99	82	11.8
	0	27	111	57	54	140	74		

¹ワクチン組成物(100%油製剤)は、Ballistivet (商標) から購入した生物弾に入れられ、手術によりウサギに筋内移植される。

²生物弾は5℃にて保存。

【表 1 1】

表 6 D

ウサギによる抗SIZP抗体の産生に対する100%油製剤でのワクチン組成物の保存の影響

保存 ² (月)	抗SIZP力価 ¹ (参照血清の%)								
	免疫化後(月)								
	0	1	2	3	4	5	6	平均	SE
0	0	60	123	112	163	109	119	114	11.2
	1	26	108	112	163	131	141		
1	0	9	13	13	41	19	60	27	6.7
	0	6	16	14	73	33	ND		
2	0	9	14	23	70	136	116	51	12.7
	0	6	30	19	41	95	57		
3	0	13	23	127	100	73	88	57	11.1
	0	13	18	90	61	58	30		
4	0	13	68	50	71	80	122	85	14.0
	0	13	114	134	81	100	179		
5	0	9	114	75	87	146	92	98	13.7
	1	22	108	116	109	179	125		

¹ワクチン組成物(100%油製剤)は、Ballistivet (商標) から購入した生物弾に入れられ、手術によりウサギに筋内移植される。

²生物弾は-20℃にて保存。

【表 1 2】

表 6 E

リポソーム中にSIZPが封入されていないSIZPの単一投与で免疫化されたウサギによる
抗SIZP抗体の産生

ウサギID 番号	抗SIZP力価(参照血清の%) ¹				
	免疫化後(月)				
	0	1	2	3	4
1	0	43	19	9	2
2	0	27	7	4	1

10

¹ウサギは、フロイント完全アジュバントに懸濁されたSIZP(50 μg/ウサギ)の単一投与で免疫化される。

水相を含まないように製剤化されたワクチンが、別の哺乳動物種において良好な応答を生じるか否かを判断するために、ハイイロアザラシ(*Halichoerus grypus*)を、等量の油相および水相、水相のみ、または油相のみを含むワクチンで免疫化した(表 6 F)。等量の油相および水相、または油のみを含むワクチンの抗SIZP力価に差はなかったが、油以外の全成分を含むワクチンを投与した場合には力価が有意に低かった。

20

【0 0 7 0】

【表 1 3】

表 6 F

ハイイロアザラシによる抗SIZP抗体の産生に対するワクチン組成物の油含量の影響

油含量 (%, v/v)	抗SIZP力価(参照血清の%) ¹				
	免疫化後(月)				
	0	1	2	3	4
0 ²	0	5	4	1	1
	0	1	2	1	1
50 ³	0	7	9	145	107
	0	41	52	82	38
100 ⁴	0	20	28	79	60
	0	3	30	90	50

30

¹各行は、同じハイイロアザラシから採取した血液サンプルの力価を表す。

²SIZP(100 μg/ハイイロアザラシ)および熱殺結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (2 mg/ハイイロアザラシ)を含むリポソーム(Sigma Chemical Co. から購入し、本明細書で報告する全ての調査において使用するフロイント完全アジュバント中の活性成分)を食塩水(0.5 ml)に懸濁する。

40

³SIZPを含むリポソーム(100 μg/ハイイロアザラシ)を食塩水(0.5 ml)に懸濁し、この水相をフロイント完全アジュバント(0.5 ml)に乳化させる。

⁴SIZPを含むリポソーム(100 μg/ハイイロアザラシ)を凍結乾燥させ、得られた凍結乾燥リポソームをフロイント完全アジュバント(0.5 ml)に懸濁させる。

実施例 7：リポソーム中での古細菌脂質の使用

リポソームは、様々な脂質物質からなり得る完全に閉じた脂質膜である。本実施例では、古細菌脂質を用いてなるリポソームを、ダイズレシチンを用いて作られたリポソームと、ウサギによる抗体産生を刺激する能力について比較する(表 7)。ダイズレシチンで作られ

50

たりポソームは、古細菌脂質で作られたりポソームよりも、抗SIZP抗体をより良く産生する。

【0071】

【表14】

表7

古細菌脂質またはダイズレシチンで調製されたりポソームで免疫化されたウサギによる
抗SIZP抗体の産生

ID番号	脂質の種類	抗SIZP力価(参照血清の%)					
		免疫化後(月)					
		0	1	2	3	4	5
112	ダイズレシチン	0	143	195	137	197	98
115	ダイズレシチン	0	200	198	157	179	106
117	古細菌脂質	0	46	30	37	13	ND
118	古細菌脂質	0	7	4	8	2	ND

ND=測定されず

実施例8：ストレプトキナーゼに対する免疫化

ワクチン組成物は、単回投与後に長時間持続する抗SIZP抗体の高い力価を産生するかは独特(unique)である。ワクチン組成物が、他の抗原で高い抗体力価を産生するか否かを決定するために、ウサギをストレプトキナーゼで免疫化する。

【0072】

ストレプトキナーゼは、連鎖球菌科の細菌の病原菌株から産生されるエキソタンパク質(exoprotein)である。血管線溶(vascular fibrinolysis)のアクチベーターとして、その治療的有用性が長い間心筋梗塞の治療において評価されてきた。ストレプトキナーゼは、非協同的に解ける。従って、タンパク質は、天然型であると思われるいくつかの領域を含むいくつかの部分的に折り畳まれた状態、およびその他は解かれた状態をとりえる。タンパク質の他の領域から独立した、異なる安定性の3つのドメインが存在する(Teutenら, 1993, Biochem. J. 290:313-319)。天然型ストレプトキナーゼは、C末端領域に免疫優性エピトープを含む(Torrensら, 1999, Immunology Letters 70:213-218)。C末端領域は、比較的構成的でないため(Parradoら, 1996, Protein Sci 5:693-704)、熱処理により構成を変えることはできない。なぜなら、熱処理前から構成的でないからである。ドメインCの熱安定性は、残りの鎖から単離されることにより、有意に高くなる(Connejero-Laraら, 1996, Protein Sci 5:2583-2591)。C末端領域の欠如により、免疫原性タンパク質が減るが、天然型分子に隠れた免疫原生エピトープを曝露する。本発明者らの調査では、C末端領域は、天然型および熱処理ストレプトキナーゼに存在し、従って、タンパク質の免疫優性領域として、ウサギの応答を決定するであろう。C末端領域が、天然型状態で見とめられるのと同じエピトープを熱処理後にも保持する場合には、抗ストレプトキナーゼ抗体が、天然型および熱処理ストレプトキナーゼに結合する際の違いは期待できないであろう。これらは、まさに見とめられた観察である(表8)。本発明者らは、本発明のワクチン組成物を用いた変性タンパク質の送達により、天然型エピトープを指向する抗体の産生に有利に働くことを提案した。これは、実施例2のアルコールデヒドロゲナーゼ調査により裏付けられる。ストレプトキナーゼでの結果は、この提案と一致する。なぜなら、熱処理は、免疫優性領域の構成を変化せず、採用する送達系とは無関係に、天然型および熱処理ストレプトキナーゼで免疫化されたウサギの免疫応答において違いがないと予想されるからである。これらは、本発明者らの間違いのない観察である(表8)。

【0073】

【表15】

表 8

従来の免疫化プロトコール¹または本発明の方法²を用いて、天然型および熱処理されたストレプトキナーゼ(5%メルカプトエタノール中100℃にて10分間)で免疫化されたウサギ由来のウサギ抗ストレプトキナーゼ血清のエピトープマッピング

免疫化			力価(参照血清の%) ³					
ウサギ ID	抗原	送達	天然型ストレプトキナーゼ			熱処理ストレプトキナーゼ		
			免疫化後(月)					
			0	1	2	0	1	2
21	天然型	本発明	0	100	122	0	98	122
24	天然型	本発明	0	82	98	0	53	108
25	天然型	従来	0	10	89	0	8	100
20	天然型	従来	0	9	94	0	3	92
23	熱処理	本発明	0	10	34	0	15	31
28	熱処理	本発明	0	25	99	0	24	94
27	熱処理	従来	0	9	107	0	7	94
30	熱処理	従来	0	10	100	0	8	94

¹ウサギを、フロイント完全アジュバント中の75 μ gストレプトキナーゼで免疫化し、その後1ヵ月後に、フロイント不完全アジュバント中の75 μ gストレプトキナーゼで1回の二次免疫注射を行った。

²ウサギを、本発明のワクチンに入った75 μ gストレプトキナーゼの単回注射で免疫化した。

³力価は、天然型および熱処理ストレプトキナーゼの両方で測定した。

この結果から、本発明のワクチンを用いたストレプトキナーゼの単回注射が、従来の一次および二次免疫注射プロトコールにより得た力価と同様の抗ストレプトキナーゼ力価を産生したということは明らかである。また、使用する免疫化プロトコール(つまり、本発明または従来のプロトコール)に関わらず、産生した抗体は、天然型および熱処理ストレプトキナーゼに同等に結合した。

【0074】

実施例9：食用植物油の使用

本発明に従って、鉱油の代わりにカノーラ油を使用してワクチン組成物を製剤化した。結果を表9に示す。結果は、カノーラ油で製剤化したワクチンが、ウサギにおいて抗SIZP抗体を産生し、従って、カノーラ油が有用であることを示す。しかし、力価レベルは、鉱油ほど高くはない。

【0075】

【表16】

表 9

ウサギにおける抗SIZP抗体の産生に対するカノーラ油の影響

ウサギ ID	ワクチン製剤	抗SIZP力価(参照血清の%)							
		免疫化後(月)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
4	ミョウバン/鉱油	0	111	123	105	124	95	125	157
14		0	231	132	205	178	279	258	251
9	FCA/鉱油 ¹	0	162	264	310	ND	ND	ND	ND
26		0	351	166	112	ND	ND	ND	ND
34	FCA/カノーラ油 ²	0	27	24	37	ND	ND	ND	ND
36		0	18	24	36	ND	ND	ND	ND

¹フロイント完全アジュバント(FCA)は、商業元(Sigma)から得て、鉱油と製剤化した。²FCA/カノーラ油は、FCA中に存在するものと同量のミコバクテリア熱殺細胞を含んでいたが、FCAの鉱油成分を食用カノーラ油に置き換えた。

ND=測定されず。

実施例 10：B型肝炎に対する免疫化

本発明に従い、食塩水(0.25 ml)に懸濁され、次いで低粘性鉱油(0.225 ml)およびオレイン酸マンニド(0.025 ml)中で乳化されたダイズレシチン(0.05 g)およびコレステロール(0.005 g)を含むリポソームに封入されたミョウバンアジュバントを含む 5 µg B型肝炎表面抗原(Recombivax HB (商標)、組換え B型肝炎抗原)を用いて、B型肝炎ワクチンを製剤化した。製造元が推奨するように0.5 ml容量の水性媒体にミョウバンアジュバントを含む 5 µgの B型肝炎表面抗原(Recombivax HB (商標))を用いた従来の B型肝炎ワクチンも投与した。8匹のウサギを本発明により調製したワクチンで免疫化し、8匹のウサギを従来のワクチンで免疫化した。結果を表 10 に示す。

【0076】

表 10 から、本発明により調製されたワクチンが、従来の B型肝炎表面抗原の送達よりも、免疫化後 1 ヶ月後に約 6 倍多い抗体を生じることが明らかである。

【0077】

【表 17】

表 10

市販のHepBワクチン、または本発明に従い製剤化したHepBワクチンで
免疫化されたウサギによる抗HepB抗体の産生

ウサギID	抗HepB力価 (mIU/ml) ¹	
	免疫化後(月)	
	0	1
市販ワクチン		
96	0	736
101	0	1237
97	0	488
100	0	1877
99	0	6251
103	0	8384
98	0	688
102	0	1568
平均	0	2654
本発明のワクチン		
93	0	32,341
95	0	3371
88	0	5717
81	0	23,808
83	0	9344
84	0	17,856
79	0	9344
85	0	21,675
平均	0	15,432

¹抗体力価は、酵素免疫アッセイを用いて、DiaSorin Inc. (Stillwater, MN, USA) から
市販されているB型肝炎表面抗原に対する抗体(抗HBs)を検出して測定した。

実施例 11：ミョウバンアジュバントをリポソームの内側および外側に用いてワクチンを 製剤化する影響

以下のようにワクチンを調製した：

グループ	SIZP抗原	ミョウバン	媒体
1	リポソーム内側	リポソーム内側	食塩水
2	リポソーム内側	リポソーム外側	食塩水
3	リポソーム内側	リポソーム内側	油
4	リポソーム内側	リポソーム外側	油
5	対照ーリポソーム無し		油
6	対照ーリポソーム無し		食塩水

グループ 1～4 は、0.1 gダイズレシチンおよび0.01 gコレステロールで形成されたリポ
ソームに封入された100 μgSIZPで調製した。グループ 1～3 のリポソームは、100 μl Imje
ctAlum (商標) も含んでいた。グループ 2 および 4 では、100 μl ImjectAlum (商標) を
リポソームの外側に用いた。グループ 1 および 2 では、リポソームを、0.25 ml食塩水に
懸濁し、この懸濁液を0.225 ml低粘性鉱油および0.025 mlオレイン酸マンニド中で乳化し
た。グループ 3 および 4 では、リポソームを凍結乾燥し、次いで0.225 ml低粘性鉱油およ
び0.025 mlオレイン酸マンニドに懸濁し、この懸濁液を0.25 ml食塩水で乳化した。グ
ループ 5 では、100 μg SIZPおよび100 μl ImjectAlum (商標) を凍結乾燥させ、次いで、
0.225 ml低粘性鉱油および0.025 mlオレイン酸マンニドに懸濁し、0.25 ml食塩水で乳

化した。グループ6では、100 µg SIZPおよび100 µl ImjectAlum（商標）を凍結乾燥させ、次いで0.25 ml食塩水に懸濁し、0.225 ml低粘性鉱油および0.025 mlオレイン酸マンニド中で乳化した。この6つのワクチンでウサギを免疫化し、結果を表11に示す。

【0078】

【表18】

表11

ミョウバンアジュバントを含む本発明の4つのワクチン製剤(グループ1~4)、およびミョウバンアジュバントを含む2つの対照製剤(グループ5~6)で免疫化されたウサギによる抗SIZP抗体の産生

グループ	ウサギ ID	抗SIZP力価 (%参照血清) 免疫化後(月)				平均力価 免疫化後(月)				平均力価の 標準誤差		
		0	1	2	3	0	1	2	3	1	2	3
1	49	2	107	176	183	0	135	203	236	22	28	37
1	76	0	134	105	124							
1	71	0	70	249	331							
1	82	0	182	236	268							
1	78	0	182	249	274							
2	73	0	373	273	304	0	287	207	258	32	24	15
2	42	0	328	199	281							
2	62	0	259	194	244							
2	77	0	182	131	235							
2	74	0	295	238	225							
3	63	0	363	135	113	0	300	171	160	32	26	34
3	67	0	286	175	140							
3	70	0	332	241	261							
3	80	0	218	131	125							
4	48	0	383	210	113	0	200	138	108	49	20	12
4	64	0	129	109	121							
4	61	0	125	98	63							
4	60	0	148	140	115							
4	66	0	215	134	130							
5	45	0	21	133	120	0	26	96	123	8	29	33
5	65	0	6	26	42							
5	69	0	49	110	121							
5	72	0	12	36	89							
5	50	0	40	176	242							
6	68	0	28	31	22	0	16	22	18	4	3	1
6	75	0	9	16	16							
6	46	0	18	23	17							
6	43	0	10	19	16							

実施例12：熱殺結核菌アジュバントをリポソームの内側および外側に用いてワクチンを製剤化する影響

以下のようにワクチンを調製した：

グループ	SIZP抗原	熱殺結核菌	媒体
1	リポソーム内側	リポソーム内側	食塩水
2	リポソーム内側	リポソーム外側	食塩水
3	リポソーム内側	リポソーム内側	油
4	リポソーム内側	リポソーム外側	油

グループ1～4は、0.1 gダイズレシチンおよび0.01 gコレステロールで形成されたリポソームに封入された100 μ gSIZPで調製した。グループ1～3のリポソームは、200 μ lの熱殺結核菌も含んでいた。グループ2および4では、200 μ gの熱殺結核菌をリポソームの外側に用いた。グループ1および2では、リポソームを、0.2 ml食塩水に懸濁し、この懸濁液を0.18 ml低粘性鉱油および0.02 mlオレイン酸マンニド中で乳化した。グループ3および4では、リポソームを凍結乾燥し、次いで0.18 ml低粘性鉱油および0.02 mlオレイン酸マンニドに懸濁し、この懸濁液を0.2 ml食塩水中で乳化した。この4つのグループのワクチンでウサギを免疫化し、結果を表12に示す。

【0079】

【表19】

10

表12

熱殺結核菌を含む本発明の4つのワクチン製剤で免疫化されたウサギによる
抗SIZP抗体の産生

グループ	ウサギ ID	抗SIZP力価 (%参照血清) 免疫化後(月)				平均力価 免疫化後(月)				平均力価の 標準誤差		
		0	1	2	3	0	1	2	3	1	2	3
1	33	0	245	236	259	0	318	262	437	51	18	126
1	29	0	390	288	614							
2	32	0	544	515	633	0	576	532	638	22	12	3
2	22	0	608	549	642							
3	9	0	162	264	310	0	293	599	508	93	237	140
3	13	0	424	933	707							
4	16	0	454	276	532	0	403	221	322	36	39	149
4	26	0	351	166	112							

20

実施例13：ミョウバンアジュバントと共に天然型および変性型酵母アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)でのウサギの免疫化

30

100 μ g天然型または変性型ADHを、100 μ lImjectAlum（商標）と共に、0.1gダイズレシチンおよび0.01 gコレステロールで形成されたリポソームに封入して、本発明のワクチンを製剤化した。リポソームを0.25 ml食塩水に懸濁し、懸濁液を0.225 ml低粘性鉱油および0.025 mlオレイン酸マンニド中に乳化した。

【0080】

従来のワクチンは、100 μ gの天然型または変性型ADHを、100 μ l ImjectAlum（商標）と共に含んで製剤化され、0.5 ml食塩水に懸濁されていた。

【0081】

ADHを100℃まで30分間加熱して変性型ADHを調製し、10%メルカプトエタノールで30分間室温にて処理することによりジスルフィド結合を切断した。メルカプトエタノールを、12時間の透析により除去し、変性型ADHを凍結乾燥により回収した。

40

【0082】

本発明のワクチンと従来ワクチンを比較した結果を表13に示す。

【0083】

【表20】

表 1 3

ミョウバンをアジュバントとして使用した天然型および変性型ADHで
免疫化されたウサギによる抗ADH抗体の産生

ウサギ ID	送達系	抗ADH力価(%参照血清)							
		免疫化後(月)							
		天然型ADH				変性型ADH			
		0	1	2	3	0	1	2	3
天然型ADH									
54	本発明	0	24	42	66	0	8	4	4
57		0	100	143	146	0	29	3	6
55		0	91	85	111	0	26	3	5
40	従来	0	1	1	2	0	1	0	1
44		0	1	1	1	0	1	0	1
47		0	5	4	8	0	3	1	1
変性型ADH									
53	本発明	0	1	2	5	0	1	1	2
58		0	1	1	2	0	1	0.5	1
52		0	1	4	15	0	1	0.5	1
51	従来	0	2	4	4	0	1	0.5	2
59		0	1	1	4	0	1	0.5	0
56		0	2	2	2	0	1	0.5	0

この結果は、本発明の製剤を用いた天然型または変性型ADHの送達が、従来方法を用いて天然型または変性型ADHに対して免疫化されたウサギによる抗ADH抗体の産生と比べて、抗ADH抗体の産生が高いことを示す。さらに、変性型ADHで免疫化されたウサギは、二次免疫注射をしない従来手段により変性型ADHが送達される場合よりも、本発明の製剤を使用した場合の方が、天然型ADHに特異的な抗体をより多く産生した。

【0084】

実施例14：エピトープマッピング

エピトープマッピングを、一次および二次ブースター注射による従来の免疫化プロトコールにより達成される場合よりも、本発明のワクチンが、抗原に対して異なる結合特異性を有する抗体を産生することを実証するために試みる。具体的にはZP抗原の断片を使用した。他の抗原も似たような作用をすると予想される。

【0085】

一次注射および2回のブースター注射でのハイイロアザラシおよびタテゴトアザラシの従来の免疫化では、抗SIZP抗体力価が低く、ハイイロアザラシおよびタテゴトアザラシの両方において免疫化後2ヶ月にピークに達する。対照的に、本発明により製剤化したワクチンでの免疫化は、1例を除いて、ハイイロアザラシにおいて少なくとも24ヶ月間、そしてタテゴトアザラシにおいて5～6ヶ月間持続する抗SIZP抗体力価を産生する。タテゴトアザラシにおける力価は、免疫化後6～10ヶ月間持続する水平期に達する。従って、本発明により製剤化したワクチンは、一次および二次免疫注射を使用する従来の免疫化プロトコールと比べて、高い抗SIZP力価を長い持続期間の間生じさせる。

【0086】

従来の免疫化プロトコール後に産生される抗SIZP抗体が、本発明のワクチンでの免疫化後に産生される抗SIZP抗体と異なる結合特異性を有することを実証するためのエピトープマッピングで使用したZPBおよびZPCのポリペプチド断片を図1に示す。断片ZPB1、ZPB2、ZPC1およびZPC2は、短いポリペプチドで、完全長ZPBおよびZPCの三次元構造をもたない。図1において、完全長未プロセシングポリペプチドを、2つのZPBおよびZPC断片の上に示す。天然型タンパク質において切断される分泌シグナルペプチドは黒塗りしている。

【0087】

従来免疫化(FCAアジュバントを使用した一次および2回の二次免疫注射)後に産生される抗SIZPハイイロアザラシ抗体は、ZPB1、ZPB2、ZPC1およびZPC2断片に対して高い親和性を有する(表14A、アザラシID1)。対照的に、本発明により製剤化したワクチンで免疫化したハイイロアザラシは(表14A、アザラシID76および96)、免疫化後1年で断片ZPB2、ZPC1およびZPC2に対して低い親和性を有し、免疫化後3年で4つ全ての断片に対して低い親和性を有する抗体を産生する。4つの断片は合わせるとSIZPに基づくタンパク質の80%を占める。

【0088】

【表21】

10

表14A

大腸菌で産生されたZPBおよびZPCの組換え断片を用いた
ハイイロアザラシ抗SIZP抗体のエピトープマッピング

アザラシ ID	免疫化後 (月)	SIZPに関する結合(%)				合計
		ZPB1	ZPB2	ZPC1	ZPC2	
1	3	30	44	59	41	174
1	4	71	70	83	63	287
76	12	54	25	8	12	99
76	36	18	9	13	11	51
96	12	47	18	15	10	90
96	36	10	8	15	10	43

20

本発明により製剤化されたワクチンで免疫化されたハイイロアザラシで産生された抗体の結合特異性の時間的調査によれば、抗体が、ZPB1断片上で主に見とめられるエピトープに対して免疫化後初期(7ヶ月未満)に結合したことを示した。免疫化後後期(7ヶ月を上回る)に産生された抗体は、ZPB1および他の3つの断片に対して低い親和性を有する。ZPB1、ZPB2、ZPC1およびZPC2は、低分子量で、グリコシル化されていない。これらの断片は、分子量が低いため、完全長ZPBおよびZPCよりも小さい三次元構造を有する。従って、SIZPに結合するが、ZPB1、ZPB2、ZPC1またはZPC2には結合しない抗体は、完全長ZPBおよびZPC上のみで見とめられる三次元構造、またはこれらのタンパク質に共有結合した糖質(carbohydrate)のいずれかを認識するはずである。免疫化後初期に断片に結合した抗体の合計量は、ZPBおよびZPCに結合した抗体の量を超えるか等しいため、糖質認識抗体は、比較的重要でない役割を有するのであろう。これは、三次元構造が、SIZPと対照的な、断片への結合の違いを決定することを意味する。本発明のワクチン中のSIZPで免疫化された9匹の他のハイイロアザラシの調査から、免疫化後5ヶ月以上で産生される抗体の同様の減少が示された。

30

【0089】

40

別の実験では、本発明のワクチンで免疫化された4匹のウサギのうち3匹が、他の3つの断片においてよりも、ZPB1中のエピトープに対して高い親和性を有する抗体を産生した。4匹全てのウサギにより産生された抗体の20~40%のみが、4つのZP断片において見とめられるエピトープに結合した。従って、本発明のワクチンで免疫化されたウサギにより産生される抗SIZP抗体の60~80%は、完全長ZPBおよびZPCにおいて見とめられるエピトープにのみ結合する。従って、本発明のワクチンで免疫化されたウサギにおいて産生された抗体の60~80%は、天然型三次元構造に関連したエピトープを認識する。

【0090】

さらに別の実験では、FCAアジュバントを用いた一次注射、その後のFIAアジュバントを用いた二次免疫注射での従来プロトコールによるタテゴトアザラシ(156および162)の免疫化

50

により、ZPB1、ZPB2およびZPC2(タテゴトアザラシ156)、または4つ全ての断片(タテゴトアザラシ162)で見とめられるエピトープ、ならびにSIZPに結合する免疫化後初期に抗体が産生された(表14B)。対照的に、本発明により製剤化したワクチンでのタテゴトアザラシ151の免疫化は、免疫化後初期(5ヶ月未満)に、4つ全てのZP断片に見とめられるエピトープに結合する抗体を産生したが、免疫化後後期(7ヶ月を上回る)に産生された抗体は、完全長ZPBおよびZPCのみに見とめられるエピトープに結合した(表14B)。本発明のワクチンによるタテゴトアザラシ153の免疫化により産生される抗体の30~40%のみが、4つのZP断片上のエピトープに良く結合し、免疫化後7ヶ月期間の間にタテゴトアザラシ153により産生される抗体の60~70%が、完全長ZPBおよびZPCにおいて見とめられるエピトープにのみ結合することを意味する。これらのエピトープは、三次元構造を意味する完全長ZPBおよびZPCにおいてのみ見とめられる構造に関係しているに違いない。本発明のワクチンでのズキンアザラシ1の免疫化では、タテゴトアザラシ151と同様の特異性の時系列を有する抗体を産生した。

【0091】

【表22】

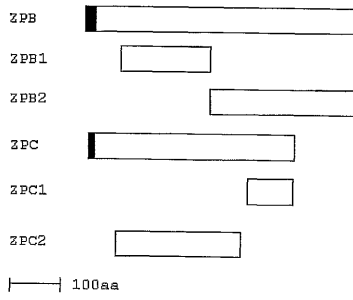
表14B

大腸菌で産生されたZPBおよびZPCの組換え断片を用いた
タテゴトアザラシおよびズキンアザラシ抗SIZP抗体のエピトープマッピング

アザラシ ID	免疫化後 (月)	SIZPに関する結合(%)				
		ZPB1	ZPB2	ZPC1	ZPC2	合計
タテゴト アザラシ 156	2	9	8	7	7	31
	3	30	19	10	24	83
	4	36	38	2	34	110
タテゴト アザラシ 162	2	8	10	11	11	40
	3	33	26	19	24	102
タテゴト アザラシ 151	1	40	33	36	33	142
	3	41	28	32	21	122
	5	21	27	35	34	117
	6	50	26	30	44	150
	7	8	6	9	8	31
	9	4	17	32	10	63
タテゴト アザラシ 153	2	12	6	11	9	38
	3	16	12	9	12	49
	4	6	5	7	3	21
	5	13	8	12	11	44
	6	12	9	11	12	44
	7	9	6	0	7	22
ズキン アザラシ 1	2	30	22	26	27	105
	3	33	25	28	30	116
	4	37	32	38	34	141
	5	31	24	29	31	115
	7	15	12	12	11	50
	8	12	13	11	8	44

【図面の簡単な説明】

【図1】 pRSETベクターで産生されたブタ透明帯のZPBおよびZPCタンパク質の組換えZPB1およびZPB2；ZPC1およびZPC2の位置を示す図である。

【☒ 1】

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/39

(72)発明者 ブラウン, ロバート, ジョージ

カナダ国 ビー2ダブリュ 2シー4, ノバ スコティア, ダートマウス, スワントン ドライブ
1 8

(72)発明者 ポハユダック, ビル

カナダ国 ビー2ブイ 2シー4, ノバ スコティア, ダートマウス, シュリュズバリー ロード
8 3

(72)発明者 キミンズ, ワルウィック, チャールズ

カナダ国 ビー3エイチ 1エー5, ノバ スコティア, ハリファックス, バルモラル ロード
5 8 6 5

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 国際公開第00/037100 (WO, A1)

特表平06-504759 (JP, A)

特表平06-507574 (JP, A)

NASH, H.A. et al., Journal of Reproductive Immunology, 1985年, Vol.7, pp.151-162

HILBERT, A.K. et al., Vaccine, 1999年, Vol.17, pp.1065-1073

EGHAFONA, N. et al., Vaccine, 1996年, Vol.14, pp.1703-1706

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00-39/39

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)