

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6600459号
(P6600459)

(45) 発行日 令和1年10月30日(2019.10.30)

(24) 登録日 令和1年10月11日(2019.10.11)

| | |
|---------------|---------------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| A 6 1 K 39/00 | (2006.01) A 6 1 K 39/00 |
| A 6 1 K 39/02 | (2006.01) A 6 1 K 39/00 H |
| A 6 1 K 39/12 | (2006.01) A 6 1 K 39/02 |
| A 6 1 K 39/39 | (2006.01) A 6 1 K 39/12 |
| C 0 7 K 7/06 | (2006.01) A 6 1 K 39/39 |

請求項の数 13 (全 26 頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2014-529976 (P2014-529976) |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年9月12日 (2012.9.12) |
| (65) 公表番号 | 特表2014-527965 (P2014-527965A) |
| (43) 公表日 | 平成26年10月23日 (2014.10.23) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2012/054786 |
| (87) 國際公開番号 | W02013/039989 |
| (87) 國際公開日 | 平成25年3月21日 (2013.3.21) |
| 審査請求日 | 平成27年7月29日 (2015.7.29) |
| 審判番号 | 不服2017-16856 (P2017-16856/J1) |
| 審判請求日 | 平成29年11月13日 (2017.11.13) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/533,512 |
| (32) 優先日 | 平成23年9月12日 (2011.9.12) |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) |

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 509263191 ピーディーエス バイオテクノロジー コ ーポレイション P D S B I O T E C H N O L O G Y C O R P O R A T I O N アメリカ合衆国 08902 ニュージャ ージー州 ノースプランズウィック ュー エス ハイウェイ ワン 675 |
| (74) 代理人 | 110000176 一色国際特許業務法人 |
| (72) 発明者 | ペデュー・アッド, フランク アメリカ合衆国 06801 コネチカッ ト州 ベセル ペニー レーン 3 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】粒子状ワクチン製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カチオン性脂質と、ミセル構造又は脂質二重層構造である抗原集合体粒子とを含み、前記抗原集合体粒子が前記カチオン性脂質に封入されていない、ワクチン製剤。

【請求項 2】

前記カチオン性脂質は、免疫調節剤である、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 3】

前記カチオン性脂質は、DOTAP、DOTMA、DOEPC、これらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 4】

前記カチオン性脂質は、DOTAP である、請求項 3 に記載のワクチン製剤。

【請求項 5】

前記カチオン性脂質は、カチオン性脂質のエナンチオマーである、請求項 1 または 3 に記載のワクチン製剤。

【請求項 6】

前記エナンチオマーは、R-DOTAP である、請求項 5 に記載のワクチン製剤。

【請求項 7】

前記抗原集合体粒子は、癌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、病原性抗原からなる群から選択される少なくとも 1 種の抗原を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

10

20

【請求項 8】

前記少なくとも 1 種の抗原は、 H P V タンパク質またはペプチドである、請求項 7 に記載のワクチン製剤。

【請求項 9】

前記抗原集合体粒子は、 1 つまたは 2 つ以上の修飾された抗原を含む、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 10】

前記抗原集合体粒子は、ペプチド抗原を含む、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 種の抗原は、メラノーマ抗原である、請求項 7 に記載のワクチン製剤 10
。

【請求項 12】

前記 1 つまたは 2 つ以上の修飾された抗原は、前記抗原の疎水性を高めるまたは低減させるよう修飾された抗原である、請求項 9 に記載のワクチン製剤。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 種の抗原は、 R A H Y N I V T F (配列番号 1)、 G Q A E P D R A H Y N I V T F (配列番号 2)、 K S S G Q A E P D R A H Y N I V T F (配列番号 3)、 Y M L D L Q P E T T (配列番号 4)、 K S S Y M L D L Q P E T T (配列番号 5)、 K S S M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T (配列番号 6)、 K S S L L M G T L G I V C P I C S Q K P (配列番号 7)、 K V P R N Q D W L (配列番号 8)、 S Y V D F F V W L (配列番号 9)、 K Y I C N S S C M (配列番号 10)、 K S S K V P R N Q D W L (配列番号 11) からなる群から選択される、請求項 7 から 12 のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

人間が使用するための安全で効果的な免疫療法や治療用ワクチンの開発には、いまだ世界中の患者にとって医療上重要な需要がある。一般に、ワクチン製剤は、標的となる免疫応答を刺激するための抗原を含む。しかしながら、開発中のワクチンの中には、広範にわたる哺乳動物集団の免疫応答に対する弱い刺激因子であるがゆえに、効き目のないものがある。たとえば、ワクチン製剤の抗原は、哺乳動物における免疫原性に乏しいことがある。加えて、ワクチンによっては、哺乳動物の免疫系の抗原提示細胞 (「 A P C 」) に抗原を効率的に送達できない。 30

【0002】

さらに、ワクチン製剤に含まれるいくつかの抗原は、哺乳動物における免疫応答の劣った刺激因子であることが知られている。他の抗原は、効果を発揮するのに、特定の抗原エピトープへの哺乳動物の免疫系による処理を必要とすることがある。結果として、このような抗原を大量に送達する必要がある。しかしながら、このような大量の送達は、ナノ粒子送達系を用いて効果的かつ安全に達成されない場合がある。水溶液でのタンパク質およびペプチド抗原の投与も、一般にこのような抗原の免疫原性が弱く、 A P C によってほとんど取り込まれないことから、有益ではないことがある。抗原をウイルス様粒子 (V L P) にする開発は成功しているが、あいにく V L P は製造に費用がかかり、大きな組換えタンパク質を必要とする。これに、融合タンパク質や特定の複雑なアセンブリ技術が求められることも多い。さらに、 V L P では、ペプチド抗原の使用が除外される。 40

背景技術および発明の開示

また、ワクチンは一般に、ワクチン製剤中の抗原の効力を高めるべく、アジュバントを含む。たとえば、油中水型エマルション、ミョウバン (たとえば、アルミニウム塩) 、他の化学物質などのアジュバントは一般に、哺乳動物における抗原応答を高めるために用いられる。従来のアジュバントに加えて、固有の免疫作用内で他のアジュバント (たとえば、インフルエンザビロソームおよび Chiron の MF59) を使用してもよい。しかしながら、こ 50

これらのアジュバントも、動物モデルでの証拠（HSVおよびインフルエンザワクチンに関する臨床試験報告による）から、これらのアジュバントが動物におけるT細胞応答を高めるのではなく、単に中和抗体の生成を増すだけであることが示唆されるため、望ましくない。

【0003】

したがって、哺乳動物における免疫応答を刺激するために、効果的に抗原を送達する、あるいは抗原提示細胞による抗原の取り込みを促進する新たなワクチン製剤に対する需要がある。さらに、おそらくは安全で効果的な免疫修飾因子（「免疫調節剤」）をワクチン製剤に含ませることで、哺乳動物における細胞媒介免疫応答を刺激するための効果的で新たな方法も、極めて望ましい。したがって、本開示は、望ましい特性を呈し、簡潔さ、抗原取り込み、哺乳動物における免疫応答の誘導という点で改善のための関連の利点を提供する、ワクチン製剤と、この製剤を使用する方法を提供する。10

【0004】

本開示は、少なくとも1種のペプチド抗原集合体と、少なくとも1種のアジュバントとを含む、ワクチン製剤を提供する。また、本開示は、ワクチン製剤を利用して、哺乳動物における免疫応答を誘導する方法と、哺乳動物における疾患を治療する方法も提供する。

【0005】

本開示によるワクチン製剤および方法は、従来技術の他の製剤および方法に比して、いくつかの利点を提供する。第一に、このワクチン製剤は、哺乳動物における適切な免疫応答を高める、指向する、または促進する免疫調節剤であるアジュバントを含む。免疫調節剤は、ワクチン製剤に含まれると、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を効果的にブーストする潜在性を有する。たとえば、免疫調節剤は、（1）抗原送達および/またはAPCにおける処理の改善、（2）細胞障害性Tリンパ球（「CTL」）をはじめとする、抗原に対する免疫応答を生じさせるのに好都合で、よって細胞媒介免疫を促進する、免疫調節性サイトカイン産生の誘導、（3）効果的なワクチンに必要な免疫回数の低減または抗原量の低減、（4）ワクチン抗原の生物学的または免疫学的半減期の延長、（5）免疫抑制因子を阻害することによる、抗原に対する免疫寛容の克服のうち1つまたは2つ以上を、都合よく達成できる。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ベースのアジュバントを、有効な免疫修飾アジュバントとして利用してもよく、ワクチン製剤で優れたT細胞応答および抗体免疫応答を誘発できる。20

【0006】

第2に、粒子状ワクチン製剤などのワクチン製剤は、ミセル構造または二重層構造などの天然に形成されるまたは自己形成される抗原集合体を含み、これは、従来のワクチン製剤に比して、APCによる大量の抗原取り込みを効果的に促進する。このような抗原集合体は、哺乳動物においてAPCによって取り込まれて処理される好適な形態での抗原の製剤を可能にし、一層強力な抗原特異的免疫応答が得られる。さらに、タンパク質またはペプチド抗原が、水性媒質中にて自然にミセル構造または二重層構造などの単純に組織化された粒子構造に形成されることで、APCによって効果的に取り込まれ、処理されることが可能な構造が可能になる。結果として、強力なワクチン製剤を、混合物あるいはアジュバントとの併用で投与可能である。30

【0007】

第3に、抗原集合体に用いられるペプチドまたはタンパク質は、親水性基と親油性基との比が二重層またはミセル構造の形成を可能にするよう修飾されてもよい。タンパク質またはペプチド抗原の修飾は、親油性基（たとえば、炭化水素鎖または疎水性のアミノ酸配列）を親水性ペプチドに結合する、これとは逆に疎水性のタンパク質またはペプチドと結合するなど、さまざまな手段によって達成されてもよい。結合する基の大きさも、ペプチドの大きさや必要な疎水性または親水性の度合いに応じて変更してもよい。

【0008】

最後に、本開示に示されるように、このようなワクチン製剤は、従来のリポソームまたはミセル封入ワクチン製剤による同一量の抗原およびアジュバントの投与に比して、ワク40

チンの免疫原性が有意に改善されることにつながる。

【0009】

以下の番号を付した実施形態が企図され、限定されるものではない。

1. アジュバントと抗原集合体とを含む、ワクチン製剤。
2. 製剤は、粒子状のワクチン製剤である、第1項に記載のワクチン製剤。
3. アジュバントおよび抗原集合体は、混合物である、第1項または第2項に記載のワクチン製剤。
4. アジュバントは、免疫調節剤である、第1項から第3項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
5. アジュバントは、ナノ粒子である、第1項から第4項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。 10
6. アジュバントは、カチオン性脂質である、第1項から第5項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
7. カチオン性脂質は、精製されている、第6項に記載のワクチン製剤。
8. カチオン性脂質は、DOTAP、DOTMA、DOEPC、これらの組み合わせからなる群から選択される、第6項または第7項に記載のワクチン製剤。 20
9. カチオン性脂質は、DOTAPである、第6項から第8項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
10. カチオン性脂質は、DOTMAである、第6項から第8項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
11. カチオン性脂質は、DOEPCである、第6項から第8項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
12. アジュバントは、カチオン性脂質のエナンチオマーである、第1項から第5項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。 30
13. エナンチオマーは、精製されている、第12項に記載のワクチン製剤。
14. エナンチオマーは、R-DOTAPまたはS-DOTAPである、第12項または第13項に記載のワクチン製剤。
15. エナンチオマーは、R-DOTAPである、第12項から第14項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
16. エナンチオマーは、S-DOTAPである、第12項から第14項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
17. 抗原集合体は、自己集合構造である、第1項から第16項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
18. 抗原集合体は、ミセル構造である、第1項から第17項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
19. 抗原集合体は、脂質二重層構造である、第1項から第17項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
20. 抗原集合体は、管状構造である、第1項から第19項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
21. 抗原集合体は、球状構造である、第1項から第19項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。 40
22. 抗原集合体は、1種または2種以上の抗原を含む、第1項から第21項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
23. 1種または2種以上の抗原は、タンパク質ベースの抗原である、第1項から第22項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
24. 1種または2種以上の抗原は、ペプチドベースの抗原である、第1項から第23項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
25. 1種または2種以上の抗原は、癌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、病原性抗原からなる群から選択される、第1項から第24項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
26. 1種または2種以上の抗原は、ウイルス抗原である、第1項から第25項のいずれ 50

か 1 項に記載のワクチン製剤。

27 . 1 種または 2 種以上の抗原は、細菌抗原である、第 1 項から第 26 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

28 . 1 種または 2 種以上の抗原は、病原性抗原である、第 1 項から第 27 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

29 . 病原性抗原は、合成抗原または組換え抗原である、第 28 項に記載のワクチン製剤。

30 . 少なくとも 1 種の抗原は、HPV タンパク質またはペプチドである、第 1 項から第 29 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

31 . 少なくとも 1 種の抗原は、メラノーマ抗原である、第 1 項から第 30 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 10

32 . メラノーマ抗原は、g p 100 (KVPRNQDWL [配列番号 8])、TRP2 (SYVDFFVWL [配列番号 9])、p 53 (KYICNSSCM [配列番号 10])、これらの組み合わせを含む群から選択される、第 31 項に記載のワクチン製剤。

33 . 少なくとも 1 種の抗原は、リポタンパク質、リポペプチド、疎水性が高められたまたは疎水性が低減されたアミノ酸配列で修飾されたタンパク質またはペプチドからなる群から選択される、第 1 項から第 32 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

34 . 1 種または 2 種以上の抗原は、脂質付加抗原あるいは、当該抗原の疎水性を高めるよう修飾された抗原である、第 1 項から第 33 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

35 . 少なくとも 1 種の抗原は、修飾されたタンパク質またはペプチドである、第 1 項から第 34 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 20

36 . 修飾されたタンパク質またはペプチドは、疎水性基に結合される、第 35 項に記載のワクチン製剤。

37 . 疎水性基に結合される、修飾されたタンパク質またはペプチドは、抗原と疎水性基との間のリンカー配列をさらに含む、第 35 項または第 36 項に記載のワクチン製剤。

38 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 37 項に記載のワクチン製剤。

39 . 少なくとも 1 種の抗原は、未修飾のタンパク質またはペプチドである、第 1 項から第 38 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

40 . 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3)、YMLDLQPETT (配列番号 4)、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7)、KVPRNQDWL (配列番号 8)、SYVDFFVWL (配列番号 9)、KYICNSSCM (配列番号 10)、KSSKVRPNQDWL (配列番号 11) からなる群から選択される、第 1 項から第 39 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 30

41 . 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1) である、第 1 項から第 40 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

42 . 少なくとも 1 種の抗原は、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2) である、第 1 項から第 41 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

43 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) である、第 1 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 40

44 . KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 43 項に記載のワクチン製剤。

45 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 44 項に記載のワクチン製剤。

46 . 少なくとも 1 種の抗原は、YMLDLQPETT (配列番号 4) である、第 1 項から第 45 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

47 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) である、第 1 項から第 46 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

48 . KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 47 項に記載のワクチン製剤。

49 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 48 項に記載のワクチン製剤。 50

5 0 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) である、第 1 項から第 4 9 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

5 1 . KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 5 0 項に記載のワクチン製剤。

5 2 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 5 1 項に記載のワクチン製剤。

5 3 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) である、第 1 項から第 5 2 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

5 4 . KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 5 3 項に記載のワクチン製剤。

5 5 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 5 4 項に記載のワクチン製剤。 10

5 6 . 少なくとも 1 種の抗原は、KVPRNQDWL (配列番号 8) である、第 1 項から第 5 5 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

5 7 . 少なくとも 1 種の抗原は、SYVDFFVWL (配列番号 9) である、第 1 項から第 5 6 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

5 8 . 少なくとも 1 種の抗原は、KYICNSSCM (配列番号 10) である、第 1 項から第 5 7 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

5 9 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSKVPRNQDWL (配列番号 11) である、第 1 項から第 5 8 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

6 0 . KSSKVPRNQDWL (配列番号 11) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 5 9 項に記載のワクチン製剤。 20

6 1 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 6 0 項に記載のワクチン製剤。

6 2 . 製剤は、マイトジエン活性化タンパク質 (M A P) キナーゼシグナル伝達経路を活性化することによって、哺乳動物における免疫応答を誘導する、第 1 項から第 6 1 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

6 3 . M A P キナーゼシグナル伝達経路は、細胞外シグナル制御キナーゼ (「 E R K 」) - 1 、 E R K - 2 、 p 3 8 のうちの少なくとも 1 つを刺激することによって活性化される、第 6 2 項に記載のワクチン製剤。

6 4 . 製剤は、哺乳動物における機能的な抗原特異的 C D 8 + T リンパ球応答を高める、第 1 項から第 6 3 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

6 5 . 哺乳動物は、ヒトである、第 6 2 項から第 6 4 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。 30

6 6 . 有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における免疫応答を誘導する方法であって、ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む、前記方法。

6 7 . 免疫応答は、哺乳動物の免疫系の細胞における M A P キナーゼシグナル伝達経路を介して活性化される、第 6 6 項に記載の方法。

6 8 . M A P キナーゼシグナル伝達経路は、 E R K - 1 、 E R K - 2 、 p 3 8 のうちの少なくとも 1 つを刺激することで活性化される、第 6 7 項に記載の方法。

6 9 . 免疫応答は、哺乳動物における細胞障害性 T リンパ球を活性化する、第 6 6 項から第 6 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。 40

7 0 . 細胞障害性 T リンパ球は、 C D 8 + T 細胞である、第 6 9 項に記載の方法。

7 1 . 投与は、哺乳動物における機能的な抗原特異的 C D 8 + T リンパ球応答を高める、第 6 6 項から第 7 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 2 . 免疫応答は、哺乳動物における抗体応答を活性化する、第 6 6 項から第 7 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 3 . 免疫応答は、哺乳動物におけるインターフェロン - (I F N -) を活性化する、第 6 6 項から第 7 2 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 4 . 製剤は、粒子状のワクチン製剤である、第 6 6 項から第 7 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 5 . アジュバントおよび抗原集合体は、混合物である、第 6 6 項から第 7 4 項のいずれ 50

か 1 項に記載の方法。

7 6 . アジュバントは、免疫調節剤である、第 6 6 項から第 7 5 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 7 . アジュバントは、ナノ粒子である、第 6 6 項から第 7 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 8 . アジュバントは、カチオン性脂質である、第 6 6 項から第 7 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

7 9 . カチオン性脂質は、精製されている、第 7 8 項に記載の方法。

8 0 . カチオン性脂質は、D O T A P 、 D O T M A 、 D O E P C 、これらの組み合わせからなる群から選択される、第 7 8 項または第 7 9 項に記載の方法。 10

8 1 . カチオン性脂質は、D O T A P である、第 7 8 項から第 8 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 2 . カチオン性脂質は、D O T M A である、第 7 8 項から第 8 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 3 . カチオン性脂質は、D O E P C である、第 7 8 項から第 8 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 4 . アジュバントは、カチオン性脂質のエナンチオマーである、第 6 6 項から第 7 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 5 . エナンチオマーは、精製されている、第 8 4 項に記載の方法。

8 6 . エナンチオマーは、R - D O T A P または S - D O T A P である、第 8 4 項または第 8 5 項に記載の方法。 20

8 7 . エナンチオマーは、R - D O T A P である、第 8 4 項から第 8 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 8 . エナンチオマーは、S - D O T A P である、第 8 4 項から第 8 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。

8 9 . 抗原集合体は、自己集合構造である、第 6 6 項から第 8 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 0 . 抗原集合体は、ミセル構造である、第 6 6 項から第 8 9 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 1 . 抗原集合体は、脂質二重層構造である、第 6 6 項から第 8 9 項のいずれか 1 項に記載の方法。 30

9 2 . 抗原集合体は、管状構造である、第 6 6 項から第 9 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 3 . 抗原集合体は、球状構造である、第 6 6 項から第 9 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 4 . 抗原集合体は、1 種または 2 種以上の抗原を含む、第 6 6 項から第 9 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 5 . 1 種または 2 種以上の抗原は、タンパク質ベースの抗原である、第 9 4 項に記載の方法。

9 6 . 1 種または 2 種以上の抗原は、ペプチドベースの抗原である、第 9 4 項に記載の方法。 40

9 7 . 1 種または 2 種以上の抗原は、癌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、病原性抗原からなる群から選択される、第 9 4 項から第 9 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 8 . 1 種または 2 種以上の抗原は、ウイルス抗原である、第 9 4 項から第 9 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

9 9 . 1 種または 2 種以上の抗原は、細菌抗原である、第 9 4 項から第 9 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 0 0 . 1 種または 2 種以上の抗原は、病原性抗原である、第 9 4 項から第 9 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 0 1 . 病原性抗原は、合成抗原または組換え抗原である、第 1 0 0 項に記載の方法。 50

102. 少なくとも 1 種の抗原は、H P V タンパク質またはペプチドである、第 94 項から第 101 項のいずれか 1 項に記載の方法。

103. 少なくとも 1 種の抗原は、メラノーマ抗原である、第 94 項から第 102 項のいずれか 1 項に記載の方法。

104. メラノーマ抗原は、g p 100 (KVPRNQDWL [配列番号 8])、TRP2 (SYVDFFVWL [配列番号 9])、p 53 (KYICNSSCM [配列番号 10])、これらの組み合わせを含む群から選択される、第 103 項に記載の方法。

105. 少なくとも 1 種の抗原は、リポタンパク質、リポペプチド、疎水性が高められたまたは疎水性が低減されたアミノ酸配列で修飾されたタンパク質またはペプチドからなる群から選択される、第 94 項から第 104 項のいずれか 1 項に記載の方法。 10

106. 1 種または 2 種以上の抗原は、脂質付加抗原あるいは、当該抗原の疎水性を高めるよう修飾された抗原である、第 94 項から第 105 項のいずれか 1 項に記載の方法。

107. 少なくとも 1 種の抗原は、修飾されたタンパク質またはペプチドである、第 94 項から第 106 項のいずれか 1 項に記載の方法。

108. 修飾されたタンパク質またはペプチドは、疎水性基に結合される、第 107 項に記載の方法。

109. 疎水性基に結合される、修飾されたタンパク質またはペプチドは、抗原と疎水性基との間のリンカー配列をさらに含む、第 107 項または第 108 項に記載の方法。

110. 疎水性基は、パルミトイル基である、第 109 項に記載の方法。

111. 少なくとも 1 種の抗原は、未修飾のタンパク質またはペプチドである、第 94 項から第 110 項のいずれか 1 項に記載の方法。 20

112. 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3)、YMLDLQPETT (配列番号 4)、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7)、KVPRNQDWL (配列番号 8)、SYVDFFVWL (配列番号 9)、KYICNSSCM (配列番号 10)、KSSKVPRNQDWL (配列番号 11) からなる群から選択される、第 94 項から第 111 項のいずれか 1 項に記載の方法。

113. 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1) である、第 94 項から第 112 項のいずれか 1 項に記載の方法。

114. 少なくとも 1 種の抗原は、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2) である、第 94 項から第 113 項のいずれか 1 項に記載の方法。 30

115. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) である、第 94 項から第 114 項のいずれか 1 項に記載の方法。

116. KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 115 項に記載の方法。

117. 疎水性基は、パルミトイル基である、第 116 項に記載の方法。

118. 少なくとも 1 種の抗原は、YMLDLQPETT (配列番号 4) である、第 94 項から第 117 項のいずれか 1 項に記載の方法。

119. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) である、第 94 項から第 118 項のいずれか 1 項に記載の方法。 40

120. KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 119 項に記載の方法。

121. 疎水性基は、パルミトイル基である、第 120 項に記載の方法。

122. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) である、第 94 項から第 121 項のいずれか 1 項に記載の方法。

123. KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 122 項に記載の方法。

124. 疎水性基は、パルミトイル基である、第 123 項に記載の方法。

125. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) である、第 94 項から第 124 項のいずれか 1 項に記載の方法。 50

1 2 6 . KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 1 2 5 項に記載の方法。

1 2 7 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 1 2 6 項に記載の方法。

1 2 8 . 少なくとも 1 種の抗原は、KVPRNQDWL (配列番号 8) である、第 9 4 項から第 1 2 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 2 9 . 少なくとも 1 種の抗原は、SYVDFFVWL (配列番号 9) である、第 9 4 項から第 1 2 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 3 0 . 少なくとも 1 種の抗原は、KYICNSSCM (配列番号 1 0) である、第 9 4 項から第 1 2 9 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 3 1 . 少なくとも 1 種の抗原は、KSSKVPRNQDWL (配列番号 1 1) である、第 9 4 項から第 1 3 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。 10

1 3 2 . KSSKVPRNQDWL (配列番号 1 1) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 1 3 1 項に記載の方法。

1 3 3 . 疎水性基は、パルミトイル基である、第 1 3 2 項に記載の方法。

1 3 4 . 哺乳動物は、ヒトである、第 6 6 項から第 1 3 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。
。

1 3 5 . 有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における疾患を治療する方法であって、ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む、方法。

1 3 6 . 上記の方法は、予防的な治療である、第 1 3 5 項に記載の方法。 20

1 3 7 . 疾患は、癌である、第 1 3 5 項に記載の方法。

1 3 8 . 投与は、哺乳動物の免疫系の細胞における MAP キナーゼシグナル伝達経路を介した免疫応答を活性化する、第 1 3 5 項から第 1 3 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 3 9 . MAP キナーゼシグナル伝達経路は、ERK - 1 、 ERK - 2 、 p 3 8 のうちの少なくとも 1 つを刺激することで活性化される、第 1 3 8 項に記載の方法。

1 4 0 . 免疫応答は、哺乳動物における細胞障害性 T リンパ球を活性化する、第 1 3 5 項から第 1 3 9 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 1 . 細胞障害性 T リンパ球は、 CD 8 + T 細胞である、第 1 4 0 項に記載の方法。

1 4 2 . 免疫応答は、哺乳動物における抗体応答を活性化する、第 1 3 5 項から第 1 4 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。 30

1 4 3 . 免疫応答は、哺乳動物におけるインターフェロン - (IFN -) を活性化する、第 1 3 5 項から第 1 4 2 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 4 . 投与は、機能的な抗原特異的 CD 8 + T リンパ球応答を高める、第 1 3 5 項から第 1 4 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 5 . 製剤は、粒子状のワクチン製剤である、第 1 3 5 項から第 1 4 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 6 . アジュバントおよび抗原集合体は、混合物である、第 1 3 5 項から第 1 4 5 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 7 . アジュバントは、免疫調節剤である、第 1 3 5 項から第 1 4 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。 40

1 4 8 . アジュバントは、ナノ粒子である、第 1 3 5 項から第 1 4 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 4 9 . アジュバントは、カチオン性脂質である、第 1 3 5 項から第 1 4 8 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 5 0 . カチオン性脂質は、精製されている、第 1 4 9 項に記載の方法。

1 5 1 . カチオン性脂質は、DOTAP 、 DOTMA 、 DOPEC 、これらの組み合わせからなる群から選択される、第 1 4 9 項または第 1 5 0 項に記載の方法。

1 5 2 . カチオン性脂質は、DOTAP である、第 1 4 9 項から第 1 5 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

1 5 3 . カチオン性脂質は、DOTMA である、第 1 4 9 項から第 1 5 1 項のいずれか 1 50

項に記載の方法。

154. カチオン性脂質は、D O E P Cである、第149項から第151項のいずれか1項に記載の方法。

155. アジュバントは、カチオン性脂質のエナンチオマーである、第135項から第148項のいずれか1項に記載の方法。

156. エナンチオマーは、精製されている、第155項に記載の方法。

157. エナンチオマーは、R-DOTAPまたはS-DOTAPである、第155項または第156項に記載の方法。

158. エナンチオマーは、R-DOTAPである、第155項から第157項のいずれか1項に記載の方法。 10

159. エナンチオマーは、S-DOTAPである、第155項から第157項のいずれか1項に記載の方法。

160. 抗原集合体は、自己集合構造である、第135項から第159項のいずれか1項に記載の方法。

161. 抗原集合体は、ミセル構造である、第135項から第160項のいずれか1項に記載の方法。

162. 抗原集合体は、脂質二重層構造である、第135項から第160項のいずれか1項に記載の方法。

163. 抗原集合体は、管状構造である、第135項から第162項のいずれか1項に記載の方法。 20

164. 抗原集合体は、球状構造である、第135項から第162項のいずれか1項に記載の方法。

165. 抗原集合体は、1種または2種以上の抗原を含む、第135項から第164項のいずれか1項に記載の方法。

166. 1種または2種以上の抗原は、タンパク質ベースの抗原である、第165項に記載の方法。

167. 1種または2種以上の抗原は、ペプチドベースの抗原である、第165項または第166項に記載の方法。

168. 1種または2種以上の抗原は、癌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、病原性抗原からなる群から選択される、第165項から第167項のいずれか1項に記載の方法。 30

169. 1種または2種以上の抗原は、ウイルス抗原である、第165項から第168項のいずれか1項に記載の方法。

170. 1種または2種以上の抗原は、細菌抗原である、第165項から第168項のいずれか1項に記載の方法。

171. 1種または2種以上の抗原は、病原性抗原である、第165項から第168項のいずれか1項に記載の方法。

172. 病原性抗原は、合成抗原または組換え抗原である、第165項から第168項のいずれか1項に記載の方法。

173. 少なくとも1種の抗原は、H P Vタンパク質またはペプチドである、第165項から第172項のいずれか1項に記載の方法。 40

174. 少なくとも1種の抗原は、メラノーマ抗原である、第165項から第173項のいずれか1項に記載の方法。

175. メラノーマ抗原は、g p 1 0 0 (KVPRNQDWL [配列番号8])、TRP2 (SYVDFFVWL [配列番号9])、p 5 3 (KYICNSSCM [配列番号10])、これらの組み合わせを含む群から選択される、第174項に記載の方法。

176. 少なくとも1種の抗原は、リポタンパク質、リボペプチド、疎水性が高められたまたは疎水性が低減されたアミノ酸配列で修飾されたタンパク質またはペプチドからなる群から選択される、第165項から第175項のいずれか1項に記載の方法。

177. 1種または2種以上の抗原は、脂質付加抗原あるいは、当該抗原の疎水性を高めるよう修飾された抗原である、第165項から第176項のいずれか1項に記載の方法。 50

178. 少なくとも 1 種の抗原は、修飾されたタンパク質またはペプチドである、第 165 項から第 177 項のいずれか 1 項に記載の方法。

179. 修飾されたタンパク質またはペプチドは、疎水性基に結合される、第 178 項に記載の方法。

180. 疎水性基に結合される、修飾されたタンパク質またはペプチドは、抗原と疎水性基との間のリンカー配列をさらに含む、第 178 項に記載の方法。

181. 疎水性基は、パルミトイール基である、第 180 項に記載の方法。

182. 少なくとも 1 種の抗原は、未修飾のタンパク質またはペプチドである、第 165 項から第 181 項のいずれか 1 項に記載の方法。

183. 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3)、YMLDLQPETT (配列番号 4)、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7)、KVPRNQDWL (配列番号 8)、SYVDFFVWL (配列番号 9)、KYICNSSCM (配列番号 10)、KSSKVPRNQDWL (配列番号 11)、からなる群から選択される、第 165 項から第 182 項のいずれか 1 項に記載の方法。 10

184. 少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号 1) である、第 165 項から第 183 項のいずれか 1 項に記載の方法。

185. 少なくとも 1 種の抗原は、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 2) である、第 165 項から第 184 項のいずれか 1 項に記載の方法。

186. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) である、第 165 項から第 185 項のいずれか 1 項に記載の方法。 20

187. KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号 3) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 186 項に記載の方法。

188. 疎水性基は、パルミトイール基である、第 187 項に記載の方法。

189. 少なくとも 1 種の抗原は、YMLDLQPETT (配列番号 4) である、第 165 項から第 188 項のいずれか 1 項に記載の方法。

190. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) である、第 165 項から第 189 項のいずれか 1 項に記載の方法。

191. KSSYMLDLQPETT (配列番号 5) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 190 項に記載の方法。 30

192. 疎水性基は、パルミトイール基である、第 191 項に記載の方法。

193. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) である、第 165 項から第 192 項のいずれか 1 項に記載の方法。

194. KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号 6) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 193 項に記載の方法。

195. 疎水性基は、パルミトイール基である、第 194 項に記載の方法。

196. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) である、第 165 項から第 195 項のいずれか 1 項に記載の方法。

197. KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号 7) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 196 項に記載の方法。 40

198. 疎水性基は、パルミトイール基である、第 197 項に記載の方法。

199. 少なくとも 1 種の抗原は、KVPRNQDWL (配列番号 8) である、第 165 項から第 198 項のいずれか 1 項に記載の方法。

200. 少なくとも 1 種の抗原は、SYVDFFVWL (配列番号 9) である、第 165 項から第 199 項のいずれか 1 項に記載の方法。

201. 少なくとも 1 種の抗原は、KYICNSSCM (配列番号 10) である、第 165 項から第 200 項のいずれか 1 項に記載の方法。

202. 少なくとも 1 種の抗原は、KSSKVPRNQDWL (配列番号 11) である、第 165 項から第 201 項のいずれか 1 項に記載の方法。

203. KSSKVPRNQDWL (配列番号 11) は、疎水性基をさらに含むよう修飾される、第 2 50

02項に記載の方法。

204. 疎水性基は、パルミトイル基である、第203項に記載の方法。

205. 哺乳動物は、ヒトである、第135項から第204項のいずれか1項に記載の方法。

= = 関連出願のクロスリファレンス = =

本出願は、米国特許法第119条(e)に基づいて、2011年9月12日にファイルされた米国仮特許出願第61/533,512号の優先権の利益を主張するものであり、その内容全体を本明細書に援用する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

10

【図1】E7抗原を用いて同様に調製された従来のアジュバントとの比較で、HPV-16 E7ペプチド抗原に結合したさまざまなカチオン性脂質アジュバントの抗腫瘍免疫応答を示す。

【図2】抗原領域からアミノ酸43から48が欠けたR-DOTAP/pE7_{49~57}複合体との比較で、R-DOTAP/pE7_{43~57}複合体のさまざまリポソーム封入された製剤を用いた、腫瘍の退縮効果を示す。

【図3】中空R-DOTAPリポソームナノ粒子との比較で、修飾されたHVP-16 E7_{43~57}ミセルと、R-DOTAPまたはS-DOTAPリポソームのアジュバントナノ粒子との混合物を用いる場合の腫瘍の退縮効果を示す。

【図4】パルミトイール-KSSGQAEPDRAHYNIVTF [配列番号3]からなる円柱状のpE7_{43~57M}ミセルと、球状のカチオン性脂質R-DOTAPナノ粒子とを含有するワクチン製剤のネガティブ染色法での電子顕微鏡画像を示す。

20

【図5】調製された混合物に共存する、パルミトイール-KSSYMLDLQPETT [配列番号5]を含む球状ミセル構造の抗原集合体と、球状のR-DOTAPリポソームナノ粒子を含むアジュバントとの混合物を含有するワクチン製剤のネガティブ染色法での電子顕微鏡画像を示す。

【図6】pE7_{1~20M}またはパルミトイール-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT [配列番号6]と、球状のカチオン性脂質R-DOTAPナノ粒子とで構成される構造を含有するワクチン製剤のネガティブ染色法での電子顕微鏡画像を示す。

【図7】R-DOTAPアジュバントに封入された、さまざまなメラノーマ抗原を含有するワクチン製剤と、R-DOTAPリポソームアジュバントと同時投与されるメラノーマペプチドミセル製剤で、メラノーマペプチドg p 100に対する抗原特異的免疫応答を比較するELISPOT研究の結果を示す。

30

【図8】ミセルとして同一用量で調製され、さまざまなアジュバントと同時投与されるHPV-16ペプチドと、リポソームアジュバントに封入されたHPV-16ペプチドに対する抗原特異的免疫応答を比較するELISPOT研究の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

40

本発明のさまざまな実施形態を、本明細書にて以下のとおり説明する。本明細書に記載の一実施形態では、ワクチン製剤が提供される。このワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。

【0012】

もうひとつの実施形態では、哺乳動物における免疫応答を誘導する方法が提供される。この方法は、有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含み、当該ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。

【0013】

さらに別の実施形態では、哺乳動物における疾患を治療する方法が提供される。この方法は、有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含み、当該ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。

【0014】

50

いくつかの実施形態では、ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。本明細書で使用する場合、「アジュバント」という用語は、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を高める、増すおよび／または増強する物質をいう。本明細書で使用する場合、「抗原集合体」という用語は、1種または2種以上の抗原を含有する組成物をいう。

【0015】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、ワクチン製剤は、粒子状のワクチン製剤である。いくつかの実施形態では、アジュバントと抗原集合体は、混合物である。

【0016】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、アジュバントは、免疫調節剤である。本明細書で使用する場合、「免疫調節剤」という用語は、哺乳動物における免疫応答を高める、指向するおよび／または促進する免疫修飾因子をいう。10

【0017】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、アジュバントは、ナノ粒子である。本明細書で使用する場合、「ナノ粒子」という用語は、大きさがナノメートル規模で測定される粒子をいう。本明細書で使用する場合、「ナノ粒子」とは、大きさが約1,000ナノメートル未満の構造を有する粒子をいう。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、リポソームである。

【0018】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、アジュバントは、カチオン性脂質である。本明細書で使用する場合、「カチオン性脂質」という用語は、生理学的pHで正味の正電荷を持つか、あるいは、プロトン化可能な基を有し、かつpKa未満のpHで正に荷電する多数の脂質種のうちの任意のものをいう。20

【0019】

本開示による好適なカチオン性脂質としては、3-[⁴N-(¹N,⁸N-ジグアニジノスペルミジン)-カルバモイル]コレステロール(BGSC)；3-[N,N-ジグアニジノエチル-アミノエタン]-カルバモイル]コレステロール(BGTC)；N,N¹,N²,N³テトラ-メチルテトラパルミチルスペルミン(セルフェクチン)；N-t-ブチル-N'-テトラデシル-3-テトラデシル-アミノプロピオン-アミジン(CLONfection)；ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド(DDAB)；1,2-ジミリストリオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(DMRE)；2,3-ジオレオイルオキシ-N-[2(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート(DOSPA)；1,3-ジオレオイルオキシ-2-(6-カルボキシスペルミル)-プロピルアミド(DOSPER)；4-(2,3-ビス-パルミトイロオキシ-プロピル)-1-メチル-1H-イミダゾール(DPIM)N,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ジオレオイルオキシ-1,4-ブタン-ジアンモニウムヨージド(Tfx-50)；N-1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)または他のN-(N,N-1-ジアルコキシ)-アルキル-N,N,N-三置換アンモニウムサーファクタント；トリメチルアンモニウム基がブタノールスペーサーアームを介して二重鎖(DOTBの場合)またはコレステリル基(ChOTBの場合)に結合している1,2ジオレオイル-3-(4'-トリメチルアンモニオ)ブタノール-sn-グリセロール(DOBT)またはコレステリル(4'トリメチルアンモニア)ブタノエート(ChOTB)；DORI(DL-1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアミノプロピル--ヒドロキシエチルアンモニウム)またはDORIE(DL-1,2-O-ジオレオイル-3-ジメチルアミノプロピル--ヒドロキシエチルアンモニウム)(DORIE)あるいはその類似体(WO 93/03709に開示されているものなど)；1,2-ジオレオイル-3-スクシニル-sn-グリセロールコリンエステル(DOSC)；コレステリルヘミスクシネートエステル(ChOSC)；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)およびジパルミトイロホスファチジルエタノールアミルスペルミン(DPPES)、コレステリ30
40
50

ル - 3 - カルボキシル - アミド - エチレントリメチルアンモニウムヨージド、1 - ジメチルアミノ - 3 - トリメチルアンモニオ - D L - 2 - プロピル - コlesterylカルボキシレートヨージド、コレステリル - 3 - O - カルボキシアミドエチレンアミン、コレステリル - 3 - - オキシスクシンアミド - エチレントリメチルアンモニウムヨージド、1 - ジメチルアミノ - 3 - トリメチルアンモニオ - D L - 2 - プロピル - コlesteryl - 3 - - オキシスクシネートヨージド、2 - (2 - トリメチルアンモニオ) - エチルメチルアミノエチル - コlesteryl - 3 - - オキシスクシネートヨージド、3 - - N - (N ' , N ' - ジメチルアミノエタン) カルバモイルコレステロール (D C - ch o l) 、3 - - N - (ポリエチレンイミン) - カルバモイルコレステロールなどのリポポリアミン ; O , O ' - ジミリスチル - N - リジルアスパルテート (D M K E) ; O , O ' - ジミリスチル - N - リジル - グルタメート (D M K D) ; 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (D M R I E) ; 1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D L E P C) ; 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D M E P C) ; 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D P E P C) ; 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D S E P C) ; 1 , 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D O T A P) ; ジオレオイルジメチルアミノプロパン (D O D A P) ; 1 , 2 - パルミトイール - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D S T A P) 、1 , 2 - ミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D M T A P) ; ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) があげられるが、これらに限定されるものではない。さらに、上述したカチオン性脂質のいずれかの構造的な変異体および誘導体も、企図される。
10
20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、D O T A P 、 D O T M A 、 D O E P C 、これらの組み合わせからなる群から選択される。他の実施形態では、カチオン性脂質は、D O T A P である。さらに他の実施形態では、カチオン性脂質は、D O T M A である。他の実施形態では、カチオン性脂質は、D O E P C である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、精製されている。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、カチオン性脂質のエナンチオマーである。「エナンチオマー」という用語は、たとえばRエナンチオマーとSエナンチオマーなど、対になる立体異性体の重ねることのできない鏡像であるカチオン性脂質の立体異性体をいう。さまざまな例では、エナンチオマーは、R - D O T A P またはS - D O T A P である。一例では、エナンチオマーは、R - D O T A P である。もうひとつの例では、エナンチオマーは、S - D O T A P である。いくつかの実施形態では、エナンチオマーは、精製されている。
30

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載のさまざまな実施形態では、抗原集合体は、自己集合構造である。本明細書に記載のさまざまな実施形態では、抗原集合体は、ミセル構造である。本明細書で使用する場合、「ミセル」という用語は、コロイド系におけるものなどの分子の凝集体をいう。他の実施形態では、抗原集合体は、脂質二重層構造である。いくつかの実施形態では、抗原集合体は、管状構造である。さらに他の実施形態では、抗原集合体は、球状構造である。
40

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載のさまざまな実施形態では、抗原集合体は、1種または2種以上の抗原を含む。本明細書で使用する場合、「抗原」という用語は、免疫系を有する哺乳動物に(直接的に、あるいは、たとえばD N Aワクチン中に含める形で発現時に)導入されると、この哺乳動物の免疫系によって認識され、免疫応答を誘発できる任意の作用剤(たとえば、タンパク質、ペプチド、多糖、糖タンパク質、糖脂質、核酸またはこれらの組み合わせ)
50

)をいう。本明細書で定義するように、抗原誘導免疫応答は、体液性であっても細胞媒介性であってもよく、その両方であってもよい。作用剤は、免疫グロブリン(抗体)またはT細胞抗原レセプター(TCR)など、免疫系の抗原認識分子と特異的に相互作用できる場合に、「抗原性」であるとされる。

【0024】

いくつかの実施形態では、1種または2種以上の抗原は、タンパク質ベースの抗原である。他の実施形態では、1種または2種以上の抗原は、ペプチドベースの抗原である。さまざまな実施形態では、1種または2種以上の抗原は、癌抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、病原性抗原からなる群から選択される。「微生物抗原」とは、本明細書で使用する場合、微生物の抗原であり、感染性ウイルス、感染性細菌、感染性寄生虫、感染性真菌を含むがこれらに限定されるものではない。微生物抗原は、インタクトな微生物ならびに、その天然単離体、フラグメントまたは誘導体、さらには、天然に生じる微生物抗原と同一または類似の合成化合物であってもよく、好ましくは、(天然に生じる微生物抗原の起源である)対応の微生物に対する免疫応答を誘導する。一実施形態では、抗原は、ウイルス抗原である。もうひとつの実施形態では、抗原は、細菌抗原である。さまざまな実施形態では、抗原は、病原性抗原である。いくつかの実施形態では、病原性抗原は、合成抗原または組換え抗原である。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、抗原は、癌抗原である。「癌抗原」とは、本明細書で使用する場合、腫瘍または癌細胞に関連し、MHC分子の文脈で、抗原提示細胞の表面において発現すると免疫応答(体液性および/または細胞性)を誘発できる分子または化合物(たとえば、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、リボタンパク質、リボペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、脂質、糖脂質、炭水化物、RNAおよび/またはDNA)である。たとえば、癌抗原は、腫瘍関連抗原であってもよい。腫瘍関連抗原は、自己抗原のみならず、癌とは特異的に関連しないこともあるが、それにもかかわらず、哺乳動物に投与されると腫瘍または癌細胞に対する免疫応答を高めるおよび/または腫瘍または癌細胞の増殖を低減する他の抗原を含む。一実施形態では、少なくとも1種の抗原は、HPVタンパク質またはペプチドである。

20

【0026】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の抗原は、メラノーマ抗原である。一実施形態では、メラノーマ抗原は、g p 1 0 0 (KVPRNQDWL [配列番号8])、TRP2 (SYVDFFVWL [配列番号9])、p 5 3 (KYICNSSCM [配列番号10])、これらの組み合わせを含む群から選択される。

30

【0027】

さまざまな実施形態では、少なくとも1種の抗原は、リボタンパク質、リボペプチド、疎水性が高められたまたは疎水性が低減されたアミノ酸配列で修飾されたタンパク質またはペプチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1種または2種以上の抗原は、当該抗原の疎水性を高めるよう修飾された抗原である。一実施形態では、少なくとも1種の抗原は、修飾されたタンパク質またはペプチドである。いくつかの実施形態では、修飾されたタンパク質またはペプチドは、疎水性基に結合される。他の実施形態では、疎水性基に結合される、修飾されたタンパク質またはペプチドは、抗原と疎水性基との間のリンカー配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、疎水性基は、パルミトイル基である。さらに他の実施形態では、少なくとも1種の抗原は、未修飾のタンパク質またはペプチドである。

40

【0028】

本開示のいくつかの実施形態では、少なくとも1種の抗原は、RAHYNIVTF (配列番号1)、GQAEPDRAHYNIVTF (配列番号2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (配列番号3)、YMLDLQPETT (配列番号4)、KSSYMLDLQPETT (配列番号5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (配列番号6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (配列番号7)、KVPRNQDWL (配列番号8)、SYVDFFVWL (配列番号9)、KYICNSSCM (配列番号10)、KSSKVPRNQDWL (配列番号11)からなる群から

50

選択される。一実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、RAHYNIVTF（配列番号 1）である。もうひとつの実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、GQAEPDRAHYNIVTF（配列番号 2）である。さらに別の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KSSGQAEPDRAHYNIVTF（配列番号 3）である。いくつかの実施形態では、KSSGQAEPDRAHYNIVTF（配列番号 3）は、疎水性基をさらに含むよう修飾される。一実施形態では、疎水性基は、パルミトイール基である。

【 0 0 2 9 】

他の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、YMLDLQPETT（配列番号 4）である。もうひとつの実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KSSYMLDLQPETT（配列番号 5）である。さらに別の実施形態では、KSSYMLDLQPETT（配列番号 5）は、疎水性基をさらに含むよう修飾される。一実施形態では、疎水性基は、パルミトイール基である。10

【 0 0 3 0 】

他の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT（配列番号 6）である。もうひとつの実施形態では、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT（配列番号 6）は、疎水性基をさらに含むよう修飾される。一実施形態では、疎水性基は、パルミトイール基である。

【 0 0 3 1 】

他の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP（配列番号 7）である。いくつかの実施形態では、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP（配列番号 7）は、疎水性基をさらに含むよう修飾される。一実施形態では、疎水性基は、パルミトイール基である。20

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KVPRNQDWL（配列番号 8）である。他の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、SYVDFFVWL（配列番号 9）である。さらに他の実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KYICNSSCM（配列番号 10）である。もうひとつの実施形態では、少なくとも 1 種の抗原は、KSSKVPRNQDWL（配列番号 11）である。いくつかの実施形態では、KSSKVPRNQDWL（配列番号 11）は、疎水性基をさらに含むよう修飾される。一実施形態では、疎水性基は、パルミトイール基である。

【 0 0 3 3 】

本明細書に記載のさまざまな実施形態では、ワクチン製剤は、マイトジエン活性化タンパク質（M A P）キナーゼシグナル伝達経路を活性化することで、哺乳動物で免疫応答を誘導する。カチオン性脂質などのアジュバントによる免疫応答の誘導については、たとえば、P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 7 6 7 8 (W O / 2 0 0 8 / 1 1 6 0 7 8 ; 「 Stimulation of an Immune Response by Cationic Lipids 」) 、P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 0 5 0 0 (W O / 2 0 0 9 / 1 2 9 2 2 7 ; 「 Stimulation of an Immune Response by Enantiomers of Cationic Lipids 」) に記載されており、両者の開示内容全体を本明細書に援用する。いくつかの実施形態では、M A P キナーゼシグナル伝達経路は、細胞外シグナル制御キナーゼ（「 E R K 」）- 1 、E R K - 2 、p 3 8 のうちの少なくとも 1 つを刺激することで、活性化される。他の実施形態では、この製剤は、機能的な抗原特異的 C D 8 + T リンパ球応答を高める。「 哺乳動物 」という用語は、当業者間で良く知られている。一実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。40

【 0 0 3 4 】

本明細書に記載の一実施形態では、哺乳動物における免疫応答を誘導する方法が提供される。この方法は、有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含み、当該ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。ワクチン製剤についての上述した実施形態を、本明細書に記載の哺乳動物における免疫応答を誘導する方法に、適用可能である。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、免疫応答は、哺乳動物の免疫系の細胞の M A P キナーゼシグナル伝達経路を介して活性化される。さまざまな実施形態では、M A P キナーゼシグナル伝達経路は、E R K - 1 、E R K - 2 、p 3 8 のうちの少なくとも 1 つを刺激することで50

、活性化される。

【0036】

他の実施形態では、免疫応答は、哺乳動物における細胞障害性Tリンパ球を活性化する。一実施形態では、細胞障害性Tリンパ球は、CD8+T細胞である。もうひとつの実施形態では、投与は、機能的な抗原特異的CD8+Tリンパ球応答を高める。さらに別の実施形態では、免疫応答は、哺乳動物における抗体応答を活性化する。他の実施形態では、免疫応答は、哺乳動物におけるインターフェロン-（IFN-）を活性化する。

【0037】

本明細書に記載の一実施形態では、哺乳動物における疾患を治療する方法が提供される。この方法は、有効量のワクチン製剤を哺乳動物に投与するステップを含み、当該ワクチン製剤は、アジュバントと、抗原集合体とを含む。ワクチン製剤および哺乳動物における免疫応答を誘導する方法についての上述した実施形態を、本明細書に記載の哺乳動物における疾患を治療する方法に、適用可能である。10

【0038】

いくつかの実施形態では、感染性の病原体との兼ね合いで本明細書にて使用する場合、「治療」、「治療する」、「治療して」とは、病原体による感染に対する被検体の耐性を高めるあるいは、被検体が病原体に感染してしまう尤度を下げる予防的な治療および／または感染と闘う（たとえば、感染を低減または排除する、あるいは、感染が悪化するのを防ぐ）ために、被検体が感染した後の治療をいう。一実施形態では、この方法は、予防的な治療である。20

【実施例】

【0039】

実施例1

アジュバントおよび抗原含有アジュバントの調製

アジュバントは、カチオン性脂質だけを用いて調製できる。あるいは、アジュバントを、カチオン性脂質と他の免疫調節剤との混合物を用いて調製してもよい。ワクチン製剤は、抗原含有カチオン性脂質ベースの製剤を用いて調製できる。本実施例では、例示的なカチオン性脂質としてDOTAPを使用し、例示的な抗原としては、HPVタンパク質E7ペプチド抗原を使用した。

【0040】

カチオン性脂質をリポソームに調製するすべての手順で、注射用滅菌水(WFI)または緩衝液を使用した。この実施例では、脂質膜を用いてリポソームを調製した。リポソームに取り込むのに用いたE7抗原は、HPV 16 E7タンパク質由来のH-2D^b拘束性CTLエピトープ(アミノ酸49~57、RAHYNIVTF[配列番号1])であった。脂質膜は、(1)クロロホルムなどの有機溶媒に脂質を溶解し、(2)乾燥窒素ガスの安定した流れのもとでクロロホルム溶液を蒸発させることによって、ガラスバイアルにて作製した。膜を一晩、真空下に維持することで、微量の有機溶媒を除去した。その後、最終濃度4~10mg/mLまで必要な量のWFIまたは緩衝液を加えて、脂質膜を水和させた。この懸濁液を200nmの大きさに押し出し、4℃で保管した。30

【0041】

抗原含有カチオン性脂質の調製用に、E7ペプチドの水溶液で、DOTAP脂質膜を再水和させた。当業者間で周知の一般的なリポソーム調製で用いられる他の方法を用いてもよい。

【0042】

実施例2

抗原ペプチド粒子構造の調製

ペプチド配列は、本発明と併用する抗原として調製できる。本実施例では、HPVタンパク質E7ペプチド抗原を、例示的な抗原として使用した。ペプチド配列は、親水性が好適になるよう選択されてもよく、疎水性の分子または配列をN末端のアミノ酸残基に結合して修飾されてもよい。たとえば、パルミチン酸部分などの疎水性鎖が、ペプチドのN末

10

20

30

40

50

端のアミノ酸残基に共有結合してもよい。得られる抗原ペプチド粒子構造は、たとえば、ミセルであっても二重層であってもよい。

【0043】

この実施例では、ペプチド配列を選択し、20から50 μg / μl の範囲の濃度で好適な溶媒に懸濁させた。具体的なワクチンの所望の特性にもとづいて、他の濃度が適することもある。

【0044】

この実施例では、脂質付加ペプチドの原液を、選択された水性媒質中で希釈して、ミセルまたは二重層を作製した。これらの希釈液は一般に、該当ペプチドを0.5~2 mg / ml 含有するが、具体的なワクチンの所望の特性に必要な抗原量に応じて、変わることもある。10

【0045】

その後、このペプチド粒子構造を1:1(v/v)で、カチオン性脂質を含む中空リポソームのナノ粒子と混合した。

【0046】

実施例3

従来のアジュバントに比した、カチオン性脂質アジュバントの抗腫瘍効果

アジュバントとして用いられるカチオン性脂質の抗腫瘍効果を、抗原特異的CTL活性を誘導することが知られている従来の良く知られたアジュバントと比較できる。この実施例では、さまざまな脂質アジュバントを、HPVタンパク質E7ペプチド抗原RAHYNIVTF(配列番号1)と共にリポソームとして調製した(a.k.a「E7」)。さまざまなカチオン性脂質に、DOTAP、DOTMA、DOEPCを含むようにした。アニオン脂質には、DOPGを含むようにした。また、この実施例では、従来の良く知られたアジュバントであるCpGおよび完全フロイントアジュバント('CFA')もE7と共に調製した。20

【0047】

カチオン性脂質/E7製剤が腫瘍に対する免疫応答を誘導する効力を他のアジュバントと比較するために、腫瘍の樹立後に、1製剤あたり6から12匹の腫瘍保持マウスを、E7ペプチド配合リポソームで6日間処理した。このカチオン性脂質アジュバント製剤は、カチオン性脂質(DOTAP、DOEPC、DOTMA)を、カチオン性脂質の100nmol用量の組成で含んでいた。アニオン脂質アジュバント製剤は、DOPGを含んでいた。従来の良く知られたアジュバント製剤は、十分に樹立された強力なアジュバントCFAまたはCpG ODN1826を含んでいた。対照群には、処置なしと、E7抗原のみ(すなわち、アジュバントなし)を含めた。30

【0048】

0日目に 10^5 個のTC-1細胞を各マウスの側腹部に注射することによって、マウスで、皮下にHPV陽性腫瘍を樹立した。6日目に、マウスに製剤を0.10mlの注射で1回皮下注射した。

【0049】

図1に示すように、CFAまたはCpG製剤およびさまざまなカチオン性脂質製剤を注射されたマウスは、26日目に、いずれも対照群と比較して腫瘍の成長の効果的な阻害が認められた。アニオン脂質製剤を注射されたマウスは、腫瘍の退縮を示さなかった。カチオン性脂質ベースの製剤であるDOTAP/E7、DOTMA/E7およびDOEPC/E7製剤を注射されたマウスは、確立されたアジュバントベースの製剤であるCpG/E7またはCFA/E7で調製したものよりも良い抗癌活性($p < 0.01$)を呈した。40

【0050】

実施例4

カチオン性脂質ナノ粒子および抗原集合体を含むワクチン製剤の抗腫瘍効果

腫瘍の退縮を評価することで、ワクチン製剤の抗腫瘍効果を評価することが可能である。この実施例では、ワクチン製剤は、カチオン性脂質ナノ粒子と、管状構造のペプチド抗原集合体とを含む。さらに、本実施例における例示的なカチオン性脂質は、R-DOTA50

Pであり、例示的な抗原集合体は、H P V - 1 6 E 7 ミセルである。

【0051】

この実施例では、H P V 1 6 E 7 タンパク質由来のH - 2 D^b拘束性C T Lエピトープ（アミノ酸49～57、RAHYNIVTF[配列番号1]）を、アミノ酸43～57まで伸長させ、GQAEPDRAHYNIVTF[配列番号2]とした。次に、配列番号2をさらにアミノ酸K S Sで伸長させ、長くなったペプチドに、疎水性のパルミトイール鎖を結合した。結果として、ミセルまたは二重層の形成が効果的に促進された（すなわち、パルミトイール-KSSGQAEPDRAHYNIVTF[配列番号3]）。配列番号2は、調製して評価すると、配列番号1と同様に、弱い抗原であることが観察された。

【0052】

約0.2～0.4mg/ml(0.1～0.2mM)のペプチド抗原を、R-DOTAPを含む2mg/ml(2.9mM)のリポソームナノ粒子に封入したところ、弱い免疫応答が生じ、効果的な腫瘍の退縮が欠如した（図2参照）。しかしながら、ペプチド抗原配列を配列番号3のみからなる粒子構造に調製すると、カチオン性脂質アジュバント送達系で送達するよりも高用量の抗原を送達できる。よって、ペプチドの弱い抗原性を克服する効果的な手段が得られる。

【0053】

この手法を評価するために、上記の実施例で説明したようにして、H P V陽性腫瘍を樹立した。6日目に、マウス（1群あたり5匹）に、さまざまなワクチン製剤を1回皮下注射した。

【0054】

- 製剤1（負の対照）：R-DOTAPを含む中空リポソームナノ粒子。

【0055】

- 製剤2：R-DOTAPリポソームナノ粒子2.3mg/mlと、ミセルとしての配列番号3のペプチド抗原集合体1.1mg/mlとの混合物（0.10mlを注射）。

【0056】

- 製剤3：S-DOTAPリポソームナノ粒子2.3mg/mlと、ミセルとしての配列番号3のペプチド抗原集合体1.1mg/mlとの混合物（0.10mlを注射）。

【0057】

図3は、製剤2を注射したマウスにおける効果的な腫瘍の退縮を示す。ネガティブ染色法での走査型電子顕微鏡観察によって、調製されたワクチン混合物に共存する球状R-DOTAPリポソームナノ粒子でのアジュバントと管状ミセル構造の抗原集合体との混合物の存在が示される（図4）。本実施例は、アジュバント（たとえば、R-DOTAPリポソームナノ粒子）と抗原集合体（たとえば、ミセル粒子としてのH P V E 7ペプチド抗原）を含むワクチン製剤が、動物において腫瘍の退縮を効果的に促進できることを示している。

【0058】

実施例5

カチオン性脂質ナノ粒子と、単一のペプチド抗原を含有する抗原集合体とを含むワクチン製剤を用いる場合のヒト化H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける免疫応答

インターフェロン-（IFN-）の誘導は、活性化された抗原特異的細胞障害性Tリンパ球（CD8+T細胞）に起因することが知られており、動物における効果的な治療免疫応答の発生に重要である。カチオン性脂質ナノ粒子と抗原集合体とを含むワクチン製剤を用いる場合のヒト化H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける免疫応答は、酵素結合免疫吸着スポット（ELISPOT）アッセイでIFN-の誘導を測定することによって評価可能である。この実施例では、ワクチン製剤は、カチオン性脂質ナノ粒子（たとえば、R-DOTAP）と、さまざまな組成および構造のペプチド抗原集合体とを含む。

【0059】

本実施例では、2種類の異なるワクチン製剤を評価した。製剤1は、カチオン性脂質R

10

20

30

40

50

- D O T A P アジュバントナノ粒子を含み、十分に樹立された H P V - 1 6 E 7 H L A - A 2 抗原性ヒトペプチド抗原YMLDLQPETT [配列番号 4] を利用していた。3つのアミノ酸とパルミチン酸を結合することで配列番号 4 を修飾し、パルミトイール - KSSYMLDLQPETT [配列番号 5] の配列を得た。本明細書に記載の方法に従って、粒子状のペプチド構造を自然に形成した。製剤 1 は、約 2 . 8 m g / m l の R - D O T A P アジュバントナノ粒子のアジュバントと、約 0 . 8 3 m g / m l の配列番号 5 のペプチドの抗原集合体とを含有していた。

【 0 0 6 0 】

0 日目と 7 日目に、マウスに 0 . 1 m l の製剤 1 を注射した。これらのマウスを屠殺し、14日目に、評価用にそれぞれのマウスから脾細胞を取り出した。免疫したマウスから脾細胞を回収し、96ウェルプレートのウェルに播種した（1ウェルあたり脾細胞約 250,000 個）。その後、個々のウェルをペプチド抗原YMLDLQPETT [配列番号 4] に曝露し、免疫応答を分析した。アッセイで生じた各スポットは単一の反応性脾細胞を示し、分析結果を読み取ることで、96ウェルのプレートで形成されるスポットの数が得られる。このように、E L I S P O T アッセイは、抗原YMLDLQPETTに対して結果として生じる免疫応答を効果的に判断するための定量的アッセイとなった。製剤 1 の高い効力を表す E L I S P O T アッセイの結果を、表 1 にあげておく。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

表 1 : E L I S P O T で測定した免疫応答

| 製剤番号 | ペプチド抗原配列／組成物 | 得られる 抗原粒子 構造 | 脾細胞 25 0, 000 個 あたりの I F N-γ スポット の平均数 |
|---------|---|--------------------|--|
| N o . 1 | —パルミトイール—KSSYMLDLQPETT | 球状 | 2 6 2 . 2 |
| N o . 2 | — パ ル ミ トイ ル — KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT | 管状 | 1 2 2 . 4 |

10

20

30

【 0 0 6 2 】

製剤 2 は、カチオン性脂質 R - D O T A P アジュバントナノ粒子を含み、H P V - 1 6 E 7 タンパク質の N 末端から最初の 20 のアミノ酸を選択したペプチドを利用していた。このペプチドを修飾して、パルミトイール - KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT [配列番号 6] とした。本明細書に記載の方法に従って、粒子状のペプチド構造を自然に形成した。製剤 2 は、約 2 . 8 m g / m l の R - D O T A P アジュバントナノ粒子のアジュバントと、約 0 . 9 5 m g / m l の配列番号 6 のペプチドの抗原集合体とを含有していた。

【 0 0 6 3 】

0 日目と 7 日目に、マウスに 0 . 1 m l の製剤 2 を注射した。これらのマウスを屠殺し、14日目に、評価用にそれぞれのマウスから脾細胞を取り出した。ここでも、表 1 に示すように、製剤 2 での免疫化に応答して、強い免疫応答が認められた。

【 0 0 6 4 】

ネガティブ染色法での走査型電子顕微鏡観察によって、調製された混合物に共存する、パルミトイール - KSSYMLDLQPETT を含む球状ミセル構造の抗原集合体と、球状の R - D O T A P リポソームナノ粒子を含むアジュバントとの混合物（すなわち、製剤 1 ）の存在が示された（図 5 参照）。

【 0 0 6 5 】

図 6 は、調製された混合物に共存する、パルミトイール - KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT を含む管状ミセル構造の抗原集合体と、球状の R - D O T A P リポソームナノ粒子を含むアジ

40

50

ュバント(すなわち、製剤2)を示す。

【0066】

実施例6

カチオン性脂質ナノ粒子と、複数のペプチド抗原を含有する抗原集合体とを含むワクチン
製剤を用いる場合のヒト化H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける免疫応答

実施例5と同様に、カチオン性脂質ナノ粒子と抗原集合体とを含むワクチン製剤の効力を評価するのに、ELISPOTを利用できる。この実施例では、ワクチン製剤は、カチオン性脂質ナノ粒子(たとえば、R-DOTAP)と、3種類のペプチド抗原を含むペプチド抗原集合体と、を含む。

【0067】

10

本実施例の製剤は、カチオン性脂質R-DOTAPアジュバントナノ粒子と、3種類のペプチド抗原を含む混合ミセル構造の抗原集合体とを含んでいた。ペプチド配列YMLDLQPE TTに対する免疫応答を評価した。この混合ペプチド粒子は、配列番号5、配列番号6、パルミトイール-KSSLLMGTLGIVCPICSQKP[配列番号7]で構成されていた。この製剤は、約2.8mg/mlのR-DOTAPアジュバントナノ粒子のアジュバントと、約1mg/mlの各ペプチドの抗原集合体とを含有していた。

【0068】

0日目と7日目に、マウスに0.1mlの製剤を注射した。これらのマウスを屠殺し、14日目に、評価用にそれぞれのマウスから脾細胞を取り出した。表2に示すように、この製剤での免疫化に応答して、強力な免疫応答が認められた。

20

【0069】

【表2】

表2：ELISPOTで測定した免疫応答

| ペプチド抗原配列／組成物 | 得られる 抗原粒子 構造 | 脾細胞25 0,000個 あたりのIF N-γスポット の平均数 |
|--|--------------------|--|
| -パルミトイール-KSSGQAEPDRAHYNIVTF、 -パルミトイール-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT、 -パルミトイール-KSSLLMGTLGIVCPICSQKP | 管状 | 447.1 |
| | | |

30

【0070】

実施例7

カチオン性脂質ナノ粒子と、ミセルメラノーマ抗原を含有する抗原集合体とを含むワクチン
製剤を用いる場合の免疫応答

カチオン性脂質ナノ粒子と、抗原集合体とを含むワクチン製剤を用いる場合のC57BL/6マウスにおける免疫応答を、ELISPOTによって評価することが可能である。この実施例では、ワクチン製剤は、カチオン性脂質ナノ粒子(たとえば、R-DOTAP)と、ミセル構造のメラノーマ抗原のペプチド抗原集合体とを含む。

40

【0071】

この実施例では、製剤Aは、カチオン性脂質R-DOTAPアジュバントナノ粒子と、3種類のメラノーマ抗原すなわち、gp100(KVPRNQDWL[配列番号8])、TRP2(SYVDFFVWL[配列番号9])、p53(KYICNSSCM[配列番号10])を封入した抗原集合体とを含んでいた。製剤Aは、約4.3mMのR-DOTAPアジュバントナノ粒子のアジュバントと、約0.25mMのgp100ペプチドとを含有していた。

【0072】

大量のgp100抗原を送達するために、ミセル製剤を開発した。修飾された抗原パル

50

ミトイル - KSS KVPRNQDWL [配列番号 11] を使用して、ミセル製剤を開発した。製剤 B は、約 4 . 4 mM のリポソーム R - DOTAP 封入 TRP 2 と、約 0 . 46 mM の gp 100 のミセル製剤とを含んでいた。修飾された抗原から作製するミセルは、実施例 2 に記載したようにして調製した。ELISPOT によって、実施例 5 で説明したようにして、C57/B6 マウスにおけるワクチンの有効性を評価した。

【0073】

図 7 は、リポソームに封入された gp 100 抗原との比較で、ミセル製剤での gp 100 抗原を含む製剤に対する免疫応答の 20 倍を超える増加を示す。免疫応答は、ミセル製剤によって送達される gp 100 抗原の量がほぼ倍になるがゆえに高まると思われる。

【0074】

実施例 8

ミセル抗原集合体およびリポソーム封入抗原集合体を用いる場合のワクチン製剤における免疫応答の比較

異なるカチオン性脂質ナノ粒子と、異なる抗原集合体とを含むワクチン製剤を用いる場合の免疫応答を、ELISPOT によって評価することが可能である。この実施例では、さまざまなカチオン性脂質ナノ粒子（たとえば、DOEPC または DOTMA）またはエマルションアジュバント Montanide を用いて、ワクチン製剤を調製可能である。さらに、ミセル構造またはリポソーム封入構造のいずれかの抗原集合体を用いて、ワクチン製剤を調製可能である。

【0075】

本実施例では、さまざまに異なるワクチン製剤を評価した。一製剤では、抗原集合体は、ペプチド抗原 [配列番号 2] (0 . 11 mM) とカチオン性脂質アジュバント DOEPC (1 mM) とを含んでいた。第 2 の製剤では、抗原集合体は、ミセルの形成を可能にするよう修飾されたペプチド抗原 [配列番号 3] (0 . 11 mM) と、カチオン性脂質アジュバント DOEPC (1 mM) とを含んでいた。第 3 の製剤では、抗原集合体は、ペプチド抗原 [配列番号 2] (0 . 11 mM) と、カチオン性脂質アジュバント DOTMA (1 mM) とを含んでいた。第 4 の製剤では、抗原集合体は、修飾されたペプチド抗原 [配列番号 3] (0 . 11 mM) と、カチオン性脂質アジュバント DOTMA (1 mM) とを含んでいた。第 5 の製剤では、抗原集合体は、ペプチド抗原 [配列番号 2] (0 . 11 mM) と、エマルションアジュバント Montanide とを含んでいた。第 6 の製剤では、抗原集合体は、修飾されたペプチド抗原 [配列番号 3] (0 . 11 mM) と、エマルションアジュバント Montanide とを含んでいた。

【0076】

抗原集合体が未修飾のペプチド抗原 [配列番号 2] を含んでいた製剤では、抗原集合体をリポソーム封入されたものとして調製した。比較して、抗原集合体が修飾されたペプチド抗原 [配列番号 3] を含んでいた製剤では、対応するリポソーム製剤に対して、同一の抗原およびアジュバント含有量を維持するために、抗原集合体をミセルとして調製し、アジュバントと 1 : 1 の比で混合した。リポソーム封入された抗原集合体およびミセル抗原集合体については、それぞれ実施例 1 および実施例 2 のプロトコールに沿って作製した。ELISPOT によって抗原特異的免疫応答を求めて、さまざまなワクチン製剤の力価を評価した。

【0077】

図 8 は、本実施例の結果を示す。同一用量の抗原とアジュバントは、抗原集合体が特定のアジュバントと共にミセル形態で送達されると、非常に優れた抗原特異的免疫応答につながる。重要なのは、リポソーム封入形態で送達される抗原集合体を用いると、観察される免疫応答が非常に弱いということである。

【0078】

また、DOTMA、DOEPC、Montanide で見られるように、観察される免疫応答は、ミセル抗原と共に投与される具体的なアジュバントに左右される。DOTMA 製剤では、DOEPC 製剤よりも優れた免疫応答が認められ、どちらのカチオン性脂質製剤も、エ

10

20

30

40

50

マルショニンアジュバントMontanideより優れていた。

【 0 0 7 9 】

以上、本発明について図示し、上記の明細書にて詳細に説明してきたが、このような図示および説明は例示的なものであって、特徴を限定するものではないとみなされる。また、ここでは例示的な実施形態を説明したにすぎず、本発明の範囲内に包含される変更および改変がすべて保護されることが望ましい旨は、理解されたい。当業者であれば、本明細書に記載の特徴を1つまたは2つ以上を取り入れ、よって本開示の範囲に包含される自らの実現形態を、容易に考案できるであろう。

【 図 1 】

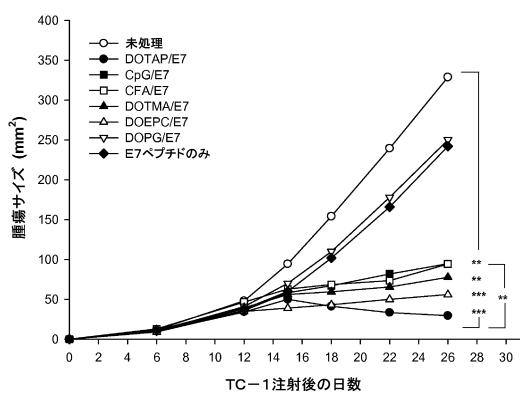


Figure 1

【 図 2 】

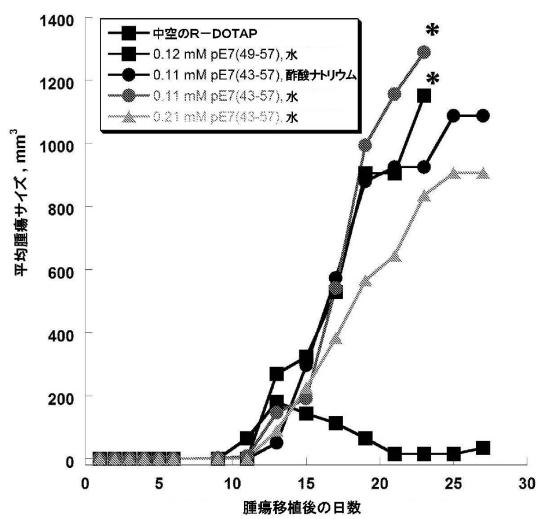


Figure 2

【図3】

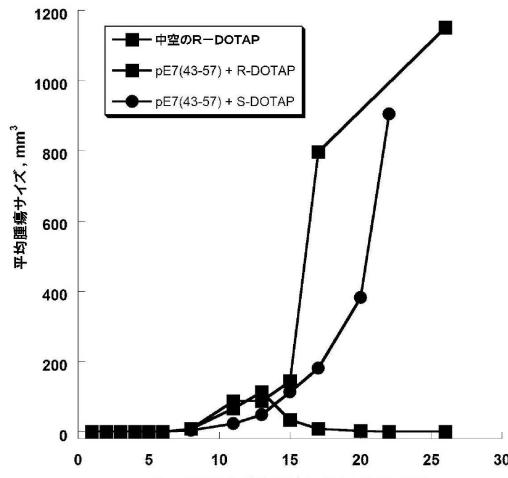


Figure 3

【図4】

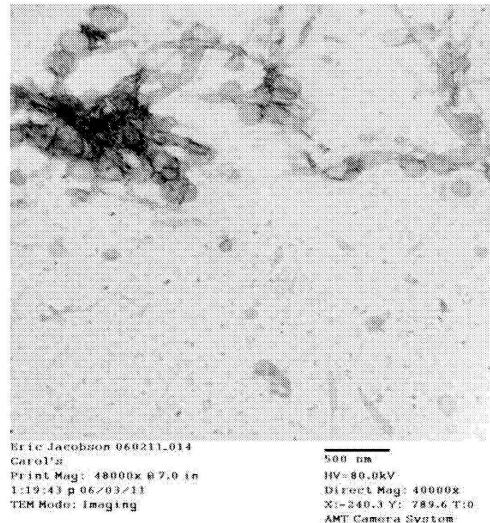


Figure 4

【図5】

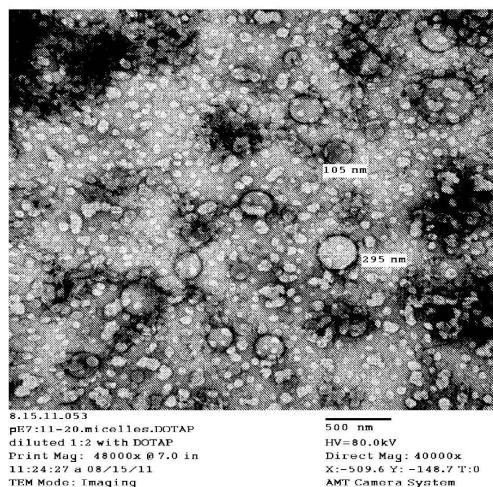


Figure 5

【図6】

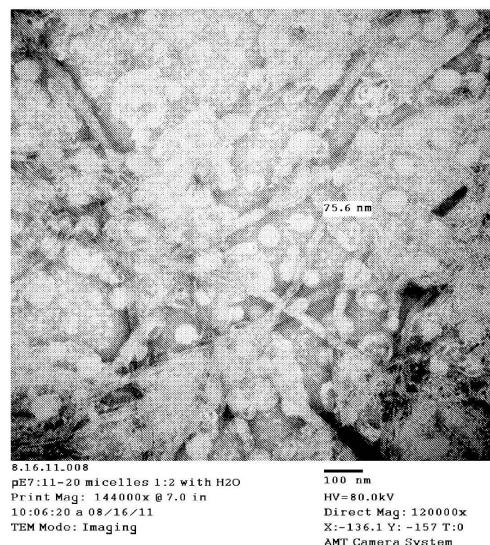


Figure 6

【図7】

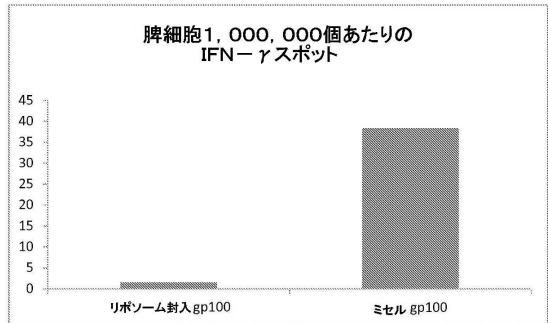


Figure 7

【図8】

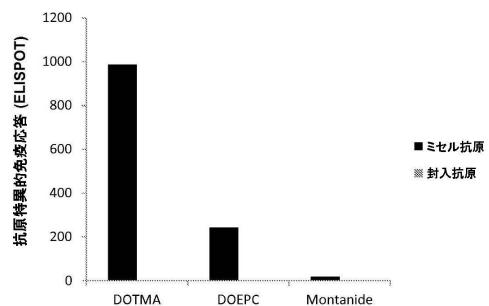


Figure 8

【配列表】

0006600459000001.app

 フロントページの続き

| | |
|------------------------|------------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| C 07K 7/08 (2006.01) | C 07K 7/06 Z N A |
| C 07K 14/005 (2006.01) | C 07K 7/08 |
| C 07K 14/195 (2006.01) | C 07K 14/005 |
| C 07K 14/47 (2006.01) | C 07K 14/195 |
| | C 07K 14/47 |

(72)発明者 コン , グレゴリー
 アメリカ合衆国 47025 インディアナ州 ローレンスバーグ ユーフェミア ストリート
 400 アパートメント 301

(72)発明者 ヤコブソン , エリック
 アメリカ合衆国 45236 オハイオ州 シンシナティ チャーター オーク ドライブ 57
 85

(72)発明者 マーサー , キャロル
 アメリカ合衆国 45040 オハイオ州 メーソン コンコード ヒルズ サークル 5104

(72)発明者 ジョンソン , ケンヤ
 アメリカ合衆国 45040 オハイオ州 メーソン ピンナス レーン 3411

合議体

審判長 關 政立

審判官 岡崎 美穂

審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 特表2010-522206 (JP, A)
 特表2011-518170 (JP, A)
 特開2007-238559 (JP, A)
 米国特許出願公開第2008/0248044 (US, A1)
 Cancer Immunol Immunother, 2011, Vol 60, p. 6
 29 - 638
 Journal of Immunotherapy, 1998, Vol. 21, No
 . 3, p. 159 - 169

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 39/00-39/44