

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4331798号

(P4331798)

(45) 発行日 平成21年9月16日(2009.9.16)

(24) 登録日 平成21年6月26日(2009.6.26)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 31/198	(2006.01)	A 6 1 K 31/198
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平10-542408	(73) 特許権者	599131930
(86) (22) 出願日	平成10年4月3日(1998.4.3)		アラージー・セラピューティックス・リミテッド
(65) 公表番号	特表2001-519797(P2001-519797A)		Allergy Therapeutics Limited
(43) 公表日	平成13年10月23日(2001.10.23)		イギリス、イーシー2エム・4ワイエイチ、ロンドン、カットラーズ・ガーデンズ、デボンシャイア・スクエア7番
(86) 国際出願番号	PCT/EP1998/002138	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W01998/044947		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成10年10月15日(1998.10.15)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成17年3月2日(2005.3.2)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	9706957.9		
(32) 優先日	平成9年4月5日(1997.4.5)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルゲン処方

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チロシン、修飾されていてもよいアレルゲンおよび 3 - d e - O - アシル化モノホスホリルリピド A を含んでなるアレルギー予防または治療用医薬組成物。

【請求項 2】

アレルゲンがチロシンで被覆および/またはチロシンに吸着されている請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

アレルギーの予防または治療において使用するための医薬の製造における、チロシン、修飾されていてもよいアレルゲンおよび 3 - d e - O - アシル化モノホスホリルリピド A の使用。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物の製法であって、(a) 架橋剤との反応によりアレルゲンを修飾してもよく；(b) 修飾されていてもよいアレルゲンの水溶液をチロシンの水性強酸溶液と混合し；(c) 混合溶液を中和し、それによりチロシンおよび修飾アレルゲンを共同沈降させ；(d) その生成物を 3 - d e - O - アシル化モノホスホリルリピド A と混合し；および(e) 生理学上許容される担体を加えてもよいことからなる方法。

【発明の詳細な説明】

本発明はアレルギー患者の脱感作治療において使用する新規処方に関する。

脱感作治療は、投与されるアレルゲンに特異的な免疫学的応答に変化をもたらすことが知

られている。かかる変化はアレルギーの症状を治療および改善する有益な効果に關与していると考えられる。

有益性に關与する免疫学的変化は完全には理解されていない。アレルギー特異的 I g G 抗体応答の亢進が望ましい治療結果であると考えられているが、現在ではアレルギー特異的 T 細胞 (T リンパ球) 応答におけるある種の変化がより重要であると考えられている。

T 細胞の 2 種のサブクラス、 T H 1 様および T H 2 様は種々のメッセンジャー分子を介して互いに相互作用する。アレルギー患者においては、アレルギー特異的 T H 1 活性よりも T H 2 活性の方が大きいと思われる。このことはアレルギー特異的 I g E 抗体を高レベルにまで引き上げ、好酸球活性をより大きくしうる。これらのことはアレルギー症候群の二つの重要な構成要素である。

10

上記した状況にてアレルギー特異的 T H 2 活性よりもむしろ T H 1 活性に変えることが、臨床的効果をもたらす免疫療法の重要な構成要素であると考えられる。

G B - A - 1 3 7 7 0 7 4 は、その中にアレルギーを分散させたチロシンの共同沈降物の製法を開示している。

G B - A - 1 4 9 2 9 7 3 は、その中に修飾したアレルギーを分散させたチロシンの共同沈降物の製法を記載している。そのアレルギーは、分子内架橋を誘起し、未修飾アレルギーと比べて生成物のアレルギー性を減少させる、グルタルアルデヒドなどの試薬と反応させることにより修飾されている。

3 D e - O - アシル化モノホスホリルリピド A (以下、 3 - D M P L または「 M P L 」と称する) は G B 2 2 2 0 2 1 1 (Ribi) より知られている。化学的には、この物質は、 3 D e - O - アシル化モノホスホリルリピド A と、 4、 5 または 6 アシル化鎖の混合物であり、 Ribi Immunochem Montana により製造されている。 3 D e - O - アシル化モノホスホリルリピド A の好ましい形態が P C T 出願番号第 9 2 / 1 1 6 5 5 6 号に開示されている。 3 - D M P L は投与されるアレルギーの T H 2 よりも T H 1 指向特性を亢進しうる物質の一つである。

20

本発明によれば、チロシン、修飾されていてもよいアレルギーおよび 3 - D M P L を含んでなる医薬組成物が提供される。典型的には、アレルギーを、例えば共同沈降または混合操作によりチロシンで被覆および / またはチロシンに吸着させる。

投与前に 3 - D M P L を組成物の別の成分と混合できる。別法として、生成物の製造中に別の成分と一緒に処方することもできる。また別法として、それを別の成分と異なる部位でまたは異なる時間に投与することができる。非経口および腸管内投与などの多くの経路により投与を行うことができる。

30

本発明のさらなる態様は、このように、アレルギーに罹患している患者の治療法であって、その患者に有効量のチロシン、修飾されていてもよいアレルギーおよび 3 - D M P L を投与してなる方法を提供する。

本発明のさらなる態様は、アレルギーの予防または治療にて用いるための医薬の製造における、チロシン、修飾されていてもよいアレルギーおよび 3 - D M P L の使用を提供する。

アレルギーは、花粉 (例えば、ブタクサまたはカバの花粉)、食物、昆虫の毒液、カビ、動物の毛皮、またはチリダニ類 (D. farinae または D. pteronyssinus) などのアレルギー誘起物質より誘導させることができる。本明細書にて用いる「アレルギー」は、単一の供給源または 1 以上の供給源より由来してもよいアレルギーの混合物を包含する。「アレルギー」なる語はまた、アレルギーの酵素分解または他の手段により、合成によってすべて調製されたアレルギーフラグメントなどの、アレルギーの 1 またはそれ以上のエピトープを含有するペプチドを包含する。

40

アレルギーはジアルデヒド、とりわけグルタルアルデヒドなどの架橋剤との反応により修飾されていてもよい。

本発明のさらなる態様は、本発明に係る医薬組成物の製法であって、 (a) 架橋剤との反応によりアレルギーを修飾する (してもよい) こと ; (b) 修飾されていてもよいアレルギーの水溶液を、チロシンの水性強酸中溶液と混合すること ; (c) 溶液の混合物を中和

50

し、それによりチロシンおよび修飾アレルゲンを共同沈降させること；(d)生成物を3-DMP Lと混合すること；および(e)所望により生理学上許容される担体を添加してもよいことからなる方法を提供する。

適当な生理学上許容される担体は、フェノール-セイラインおよび滅菌水を包含する。典型的には、アレルゲンを、水溶液中、pH 5から10、典型的には約7で、温度は0から100で、より一般的には4から37で、10時間まで、例えば室温で約2時間、グルタルアルデヒドなどのジアルデヒドと反応させることにより修飾する。アレルゲンのグルタルアルデヒドに対する比率は、典型的には、50：1から2：1の範囲、例えば約10：1である。

中間体を凍結乾燥させ、あるいは次の段階で使用することができる。

ついで、典型的にはpH 7 ± 1 の、架橋操作または固体の溶媒和のいずれかから反応混合物として得られた修飾アレルゲンの溶液を、チロシンの水性強酸中溶液と混合する。強酸は、通常、無機酸、好ましくは塩酸である。この工程で使用したアレルゲン溶液は、典型的には、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば約 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアレルゲンタンパク質を含有する。混合物中のアレルゲン：チロシンの比率は、典型的には $1 : 4 \times 10^5$ から $1 : 1 \times 10^2$ 重量/重量の範囲である。

得られたアレルゲンおよびチロシン溶液の混合物を中和する。中和とはpHを4.0から7.5の範囲内にその値に調整することを意味する。中和の間、溶液のpHが、決して、または少なくとも長時間、明らかに7.5を超えないことが重要である。この条件は、溶液を激しく攪拌し、所望により必要な量の塩基のみを使用することで合致させることができる。種々の緩衝剤をアレルゲンの溶液に添加し、混合および中和段階でpH調節を補助することができる。

中和を行うのに特に有用な方法は、チロシンの酸中溶液と中和塩基を別々の流れでアレルゲンの溶液と混ぜることである。添加する溶液の流速は、pHスタット、すなわち、反応混合物のpHが実質的に所定のレベルで一定であるように、溶液の一方または両方の流速を制御する装置で調節する。本発明者らは、正確なpHはアレルゲンの特性により変化するが、最適な結果は、通常、pHを6.5ないし7.5の範囲内に調整することで得られることを見出した。

中和した結果、アレルゲンの溶液が吸蔵および/または吸着されている範囲内および/または上で、チロシンが迅速に沈降する。沈降した後、混合物を直ちに洗浄するか、または洗浄までに2、3時間ないし1日もしくは2日放置する。

得られた沈降物を遠心分離または濾過により溶液から取りだし、例えばフェノール-セイラインで洗浄した後、フェノール-セイラインまたは滅菌水などの生理学上許容される担体に懸濁させ、3-DMP Lと組みあわせた脱感作治療における使用に適した注射用組成物を生成することができる。

以下の調製3に記載する方法により、または音波処理により溶解したMPLをアレルゲンまたは修飾アレルゲンのチロシン吸着物に加える前に種々の方法により希釈できる。MPLの調製物を、最初、典型的には $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ と $4 \text{mg}/\text{ml}$ の間、例えば $1 \text{mg}/\text{ml}$ の濃度で調製する。ついで、それを $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間、好ましくは約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈できる。この希釈物は、精製水または1%と4%の間、好ましくは2%のグリセロールを含有するグリセロール水溶液中で行うことができる。ついで、かかる希釈物を前記のように製造したチロシン吸着体の懸濁液に加えることができる。都合よくは、MPL溶液およびチロシン吸着物の懸濁液の濃度は、各々、略等しい容量を混合して注射用の最終生成物が得られるように選択する。典型的な最終生成物は約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアレルゲンと約 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ のMPLを含有する。

以下の実施例は本発明を説明するものである。

調製 1

透析または分画化により一部精製した略 $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ の芝草花粉(grass pollen)抽出物の中性溶液を、 0.25 重量/容量%のグルタルアルデヒドを等容量添加することで化学的に修飾し、混合物を室温で約2時間攪拌した。前記の混合物にpH 7 ± 1 のリン酸

10

20

30

40

50

緩衝液を加えた。1容量のHCl中のL-チロシン(24gのL-チロシンを3.8MHCl(100ml)に溶解して調製)および1容量の3.2MNaOHを4容量のアレルゲン溶液に同時に加えて激しく攪拌して、アレルゲン溶液をチロシンで共同沈降させた。そのようにして形成した懸濁液を遠心分離に付し、緩衝セイラインで繰り返し洗浄して夾雑物を除去し、緩衝セイライン(pH6±1)で元の容量に再懸濁させた。

前記の製剤と共同投与するのに適した3-DMP Lを以下の調製3に記載のとおり調製した。

調製2

卵白アルブミン(XOA)8mgをEVANS溶液20mlに混合することにより溶解した。次いでリン酸塩緩衝液(6.9ml)を混合しながら加えた。磁気攪拌棒の入った100mlビーカーに溶液を入れた。磁気攪拌機を使用して混合しながら、3.2NNaOH(6.9ml)および24重量/容量%-チロシンを含有する3.8NHCl(6.9ml)を5分間にわたって同時に滴加し、沈降物を形成させた。混合物をさらに5分間攪拌し、次いで50mlの遠心管に移して2500rpmで10分間遠心した。遠心分離に付した後、上澄をデカンテーションし、ペレット状の沈降物をリン酸緩衝液(40ml)に再び懸濁させた。混合物を2500rpmで5分間遠心分離に付した。遠心分離に付した後、上澄をデカンテーションし、沈降物をリン酸塩緩衝液(40ml)に再び懸濁させた。混合物を2500rpmで5分間遠心分離に付した。遠心分離に付した後、上澄をデカンテーションし、ペレット状の沈降物を0.4容量/容量%グリセロールおよび保存剤として0.01重量/容量%のチメロサルを含有するリン酸塩緩衝セイライン(40ml)に再び懸濁させた。最終生成物は略40mg/mlのチロシン吸着物を含有する。チロシン吸収物に対してXOAの100%が結合すると仮定すると、最終生成物中XOAは200μg/mlであった。XOA-チロシン吸着物は必要時まで4で保存した。

調製3

1,2-ジパルミトイル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)の無水エタノール中溶液(4mg/ml)を調製した。各1.0mgのMPLR-TEA塩を溶解させるために、DPPC(27μl)を加えてMPLRを溶かした。窒素流をバイアルに穏やかに吹き込みエタノールを除去した。ついで、乾燥MPLR/DPPC混合物に、MPLR各1mgについて、発熱物質不含の注射用水(1.0ml)を加えた。溶液を透明になるまで60-70の音波処理浴にて超音波処理に付した。次いで、SFC A 290-4520 Nalgene 0.2μmフィルターを通して濾過することにより、MPLR/DPPC溶液を濾過滅菌した。MPLR/DPPC溶液を1.0mg/mlで発熱物質を除去したバイアルに無菌状態にて分配し、MPLR-AFのラベルを貼り、4で保存した。

生物学的活性

マウスにおけるTH1誘発活性はIgG2aおよびIgG2b抗体の産生と等しく、TH2誘発活性はIgG1抗体およびIgE抗体の産生と同等であることができる。従って、一例として、マウスにおいて実験を行い、鶏卵より由来する周知の食物アレルゲンである標本アレルゲン卵白アルブミン(XOA)に対するアレルゲン特異的抗体のプロファイルを測定した。これにより、MPL+XOA+チロシンからなる処方MPL+XOA、XOA+チロシンまたはXOA単独よりも優れた抗体プロファイルを刺激することが確認された。

一群8匹のBALB/c雌マウス(6-8週齢)に、以下のワクチンの一つを0.2mlにて鼠蹊部に皮下注射した。

XOA+チロシン: 注射する30分以内に、前記の調製2で調製したXOAチロシン吸着物を同容量のリン酸緩衝セイラインで希釈した。

XOA+チロシン+MPL: 注射する30分以内に、前記の調製2で調製したXOAチロシン吸着物を、同容量のリン酸緩衝セイライン中500μg/mlのMPLR-AFで希釈した。

XOA+MPL: XOAをリン酸緩衝セイラインに200μg/mlで溶解し、注射する

10

20

30

40

50

30分以内に、同容量のリン酸緩衝セイライン中500 μ g/mlのMPL R-AFで希釈した。

XOA単独：XOAをリン酸緩衝セイラインに200 μ g/mlで溶解し、同容量のリン酸緩衝セイラインで希釈した。

21日後、4群のマウスに新たに調製したワクチン0.2mlをブースター投与した。ブースター投与した14日後に、マウスを放血させて、血清を分離して-70℃で検定時まで保存した。

その血清を、Southern Biotechnology, Inc. (Birmingham, AL) から購入し、製造業者の指示に従って用いられる、西洋ワサビ接合ヤギ抗マウスIgG₁、IgG_{2a}およびIgG_{2b}抗体を用いる、慣用的なELISA技術により検定した。IgG₁、IgG_{2a}およびIgG_{2b}力価はA₄₉₀で > 0.1 ODユニットの読取りを付与する相互の血清希釈を示す。抗IgE捕捉ELISAを用い、つづいてビオチニル化卵白アルブミンプローブを用いて血清中IgEレベルを測定した。西洋ワサビ接合ストレパピジン調製物を加えた後に、結合を測定した。その結果をA₄₉₀でのODユニットとして報告する。

結果

処方	IgG1力価	IgG2a力価	IgG2b力価	IgE OD 1/10希釈度
XOA+チロシン	102400	100	200	0.213
XOA+チロシン +MPL	409600	102400	102400	0.104
XOA+MPL	102400	200	400	0.218
MOA単独	6400	<100	<100	0.235
正常なマウス 血清値	<100	<100	<100	0.095

特に重要なことは、アレルゲン+チロシン+MPLを組み合わせが、他の組み合わせほどアレルゲン特異的IgE抗体を誘発しないことである。さらには、IgG_{2a}およびIgG_{2b}のIgG₁抗体に対する比率が大きく、初めの2つの抗体のイソタイプで最高レベルが、他のいずれの群のマウスよりもアレルゲン+チロシン+MPLを投与したマウスの実験で観察されることとも一致する。これはこの群では他の群のマウスで誘発される割合と比較して、TH1細胞誘発のTH2細胞誘発に対する割合が大きいことを示すものである。

フロントページの続き

- (72)発明者 ウルリッヒ, ジョリ・テリー
アメリカ合衆国59840モンタナ州ハミルトン、オールド・コーバリス・ロード553番、リビ
・イミューノケム・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ウィーラー, アラン・ワーランド
イギリス、シーエム19・5エイダブリュー、エセックス、ハーロウ、サード・アベニュー、ニュ
ー・フロンティアーズ・サイエンス・パーク・サウス、スミスクライン・ビーチャム・ファーマシ
ューティカルズ

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 国際公開第96/034626(WO, A1)
米国特許第04912094(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/39
A61K 31/198
A61P 37/08
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)