

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-514696

(P2015-514696A)

(43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/12	Z N A 4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 15/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 15/00	
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39	
<b>C 0 7 K 14/025 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/025	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2014-561480 (P2014-561480)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月18日 (2013. 3. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月6日 (2014. 11. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/055582  
 (87) 国際公開番号 W02013/139744  
 (87) 国際公開日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)  
 (31) 優先権主張番号 61/612, 345  
 (32) 優先日 平成24年3月18日 (2012. 3. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 305060279  
 グラクソスミスクライン バイオロジカル  
 ズ ソシエテ アノニム  
 ベルギー ベー-1 3 3 0 リクセンサー  
 ル リュ ドランスティテュ 8 9  
 (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 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫  
 (74) 代理人 100169971  
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト・パピローマウイルスに対するワクチン接種方法

(57) 【要約】

本開示は、個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法に使用するための、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせる。含む免疫原性組成物を提供するものであり、該方法においては、HPV VLPおよびTLRアゴニストを含む第1回投与量の免疫原性組成物を投与し、その後1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含むがTLRアゴニストは含まない第2回投与量の免疫原性組成物を投与する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法に使用するための、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む第1の免疫原性組成物であって、該方法が以下：

- (i) 個体に、少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与し；その後
- (ii) 該個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含み、TLRアゴニストを含まない少なくとも1回投与量の該第2の免疫原性組成物を投与すること；  
を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しないHPV型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである、上記第1の免疫原性組成物。

10

**【請求項 2】**

個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法に使用するための、少なくとも1つのHPV型に由来するHPV VLPをアルミニウム塩を含むがTLR4アゴニストは含まないアジュバントと組み合わせて含む免疫原性組成物であって、該方法が以下：

- (i) 個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む、少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与すること；  
および
- (ii) 該個体に、TLR4アゴニストを含まずHPV VLPを含む免疫原性組成物である、少なくとも1回投与量の第2の免疫原性組成物を投与すること；  
を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しないHPV型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである、上記免疫原性組成物。

20

**【請求項 3】**

個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法であって、以下：

- (i) 個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む、少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与すること；  
および
- (ii) 該個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含み、TLRアゴニストを含まない少なくとも1回投与量の該第2の免疫原性組成物を投与すること；  
を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しない型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである、上記方法。

30

**【請求項 4】**

前記第1の免疫原性組成物がHPV 16もしくはHPV 18 VLP、またはHPV 16およびHPV 18 VLPを含む、請求項1~3のいずれか1項記載の使用または方法。

**【請求項 5】**

前記第1の免疫原性組成物がHPV 16もしくはHPV 18またはHPV 16とHPV 18の両方に対する型特異的免疫応答を増大させる、請求項4記載の使用または方法。

**【請求項 6】**

前記第1の免疫原性組成物が、同等回数投与量の前記第2の免疫原性組成物のみを投与した場合の前記HPV型に対する型特異的免疫応答と比較して該免疫応答を増大させる、請求項1~5のいずれか1項記載の使用または方法。

40

**【請求項 7】**

前記第1の免疫原性組成物が、前記第2の免疫原性組成物中に存在する1つまたは複数の高リスクまたは低リスクHPV型に対する交差反応性免疫応答を引き出す、請求項1~6のいずれか1項記載の使用または方法。

**【請求項 8】**

前記第1の免疫原性組成物が、前記第2の免疫原性組成物中に存在する1つまたは複数の低リスクHPV型に対する交差反応性免疫応答を引き出す、請求項1~7のいずれか1項記載の

50

使用または方法。

【請求項 9】

前記第1の免疫原性組成物がHPV 6に対する交差反応性免疫応答を引き出し、かつ前記第2の免疫原性組成物がHPV 6 VLPを含む、請求項1～8のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 10】

前記第1の免疫原性組成物がHPV 11に対する交差反応性免疫応答を引き出し、かつ前記第2の免疫原性組成物がHPV 11 VLPを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 11】

前記第1の免疫原性組成物が、前記第2の免疫原性組成物中に存在し前記第1の免疫原性組成物中には存在しない型に対する交差反応性免疫応答を、同等回数の投与量の前記第2の免疫原性組成物のみを投与した場合の該型に対する免疫応答と比較して増大させる、請求項1～10のいずれか1項記載の使用または方法。

10

【請求項 12】

前記第2の免疫原性組成物がHPV 6、11、16、および18 VLPならびに場合によっては他の型を含む、請求項1～11のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 13】

前記第2の免疫原性組成物がHPV 6、11、16、18、31、45、52および58を含む、請求項1～12のいずれか1項記載の使用または方法。

20

【請求項 14】

前記第1の免疫原性組成物がTLR4アゴニストを含む、請求項1～13のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 15】

前記TLR4アゴニストがMPLである、請求項14記載の使用または方法。

【請求項 16】

前記第1の免疫原性組成物がMPLおよびアルミニウム塩を含む、請求項15記載の使用または方法。

【請求項 17】

前記アルミニウム塩が水酸化アルミニウムである、請求項16記載の使用または方法。

30

【請求項 18】

前記第2の免疫原性組成物がアルミニウム塩を含む、請求項1～17のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 19】

前記第2の免疫原性組成物中のアルミニウム塩がアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩である、請求項18記載の使用または方法。

【請求項 20】

2回投与量の前記第1の免疫原性組成物を投与し、その後1回投与量または複数回投与量の前記第2の免疫原性組成物を投与する、請求項1～19のいずれか1項記載の方法または使用。

40

【請求項 21】

1回投与量の前記第1の免疫原性組成物を投与し、その後1または2または複数回投与量の前記第2の免疫原性組成物を投与する、請求項1～19のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項 22】

3回投与量を投与し、かつ前記の第1および第2の免疫原性組成物の両方に存在する1つまたは複数のHPV型に対する免疫応答を、3回投与量の前記第2の免疫原性組成物のみを投与した場合の該HPV型に対する免疫応答と比較して増大させる、請求項20または21記載の使用または方法。

【請求項 23】

50

3回投与量を投与し、かつ前記第2の免疫原性組成物中にのみ存在する1つまたは複数のHPV型に対する免疫応答が、3回投与量の前記第2の免疫原性組成物のみを投与した場合の該HPV型に対する免疫応答よりも大きい、請求項20～22のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項24】

前記HPV VLPがL1またはその免疫原性断片を含む、請求項1～23のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項25】

前記HPV VLPがL1単独型VLPである、請求項1～24のいずれか1項記載の使用または方法。

【請求項26】

以下：

(i) 少なくとも1つのHPV型に由来するVLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む第1の免疫原性組成物；および

(ii) 少なくとも1つのHPV型に由来するVLPを含みかつTLRアゴニストを含まない第2の免疫原性組成物を含むキット。

【請求項27】

前記第1および第2の免疫原性組成物がHPV 16およびHPV 18 VLPを含む、請求項26記載のキット。

【請求項28】

前記第2の免疫原性組成物が、前記第1の免疫原性組成物には存在しないHPV 6および/またはHPV 11 VLPをさらに含む、請求項26または27記載のキット。

【請求項29】

前記第2の免疫原性組成物がHPV 6、11、16、および18 VLPならびに場合によっては他の型を含む、請求項26～28のいずれか1項記載のキット。

【請求項30】

前記第1の免疫原性組成物がTLR4アゴニストを含む、請求項26～29のいずれか1項記載のキット。

【請求項31】

前記TLR4アゴニストがMPLである、請求項30記載のキット。

【請求項32】

前記第1の免疫原性組成物がアルミニウム塩を含む、請求項26～31のいずれか1項記載のキット。

【請求項33】

前記第2の免疫原性組成物がアルミニウム塩を含む、請求項26～32のいずれか1項記載のキット。

【請求項34】

前記第1の免疫原性組成物が水酸化アルミニウムを含み、かつ前記第2の免疫原性組成物がアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩を含む、請求項33記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本開示は、ヒト用ワクチンの分野に関するものである。より具体的には、本開示は、ヒト・パピローマウイルス(HPV)感染または疾患の予防または治療のための医薬用かつ免疫原性の組成物、およびHPV感染または疾患に対するワクチン接種のための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

パピローマウイルスは、小型で種特異性の高いDNA腫瘍ウイルスである。ヒト・パピロ

10

20

30

40

50

ーマウイルスは、基底上皮(皮膚または粘膜)細胞に感染するDNAウイルスである。100を超える別個のヒト・パピローマウイルス(HPV)遺伝子型が記載されている。HPVは、一般に皮膚の扁平上皮に特異的(例えば、HPV-1および-2)であるか、または粘膜表面に特異的(例えば、HPV-6および-11)であり、また通常は数ヶ月間または数年間持続する良性腫瘍(疣贅)を引き起こす。

#### 【0003】

発癌性のヒト・パピローマウイルス(HPV)型による持続感染は、世界的に女性の癌死の第2原因となっている子宮頸癌の必要原因である。「高リスク」遺伝子型、例えば遺伝子型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68および73は、子宮頸癌を招く可能性があり、また他の粘膜肛門性器癌および頭頸部癌と関連があるという国際的コンセンサスが存在する。世界的に見ると、HPV-16およびHPV-18が主要な発癌型であり、累積的には全浸潤性子宮頸癌症例の70~80%超を占めている。

10

#### 【0004】

「低リスク」と称される他の遺伝子型による感染は、良性または低悪性度の頸部組織変化、ならびに、女性では子宮頸部、膣、外陰部および肛門、また男性では陰茎、陰囊または肛門に生じる腫瘍である性器疣贅(尖圭コンジローマ)を引き起こす可能性がある。またそれらは、外科的介入を必要とする、小児および成人の声帯の上皮腫瘍(若年性呼吸器乳頭腫症または再発性呼吸器乳頭腫症)も引き起こす。

#### 【0005】

2種の予防的HPVワクチンが最近になって多くの国々で認可された。いずれも、HPV-16および-18頸部前癌性病変および癌を予防するために、個々のHPV型の組換えL1キャプシドタンパク質からなるウイルス様粒子(VLP)を利用したものである。Cervarix(商標)(GlaxoSmithKline Biologicals)は、キンウワバ(*Trichoplusia ni*)昆虫細胞基質においてバキュロウイルス発現ベクター系を利用して産生させたHPV-16および-18 VLPを含有しており、かつ免疫賦活剤3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドA(MPLとしても知られる3D MPL)および水酸化アルミニウム塩と共に製剤化されている。Gardasil(商標)(Merck)は酵母サッカロミセス・セレピシア(*Saccharomyces cerevisiae*)において産生されたHPV-16および-18 VLPを含有しており、かつ非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩と共に製剤化されている。さらに、Gardasil(商標)は、性器疣贅の75~90%に關与している非発癌性の型HPV-6および-11に由来するVLPも含有している。いずれのワクチンについても、発癌性の型HPV-16およびHPV-18による感染ならびに関連前癌病変に対する特異的防御がランダム化臨床試験において実証されている。

20

30

#### 【0006】

子宮頸癌を引き起こす原因となる発癌性HPV型のリストには、少なくとも、子宮頸癌に見られるHPV型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68および73が含まれる(Mahdaviら、2005; Quintら、2006)。

#### 【0007】

既存のワクチンは、これらのHPV型の一部による感染および/または疾患に対して様々な程度まで特異的防御を提供することが可能である。例えば、Cervarix(商標)は、HPV型33、31、45および51に対する交差防御効果を提供する。HPV-16/18型およびこれら4つの型は子宮頸癌の約85%を引き起こし;さらに、HPV-33感染には頸部病変に進行する特に高いリスクがあり、またHPV-45は腺癌において大きな比率を占めている(Wheelerら、2012)。しかしながら、子宮頸癌に対してCervarix(商標)により達成される高度の防御を提供すること、そしてさらに他のHPV型により引き起こされる感染および疾患に対するある程度の防御も提供することは、潜在的に有益であろう。子宮頸癌に対する高度の防御を提供すること、そしてさらに、HPV-6およびHPV-11により引き起こされる性器疣贅に対して既存のワクチンにより提供される防御よりも改善された防御を提供することは、潜在的に有益であろう。

40

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

50

ここで、MPLアジュバントを含有しない別のHPVワクチンを用いるワクチン接種スキームにおいて、アジュバントMPLを含む1または複数回投与量のHPVワクチンを投与することにより、一定の利点が得られることを見出した。例えば、ワクチン中に存在する特定のHPV型(例えば、HVP 18)に対する免疫応答を、アルミニウムアジュバントのみを使用するワクチン接種スキームと比較して増大させることができる。これは特に、MPL含有ワクチンを最初に投与した場合に見られるが、排他的なものではない。あるいは、または加えて、MPLアジュバント添加ワクチン中には存在しないがアルミニウムアジュバント添加ワクチン中には存在する特定のHPV型に対する交差反応性免疫応答を、MPL含有ワクチンを最初に投与し、その後アルミニウムアジュバント添加ワクチンを投与することにより、アルミニウムアジュバント添加ワクチンのみを使用するワクチン接種と比較して同等とするかまたは増大させることができる。

10

【0009】

#### 概要

本開示は、HPVに対するワクチン接種を強化するための、TLRアゴニスト含有HPVワクチンの使用に関するものである。本開示はさらに、ワクチン接種スキームにおいて、TLRアゴニスト含有ワクチンを含む種々のHPVワクチンを特定の順序で使用することに関するものである。具体的には、本開示は、非TLRアゴニスト含有HPVワクチンを用いるワクチン接種スキームにおけるTLRアゴニスト含有HPVワクチンの使用により、特定のHPV型に対する応答を改善することに関するものである。本開示はさらに、プライミングワクチンに存在しない1つまたは複数のHPV型に対する交差反応性免疫応答を誘導するプライミングワクチンと、続いて、該プライミングワクチンに存在せずかつ該プライミングワクチンにより交差反応性応答が誘導される1つまたは複数のHPV型を含有するブースター(boosting)ワクチンを用いるワクチン接種スキームに関するものである。存在しないHPV型に対する免疫応答は、ブースターワクチンにより、同等回数(equivalent number)の投与量のブースターワクチンのみによって誘導される免疫応答と少なくとも等しいか、より高いレベルまで増強される。異なるプライミングおよびブースターワクチンの使用は、1つのワクチン接種スケジュールにおける異なるワクチンの使用もまた可能にする。

20

【0010】

1つの態様においては、本発明は、個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法に使用するための、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む第1の免疫原性組成物を提供し、該方法は以下：

30

- (i) 個体に、少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与し；その後
  - (ii) 該個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含み、TLRアゴニストを含まない少なくとも1回投与量の該第2の免疫原性組成物を投与すること；
- を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しないHPV型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである。

【0011】

さらなる態様においては、本発明は、個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法に使用するための、少なくとも1つのHPV型に由来するHPV VLPを、アルミニウム塩を含むがTLR4アゴニストは含まないアジュバントと組み合わせて含む免疫原性組成物を提供し、該方法は以下：

40

- (i) 個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与すること；および
  - (ii) 該個体に、HPV VLPをTLR4アゴニストではなくアルミニウム塩と組み合わせて含む免疫原性組成物である少なくとも1回投与量の第2の免疫原性組成物を投与すること；
- を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しないHPV型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである。

50

## 【0012】

別の態様においては、本発明は、個体におけるHPV感染または疾患の予防のための方法であって、以下：

(i) 個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む少なくとも1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与すること；および

(ii) 該個体に、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含み、TLRアゴニストを含まない少なくとも1回投与量の該第2の免疫原性組成物を投与すること；

を含み、該第1の免疫原性組成物は、該第2の免疫原性組成物中に存在し該第1の免疫原性組成物中には存在しない型に対する型特異的免疫応答または交差反応性免疫応答のうちの少なくとも一方を増大させるものである、上記方法を提供する。

10

## 【0013】

別の態様においては、本発明は、以下：

(i) 少なくとも1つのHPV型に由来するVLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む第1の免疫原性組成物；および

(ii) 少なくとも1つのHPV型に由来するVLPを含み、かつTLRアゴニストを含まない第2の免疫原性組成物

を含むキットを提供する。

## 【0014】

別の態様においては、本発明は、本明細書中に記載した第1および第2の免疫原性組成物をヒトに投与することを含む、ヒトにおいてHPVに対する抗体を誘導する方法を提供する。

20

## 【0015】

別の態様においては、本発明は、本明細書中に記載した第1および第2の免疫原性組成物をヒトに投与することを含む、ヒトにおいてHPVに対する中和抗体を誘導する方法を提供する。かかる方法により交差中和抗体を誘導することも可能である。

## 【0016】

別の態様においては、本発明は、本明細書中に記載した第1および第2の免疫原性組成物をヒトに投与することを含む、ヒトにおいてHPVに対する細胞性免疫を誘導する方法を提供する。

30

## 【0017】

別の態様においては、本発明は、本明細書中に記載した第1および第2の免疫原性組成物をヒトに投与することを含む、ヒトにおいてHPVに対する中和抗体および細胞性免疫を誘導する方法を提供する。かかる方法により交差中和抗体を誘導することも可能である。

## 【0018】

さらなる態様においては、本開示は、HPV感染または疾患の予防を強化する方法に使用するための、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPをTLRアゴニストを含むアジュバントと組み合わせて含む第1の免疫原性組成物に関し、ここで該方法は、1または複数回投与量の該免疫原性組成物を、1つまたは複数のHPV型に由来するHPV VLPを含むがTLRアゴニストを含まない1または複数回投与量の第2の免疫原性組成物を既に投与した個体に投与することを含むものである。

40

## 【0019】

#### 図面の簡単な説明

図1~20および22~33は、Cervarix(商標)およびGardasil(商標)を用いた種々のワクチン接種スキームによる免疫化後のマウスにおいて、それぞれELISAおよび偽ウイルス中和アッセイにより測定した、マウスにおける総および中和抗体応答を示したものである。これらは3つの独立した実験の結果である。実施例1のデータは図1~16として、実施例2のデータは図17~20として、また実施例3のデータは図22~33としてグループ分けした。図21は実施例2の一部をなす防御アッセイの結果を示したものであり、また図34~38は実施例3の一部をなす防御アッセイの結果を示したものである。

50

【 0 0 2 0 】

さらなる詳細については以下の通りである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 1 】

【 図 1 】 図1は、総抗-HPV 16 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 2 】 図2は、総抗-HPV-16応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 3 】 図3は、中和抗-HPV-16 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 4 】 図4は、中和抗-HPV 16応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 5 】 図5は、総抗-HPV 18 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 6 】 図6は、総抗-HPV-18応答に関する統計分析の概要を示したものである。 10

【 図 7 】 図7は、中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 8 】 図8は、中和抗-HPV 18応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 9 】 図9は、総抗-HPV-6 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 1 0 】 図10は、総抗-HPV6抗体応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 1 1 】 図11は、中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 1 2 】 図12は、中和抗-HPV6抗体応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 1 3 】 図13は、総抗-HPV-11 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 1 4 】 図14は、総抗-HPV11抗体応答に関する統計分析の概要を示したものである。

【 図 1 5 】 図15は、中和抗-HPV-11 L1 VLP抗体応答を示したものである。

【 図 1 6 】 図16は、中和抗-HPV11抗体応答に関する統計分析の概要を示したものである。 20

【 図 1 7 】 図17は、総抗-HPV-18抗体応答(実施例2)を示したものである。

【 図 1 8 】 図18は、中和抗-HPV-18抗体応答(実施例2)を示したものである。

【 図 1 9 】 図19は、総抗-HPV-11抗体応答(実施例2)を示したものである。

【 図 2 0 】 図20は、中和抗-HPV-11抗体応答(実施例2)を示したものである。

【 図 2 1 】 図21は、実施例2の膈内チャレンジ実験後のマウスにおける11後1ヶ月目の比較防御率および生物発光シグナルを示したものである。

【 図 2 2 】 図22は、1M PIIIでの総抗-HPV-18 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。

【 図 2 3 】 図23は、6M PIIIでの総抗-HPV-18 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。

【 図 2 4 】 図24は、1M PIIIでの中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。 30

【 図 2 5 】 図25は、6M PIIIでの中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。

【 図 2 6 】 図26は、1M PIIIでの総抗-HPV-6 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。

【 図 2 7 】 図27は、6M PIIIでの総抗-HPV-6 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。

【 図 2 8 】 図28は、1M PIIIでの中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。

【 図 2 9 】 図29は、6M PIIIでの中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。

【 図 3 0 】 図30は、1M PIIIでの総抗-HPV-11 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。

【 図 3 1 】 図31は、6M PIIIでの総抗-HPV-11 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである。 40

【 図 3 2 】 図32は、1M PIIIでの中和抗-HPV-11 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。

【 図 3 3 】 図33は、6M PIIIでの中和抗-HPV-11 L1 VLP抗体(実施例3)を示したものである

。

【 図 3 4 】 図34は、11後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(実施例3)を示したものである。

【 図 3 5 】 図35は、11後1Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(実施例3)を示したものである。

【 図 3 6 】 図36は、11後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(実施例3)を示したものである。 50

【図37】図37は、III後1Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(実施例3)を示したものである。

【図38】図38は、III後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(実施例3)を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

本発明は、ワクチン中に存在する1つまたは複数のHPV型、特に子宮頸癌のリスクが高いHPV型または性器疣贅を引き起こす低リスクHPV型に対する免疫応答を増大させるための、非TLRアゴニスト含有HPVワクチンも投与される個体におけるTLRアゴニスト含有HPVワクチンの使用について初めて記載するものである。本発明はさらに、第2の非TLRアゴニスト含有ワクチンの形で投与されるHPV型に対する交差反応性免疫応答を引き出すための、TLRアゴニスト含有HPVワクチンの使用について記載するものである。より具体的には、本発明は、異なるプライミングワクチンおよびブースターワクチンを投与することによるHPV関連疾患または感染の予防のための方法について記載するものであり、該方法においては、プライミングワクチンは、該プライミングワクチン中に存在しないがブースターワクチン中には存在するHPV型に対する免疫応答を誘導する。本発明は、1つのワクチンスケジュールにおいて、ワクチンの一方には存在しないHPV型に対する免疫応答を低下させることなく、またより重要なことには、特定のHPV型に対する免疫応答を改善しつつ、1つのワクチンを別のものの代わりに使用する可能性を提供するものである。

10

20

【0023】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物はHPV 16および/またはHPV 18 VLPを含む。特定の実施形態においては、第1の免疫原性組成物はHPV 16およびHPV 18 VLPだけを含み、他のHPV VLPを含まない。

【0024】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物は、HPV 16もしくはHPV 18、またはHPV 16とHPV 18の両方に対する型特異的免疫応答を増大させる。

【0025】

型特異的免疫応答の増大は、同等回数の投与量の第2の免疫原性組成物(すなわち、TLRをアジュバントとして用いていない組成物)のみを投与した場合の特定のHPV型に対する免疫応答と比較した際の免疫応答の増大でありうる。

30

【0026】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物は、第2の免疫原性組成物中に存在する1つまたは複数の高リスクまたは低リスクHPV型に対する交差反応性免疫応答を引き出す。

【0027】

子宮頸癌の原因である、いわゆる「高リスク」HPV型は遺伝子型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68および73であるが、より多くのHPV型が発見されるにつれて経時的にこのリストに追加されうことは理解されよう。いわゆる「低リスク」粘膜型HPV型は、癌を引き起こすリスクが低い型(例えば、性器疣贅を引き起こすHPV 6および11)、尋常性疣贅と関連している型(例えば、HPV 2および3)、ならびに良性皮膚疣贅と関連しているHPV 76である。一実施形態においては、本発明において使用する組成物中に存在する低リスクHPV型は、HPV 6もしくはHPV 11またはHPV 6およびHPV 11である。

40

【0028】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物は、第2の免疫原性組成物中に存在し第1の免疫原性組成物中には存在しない型に対する交差反応性免疫応答を、同等回数の投与量の第2の免疫原性組成物のみを投与した場合の該型に対する免疫応答と比較して、増大させる。

【0029】

特定のHPV型に対して引き出された免疫応答は、該HPV型に対する特異的抗体の適切なアッセイ、例えば、本明細書中の実施例、またはHarperら2004、Dessyら2008またはPastran

50

aから2004に記載されているようなELISAおよび/または偽中和アッセイにより測定することができる。

【0030】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物は、HPV 6、HPV 11、HPV 16およびHPV 18 VLPを含み、さらなるHPV VLPを含むか、または含まない。そうしたさらなるHPV型としては、追加の高リスク発癌性HPV型(例えば、HPV 31、HPV 33、HPV 45、HPV 52およびHPV 58のうちの1つまたは複数)が挙げられ、該HPV型はどのような組み合わせで存在していてもよい。特定の実施形態においては、HPV 6、11、16、18、31、33、45、52および58 VLPが9価のHPVワクチンの形で第2の免疫原性組成物中に存在する。

【0031】

本明細書中で使用する場合、プライミング組成物は、ブースター組成物の前に投与される免疫原性組成物である。

【0032】

同様に、ブースター組成物は、プライミング組成物の後に投与される免疫原性組成物である。

【0033】

本明細書中に記載したプライミングおよびブースター組成物は免疫原性組成物である、つまりそれらは(例えば、実験設定において)例えばヒト・パピローマウイルスなどの病原体に対する特異的免疫応答を誘発することができる、ヒトまたは動物被験体への投与に適した組成物である。従って、免疫原性組成物は、1つまたは複数の抗原(例えば、ウイルスの抗原性サブユニット、例えば、そのポリペプチド)または抗原エピトープを含む。免疫原性組成物は、免疫応答を誘発するかまたは強化することができる1つまたは複数の追加の成分(例えば、賦形剤、担体、および/またはアジュバント)もまた含む。特定の場合には、免疫原性組成物は、病原体により誘導される症候または症状から被験体を守る免疫応答を誘発するために投与される。場合によっては、病原体により引き起こされる症候または疾患は、該病原体への被験体の曝露後に該病原体(例えば、ヒト・パピローマウイルス)の複製を阻害することにより予防される(または治療される、例えば、軽減もしくは改善される)。例えば、本開示との関連においては、ヒト・パピローマウイルスに対する防御的または一時的(palliative)免疫応答を誘発することを目的とした1被験体または被験体集団への投与が意図される免疫原性組成物の特定の実施形態は、ワクチン組成物またはワクチンである。

【0034】

「ワクチン」という用語は、ヒトなどの個体において免疫応答を惹起することができる免疫原性成分を含む組成物を指し、該組成物は場合によってアジュバントを含有する。HPV用ワクチンは、適切には、1つまたは複数のHPV型により引き起こされる偶発感染、または持続感染、または細胞学的異常、例えば、ASCUS、CIN1、CIN2、CIN3、もしくは子宮頸癌に対する防御免疫応答を誘発する。

【0035】

本明細書中に記載した免疫原性組成物の投与量は、ヒト用量でありうる。「ヒト用量」という用語は、ヒトへの使用に適した体積を有する投与量を意味する。ヒト用量は、ヒトにおいて免疫応答を引き出すのに適した抗原の量を含む。一般に、ヒト用量の体積は、体積0.3~1.5 mLの液体である。ある実施形態においては、ヒト用量は0.5 mLである。さらなる実施形態においては、ヒト用量は0.5 mLより多く、例えば、0.6、0.7、0.8、0.9または1 mLである。さらなる実施形態においては、ヒト用量は1 mL~1.5 mLである。

【0036】

1つのHPV型により別のHPV型に対して引き出される免疫応答が交差反応性免疫応答である。本明細書中に記載した交差反応性免疫応答の存在または不在は、関連のあるHPV型、特に関連のあるHPV型のVLPに対する特異抗体を測定するための任意の適切なアッセイにより検出および測定することができる。抗体をスクリーニングする方法は当分野で周知である。ELISA、例えば本明細書中で実施例において記載したELISAを使用することにより、抗

10

20

30

40

50

体の交差反応性を評価することができる。適切なELISAはHarperら、2004 (webappendixを参照されたい)にも記載されている。交差反応性応答は交差中和である場合もあり、また抗体は、例えば本明細書中で実施例において記載したような偽ウイルス中和アッセイなどの適切なアッセイを利用して、中和および交差中和特性について試験しうる。適切な偽ウイルス中和アッセイはDessyら、2008およびPastranaら、2004に記載されている。

【0037】

本明細書中に記載した第1および第2の免疫原性組成物は、典型的には少なくとも1つの薬学的に許容しうる希釈剤または担体を含み、また場合により(第2の免疫原性組成物に関しては)アジュバントも含む。

【0038】

「アジュバント」とは、非特異的な様式で免疫応答の生成を強化する物質である。一般的なアジュバントとしては、抗原が吸着される鉱物(ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム)の懸濁液; エマルション、例えば油中水型および水中油型エマルション(およびその変形、例えば多相エマルションおよび転相可能な(reversible)エマルション)、リポ糖、リポ多糖、免疫刺激性核酸(例えば、CpGオリゴヌクレオチド)、リポソーム、Toll様受容体アゴニスト(具体的には、TLR2、TLR4、TLR7/8およびTLR9アゴニスト)、ならびにかかる成分の様々な組み合わせが挙げられる。

【0039】

ある実施形態においては、第1または第2の免疫原性組成物のいずれか、または両方におけるVLPをアルミニウムと組み合わせて使用し、また該VLPをアルミニウムアジュバント、例えば、水酸化アルミニウムまたは非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩に吸着させるかまたは部分的に吸着させることができる。

【0040】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物中のTLRアゴニストは、リピドAの非毒性誘導体、例えば、モノホスホリルリピドA、もしくはより具体的には3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドA(3D-MPL)、またはQS21である。ある実施形態においては、MPLを水酸化アルミニウムと組み合わせて使用する。

【0041】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物はアルミニウム塩、例えば、非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩を含む。

【0042】

VLPがアルミニウム含有アジュバントに吸着される場合、最終ワクチン製品を作製するためのVLPの混合に先立って、該VLPをこのアルミニウムアジュバントに吸着させることができる。

【0043】

従って、ある実施形態においては、プライミング組成物はアルミニウム塩を含む。VLPはアルミニウム塩に吸着されていても、または部分的に吸着されていてもよい。特定の実施形態においては、アジュバントは水酸化アルミニウムおよび3D MPLである。本開示による、かかるアジュバントを含む組成物は、例えばWO 00/23105(参照により本明細書中に組み込まれるものとする)に記載されている通りに調製することができる。

【0044】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物はアルミニウム塩を含む。VLPはアルミニウム塩に吸着されるかまたは部分的に吸着されうる。特定の実施形態においては、アルミニウム塩は非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩である。

【0045】

特定の実施形態においては、第1の免疫原性組成物は水酸化アルミニウムおよび3D MPLを含み、かつ第2の免疫原性組成物は非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩を含む。

【0046】

ある実施形態においては、本明細書中に記載した第1の免疫原性組成物中にHPV抗原と共

10

20

30

40

50

に用いるためのTLRアゴニストは、非毒性細菌リポ多糖誘導体である。適切なりピドAの非毒性誘導体の1例は、既に記載した通り、モノホスホリルリピドA、またはより具体的には3-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)である。3D-MPLはGlaxoSmithKline Biologicals N.A.からMPLという名称で販売されており、本明細書全体を通してMPLまたは3D-MPLと称するものとする。例えば、米国特許第4,436,727号；第4,877,611号；第4,866,034号および第4,912,094号を参照されたい。3D-MPLは主にIFN- $\gamma$  (Th1)表現型を有するCD4+T細胞応答を促進する。3D-MPLはGB2220211 Aに開示されている方法に従って製造することができる。化学的には、3D-MPLは3、4、5または6アシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。本発明の組成物においては、小粒子3D-MPLを使用することができる。小粒子3D-MPLは、0.22  $\mu$ mフィルターに通して滅菌ろ過できるような粒径を有する。かかる調製物はWO94/21292に記載されている。

10

## 【0047】

他の実施形態においては、リポ多糖は米国特許第6,005,099号および欧州特許第0 729 473 B1号に記載の(1-6)グルコサミン二糖でありうる。当業者であれば、これらの参考文献の教示内容を基に様々なリポ多糖(例えば3D-MPL)を容易に製造することが可能であろう。前述の免疫賦活剤(その構造はLPSまたはMPLまたは3D-MPLのものと類似している)に加えて、MPLの上記構造に対する下位部分(sub-portion)であるアシル化単糖および二糖誘導体もまた適切なアジュバントである。他の実施形態においては、アジュバントはリピドAの合成誘導体であって、その一部はTLR-4アゴニストであり、また例として、限定するものではないが、以下：

20

OM174 (2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ-D-グルコピラノシル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-D-グルコピラノシル二水素ホスファート)、(WO 95/14026)

OM 294 DP (3S, 9 R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(二水素ホスファート)(WO 99/64301およびWO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3- (R) -ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1 -二水素ホスファート 10-(6-アミノヘキサノアート)(WO 01/46127)

が挙げられる。

30

## 【0048】

使用しうる他のTLR4リガンドは、アルキルグルコサミニドホスファート(AGP)、例えばWO 98/50399または米国特許第6,303,347号(AGPの調製のための工程も開示されている)に開示されているAGPであり、適切にはRC527もしくはRC529または米国特許第6,764,840号に開示されているようなAGPの薬学的に許容される塩である。一部のAGPはTLR4アゴニストであり、また一部はTLR4アンタゴニストである。いずれもアジュバントとして有用であると考えられる。

## 【0049】

TLR-4を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができる他の適切なTLR-4リガンド(Sabroeら、JI 2003 p1630-5)は、例えば、グラム陰性菌由来のリポ多糖およびその誘導体、またはその断片、特にLPSの非毒性誘導体(例えば3D-MPL)である。他の適切なTLRアゴニストは、以下：熱ショックタンパク質(HSP)10、60、65、70、75または90；サーファクタントタンパク質A、ヒアルロンオリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノゲンペプチドおよびb-デフェンシン-2、ならびにムラミルジペプチド(MDP)である。ある実施形態においては、TLRアゴニストはHSP 60、70または90である。他の適切なTLR-4リガンドは、WO 2003/011223およびWO2003/099195に記載されているもの、例えば、WO2003/011223の第4～5頁またはWO2003/099195の第3～4頁に開示されている化合物I、化合物IIおよび化合物III、ならびに、特にWO2003/011223にER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680、およびER804764として開示されているそれらの化合物である。例えば、1つの適切なTLR-4リガンドはER8040

40

50

57である。

【0050】

本発明のある実施形態においては、TLR-1を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-1を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、以下：トリアシル化リボペプチド(LP)；フェノール可溶性モジュリン(phenol-soluble modulin)；結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のLP；細菌リポタンパク質のアセチル化アミノ末端を模倣するS-(2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-(2-RS)-プロピル)-N-パルミトイル-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH三塩酸塩(Pam3Cys)LPおよびライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)由来のOspA LPから選択される。代替実施形態においては、TLR-2を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-2を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、リポタンパク質、ペプチドグリカン、結核菌(*M. tuberculosis*)、ライム病ボレリア(*B. burgdorferi*)またはTパリダム(*T. pallidum*)由来の細菌性リボペプチド；黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を含む種に由来するペプチドグリカン；リポテイコ酸、マンヌロン酸、ナイセリア属のポーリン(*Neisseria porins*)、細菌の繊毛、エルシニア属(*Yersinia*)の病原因子、CMVのピリオン、麻疹赤血球凝集素、および酵母由来のザイモサンのうちの1つまたは複数である。代替実施形態においては、TLR-3を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-3を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、二本鎖RNA(dsRNA)、またはポリイノシン・ポリシチジル酸(Poly IC)、ウイルス感染に関連する分子核酸パターンである。代替実施形態においては、TLR-5を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-5を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは細菌のフラジェリンである。代替実施形態においては、TLR-6を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-6を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストはマイコバクテリアのリポタンパク質、ジアシル化LP、およびフェノール可溶性モジュリンである。追加のTLR6アゴニストはWO 2003/043572に記載されている。代替実施形態においては、TLR-7を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストを使用する。適切には、TLR-7を介してシグナル伝達応答を引き起こすことができるTLRアゴニストは、一本鎖RNA(ssRNA)、ロキソリピン、N7位およびC8位におけるグアノシン類似体、もしくはイミダゾキノリン化合物、またはその誘導体である。ある実施形態においては、TLRアゴニストはイミキモドである。さらなるTLR7アゴニストはWO 2002/085905に記載されている。

【0051】

1回投与量に使用する3D-MPLの量は、適切には、ヒトにおいて抗原に対する免疫応答を強化することが可能である。具体的には、適切な3D MPL量は、アジュバント無添加組成物と比較して、または別の量の3D MPLをアジュバントとして用いた組成物と比較して、該組成物の免疫学的能力を改善し、同時に反応原性プロフィールから許容される量である。各ヒト用量のワクチン中の3D-MPLの量は、例えば1回投与量あたり1~200 µg、または10~100 µg、または20~80 µg、例えば25 µg、または1回投与量あたり40~60 µg、例えば50 µgとしよう。

【0052】

本明細書中に記載した免疫原性組成物は、安定剤としてアルミニウムまたはアルミニウム化合物も含みうる。

【0053】

ある実施形態においては、1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与し、その後1または複数回投与量の第2の免疫原性組成物、例えば1または2または3回投与量の第2の免疫原性組成物を投与する。

【0054】

別の実施形態においては、2回投与量の第1の免疫原性組成物を投与し、その後1または

10

20

30

40

50

複数回投与量の第2の免疫原性組成物、例えば1または2回投与量の第2の免疫原性組成物を投与する。

【0055】

特定の実施形態においては、1回投与量の第1の免疫原性組成物を投与した後に2回投与量の第2の免疫原性組成物を投与するか、または2回投与量の第1の免疫原性組成物を投与した後に1回投与量の第2の免疫原性組成物を投与する。

【0056】

特定の実施形態においては、2回投与量以下の第1の免疫原性組成物を投与する。

【0057】

本明細書中に記載したキットの場合、各組成物の投与回数は使用または方法に関して記載した通りとしうる。

10

【0058】

従って、本明細書中に記載した方法および使用およびキットは、単一投与量の第1の免疫原性組成物、または単一投与量の第2の免疫原性組成物、または単一投与量の第1の免疫原性組成物と第2の免疫原性組成物の両方を用いる。

【0059】

ある実施形態においては、第1および第2の免疫原性組成物はHPV VLPを1回投与量あたり20 µg以上の量で含む。各回投与量は、例えば、30 µgの各VLP、または40 µgの各VLP、または60 µgの各VLPを含有していてもよい。種々のVLPが同一量または異なる量で存在していてもよい。第1および第2の免疫原性組成物は同一のHPV VLPを異なる量で含んでいてもよい。

20

【0060】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物はHPV 16およびHPV 18 VLPを1回投与量あたり20 µgの量で含む。

【0061】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物は、HPV 6、HPV 11、HPV 16およびHPV 18 VLPを、それぞれ1回投与量あたり20 µg、40 µg、40 µgおよび20 µgの量で含む。

【0062】

免疫原性組成物の投与は、2回または3回またはそれ以上の回数投与するワクチン接種のための任意のスケジュール、例えば、2回投与ワクチンのための0, 1ヶ月スケジュール、0, 2ヶ月スケジュール、0, 3ヶ月スケジュール、0, 4ヶ月スケジュール、0, 5ヶ月スケジュールまたは0, 6ヶ月スケジュール；3回投与ワクチン接種のための0, 1, 6ヶ月スケジュール、0, 2, 6ヶ月スケジュール、0, 3, 6ヶ月スケジュール、0, 4, 6ヶ月スケジュールに合わせることができる。従って、第2回投与量は、例えば、第1回投与量の1ヶ月または2ヶ月または3ヶ月または4ヶ月または5ヶ月または6ヶ月または最長12ヶ月または最長24ヶ月後に投与してもよい。同様に、第3回投与量は、第2回投与量の1ヶ月または2ヶ月または3ヶ月または4ヶ月または5ヶ月または6ヶ月または最長12ヶ月または最長24ヶ月後に投与してもよい。

30

【0063】

HPV VLPおよびVLPの製造方法は当分野で周知である。VLPは、典型的にはウイルスのHPV L1タンパク質から構成されており、またL2タンパク質も含みうる。VLPについては、例えば、W09420137、US5985610、W09611272、US6599508B1、US6361778B1、EP595935を参照されたい。

40

【0064】

本明細書中に記載したいずれの実施形態においても、別のタンパク質またはペプチド、例えばL2タンパク質またはペプチドの有無に関わらず、HPV VLPはHPV L1タンパク質またはその免疫原性断片を含みうる。

【0065】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物中のVLPは、その内部にL2の1つまたは複数のエピトープが挿入されているHPV L1タンパク質またはその免疫原性断片(例えば、

50

参照により本明細書中に組み込まれるWO 2010/149752に記載されているものなど)からなる。特定の実施形態においては、第1の免疫原性組成物は、L2の1つまたは複数のエピトープが挿入されているかかるHPV L1 VLPを、HPV L1単独型VLP(HPV L1 only VLP)と共に含み、例えば、HPV 16およびHPV 18 L1単独型VLPと、そのL1内にL2の1つまたは複数のエピトープが挿入されているHPV L1 VLPとの組み合わせを含む。

【0066】

別の実施形態においては、第1の免疫原性組成物中のVLPは、L1またはその免疫原性断片を含みL2を含まないVLPであるL1単独型VLPである。

【0067】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物中のVLPは、L1またはその免疫原性断片を含みL2を含まないL1単独型VLPである。

10

【0068】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物中のVLPは末端切断型L1を含む。

【0069】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物中のVLPは全長L1を含む。

【0070】

適切なHPV L1の免疫原性断片は、L1の末端切断、欠失、置換、または挿入変異体を含む。かかる免疫原性断片は免疫応答を生じさせる能力がある可能性があり、該免疫応答はL1タンパク質、例えばウイルス粒子またはVLPの形態のL1を、該L1タンパク質が由来するHPV型から識別することができる。

20

【0071】

使用しうる免疫原性L1断片としては、末端切断型L1タンパク質が挙げられる。ある実施形態においては、末端切断により核局在化シグナルが除去され、また場合によってはL1 C末端領域のDNA結合パターンも除去される。別の態様においては、末端切断はC末端切断である。さらなる態様においては、C末端切断により50個未満のアミノ酸、例えば40個未満のアミノ酸が除去される。L1がHPV 16由来である場合、その際は別の態様においてC末端切断によりこのHPV 16 L1のカルボキシ末端から34個のアミノ酸が除去される。L1がHPV 18由来である場合、その際はさらなる態様においてC末端切断によりこのHPV 18 L1のカルボキシ末端から35個のアミノ酸が除去される。従って、末端切断型L1タンパク質は、野生型L1と比較してC末端側で切断され、例えば該タンパク質のC末端側終端からの50個未満または40個未満のアミノ酸の除去により核局在化シグナルを除去し、また場合によってはDNA結合パターンも除去しうる。HPV 16および18由来のL1に関するかかる末端切断型タンパク質の具体例を、配列番号：1および2として以下に記載する。末端切断型L1タンパク質は、参照により本明細書中に組み込まれるUS 6,060,324、US 6,361,778、およびUS 6,599,508にも記載されている。

30

【0072】

ある実施形態においては、HPV 16 L1アミノ酸配列は以下の配列：(配列番号：1)

MSLWLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKPPNNKI	60
LVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKFPGFDPDTSFYNPDTQRLWACVGVGVGRGQPLGVGISGH	120
PLLNLDDTENASAYAANAGVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGGSPCTNVAV	180
NPGDCPPLELINTVIQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSE	240
PYGDSLFFYLRRREQMFVRHLFNRAVGENVPDDLVIKGGSGSTANLASSNYFPTPSGSMV	300
TSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSLCAAISTSETTYKNTNF	360
KEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGGTLEDYRF	420
VTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLQ	471

10

である。

【 0 0 7 3 】

HPV 16 L1配列は、W094/05792またはUS 6,649,167に開示されているもの、例えば、適切に末端が切断されているものであってもよい。適切な末端切断産物は、配列比較により、かつ本明細書中に開示した基準を利用して評価した場合、先に示した位置と同等の位置で切断されている。

20

【 0 0 7 4 】

ある実施形態においては、HPV 18 L1アミノ酸配列は以下の配列：(配列番号：2)

MALWRPSDNTVYLPPPSVARVWNTDDYVTRTSIFYHAGSSRLLTVGNPYFRVPAGGGNKQ	60
DIPKVSAYQYRVFRVQLPDPNKFGLPDNSIYNPETQRLWACVGVVEIGRGQPLGVGLSGH	120
PFYNKLDDTESSHAATSNVSEDVRDNVSDYKQTQLCILGCAPIGEHWAKGTACKSRPL	180
SQGDCPPLELKNTVLEDGDMVDTGYGAMDFSTLQDTKCEVPLDICQSICKYPDYLQMSAD	240
PYGDSMFFCLRREQLFARHFWRAGTMGDTVPPSLYIKGTGMRASPGSCVYSPSPSGSIV	300
TSDSQLFNKPYWLHKAQGHNNGVCWHNQLFVTVVDTTRSTNLTICASTQSPVPGQYDATK	360
FKQYSRHHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMSYIHSMNSSILEDWNFGVPPPPTSLVDYR	420
FVQSVAITCQKDAAPAENKDPYDKLKFVNVDLKEKFSLDLDQYPLGRKFLVQ	472

30

である。

【 0 0 7 5 】

代替のHPV 18 L1配列はW096/29413に開示されており、該配列は適切に末端が切断される。適切な末端切断産物は、配列比較により評価して、かつ本明細書中に開示した基準を利用して、先に示した位置と同等の位置で切断されている。

40

【 0 0 7 6 】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物のHPV VLPは末端切断型L1を含むL1単独型VLPであり、かつ第2の免疫原性組成物のHPV VLPは全長L1を含むL1単独型VLPである。

【 0 0 7 7 】

VLPは、酵母細胞または細菌細胞または昆虫細胞などの任意の適切な細胞基質において、例えばキンウワバ(*Trichoplusia ni*)から得た細胞などの昆虫細胞においてバキュロウイルス系を使用して作製することが可能であり、またVLPの調製のための技術は当分野で

50

周知である(例えば、その全内容が参照により本明細書中に組み込まれるWO9913056、US 6 416945B1、US 6261765B1およびUS6245568、ならびにその参考文献)。

【0078】

ある実施形態においては、第1の免疫原性組成物中のHPV VLPを昆虫細胞において発現させる。

【0079】

ある実施形態においては、第2の免疫原性組成物中のHPV VLPを酵母において発現させる。

【0080】

VLPは、分解(disassembly)および再構成(reassembly)技術により作製することができる。例えば、McCarthyら、1998 "Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Virus like Particles in Vitro" J. Virology 72(1): 33-41には、VLPの均一調製物を取得するための、昆虫細胞から精製した組換えL1 HPV 11 VLPの分解および再構成について記載されている。WO99/13056およびUS6245568にも、HPV VLPを作製するための分解/再構成工程について記載されている。

【0081】

ある実施形態においては、HPV VLPをWO99/13056またはUS6245568に記載されている通りに作製する。

【0082】

あるいは、VLPは、L1タンパク質または免疫原性断片を発現させて、これをその産生系または細胞基質から抽出し、さらに該タンパク質が主にL1モノマーまたはペンタマー(カプソマー)の形態であるうちに該タンパク質を精製し、さらにその後精製タンパク質からVLPを形成させることにより、作製することができる。ある実施形態においては、抽出および/または精製段階を、VLPの形成を防ぐためにβ-メルカプトエタノール(BME)などの還元剤の存在下で実施する。ある実施形態においては、この工程は、BMEなどの還元剤を除去することによりVLPを自発的に形成させる段階を含む。

【0083】

VLPの形成は、例えば、電子顕微鏡および動的レーザー光散乱などの標準的な技術により評価することができる。

【0084】

場合によっては、免疫原性組成物は、他の非HPV抗原と共に製剤化または同時投与することもできる。適切には、これらの非HPV抗原は、他の疾患、例えば単純ヘルペスウイルス(HSV)などの性感染症に対する防御を提供することができる。例えば、ワクチンはHSV由来のgDまたはその末端切断産物を含んでいてもよい。この様にして、ワクチンはHPVとHSVの両方に対する防御を提供する。

【0085】

ある実施形態においては、免疫原性組成物は液状ワクチン製剤として提供されるが、該組成物は凍結乾燥させて投与前に再構成させることができる。

【0086】

本明細書中に記載した免疫原性組成物は、経口、局所、皮下、粘膜(典型的には腔内)、静脈内、筋肉内、鼻腔内、舌下、皮内などの多様な経路のいずれかにより、また坐剤を介して、投与することができる。筋肉内および皮内への送達が好ましい。

【0087】

VLPの投与量は、個体の症状、性別、年齢および体重、ワクチンの投与経路およびHPVに応じて異なりうる。その分量もまたVLP型の数に応じて異なりうる。適切には、送達は、免疫学的防御応答を引き出すのに適したVLPの量の送達とする。適切には、各ワクチン投与量は、1~100 μgの各VLP、適切には少なくとも5 μg、または少なくとも10 μg、例えば、5~50 μgの各VLP、最も適切には10~50 μgの各VLP、例えば5 μg、6 μg、10 μg、15 μg、20 μg、40 μgまたは50 μgを含む。

【0088】

10

20

30

40

50

本明細書中に記載した免疫原性組成物は、ワクチンが免疫原性であることを確認するために、標準的な技術を利用して、例えば標準的な前臨床モデルで試験することができる。

【0089】

本明細書中に記載した全ての方法および使用およびキットは、9歳以上、例えば10～15歳、例えば10～13歳の青年期の女子に使用するためのものでありうる。しかしながら、15歳より年長の女子および成人女性にワクチンを接種することもできる。同様に、ワクチンをより年少の年齢群、例えば2～12歳に投与することができる。またワクチンを、異常な子宮頸癌検査結果後の女性またはHPVにより引き起こされる病変の除去に伴う外科手術後の女性、またはHPVによる癌の型に対して血清学的陰性およびDNA陰性である女性に投与することもできる。

10

【0090】

ある実施形態においては、本明細書中に記載した方法および使用およびキットは、以下の年齢層：9～25歳、10～25歳、9～19歳、10～19歳、9～14歳、10～14歳、15～19歳、20～25歳、14歳以下、19歳以下、25歳以下のうちの1つまたは複数に当てはまる女性に使用するためのものである。

【0091】

本明細書中に記載した方法および使用およびキットは、男性および男児に使用することができる。

【0092】

特許出願および付与された特許を含む本出願中の全参考文献の教示内容は、参照により本明細書中に完全に組み込まれるものとする。

20

【0093】

参考文献

Dessy FJ, Giannini SL, Bougelet CA, Kemp TJ, David MP, Poncelet SM, Pinto LA, Wettendorff MA . Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine. *Hum Vaccin*. 2008 Nov-Dec;4(6):425-34. Epub 2008 Nov 11.

Einstein MH et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix™ and Gardasil® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Human Vaccines* 5:10, 705-719; October 2009.

10

Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Nov 13; 364: 1757-65.

Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist*. 2005 Aug;10(7):528-38. Review.

20

Pastrana DV, Buck CB, Pang YY, Thompson CD, Castle PE, FitzGerald PC, Krüger Kjaer S, Lowy DR, Schiller JT. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*. 2004 Apr 10;321(2):205-16.

Quint WG, Pagliusi SR, Lelie N, de Villiers EM, Wheeler CM; World Health Organization Human Papillomavirus DNA International Collaborative Study Group. Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):571-9.

30

Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM, Szarewski A, Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Chow S-N, Apter D, Kitchener H, Teixeira JC, Skinner SR, Jaisamrarn U, Limson G, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WAJ, Bosch FX, Harper DM, Huh W, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Dubin G, Lehtinen M. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *The Lancet Oncology* 2012 Jan; 13(1):89-99. Published online Nov 2011.

40

【 実施例 1 】

【 0 0 9 4 】

50

マウスにおける3回投与免疫原性試験

BALB/cマウス(1群あたり23匹のマウス)に、全ての群に対して0、21および120日目に筋肉内注射を施した。投与量はいずれも、抗原のヒト用量の10分の1とした。2つの対照群には、Cervarix(商標)(HPV-16/18 L1 VLP 2/2 µg+AS04)またはGardasil(商標)(HPV-16/18/6/11 L1 VLP 4/2/2/4 µg+Merckアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩(MAA\*))ワクチンの注射を3回施した。4つの他の追加の群には、0日目にCervarix(商標)、21および120日目にGardasil(商標); 0および21日目にCervarix(商標)、その後120日目にGardasil(商標); 0日目にGardasil(商標)、その後21および120日目にCervarix(商標)、または0および21日目にGardasil(商標)、その後120日目にCervarix(商標)を注射した。

【0095】

血液を42日目(D21 PII)および162日目(D42 PIII)に採取し、HPV-16/18/6および11 L1 VLPに対する総抗体力価(ELISA)について分析した。HPV-16/18/6および11に対する中和抗体力価(PBNA)もまた162日目に測定した。以前の実験に基づき、かつANOVA-一元配置分析を利用すると、91%の検定力で6群間に2倍の差を検出するにはマウス23匹というサンプルサイズが必要であった。

【0096】

\* MAA = Merckアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩

下記の6群のマウスを使用した。

【表1】

群	D0	D21	D120
1	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)
2	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)
3	Cervarix(商標)	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)
4	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)	Gardasil(商標)
5	Gardasil(商標)	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)
6	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)	Cervarix(商標)

【0097】

アジュバント製剤(ヒト用量の1/10)

【表2】

製剤	アルミニウム	MPL
Cervarix(商標)	50µg Al(OH) <sub>3</sub>	5µg
Gardasil(商標)	22.5µg MAA*	-

【0098】

結果

種々の免疫化スキームの注射後のHPV-16、18、6および11 L1 VLPに対する体液性応答を、総抗体応答および中和抗体応答によりモニタリングした(実施例1の最後に記載した方法を参照されたい)。

【0099】

1. HPV-16 L1 VLP 応答1.1 総抗体応答 HPV16(ELISA、IIおよびIII後)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の総抗体応答(ELISA-後述の材料および方法の項を参照されたい)の比較を図1に示した。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図2に示す。図中のシリンジ状部分は注射時点に対応していることに留意されたい。

【0100】

1.2 中和応答HPV16(PBNA、D42 PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイ-後述の材料および方法の項を参照されたい)の比較をIII後D42に実施し、そして図3に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図4に示す。

【0101】

2. HPV-18 L1 VLP応答

2.1 総抗体応答HPV18(ELISA、IIおよびIII後)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の総抗体応答(ELISA)の比較を図5に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図6に示す。

10

【0102】

2.2 中和応答HPV18(PBNA、D42 PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイ)の比較をIII後D42に実施し、そして図7に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図8に示す。

【0103】

3. HPV-6 L1 VLP応答

3.1 総抗体応答HPV6(ELISA、IIおよびIII後)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の総抗体応答(ELISA)の比較を図9に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図10に示す。

20

【0104】

3.2 中和応答HPV6(PBNA、D42 PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイ)の比較をIII後D42に実施し、そして図11に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図12に示す。

【0105】

4. HPV-11 L1 VLP応答

4.1 総抗体応答HPV11(ELISA、IIおよびIII後)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の総抗体応答(ELISA)の比較を図13に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図14に示す。

30

【0106】

4.2 中和応答HPV11(PBNA、D42 PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイ)の比較をIII後D42に実施し、そして図15に示す。全ての群をCervarix(商標)またはGardasil(商標)対照群と比較した統計分析の概要を図16に示す。

【0107】

結論

40

・Gardasil(商標)プライミングと比較して1回投与Cervarix(商標)プライミングがIII後に総および中和抗-HPV-6および11応答に与えた正の影響(3.5~32倍、 $p < 0.0001$ ) CGG > GCC およびGGC

・Gardasil(商標)プライミングと比較して2回投与Cervarix(商標)プライミングがIII後に総抗-HPV-6および11応答にのみ与えた正の影響(3.1~5.8倍、 $p < 0.0001$ ) CCG GCCおよびGGC

・Gardasil(商標)プライミングと比較してCervarix(商標)プライミング(1または2回投与量)がIII後42日目に総および中和抗-HPV-16応答に与えた正の影響(1.9~2.6倍、 $p = 0.0006$ ) CCG ~ CCG GGG、GCCおよびGGC

・Gardasil(商標)プライミングと比較して2回投与Cervarix(商標)プライミングがIII後42

50

日目に総抗-HPV-18応答に与えた正の影響(1.7~4.2倍、p 0.0066) CCG GGG、GCCおよびGGC

Cervarix(商標)プライミングとGardasil(商標)プライミングの比較により、Cervarix(商標)プライミングが全HPV L1 VLP(6および11を含む)に対するELISA抗体応答ならびにHPV-16、6および11に対するPBNA応答に与える再現性のある正の影響が示された。

【0108】

HPV-16に関してCervarix(商標)と同様の抗体応答を誘導するにはCervarix(商標)による1回のプライミングで十分であるが、HPV-18に関してCervarix(商標)と同様の力価を確保するためには少なくとも2回投与量のCervarix(商標)を用いたプライミングが必要であることも示された。

10

【0109】

結論として、前記の免疫原性データにより、Cervarix(商標)またはGardasil(商標)を用いた完全なワクチン接種スケジュールと比較した上での、少なくとも1x (HPV-16、6および11)または2 x (HPV-18)のCervarix(商標)を用いたプライミングの付加価値が示された。

【0110】

表：HPV 6およびHPV 11に関するワクチン接種スキームの総および中和抗体応答に基づくランキング

【表3】

ELISA 6/11	ワクチン	PBNA 6/11
+++	CGG	++++
++	GGG	+++
++	GGC	+
+	GCC	+/-
+++	CCG	+/-
+	CCC	-

20

【0111】

1回投与量のCervarix(商標)を用いたプライミングの付加価値は、1/50 HDでの2回投与スキームにおいて、2回投与量のGardasil(商標)と比較してより高い総抗-HPV18応答および同様の総抗-HPV11応答を示すことにより維持された。実施例2を参照されたい。

30

【0112】

材料および方法

抗-HPV 16/18/6/11 L1 VLP ELISA

抗-HPV-16/18/6/11 L1 VLP抗体の定量は、HPV-16、HPV-18、HPV-6およびHPV-11末端切断型L1 VLPをコーティングとして使用するELISAにより実施した。抗原をPBS中1、2または5 µg/mLの最終濃度に希釈した後、96ウェルマイクロタイタープレート(Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Denmark)のウェルに4 で一晩吸着させた。次いで、該プレートを0.1%Tween 20 + 1%BSA含有PBS(飽和緩衝液)と共に37 で1時間インキュベートした。飽和緩衝液で希釈した血清を前記のHPV L1コートプレートに添加した後、37 で1時間30分インキュベートした。該プレートをPBS 0.1%Tween20で4回洗浄した後、飽和緩衝液で希釈したビオチン結合抗マウスIg(Dako, UK)を各ウェルに添加してから37 で1時間30分インキュベートした。洗浄段階後、飽和緩衝液で希釈したストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Dako, UK)を37 でさらに30分間添加した。プレートを上記の通りに洗浄した後、0.1%Tween20, 0.05Mクエン酸緩衝液pH 4.5中0.04%o-フェニレンジアミン(Sigma)0.03% $H_2O_2$ の溶液と共に室温で20分間インキュベートした。2N  $H_2SO_4$ を用いて反応を停止させてから、492/620 nmで読み取った。ELISA力価を(4変数方程式を利用して)SoftMaxProにより参考値から算出し、EU/mLで表した。

40

50

## 【 0 1 1 3 】

偽中和アッセイ (PBNA)

偽ウイルス (PsV) を、L1とL2の両方を発現するプラスミドおよびレポータープラスミド p2CMVSEAP (SEAP = 分泌型アルカリホスファターゼ) による293TT細胞 (ヒト胎児由来腎臓細胞系 + SV40 T抗原) のトランスフェクションにより作製した。簡潔に述べると、2000万個の293TT細胞をトランスフェクションの16時間前に播種した。一例：HPV16偽ウイルスの産生のために、前記細胞に各27 µgのpYSEAP、p16L1h、およびp16L2hをトランスフェクト (Lipofectamine 2000 / Invitrogen) し、その後トランスフェクションの40~48後に回収した。その後、抽出した偽ピリオン粒子をOptiprep (Sigma) を使用してさらに精製した。調製物を、その純度について10% SDS-Tris-グリシンゲル (Bio-Rad) で調べ、293TT細胞に漸増添加 (titrated) してSEAP検出 (Chemiluminescence, BD Clontech) により感染価を調べ、その後プールし、そして使用するまで-80 °Cで凍結した。

10

## 【 0 1 1 4 】

血清サンプルの中和力価をアッセイするために、293TT標的細胞を96ウェル平底プレートに30,000個の細胞/ウェルで3~4時間前に予め播種しておいた。偽ウイルス調製物を、30~70相対発光量 (RLU) の出力読み取り (output reading) のためのアルカリホスファターゼ (SEAP) を取得するために、適当に希釈した。希釈した偽ウイルスストックを96ウェルプレートに入れてから希釈血清と合わせ、その後1時間氷上に静置した。次に、この偽ウイルス・抗体混合物を予め播種しておいた細胞上に移し入れ、そして72時間インキュベートした。インキュベーションの最後に上清を回収し、そして1500 × gで5分間清澄化した。清澄化上清のSEAP含有量は、Great ESCAPE SEAP Chemiluminescence Kit (BD Clontech) を製造業者の指示通りに使用して測定した。基質を添加してから20分後に、サンプルを、白色Microplate 1 (Dyner) またはOptiplate-96 (Perkin-Elmer) 不透明96ウェルプレートにおいてGlow-Endpointに設定したMLX Microplate Luminometer (Dyner Technologies) を使用して0.20秒/ウェルで読み取った。

20

## 【 0 1 1 5 】

血清中和力価は、血清不含対照と比較してSEAP活性を少なくとも50%低下させる最高希釈倍数の逆数として定義される。血清がBPV1中和アッセイにおいて観察される力価 (陰性対照) より少なくとも4倍高い希釈倍数で中和する場合に、HPV-16、HPV-18、HPV-6およびHPV-11アッセイにおいて中和陽性とみなした。

30

## 【 0 1 1 6 】

統計分析

群平均値は一元配置分散分析 (ANOVA 1) を利用して比較した。該分析は、正規化を目的としてlog10変換データを基に行った。群平均値間に有意差が検出された場合は (p値 < 0.05)、平均値間の対比較を0.05の有意水準で実施した (Tukey-HSD比較判定法)。

## 【 0 1 1 7 】

UL/LL = 95% 信頼区間 (CI) の上限 / 下限。

## 【 実施例 2 】

## 【 0 1 1 8 】

マウスにおける2回投与免疫化試験 (チャレンジ試験を含む)

CC、CG、GGまたはGCスキームによるワクチン接種後にHPV-18および11に対して誘導された特異的防御を比較するため、本前臨床実験に着手した。本実験においては、ワクチンをヒト用量の1/50の投与量で使用した。

40

## 【 0 1 1 9 】

パートI - 免疫原性試験

BALB/cマウス (1群あたり10匹のマウス) に、0および21日目に、2回投与量のCervarix (商標) 1/50 HD、2回投与量のGardasil (商標) 1/50 HD、1回投与量のCervarix (商標) 1/50 HDとその後の1回投与量のGardasil (商標) 1/50 HD、または1回投与量のGardasil (商標) 1/50 HDとその後の1回投与量のCervarix (商標) 1/50 HDを用いて筋肉内注射を施した。

## 【 0 1 2 0 】

50

血液を11後28日目に採取し、そしてCC、GG、CGまたはGCを用いたワクチン接種後のHPV-18および11 L1 VLPに対する総抗体力価についてELISAにより分析した。HPV-18および11に対する中和抗体力価も(PBNAにより)11後28日目に測定した。

## 【 0 1 2 1 】

前記の種々の免疫化スキームにより誘導された特異的および交差防御を評価するため、マウスに11後1ヶ月目にPsV-18および11をチャレンジした。

## 【 0 1 2 2 】

群

## 【表 4】

群	D0	D21	チャレンジ M1 PII	
			Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)
1	Cervarix (商標)	Cervarix (商標)	Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)
2	Gardasil (商標)	Gardasil (商標)	Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)
3	Cervarix (商標)	Gardasil (商標)	Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)
4	Gardasil (商標)	Cervarix (商標)	Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)
5	NaCl	NaCl	Luc. PsV18 (n=5)	Luc. PsV11 (n=5)

Luc. PsV18 =ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む HPV 18 偽ウイルス

## 【 0 1 2 3 】

アジュバント製剤 (1/50 HD)

## 【表 5】

製剤	アルミニウム	MPL
Cervarix (商標)	10 $\mu$ g Al (OH) <sub>3</sub>	1 $\mu$ g
Gardasil (商標)	4.5 $\mu$ g MAA*	-

## 【 0 1 2 4 】

\* MAA = Merckアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩

結果

種々の免疫化スキームの注射後のHPV-18および11 L1 VLPに対する体液性応答を、総(ELISA)抗体応答および中和(PBNA)抗体応答によりモニタリングした。

## 【 0 1 2 5 】

## 1. HPV-18 L1 VLP応答

## 1.1 総抗体応答HPV-18(ELISA、D28 PII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後PII 28日目の総抗体応答(ELISA)の比較を図17に示す。

- CC ~ CG (2.3 ~ 4.8倍、p = 0.0613) GG ~ GC

## 【 0 1 2 6 】

## 1.2 中和抗体応答HPV-18(PBNA、D28 PII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイ - 実施例1の材料および方法の項を参照されたい)の比較を図18に示す。

- CC ~ CG ~ GG ~ GC

## 【 0 1 2 7 】

## 2. HPV-11 L1 VLP応答

## 2.1 総抗体応答HPV-11(ELISA、D28 PII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の総抗体応答(ELISA)の比較を図19に示す。

- CG ~ GG (1.8 ~ 3.5倍、p = 0.0038 ~ 0.2924) GC (5.1倍、p = 0.0001) > CC

## 【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

## 2.2 中和抗体応答HPV-11(PBNA、D28 PII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後の中和抗体応答(偽中和アッセイNCI)の比較を図20に示す。

- GG(5.6 ~ 11.5倍、 $p = 0.0001$ ) > GC ~ CG(58 ~ 120倍、 $p < 0.0001$ ) > CC
- CC 1/50 HDでは陽性応答は観察されなかった(カットオフ値)。

【0129】

### 結論

CCおよびCGについて同様の総抗-VLP18力価が観察され、これらはGGおよびGCスキームよりも高かった。

【0130】

GGおよびCGについては、GCおよびCCと比較して統計的に有意な高い総抗-VLP11応答が認められた。

【0131】

全てのワクチン接種スキームについて、HPV-18に対する同様の特異的中和抗体力価が認められた。

【0132】

CGについては、GGと比較すると低いCGスキームよりも高い、HPV-11に対する統計的に有意な中和抗体力価が認められた。

【0133】

### パートII - 膈内チャレンジおよび防御

CC、GG、CGまたはGCワクチン接種スキーム後に誘導される特異的防御を、II後1ヶ月にワクチン接種マウスのルシフェラーゼPsV-18および11(後述の材料および方法の項を参照されたい)によるチャレンジ後に評価した。

【0134】

#### 1. PsV-18チャレンジ

NaCl群(すなわち非ワクチン対照)で観察された予期せぬ防御(60%)を受け、PsV-18によるチャレンジ後の防御レベルについて結論を下すことができなかった(そのため、データは示さない)。

【0135】

#### 2. PsV-11チャレンジ

CC、GG、CGまたはGCワクチン接種後に誘導されたPsV-11に対する防御の比較を図21に示す。

【0136】

注：膈内チャレンジのばらつきのため、NaCl群における最大20%の防御(完全または部分的防御)は許容する。

【表6】

	CC1/50 HD	CG1/50 HD	GG1/50 HD	GC1/50 HD	NaCl
防御% (M1PII)	0%	100%	100%	100%	20%
ELISA 力価 (EU/mL)	452	4250	8003	2312	35
PBNA 力価 (ED50/mL)	20	1168	13429	2392	NT

【0137】

- ・ GG、CGおよびGCについて完全な防御(100%)率が観察された
- ・ CCワクチン接種による防御は認められなかった
- ・ 中和抗体応答が測定されない場合の防御は観察されなかった

### 結論

GGと比較すると、CGおよびGCワクチン接種スキームでのHPV-11に対する中和応答は低いにもかかわらず、PsV-11に対する100%の防御がこれら2つのスキームで観察された。さら

に、CCワクチン接種ではHPV-11に対する中和抗体の不在が観察されると同時にこの同型に対する防御が認められず、中和抗体の存在と防御率との相関関係が示唆される。

【0138】

結果のハイライト：

・総抗体(ELISA)

HPV-18：CC～CG GG～GC

HPV-11：GG～CG GC>CC

・中和抗体(PBNA：HPV-6/11)

HPV-18：CC～CG～GG～GC

HPV-11：GG>GC～CG>CC

・有効性(膈内チャレンジマウスモデル)

HPV-18：NaCl群における予期せぬ防御を受け不確定なデータ

HPV-11：GG～CG～GC>CCワクチン接種(100%の完全防御か0%)

結論

1回投与量のCervarix(商標)とその後の1回投与量のGardasil(商標)を用いたプライミングは、2回投与量のCervarix(商標)(CC)と同様の総抗-HPV-18応答、および2回投与量のGardasil(商標)(GG)と比較して同様の抗-HPV-11応答を誘導した。さらに、CGワクチン接種において、GGの場合と同様に、PsV-11に対して100%の防御が観察された。これらの観察結果から、ELISA力価および防御率を基にCervarix(商標)を用いるワクチン接種スキームを始めるための潜在的な付加価値が確認された。

【0139】

材料および方法

In Vivoチャレンジ

免疫化の2週間後、マウスに3mg/100 $\mu$ Lのデポプロペラを皮下注射することにより、マウスのホルモン周期を同調させた。4日後、マウスに、50 $\mu$ LのConceptrol(膈管の上皮を破壊するために使用される4%ノンオキシノール-9を含有するCMCベースの殺精子剤)を用いてその膈内に前処置を施した。該マウスに、1.5%低粘度カルボキシメチルセルロースで希釈した30 $\mu$ Lのルシフェラーゼ-偽ビリオンを6時間後に膈内チャレンジした。該偽ビリオンは、ルシフェラーゼタンパク質を発現する封入レポータープラスミドを有するHPV L1およびL2表面タンパク質から構成されている。PsV感染は、チャレンジ後2日目に生殖管におけるルシフェラーゼ発現を測定することによりモニタリングした。麻酔下のマウスに20 $\mu$ Lのルシフェリン(15mg/mL)を膈内注入し、そして5分後にXenogen IVIS Spectrum in vivo撮像装置(Caliper LifeSciences)を使用して2分間露出して撮像した。

【0140】

SEAPを発現するPsV-18をチャレンジしたNaClワクチン接種マウス(陰性対照)で取得したシグナルの平均+3 SDを下回るシグナルをマウスが示した場合に防御と定義した。

【0141】

チャレンジ後に取得した生物発光シグナルがカットオフ値939 ph/sec/cm<sup>2</sup>未満である場合に、マウスは完全に防御されたとみなした。この値は、無関係な胸部(thoracic zone)で測定した生物発光シグナルを利用して統計学者が決定した(#10の実験)。測定した生物発光シグナルがカットオフ値939 ph/sec/cm<sup>2</sup>より高いが陰性NaCl対照群において観察されたCI95の下限值未満である場合、マウスは部分的に防御されたとみなした。

【実施例3】

【0142】

3回投与ワクチン接種スキーム(0日目、45日目、120日目、ヒト用量の1/50)においてCervarix(商標)およびGardasil(商標)ワクチンにより誘導される比較短期および長期防御

CCC、GGG、CGG、CCG、GCCおよびGGCスキームによるワクチン接種後にHPV-18/6および11に対して誘導された特異的および交差防御を比較するため、これらの前臨床実験に着手した。これは、短期および長期防御を模倣するためにIII後1および6ヶ月目に評価した。ワクチン接種スキームD0/45/120を利用することにより、臨床での0/M2/M6ワクチン接種スキ

10

20

30

40

50

ームを模倣した。

【0143】

BALB/cマウス(1群あたり20匹のマウス)に、0、45および120日目に筋肉内注射を施した。2つの群には、Cervarix(商標) 1/50 HD (HPV-16/18 L1 VLP 0.4/0.4 μg + AS04) ワクチンまたはGardasil(商標) 1/50 HD (HPV-16/18/6/11 L1 VLP 0.8/0.4/0.4/0.8 μg + MAA\*) ワクチンの注射を3回施した。4つの他の追加の群には、0日目にCervarix(商標) 1/50 HD ならびに45および120日目にGardasil(商標) 1/50 HD ; 0および45日目にCervarix(商標) 1/50 HD、その後120日目にGardasil(商標) 1/50 HD ; 0日目にGardasil(商標) 1/50 HD、その後45および120日目にCervarix(商標) 1/50 HD、または0および45日目にGardasil(商標) 1/50 HD、続いて120日目にCervarix(商標) 1/50 HDを注射した。

10

【0144】

血液を、HPV-18/6および11 L1 VLPに対する総抗体力価(ELISA)を分析するために、III後1ヶ月目(20100801)またはIII後6ヶ月目(20100810)およびチャレンジ直前に採取した。

【0145】

HPV-18/6および11に対する中和抗体力価(PBNA)もIII後1または6ヶ月目に測定した。

【0146】

これらの種々の免疫化スキームにより誘導された特異的防御を評価するために、第3回の投与後1または6ヶ月目にPsV-18/6または11をマウスにチャレンジした。

【0147】

群

20

【表7】

群	D0	D45	D120
1	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)
2	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)
3	Cervarix(商標)	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)
4	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)	Gardasil(商標)
5	Gardasil(商標)	Cervarix(商標)	Cervarix(商標)
6	Gardasil(商標)	Gardasil(商標)	Cervarix(商標)

30

【0148】

アジュバント製剤(1/50ヒト用量)

【表8】

製剤	アルミニウム	MPL
Cervarix(商標) AHPVA044A	10μg Al(OH) <sub>3</sub>	1μg
Gardasil(商標) NJ17990	4.5μg MAA*	-

【0149】

40

\* MAA = Merckアルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩

結果

種々の免疫化スキームの注射後のHPV-18、6および11 L1 VLPに対する体液性応答を、ワクチン接種後1ヶ月または6ヶ月目に総(ELISA)抗体応答および中和(PBNA)抗体応答によりモニタリングした。

【0150】

1.1. 体液性応答

1.1.1. HPV-18 L1 VLP応答

1.1.1.1. 総抗体応答HPV-18(ELISA、1または6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの総抗体応答(ELISA)の

50

比較を図22および23に示す。

【 0 1 5 1 】

統計分析の概要は以下の通りである。

【表 9】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		~	~	~	~	~

【表 1 0】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	~		~	~	~	~

10

【表 1 1】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
6M PIII		~	~	~	~	~

20

【表 1 2】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
6M PIII	~		~	~	~	~

【 0 1 5 2 】

1.1.1.2. 中和抗体応答HPV-18(ELISA、1または6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの中和抗体応答(ELISA)の比較を図24および25に示す。

30

【 0 1 5 3 】

統計分析の概要は以下の通りである。

【表 1 3】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		~	~	~	~	~

【表 1 4】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	~		~	>	>	>

40

【表 1 5】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
6M PIII		<	~	~	~	~

【表 1 6】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
6M PIII	>		>	>	>	~

10

【 0 1 5 4】

1.1.2. HPV-6 L1 VLP 応答

1.1.2.1. 総抗体 応答 HPV-6 (ELISA、1 または 6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの総抗体 応答 (ELISA) の比較をそれぞれ図26および27に示す。

【 0 1 5 5】

統計分析の概要は以下の通りである。

【表 1 7】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		>	>	>	>	>

20

【表 1 8】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	<		~	<	<	<

30

【表 1 9】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII		>	>	>	>	>

【表 2 0】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII	<		<	<	<	~

40

【 0 1 5 6】

1.1.2.2. 中和抗体 応答 HPV-6 (ELISA、1 または 6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの中和抗体 応答 (ELISA) の比較をそれぞれ図28および29に示す。

【 0 1 5 7】

統計分析の概要は以下の通りである。

【表 2 1】  
対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		>	>	>	>	>

【表 2 2】  
対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	<		~	<	<	<

10

【表 2 3】  
対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII		>	>	>	>	>

【表 2 4】  
対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII	<		~	<	<	<

20

【 0 1 5 8 】

1.1.3. HPV-11 L1 VLP 応答

1.1.3.1. 総抗体応答 HPV-11 (ELISA、1 または 6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後 1M および 6M PIII での総抗体応答 (ELISA) の比較を図 30 および 31 に示す。

【 0 1 5 9 】

統計分析の概要は以下の通りである。

30

【表 2 5】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		>	>	>	>	>

【表 2 6】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	<		~	<	<	~

40

【表 2 7】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII		>	>	>	>	>

## 【表 2 8】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII	<		<	<	<	≦

## 【 0 1 6 0】

## 1.1.3.2. 中和抗体応答HPV-11(ELISA、1または6M PIII)

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの中和抗体応答(ELISA)の比較をそれぞれ図32および33に示す。

10

## 【 0 1 6 1】

統計分析の概要は以下の通りである。

## 【表 2 9】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII		>	>	>	>	>

## 【表 3 0】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D30 PIII	<		~	<	<	<

20

## 【表 3 1】

対 Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII		>	>	>	>	>

30

## 【表 3 2】

対 Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
M6 PIII	<		~	<	<	<

## 【 0 1 6 2】

## 1.1.4. 結論

ワクチン接種後1および6ヶ月では、試験した全てのワクチン接種スキームについて同様の(<2倍、 $p=0.0051\sim 1.000$ )総抗-HPV18応答が認められた。古典的Gardasil(商標)3回投与と比較したCervarix(商標)ブーストの正の影響、およびGardasil(商標)プライミングと比較した総抗-HPV18応答に対する2X Cervarix(商標)プライミングの正の影響は、本実験では確認されなかった。

40

## 【 0 1 6 3】

本実験では、Gardasil(商標)プライミングと比較した上での、III後1および6ヶ月目の総および中和抗-HPV-6および11応答に対する1X Cervarix(商標)プライミングの再現性のある付加価値は示されなかった。

## 【 0 1 6 4】

総合的結論を参照されたい。

## 【 0 1 6 5】

50

## 1.2. 膈内チャレンジおよび防御

種々のワクチン接種スキーム後に誘導された特異的防御を、III後1ヶ月または6ヶ月にルシフェラーゼPsV-18/6または11を用いたワクチン接種マウスのチャレンジ後に評価した。

【0166】

### 1.2.1. PsV-18チャレンジ

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後6M PIIIでの防御率の比較を図34に示す。

【0167】

ワクチン接種の1ヶ月後にNaCl群について観察された防御(80%)という予期せぬ知見を受け、PsV-18を用いたチャレンジ後の短期防御レベルについて結論を下すことはできなかった(データは示さず)。

【0168】

\* 膈内チャレンジのばらつきのため、NaCl群における最大20%の防御(完全または部分的防御)は許容する。

【表33】

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC	NaCl
防御% (M6PIII)	100%	100%	80%	100%	100%	100%	20%

【0169】

・CGG(80%)以外の全てのワクチン接種スキームにおいて100%の防御が観察された。

【0170】

### 1.2.2. PsV-6チャレンジ

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの防御率の比較をそれぞれ図35および36に示す。

【0171】

\* 膈内チャレンジのばらつきのため、NaCl群における最大20%の防御(完全または部分的防御)は許容する。

【表34】

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC	NaCl
防御% (M1PIII)	0%	100%	100%	100%	100%	100%	20%

【0172】

・III後1ヶ月目に、PsV-6に対する防御が全く認められないCCCワクチン接種とは対照的に、GGG、CGG、CCG、GCCおよびGGCについて100%の防御が観察された GGG ~ CGG ~ CCG ~ GCC ~ GGC > CCC

【表35】

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC	NaCl
防御% (M6PIII)	0%	100%	100%	100%	100%	100%	0%

【0173】

・III後6ヶ月目に、PsV-6に対する防御が全く認められないCCCワクチン接種とは対照的に、GGG、CGG、CCG、GCCおよびGGCについて100%の防御が観察された GGG ~ CGG ~ CCG ~ GCC ~ GGC > CCC

10

20

30

40

50

### 1.2.3. PsV-11チャレンジ

種々のワクチン接種スキームによる免疫化後1Mおよび6M PIIIでの防御率の比較をそれぞれ図37および38に示す。

【表 3 6】

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC	NaCl
防御% (M1PIII)	20%	100%	100%	50+25%	75+25%	40+60%	0%

【 0 1 7 4】

- ・ III後1ヶ月目に100%の防御がGGGおよびCGGについて観察された
- ・ 良好な防御率がCCG、GCCおよびGGCについて観察され、GCCによる防御の質がより良いという傾向が認められた
- ・ 低い防御(20%)がCCCについて観察された。

【表 3 7】

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC	NaCl
防御% (M6PIII)	0%	100%	100%	100%	100%	100%	0%

【 0 1 7 5】

- ・ III後6ヶ月目には、PsV-11に対する防御が全く認められないCCCワクチン接種とは対照的に、GGG、CGG、CCG、GCCおよびGGCについて100%の防御が観察された GGG ~ CGG ~ CCG ~ GCC ~ GGC > CCC

#### 結論

得られたデータは、ワクチン接種後6ヶ月までのPsV-18、6および11に対する良好な持続性防御を示しており、Cervarix(商標) / Gardasil(商標)混合の潜在的な利益が確認される。膈内チャレンジマウスモデルは、特異的防御についてヒトに対する同様の結論を示すものである。

【 0 1 7 6】

#### 防御率および総 / 中和抗体レベルの相関

総および中和抗体のレベルと防御率との相関関係を検討することにより、防御を誘導するのに必要な抗体の最小量を評価することができる。データを下記表に要約する。

【 0 1 7 7】

#### III後1ヶ月のデータ

10

20

30

【表 3 8】

		CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
HPV-18	防御% (総+部分)	使用不可データ					
	総 Abs (EU/mL)	154059	156657	122543	207997	112738	125080
	Nabs (ED50)	120374	63182	103478	199974	164226	169196
HPV-6	防御% (総+部分)	0%	100%	100%	100%	100%	100%
	総 Abs (EU/mL)	1438	39258	24508	12514	5903	16817
	Nabs (ED50)	<カットオフ	120557	113614	2531	2588	27728
HPV-11	防御% (総+部分)	20%	100%	100%	50+25%	75+25%	40+60%
	総 Abs (EU/mL)	1028	39875	34488	14343	7484	23714
	Nabs (ED50)	<カットオフ	36651	79618	1532	2276	12379

10

20

【 0 1 7 8 】

III 後6ヶ月のデータ

【表 3 9】

		CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
HPV-18	防御% (総+部分)	100%	100%	80%	100%	100%	100%
	総 Abs (EU/mL)	67637	68725	59129	101312	73996	51293
	Nabs (ED50)	74760	17801	56757	68843	50816	45063
HPV-6	防御% (総+部分)	0%	100%	100%	100%	100%	100%
	総 Abs (EU/mL)	1520	23106	8027	6158	3966	13317
	Nabs (ED50)	<カットオフ	54513	29170	1284	1619	17808
HPV-11	防御% (総+部分)	0%	100%	100%	100%	100%	100%
	総 Abs (EU/mL)	1244	21346	9157	5910	4275	10842
	Nabs (ED50)	<カットオフ	16153	8791	1413	2131	2645

10

20

## 【 0 1 7 9 】

・ CCCでのPsV-6およびPsV-11に対する防御の欠如は、総抗-HPV6/11応答のレベルの低さ、およびHPV-6および11に対する中和抗体の欠如と相関すると考えられる。

## 【 0 1 8 0 】

30

実施例3の結果 - 一般のハイライト：

免疫原性

## ・ 総抗体 (ELISA)

ワクチン接種後1および6ヶ月目にはHPV-18 ELISA抗体応答に対するCervarix(商標)の影響は認められなかった GGG ~ GCC ~ GGC

HPV-6 ELISAに対するCervarix(商標)の負の影響：CervarixはIII後1ヶ月目には既存のHPV-6応答を増強することはできなかった GGG > GCC ~ GGC

III後6ヶ月目でのHPV-6 ELISAに対するCervarix(商標) 2Xの負の影響が認められたが、GGGおよびGGCでは同様の応答が観察された GGG ~ GGC > GCC

III後1および6ヶ月目でのHPV-11 ELISAに対するCervarix(商標) 2Xの負の影響が認められたが、GGGおよびGGCについては同様の応答が観察された GGG ~ GGC > GCC

40

## ・ 中和抗体 (PBNA)

HPV-18に対する同様の中和抗体応答がPIII 1ヶ月で全てのワクチン接種スキームについて観察され、ワクチン接種後6ヶ月ではCCCと比較してGGGについてのみ低い応答が観察された。

Cervarix(商標)プライミングとその後の2回投与量のGardasil(商標)を古典的Gardasil(商標)3回投与と比較した場合、HPV-6および11に対する中和抗体応答は同様であった。

## 【 0 1 8 1 】

有効性 (膣内チャレンジマウスモデル)

50

・HPV-18：6通りのワクチン接種スキーム全てについてIII後6ヶ月まで高い持続性防御が認められた。

【0182】

#### 実施例3の総合的結論

Cervarix(商標)またはGardasil(商標)を用いた3回投与ワクチン接種スキームと比較した上での、Cervarix(商標)を用いたプライミングの付加価値は、本実験では確認されなかった。このことは、古典的D0/21/120スキームで観察された先のデータに比べてD0/45/120に相当するワクチン接種スケジュールと関連づけることができる。注目すべきは、CCCはGGと比較すると臨床において奏効した(Einsteinら2009を参照されたい)ようには奏効しなかったという点である。

10

【0183】

3回投与ワクチン接種スキームにおいて1または2回投与量のCervarix(商標)を用いたワクチン接種は、古典的Gardasil(商標)3回投与スキームと同様に、PsV-6および11に対して100%の完全防御を示す。さらに、通常のCervarix(商標)およびGardasil(商標)3回投与スキームでPsV-18に対する高い(80~100%)防御が観察されたが、かかる防御は混合ワクチンを注射した群でも観察された。これらのデータにより、Cervarix(商標)/Gardasil(商標)混合の潜在的な利益が確認される。

【0184】

3回投与量のCervarix(商標)を用いたワクチン接種後にはPsV-6およびPsV-11に対する防御は観察されず、これは臨床データと相関しており、またPsV-6/18および11に対する特異的応答および交差反応性応答との関連における腔内チャレンジマウスモデルの妥当性を示している。

20

【0185】

#### 実施例1、2および3の総合的結論

##### 免疫原性

血清学的データにより、Gardasil(商標)を用いた3回投与ワクチン接種スキームと比較した、Cervarix(商標)を少なくとも1X用いたプライミングの付加価値(総および中和HPV-16/18応答)が示された。HPV-11に対する総および中和抗体応答はまた、1回投与量のCervarix(商標)を用いたプライミングおよびその後の2回投与量のGardasil(商標)を用いた場合、古典的Gardasil(商標)3回投与と比較して、より高かった。3回投与のGardasil(商標)と比較したCervarix(商標)(1または2回投与量)を用いたプライミングの付加価値は、総抗-HPV6応答に関しては観察されたが、中和抗体に関しては観察されなかった。

30

【0186】

古典的Cervarix(商標)3回投与と比較すると、1回投与量(HPV-6および11)または2回投与量(HPV-16)のCervarix(商標)を用いたプライミングは、HPV-16/6および11に対してより高い総および中和応答を誘導する。

【0187】

これらのデータは、1/10 HDを用いた3回投与スキームでは観察されたが、1/50 HDを用いた場合は確認されなかった。このワクチン希釈物をD0-45-120スキームにおいて試験したところ、得られたデータは、通常のように、GGGと比較してCCCでより高い抗-VLP18応答を示すことはなかった。1/50 HDを用いた2回投与スキームにおいてはCervarix(商標)においてより高い抗-VLP18応答が維持されるという事実を踏まえると、D0-45-120ワクチン接種スケジュールはこの評価にとって最適であるとは考えられない。

40

【0188】

1回投与量のCervarix(商標)を用いたプライミングの付加価値は、1/50 HDを用いた2回投与スキームにおいては、2回投与量のGardasil(商標)と比較してより高い総抗-HPV18応答および同様の総抗-HPV11応答を示すことにより維持される。

【0189】

##### 有効性

各ワクチンについて1/50 HDを用いた3回投与(CCC、GGG、CCG、CGG、GCCもしくはGGC)ま

50

たは2回投与(CC、GG、CGもしくはGC)によるワクチン接種後に、有効性データを得た。

【0190】

PsV-18に対する特異的防御が、3回投与ワクチン接種スキーム全てでIII後6ヶ月まで示された。さらに、PsV-6およびPsV-11に対する100%の防御が、古典的3回投与Gardasil(商標)だけでなくGCC、GGC、CGGおよびCCGでも示され、この防御はワクチン接種後6ヶ月まで持続した。予想通り、3回投与量のCervarix(商標)を用いたワクチン接種後にはPsV-6およびPsV-11に対する交差防御は観察されなかった。

【0191】

驚くべきことに、PsV-11に対する100%の防御はCGを1/50 HD用いたワクチン接種後にも達成されたが、高レベルのELISA力価が誘導されたにもかかわらず中和抗体応答は認められなかった。3回投与ワクチン接種スキームと同様に、PsV-11に対する交差防御はCCでは観察されなかった。

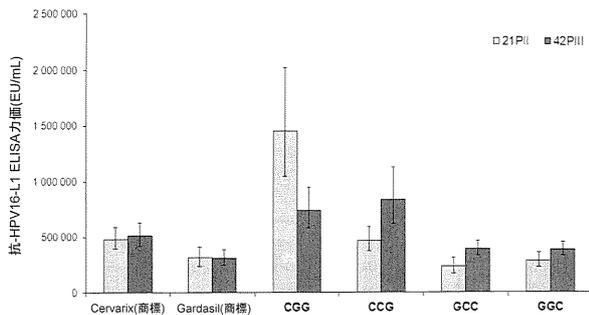
【0192】

これらのデータは、特定の型(HPV-18/6/11)に対する高レベルの防御を維持しながら、Cervarix(商標)/Gardasil(商標)ワクチンを混合する可能性を示すものである。CG、CCGおよびCGG免疫化スキームは、高リスクHPV型および性器疣贅に対する防御を同時に達成することから、優れた候補となりうる。

10

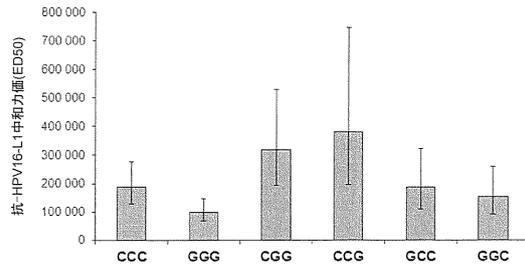
【図1】

総抗-HPV-16 L1 VLP抗体



【図3】

中和抗-HPV-16 L1 VLP抗体



【図4】

中和抗-HPV16応答に関する統計分析の要約表

【図2】

総抗-HPV-16応答に関する統計分析の要約表

総抗-VLP16応答(IIおよびIII後)

対Cervarix

	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P(II)	≤	>	<							
D42P(III)					≤	~	≥	~	~	~

対Gardasil

	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P(II)	≥	>	~							
D42P(III)					≥		>	>	~	~

> 有意に高い  
 ≥ より高い応答を示す傾向あり  
 ~ 同様

< 有意に低い  
 ≤ より低い応答を示す傾向あり

対Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	~	~	~	≥	~	~

対Gardasil

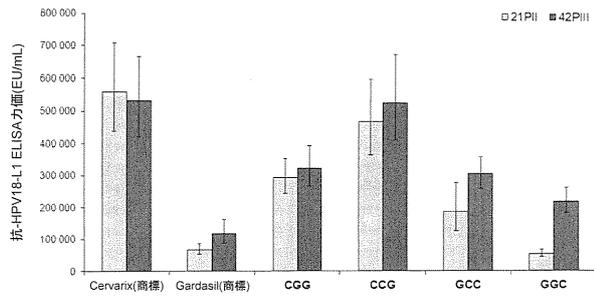
	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	~	~	>	>	~	~

> 有意に高い  
 ≥ より高い応答を示す傾向あり  
 ~ 同様

< 有意に低い  
 ≤ より低い応答を示す傾向あり

【 図 5 】

総抗-HPV-18 L1 VLP抗体



【 図 6 】

総抗-HPV18応答に関する統計分析の要約表  
総抗-VLP18応答(IIおよびIII後)

対Cervarix

	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P11	<	≤	<							
D42P11					<	≤	~	≤	<	

対Gardasil

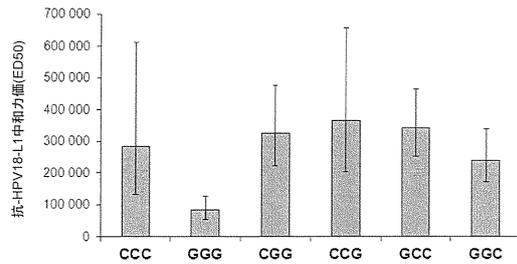
	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P11	>	>	>							
D42P11					>	>	>	>	>	≥

> 有意に高い  
≥ より高い応答を示す傾向あり  
~ 同様

< 有意に低い  
≤ より低い応答を示す傾向あり  
~ 同様

【 図 7 】

中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体



【 図 8 】

中和抗-HPV18応答に関する統計分析の要約表

対Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	<	~	~	~	~	~

対Gardasil

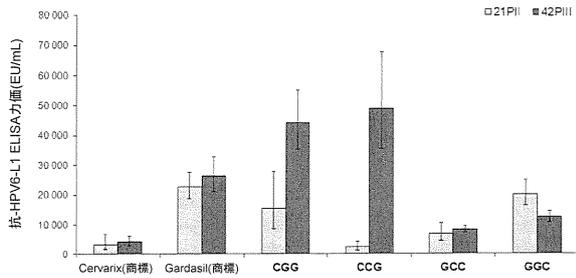
	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	>	>	>	>	>	>

> 有意に高い  
≥ より高い応答を示す傾向あり  
~ 同様

< 有意に低い  
≤ より低い応答を示す傾向あり  
~ 同様

【 図 9 】

総抗-HPV-6 L1 VLP抗体



【 図 1 0 】

総抗-HPV6応答に関する統計分析の要約表  
総抗-VLP6応答(IIおよびIII後)

対Cervarix

	C	G	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P11					>	>						
D42P11							>	>	>	>	≥	>

対Gardasil

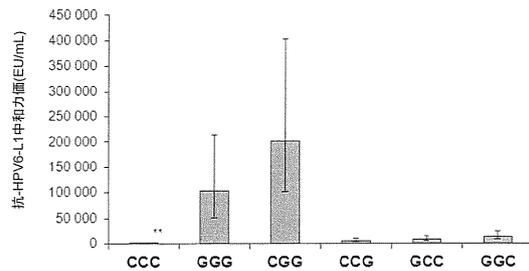
	C	G	CC	GG	CG	GC	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D21P11	<		~	<								
D42P11							<	≥	≥	<	<	<

> 有意に高い  
≥ より高い応答を示す傾向あり  
~ 同様

< 有意に低い  
≤ より低い応答を示す傾向あり  
~ 同様

【 図 1 1 】

中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体



\*\* : 陽性応答なし; カットオフ値と同等のデータ

【 図 1 2 】

中和抗-HPV6応答に関する統計分析の要約表

対Cervarix

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	>	>	>	>	>	>

対Gardasil

	CCC	GGG	CGG	CCG	GCC	GGC
D162	<	<	~	<	<	<

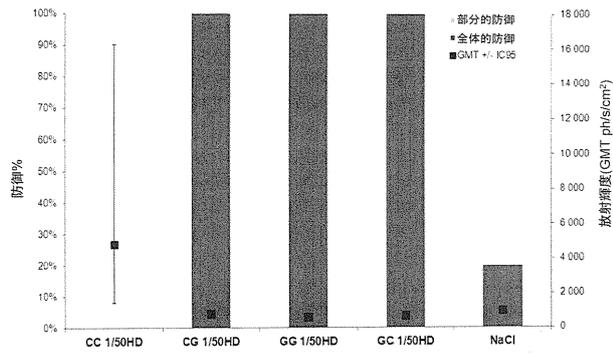
> 有意に高い  
≥ より高い応答を示す傾向あり  
~ 同様

< 有意に低い  
≤ より低い応答を示す傾向あり  
~ 同様



【 図 2 1 】

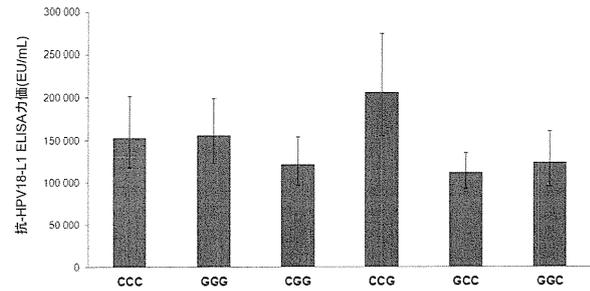
II後1Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)



\* 室内チャレンジのばらつきのため、NaCl群における防御(完全または部分的防御)の最大20%を許容する。

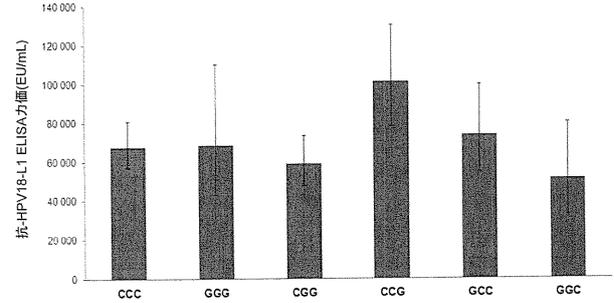
【 図 2 2 】

1M PIIIでの総抗-HPV-18 L1 VLP抗体(ELISA/20100801)



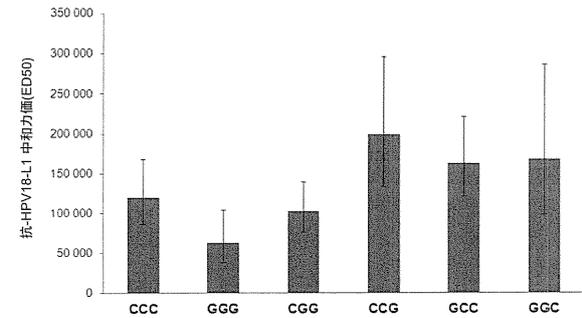
【 図 2 3 】

6M PIIIでの総抗-HPV-18 L1 VLP抗体(ELISA/20100810)



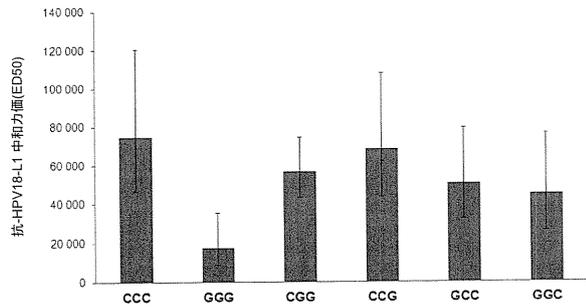
【 図 2 4 】

1M PIIIでの中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体(PBNA/20100801)



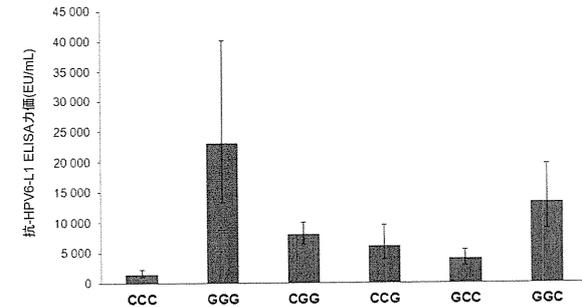
【 図 2 5 】

6M PIIIでの中和抗-HPV-18 L1 VLP抗体(PBNA/20100810)



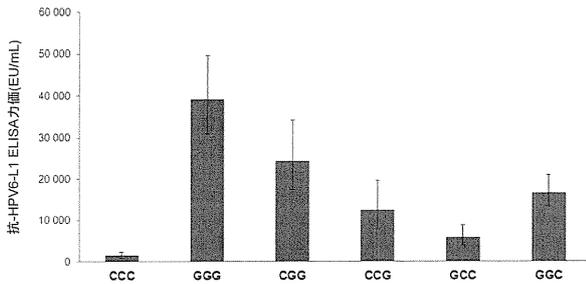
【 図 2 7 】

6M PIIIでの総抗-HPV-6 L1 VLP抗体(ELISA/20100810)



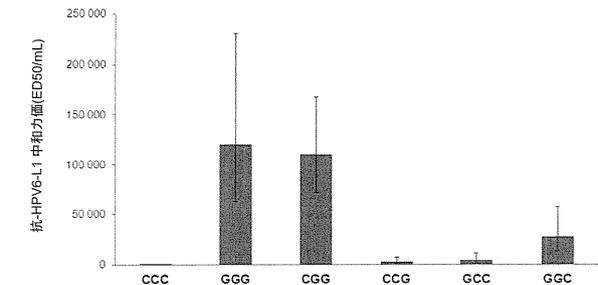
【 図 2 6 】

1M PIIIでの総抗-HPV-6 L1 VLP抗体(ELISA/20100801)



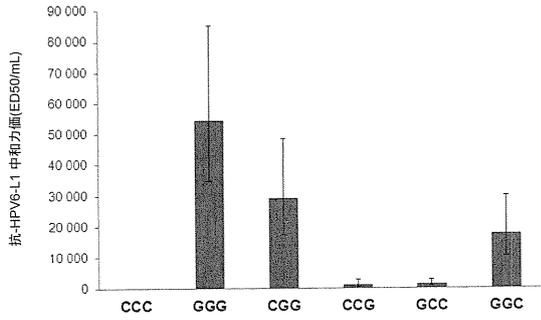
【 図 2 8 】

1M PIIIでの中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体(PBNA/20100801)



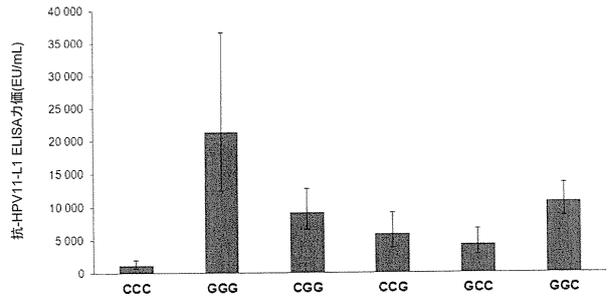
【 図 2 9 】

6M PIIIでの中和抗-HPV-6 L1 VLP抗体(PBNA/20100810)



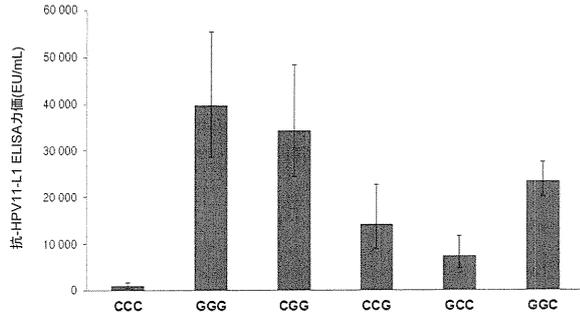
【 図 3 1 】

6M PIIIでの総抗-HPV-11 L1 VLP抗体(ELISA/20100810)



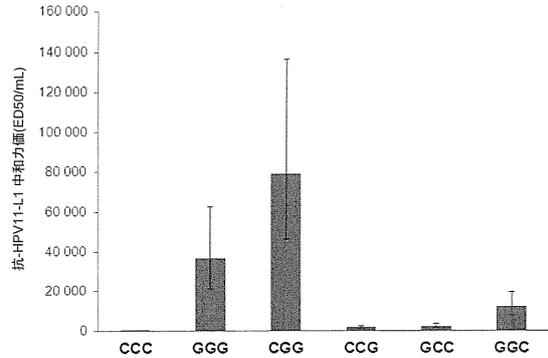
【 図 3 0 】

1M PIIIでの総抗-HPV-11 L1 VLP抗体(ELISA/20100801)



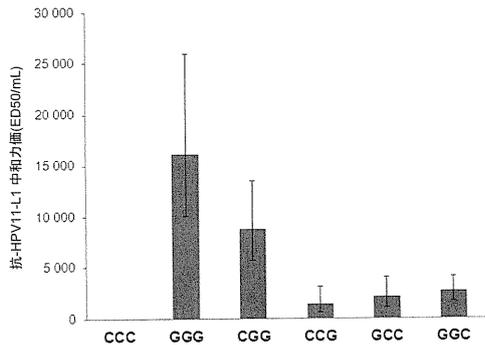
【 図 3 2 】

1M PIIIでの中和抗-HPV-11 L1 VLP抗体(PBNA/20100801)



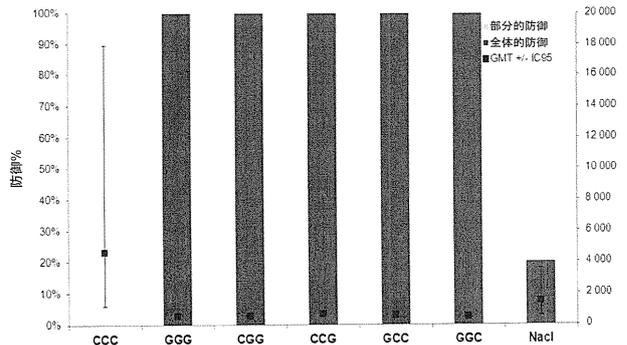
【 図 3 3 】

6M PIIIでの中和抗-HPV-11 L1 VLP抗体(PBNA/20100810)



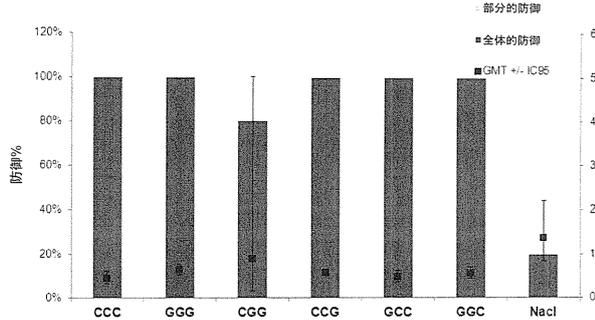
【 図 3 5 】

III後1Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm²)(20100801)→PsV6



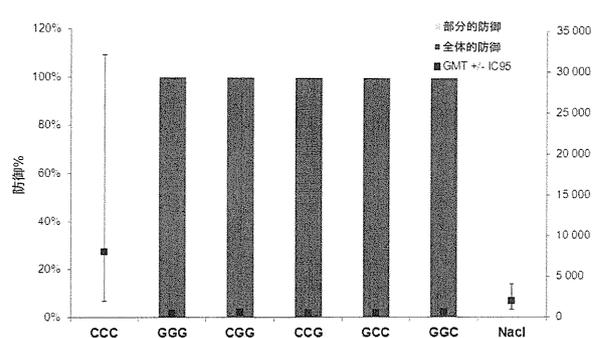
【 図 3 4 】

III後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm²)(20100810)→PsV18



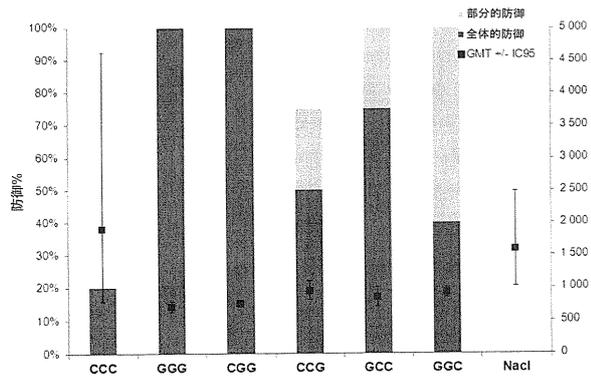
【 図 3 6 】

III後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm²)(20100810)→PsV6



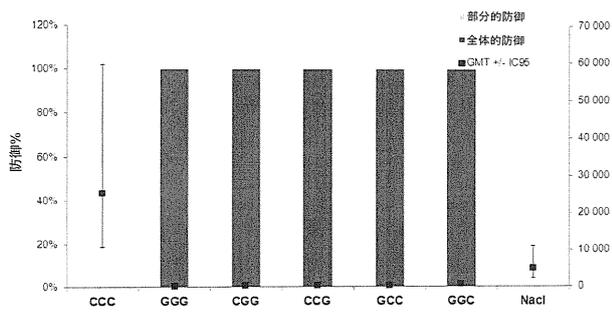
【 図 3 7 】

III後1Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(20100801)→PsV11



【 図 3 8 】

III後6Mでの比較防御率および生物発光シグナル(放射輝度、Ph/Sec/cm<sup>2</sup>)(20100810)→PsV11



【 配 列 表 】

2015514696000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/055582

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/055582

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K39/12 A61K39/39 A61P31/20 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIANNINI S L ET AL: "Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 24, no. 33-34, 14 August 2006 (2006-08-14), pages 5937-5949, XP028011066, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2006.06.005 [retrieved on 2006-08-14] e.g. abstract; page 5939, section 2.2.1 and 2.2.3; the whole document ----- -/--	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  27 June 2013		Date of mailing of the international search report  04/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Gruber, Andreas

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/055582

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LEE H J ET AL: "Development of a novel viral DNA vaccine against human papillomavirus: ACHERV-HP16L1", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 6, 10 February 2010 (2010-02-10), pages 1613-1619, XP026884490, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.11.044 [retrieved on 2009-12-02] e.g. abstract; the whole document</p> <p>-----</p>	1-34
Y	<p>W0 2010/149752 A2 (GLAXOSMITHLINE BIOLOG S A [BE]; BAUDOUX GUY JEAN MARIE FERNAND PIERRE) 29 December 2010 (2010-12-29) e.g. paragraph 200, 201; the whole document</p> <p>-----</p>	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/055582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010149752 A2	29-12-2010	AU 2010264695 A1	19-01-2012
		CA 2768172 A1	29-12-2010
		CN 102497880 A	13-06-2012
		CO 6480995 A2	16-07-2012
		CR 20120026 A	13-04-2012
		DO P2011000396 A	15-02-2012
		EA 201190327 A1	30-07-2012
		EP 2445525 A2	02-05-2012
		JP 2012530505 A	06-12-2012
		KR 20120098580 A	05-09-2012
		MA 33440 B1	03-07-2012
		PE 05632012 A1	17-05-2012
		SG 177269 A1	28-02-2012
		US 2012087937 A1	12-04-2012
WO 2010149752 A2	29-12-2010		
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 コラウ, プリジット, デジレ, アルベール

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9, グラクソスミスクライン

(72)発明者 ジャンニーニ, サンドラ

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9, グラクソスミスクライン

(72)発明者 ロックマン, ローレンス

ベルギー ベー - 1 3 3 0 ワーブル, アベニュー フルミング 2 0, グラクソスミスクライン

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA51 EE01 EE06 FF02 FF14

4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA86 EA20 EA31 FA74