

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5198712号
(P5198712)

(45) 発行日 平成25年5月15日 (2013.5.15)

(24) 登録日 平成25年2月15日 (2013.2.15)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/385	(2006.01)	A 6 1 K 39/385	Z N M
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P 33/06	

請求項の数 25 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-526413 (P2002-526413)
(86) (22) 出願日	平成13年9月14日 (2001.9.14)
(65) 公表番号	特表2004-507566 (P2004-507566A)
(43) 公表日	平成16年3月11日 (2004.3.11)
(86) 国際出願番号	PCT/AU2001/001160
(87) 国際公開番号	W02002/022164
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002.3.21)
審査請求日	平成20年9月11日 (2008.9.11)
(31) 優先権主張番号	PR 0117
(32) 優先日	平成12年9月14日 (2000.9.14)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)
(31) 優先権主張番号	PR 4888
(32) 優先日	平成13年5月10日 (2001.5.10)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)

(73) 特許権者	502279319
	ジ・オースティン・リサーチ・インスティテュート
	オーストラリア・ヴィクトリア・3084
	・ハイデルベルグ・スタッドレイ・ロード
	・エー・アンド・アールエムシー・クロン
	ハイマー・ビルディング・(番地なし)
(74) 代理人	100064908
	弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	100108578
	弁理士 高橋 詔男
(74) 代理人	100089037
	弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	100101465
	弁理士 青山 正和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性微粒子を含む組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

0.03 μm から 0.10 μm の平均粒径を有する微粒子及び前記微粒子表面と共有結合した抗原を含む免疫原性組成物であって、対象となるヒトまたは動物への免疫付与により、前記抗原に対して細胞性免疫応答を生産する、組成物。

【請求項 2】

前記微粒子が 0.03 μm から 0.05 μm の平均粒径を有する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記微粒子が 0.04 μm から 0.049 μm の平均粒径を有する、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 4】

前記微粒子が実質的に均一な大きさである請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記微粒子が固体コアを有する請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記微粒子がラテックス、鉄分子、金、ガラス、リン酸カルシウム、ポリスチレン、ポリリシン G、生分解性ポリマー、生体適合性ポリマー、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記微粒子が前記対象となるヒトまたは動物において樹状細胞によって取り込まれることが可能な、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記樹状細胞が D E C 2 0 5 +、C D 4 0 + または C D 8 6 + 細胞である、組成物。

【請求項 8】

前記抗原がペプチド、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗原が病原体、組織、細胞器官または分子に由来し、下記：

花粉、C 型肝炎ウイルス (H C V) コア、E 1、E 2 および N S 2 タンパク質、P . v i v a x、P . f a l c i p a r u m のスポロゾイト周囲タンパク質 (c i r c u m s p o r o z o i t e p r o t e i n (C S))、ヒト P . f a l c i p a r u m、P . v i v a x、P . o v a l a e、および P . m a l a r i a e、T R A P、M S P - 1、M S P - 2、M S P - 3、M S P - 4、M S P - 5、A M A - 1、R E S A、S A L S A、S T A R P、L S A 1 および L S A 3 からなる群から選択されるマラリア原虫 (P l a s m o d i u m) 種由来抗原、H I V - g p 1 2 0 / 1 6 0 エンベロープ糖タンパク質、連鎖球菌表面タンパク質抗原、インフルエンザ核タンパク質、ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ表面感染タンパク質、T c p A ピリン (p i l i n) サブユニット、V P 1 タンパク質、L M C V 核タンパク質、リーシュマニア属の主要表面糖タンパク質 (g p 6 3)、百日咳 (B o r d e t e l l a p e r t u s s i s) 表面タンパク質、狂犬病ウイルス G タンパク質、連鎖球菌 M タンパク質、ブドウ状球菌タンパク質、ヘリコバクター・ピロリ (H e l i c o b a c t e r p y l o r i) タンパク質、合胞体 (S y n c y t i c i a l) ウイルス (R S V) F または G タンパク質、エプスタイン - バー・ウイルス (E B V) g p 3 4 0 または核抗原 3 A、ヘマグルチニン、ボレリア・ブルグドルフェリ (B o r r e l i a b u r g d o r f e r i) 表層タンパク質 (O s p : o u t e r s u r f a c e p r o t e i n) A、ヒト型結核菌 (M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s) 3 8 k D リボタンパク質または 3 0 k D タンパク質 (A g 8 5)、1 0 k D または 6 5 k D タンパク質、ナイセリア・メニンギチディス (N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s) クラス 1 表層タンパク質、水痘帯状疱疹ウイルス I E 6 2 および g p 1、風疹ウイルス・キャプシド・タンパク質、B 型肝炎ウイルス p r e S 1 a g、単純疱疹ウイルス・タイプ I 糖タンパク質 G または g p D もしくは C P 2 7、マレーバレー脳炎ウイルス E 糖タンパク質、A 型肝炎ウイルス V P 1、ポリオ・ウイルス・キャプシド・タンパク質 V P 1、V P 2 および V P 3、クラミディア・トラコマティス (c h l a m y d i a t r a c h o m a t i s) 表面タンパク質、B 型肝炎ウイルス・エンベロープ A g p r e S 2、ヒト・ライノウイルス (H R V) キャプシド、ガン遺伝子 E 6 および E 7 由来の乳頭腫ウイルス・ペプチド、リステリア菌表面タンパク質、水痘ウイルス・エンベロープ・タンパク質、ワクシニアウイルス・エンベロープ・タンパク質、ブルセラ菌表面タンパク質、ロタウイルス V P - 3、V P - 4、V P - 5、V P - 7 および V P - 8、前記抗原の 1 種または複数の組合せ、長さにして 5 個以上のアミノ酸を含む前記抗原のアミノ酸サブユニットおよび前記サブユニットの 1 種または複数の組合せからなる群から選択される請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗原が乳ガン抗原、肺ガン抗原、膵臓ガン抗原、結腸ガン抗原および黒色腫抗原からなる群から選択される請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記抗原が組換えペプチドまたはタンパク質である請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗原との共有結合の後に、前記微粒子がグリシン、アルコール、アミンまたはアルデヒドから選択されるクエンチング剤でクエンチされる、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記対象となるヒトまたは動物への免疫付与により、さらに体液性免疫応答を提供し、前記体液性免疫応答が前記抗原に対する免疫グロブリン G、免疫グロブリン M または免疫グロブリン A から選択される、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記組成物の単回投与に続いて前記抗原に対する前記細胞性免疫応答が誘発される、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記細胞性免疫応答が C D 8 免疫応答を含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

樹状細胞による前記微粒子の取込みの後に、前記細胞性免疫応答が前記樹状細胞の増殖および/または発達および/または成熟および/または刺激により促進される、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

対象である哺乳動物における *in vivo* での樹状細胞による抗原の取込みを刺激するための、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

対象である哺乳動物における *in vivo* での樹状細胞による抗原の取込みの刺激用組成物であって、0.03 μm から 0.10 μm の平均粒径を有する有効量の微粒子及び前記微粒子表面と共有結合した抗原を含み、*in vitro* における樹状細胞による微粒子の取込みが酢酸ミリスチン酸ホルボール (PMA) により阻害される、組成物。

【請求項 1 9】

前記対象に対して、経口での、吸入による、粘膜表面もしくは粘膜部を介した投与による、または皮下、皮内、筋肉内、腹膜内もしくは静脈への注入による、投与に適している、請求項 1 7 または 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記対象に対して、粘膜表面もしくは粘膜部を介した投与による、または皮下、皮内、筋肉内もしくは腹膜内への注入による、投与に適している、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記樹状細胞による前記抗原の取込みが前記対象における前記抗原に対する細胞性免疫応答を促進する、請求項 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記抗原に対する細胞性免疫応答が前記組成物の単回投与に続いて誘発される、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記細胞性免疫応答が C D 8 免疫応答を含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記樹状細胞による前記抗原の取込みが前記抗原に対する体液性免疫応答をも促進し、前記体液性免疫応答が前記抗原に対する免疫グロブリン G、免疫グロブリン M または免疫グロブリン A から選択される、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の組成物を含むワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫原性組成物、ワクチン組成物、患者における免疫応答を誘発する方法およびこれらの組成物の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトや動物の免疫系の操作は、ある種の疾病や症状を回避しまたは治療する方法として知

10

20

30

40

50

られている。

【 0 0 0 3 】

免疫系が疾病をコントロールするメカニズムは、中和抗体の誘導(体液性免疫応答)および細胞性応答すなわちT細胞応答の発生を含む。後者はヘルパーT細胞(T_H)および細胞毒性Tリンパ球(CTL)を含む。ウイルス感染(例えばポリオ、肝炎)の例で言えば、抗体はウイルスが細胞に感染するのを防ぐことにより保護をもたらす。抗体はまた、殺菌メカニズムを用いたりバクテリア毒素を中和することによって、バクテリア(例えば肺炎球菌、ブドウ球菌)からの保護を果たすことができる。

【 0 0 0 4 】

抗原からのペプチド断片がMHC IまたはMHC II(major histocompatibility complex;主要組織適合性複合体クラスIまたはクラスII)として知られている分子に結合し、DC(dendritic cell;樹状細胞)またはマクロファージなどの専門のAPC(antigen presenting cell;抗原提示細胞)の表面に示されたときには、T細胞が刺激され得る。T細胞は抗原受容体を有しており、これを用いて細胞表面における抗原由来ペプチド断片の存在をモニターしている。 T_H 細胞上の抗原受容体は、MHC II分子に結合した抗原ペプチドを認識する。これとは対照的に、CTL上の受容体はクラスI分子に対して示される抗原と反応する。

10

【 0 0 0 5 】

T細胞が病原体に感染した標的細胞またはそれが認識するエピトープを含む細胞を認識した場合、一連のイベントが生起され、刺激されたT細胞は免疫応答を増幅し、これらは最終的には、感染細胞の死をもたらす。さらに、T細胞の中には、サイトカインやリンホカインの分泌を刺激し得るものもあり、その結果、最終的には病原体の不活性化または根絶に結びつく効果を及ぼす。

20

【 0 0 0 6 】

多くのワクチンが出回っているが、多数の疾病や症状に対しより効果を有し広い範囲に効果の及ぶワクチンの製造が求められている。また、現時点でワクチンがないか効果がない感染因子(infective agent)や病原体からの保護の必要も残る。さらに、有効な単回服用ワクチン(それは、経済的理由や送達のしやすさの点で、また、患者や被治療者の服薬順守の点で特に望ましい)も求められている。

【 0 0 0 7 】

ほとんどのワクチンは、免疫学的に有効になるように様々なタイプの体液性応答と細胞性応答とを最適の組合せで誘導することができないという問題点を有する。例えば、抗体と細胞性応答の両者が働けばより有効と思われる場合に、抗体応答しか刺激しないワクチンもある。別の例では、対象とする感染因子からの保護を達成するためにはワクチンの多数回投与、例えば、追加刺激注射(booster shots)が必要とされる。

30

【 0 0 0 8 】

他のいくつかの例では、IgA、IgGおよびIgMなどの他の所望の免疫グロブリンと共にIgE生産が誘導される。免疫グロブリンはアレルギー反応に関係するので、IgEを誘導するワクチンは望ましくない。

【 0 0 0 9 】

IgA生産の刺激は粘膜部位または表面を通して侵入して感染する病原体に対する「最前線」防御である。したがって、IgE生産を増大せず、高IgA分泌免疫応答を生じさせることができるワクチンも有用であろう。

40

【 0 0 1 0 】

さらに他の例を挙げると、ワクチンはAPCの刺激をもたらすが、免疫の刺激の程度は最適値以下である。例えば、樹状細胞すなわちDCは、表面分子によって互いに識別可能な一連の細胞部分集合として特徴付けられるが、この表面分子がT細胞上の受容体と結合する特異的リガンドであるものもある。従って、DCの部分集合(例えば、効率的なCD8 T細胞プライミングが可能な部分集合)を選択的に標的とするワクチンを生産することが望ましいであろう。これらのT細胞は多くの細胞内病原体およびガンに対する保護免疫に重大な役割を果たすが、誘導することが悪評高いほどに困難だからである。

50

【 0 0 1 1 】

さらに、ワクチンに関して、細胞外抗原は、ほとんどの細胞において伝統的にMHC-I処理経路に入らない。アポトーシスを起こす細胞、免疫複合体および粒子の取込みを経由するAPC中でのクラスIプロセッシングおよび提示の代替ルートが提案されているが[1]、一般に、不活化ワクチンを使用するCTL免疫の生産はありそうもない。B型肝炎表面タンパク質または酵母レトロトランスポゾン・タンパク質粒子からなる非感染性ウイルス様粒子(VLP)は、マクロファージによってMHC I提示に適したかたちに効率的に処理されin vitroでもin vivoでもCD8 CTL応答を誘導することが示されている[2、3]。VLPは、脂質含有量が乾燥重量の50%以上の多量体(multimeric)脂質含有タンパク質粒子である。

【 0 0 1 2 】

しかし、B型肝炎コアタンパク質粒子は免疫原ではなく脂質含有量が低い。このため、VLPはその大きさによってではなく生化学組成によって免疫原になっているのではないかとの提案がなされた。これは、抗原を脂質または洗剤を含む処方中で提示すると、恐らくは細胞膜の破損によりAPCと融合し、この結果細胞質に取り込まれるようになるという提案と矛盾しないであろう。

【 0 0 1 3 】

内部に抗原を封じ込めたミクロスフェアの使用については、ワクチン組成物としての可能性が検討されている。ミクロスフェアは、乳酸やグリコール酸(PLAおよびPLGA)の生分解性ポリエステルで作られる。ミクロスフェアは、そのサイズおよびポリマー組成物により分解速度をコントロールするように形成する。ミクロスフェアが分解するにつれ、封じ込められていた抗原がそこから放出され、抗原の抑制された放出をもたらして免疫応答を刺激する。これらの分子が、細胞膜と生体適合性をもつタンパク質粒子と同じように免疫細胞と接して反応する可能性は低いだろう。

【 0 0 1 4 】

しかし、この形態のワクチン組成物の難点として、抗原の安定性、スフェアの大きさや抗原放出の動力学といった点があり、良好な抗原性および持続的免疫性を備えたワクチンを生産し、また経済的に製造し投与できるワクチンを生産するためには、これらを全て解決する必要がある[4]。

【 0 0 1 5 】

米国特許第4,225,581号には、大きさに広がりのある外来粒子混合物を含む組成物が、重合体の粒子表面上に吸着された抗原を身体に送達するのに有用であると記載されている。しかし、こうしたワクチンによって送達が可能になったこと、抗原性および免疫性は具体例も証明もない。特に、CD8 T細胞応答の誘導について言及はなく、MHCクラスI提示経路へのプロセッシングについてさえ言及がない。この微粒子の重合体の材料が上記のようなPLAまたはPLGAの微粒子と同様の特性を持つと予想されるであろう。

【 0 0 1 6 】

したがって、ワクチンの一部として投与する粒子の大きさ自体が免疫原の応答を誘導し得るかについては本発明以前には知られていなかった。

【 0 0 1 7 】

本発明に至る研究において、本発明者は、驚くべきことに、抗原を伴うウイルスとほぼ同じ大きさの微粒子が被治療者に強い細胞性および体液性抗体応答をもたらすという事実を見出した。

【 0 0 1 8 】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】

本発明の第1の実施形態では、ウイルスと同じ大きさの範囲にある微粒子と結合した少なくとも1つの抗原を含む免疫原の組成物を提供する。

【 0 0 1 9 】

免疫原組成物に関して使用する「含む」という用語は、組成物が抗原および微粒子を含むことを意味する。それは他の成分を含んでもよい。

【 0 0 2 0 】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘発することができる任意の分子、部分または実体を指す。この中には、細胞性および/または体液性免疫応答が含まれる。組成物に意図した機能によっては、1つ以上の抗原を含んでもよい。

【0021】

抗原はペプチド、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、他のタイプの分子またはこれらのうちのいずれかの組合せでもよい。

【0022】

抗原は、組成物に意図した目的により、病原体、組織、細胞、器官または分子に由来するものでもよいし、精製された抗原でもよいし、バクテリア、酵母または細胞培養などの適切なベクターにより生成した組換え体由来のものでもよい。病原体は、例えば任意の病原体でもよく、細胞内病原体や細胞外病原体、抗原性部分またはその一部、HIV、インフルエンザ・ウイルス、肝炎ウイルス、マラリアなど、ウイルス、バクテリア、原生動物に由来するものでもよい。特に本発明が想定する抗原の例は以下のとおりである：花粉、C型肝炎ウイルス、(HCV)コア、E1、E2およびNS2タンパク質、プラスモジウム・ファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) のスポロゾイト周囲タンパク質 (circumsporozoite protein (CS)) やヒト *P. falciparum*、*P. vivax*、*P. ovale*、*P. malariae* を含む *P. vivax* その他のマラリア原虫種などのマラリア原虫 (*Plasmodium*) 種由来抗原、TRAP、MSP-1、MSP-2、MSP-3、MSP-4、MSP-5、AMA-1、RESA、SALSA、STARP、LSA1およびLSA3、HIV-gp120/160エンベロープ糖タンパク質、連鎖球菌表面タンパク質Ag、インフルエンザ核タンパク質、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ表面感染タンパク質、TcpAピリン (pilin) サブユニット、VP1タンパク質、LMCV核タンパク質、リーシュマニア属の主要表面糖タンパク質 (gp63)、百日咳 (*Bordetella pertussis*) 表面タンパク質、狂犬病ウイルスGタンパク質、連鎖球菌Mタンパク質、ブドウ球菌またはヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) タンパク質、合胞体 (Syncytial) ウイルス (RSV) FまたはGタンパク質、エプスタイン-バー・ウイルス (EBV) gp340または核抗原3A、ヘマグルチニン、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 表層タンパク質 (Osp: outer surface protein) A、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 38kDリポタンパク質または30kDタンパク質 (Ag85)、10kDまたは65kDタンパク質、ナイセリア・メニンギチディス (*Neisseria meningitidis*) クラス1表層タンパク質、水痘帯状疱疹ウイルスIE62およびgp1、風疹ウイルス・キャプシド・タンパク質、B型肝炎ウイルスpreS1ag、単純疱疹ウイルス・タイプI糖タンパク質GまたはgpDもしくはCP27、マレーバレー脳炎ウイルスE糖タンパク質、A型肝炎ウイルスVP1、ポリオ・ウイルス・キャプシド・タンパク質VP1、VP2、VP3およびVP6、クラミディア・トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*) 表面タンパク質、B型肝炎ウイルス・エンベロープAgpreS2、ヒト・ライノウイルス (HRV) キャプシド、ガン遺伝子E6およびE7由来の乳頭腫ウイルス・ペプチド、リステリア菌表面タンパク質、水痘ウイルス・エンベロープ・タンパク質、ワクシニアウイルス・エンベロープ・タンパク質、プルセラ菌表面タンパク質、ロタウイルスVP-3、VP-4、VP-5、VP-7およびVP-8、前記抗原の1種または複数の組合せ、5個以上のアミノ酸を含む前記抗原のアミノ酸サブユニットまたは前記サブユニットの1種または複数の組合せ。

【0023】

例として挙げた病原体から得られる溶解物または培養液を抗原として使用してもよい。それらが抗原性および/または免疫性をもたらず限り、そうした画分は精製、濃縮または希釈した形としてもよい。したがって、本発明によれば、患者の腫瘍溶解物や腫瘍タンパク質の特異的セット抗原を微粒子に結合することにより、患者に応じて免疫原組成物を「テ

10

20

30

40

50

ーラーメードで」作成することができる。

【0024】

抗原は任意の腫瘍タイプまたは悪性腫に由来するものでもよい。抗原がガン由来の場合、そのタイプの例としては乳ガン、肺ガン、膵臓ガン、および結腸ガンおよび黒色腫が挙げられる。腫瘍から得られる特異的抗原の別の例は、黒色腫特異的抗原(例えば、MAGEシリーズ抗原)、結腸由来のガン胎児性抗原(CEA)、nm23ガン抗原および他のガン抗原、または任意の腫瘍から抽出された実際の抗原、例えば、MUC-1～MUC-7抗原などのムチンである。組換えペプチドまたはタンパク質を単独でまたは組合せて使用してもよい。

【0025】

抗原はさらに、上に挙げた1種または複数の抗原に基づく模倣物(mimic)またはペプチドミメティック(peptidomimetic)などの合成エピトープでもよい。

10

【0026】

「結合した」という用語は、微粒子と抗原の間の結合を指す。これは吸着によるものでも、複合体形成、共有結合によるものでもよい。好ましくは、抗原は、微粒子に共有結合で結合する。さらにより好ましくは、抗原は微粒子表面に結合する。

【0027】

微粒子という用語は小さな粒子を指す。これは、ビーズ状もしくは球状または他の適当な形とすることができる。

【0028】

本願では、「ウイルス・サイズの粒子」(VSP)という用語は、本発明の免疫原組成物のある実施形態について説明するために使用する。用語VSPは便宜上用いられるだけであり、本発明が既知のウイルス・サイズに限定されないことが理解されるべきである。例えば、未知のウイルスと同じサイズの粒子も本発明が想定するものである。

20

【0029】

本発明の微粒子は、中空であるか分子をカプセルに入れる従来技術のミクロスフェアとは異なるものとして、好ましくは、複合化または結合する抗原に安定性をもたらす固体コアを有する。抗原が粒子の表層に存在する場合、本願では便宜上これをウイルス・サイズの固体粒子(VSSP:virus sized solid particles)と呼ぶ。VSSPを作るために使用する粒子は、メーカーから入手可能で実質的に均一のサイズ(つまり規定サイズの $\pm 10\%$ 以内)である。

30

【0030】

「固体コア」という用語は、実質的に固体である(つまり、粒子は中空ではない)ことを意味する。免疫原の組成物の機能を低めるものでない限り、微粒子は任意の適当な材料から構成されるものでよい。したがって、微粒子は、ラテックス、鉄分子、金(金のナノ粒子など)、ガラス、リン酸カルシウム、ポリスチレンまたはPLG(ポリリシン)などの生分解性かつ生体適合的なポリマー材料などで作ることができる。好ましくは、微粒子はポリスチレン、PLGまたは金から構成される。最も好ましくは、微粒子はポリスチレン製である。

【0031】

微粒子は、既知のウイルスと同じサイズ内にある。これは、微粒子が好ましくは約 $0.50\mu\text{m}$ 未満であることを意味する。好ましくは、微粒子は、免疫応答を誘発するのに適合したサイズである。特にそれは、人間のまたは動物被験者の抗原提示細胞による取込みに適合したものである。より好ましくは、微粒子は、約 0.03 と $0.50\mu\text{m}$ の間、好ましくは約 0.03 と $0.15\mu\text{m}$ の間、さらに好ましくは、約 0.03 と $0.10\mu\text{m}$ の間である。さらにより好ましくは、微粒子は約 0.03 と $0.05\mu\text{m}$ の間であり、より好ましくは微粒子は約 $0.03\mu\text{m}$ と $0.049\mu\text{m}$ の間であり、さらにより好ましくは微粒子は、 0.03 と $0.04\mu\text{m}$ の間または 0.04 と $0.049\mu\text{m}$ の間である。

40

【0032】

好ましい実施形態では、本発明に従って使用する微粒子の集合、例えば、ワクチンの1回投与分は均一のサイズである。これは、与えられた集合中の大多数の粒子が規定のサイズ

50

であることを意味する。

【0033】

好ましくは、微粒子/抗原組成物は細胞性および/または体液性の免疫応答を誘発するのに特に適合したものである。細胞性応答は、好ましくは T_H 細胞、特にIFNおよびIL-4産生T細胞、CTL、特にCD8 CTLおよびB細胞の活性化、成熟または増殖からなる群から選択される。好ましくは、微粒子/抗原組成物は、抗原のMHCクラスI提示メカニズムを誘発する。これは、カヴェオール(caveole)および/またはクラスリン(clathrin)ピットが関わる従来未知のメカニズムによって開始され、実施例4および7で説明するようなRab 4非依存およびTAP依存プロセスによってさらにプロセッシングされる。体液性応答は、好ましくは、IgA、IgD、IgG、IgMおよびそのサブクラスからなる群から選択される。

10

【0034】

免疫応答の増加や増幅を支援する細胞を組成物によって刺激してもよい。これらの例としては、骨髄またはリンパ(その両方)起源のDCなどのAPCおよびマクロファージが含まれるがこれらに限定されない。これらの細胞の成熟、活性化または増殖が想定されるが、T細胞、例えば、CD 40、CD 80およびCD 86と相互作用する、前記細胞に対する共同刺激的なリガンドまたは分子も同様である。

【0035】

本発明の免疫原組成物は、抗原との接触により、またはこれに伴って引き起こされる疾病や症状の治療、予防または防止に使用することができる。例えば、組成物は、ある種のガンの治療や予防に使用することができる。

20

【0036】

別の実施形態では、本発明は、少なくとも1つの抗原を結合した微粒子(ここで、微粒子はウイルスと同じ範囲の大きさである)を含むワクチン組成物を提供する。本発明の組成物はそのままでも単回投与ワクチンとして特に有用で効果があるが、多数回投与療法において使用してもよい。

【0037】

したがって、本発明は、1つの実施形態では、少なくとも1つの抗原を結合した微粒子(ここで微粒子はウイルスと同じ範囲の大きさである)を含む単回投与ワクチン組成物を提供する。

【0038】

「単回投与」は、組成物またはワクチンの1回の投与によって、体液性および/または細胞性の免疫応答を最大のレベル(「最大」とはワクチン投与を繰り返してもさらに増加させることができないレベルを意味する)に刺激ないし増強し、または組成物の受容者に保護を与えることを意味する。投与は任意の適当な手段、例えば、注入(i.m、i.p、i.v)、経口投与、吸入、あるいは粘膜表面または粘膜部を通しての投与によって行うことができる。

30

【0039】

好ましくは、抗原は微粒子の表面に結合する。微粒子のサイズは、直径で約0.03と0.5 μm の間、好ましくは約0.03~0.15 μm 、より好ましくは約0.03~0.10 μm 、さらに好ましくは0.03~0.05 μm 、さらに好ましくは約0.03~0.049 μm である。さらに好ましくは0.03~0.04 μm または0.04 μm ~0.049 μm である。微粒子は、最も好ましくはポリスチレン、PLG、ガラス、リン酸カルシウムまたは金から構成される。好ましい実施形態では、本発明に従って使用する抗原はそれぞれ均一のサイズの微粒子に結合する。

40

【0040】

別の実施形態では、本発明は、少なくとも1つの抗原を結合した、ウイルスと同じ範囲の大きさの微粒子を含む、体液性免疫応答および細胞性免疫応答を開始できる単回投与ワクチン組成物を提供する。

【0041】

細胞性応答は、好ましくは T_H 細胞、CTLおよびB細胞の刺激、成熟または増殖からなる群から選択される。体液性応答は、好ましくは、IgA、IgG、IgMおよびそのサブクラスからな

50

る群から選択される。好ましくは、IgG、IgAおよび/またはIgM応答が刺激される。

【0042】

免疫応答の開始または増幅を支援する細胞を組成物によって刺激してもよい。これらの中には骨髄またはリンパ(その両方)起源のDCなどのAPCおよびマクロファージが含まれるがこれらに限定されない。これらの細胞の成熟、活性化または増殖が想定される。

【0043】

「含む」という用語は上記と同じ意味である。

【0044】

微粒子という用語は上記と同じ意味である。好ましくは、微粒子は動物中の抗原提示細胞によって取り込まれるのに適合するものである。好ましくは、微粒子は0.03と0.5 μm の間、好ましくは0.03と0.15 μm の間である。より好ましくは微粒子は約0.03と0.10 μm の間であり、より好ましくは微粒子は約0.03と約0.05 μm の間である。さらに好ましくは微粒子は約0.03~0.049 μm または0.04 μm と0.049 μm である。

【0045】

「抗原」および「結合した」という用語は上記と同じ意味である。適当なものであればどのような抗原も、ワクチン投与を意図する症状/疾病に応じて使用してもよい。

【0046】

患者に送達される本発明のワクチン組成物の量は臨界的でなく限定されない。有効量のワクチン組成物は、好ましくは一回の服用または投与後に抗原成分に対する免疫応答を刺激する量であり、望ましくは、強い細胞性応答および体液性応答をもたらす量である。組成物の量は、患者の(患者が免疫抑制されるか免疫刺激されるかに依存して)免疫の状態、主治医または獣医の判断、また、組成物を疾病状態を防止するワクチンとして用いるのかその治療に用いるか、あるいは腫瘍の形成を防ぐワクチンとして使用するのか、既存の腫瘍の治療に用いるのかによって変えることができる。例として挙げれば、患者は、本発明の組成物を1 μg ~10,000 μg 、より好ましくは50 μg ~5,000 μg 、さらに好ましくは100 μg ~1,000 μg 、さらにより好ましくは本発明の組成物100 μg ~500 μg を受容することができる。アジュバントは一般に必要なない。しかし、免疫付与のためにアジュバントを使用してもよい。適当なアジュバントとしては、ミョウバンやヒト投与用ワクチン技術においてよく知られた他の任意のアジュバントが含まれる。

【0047】

本発明のワクチンは、注射によって投与してもよいし、経口ルート経路や吸入によって、あるいは粘膜表面または粘膜部位を経由して投与してもよい。1つの実施形態では、本発明のワクチンは遺伝子銃によって投与する。鉄微粒子および金微粒子は、本発明に従って使用するのであれば遺伝子銃による投与に特にふさわしい。しかし、抗原を有する他のタイプの微粒子もこの方法で投与してもよい。例えば、マラリア・ライブラリー、DNAまたはプラスミドに由来する抗原は、Smooker PMらが「Expression library immunisation protects mice against a challenge with virulent malaria.」、Vaccine、18(22):2533-2540(2000年)-その全内容が本参照によって本願に組み込まれている-に記載した手順に従って遺伝子銃によって有効に投与されることが示された。ワクチンは単回投与によるものでも、複数回投与によるものでも、あるいはプライム-ブースティング(prime-boosting)によるものでもよい。

【0048】

さらに別の実施形態では、本発明は対象に微粒子(ここで微粒子はウイルスと同じサイズである)に結合した少なくとも1つの抗原を含む免疫学的に有効な量の組成物を投与することを含む対象の免疫応答を誘発する方法を提供する。

【0049】

対象は免疫応答の誘発が望まれるいずれの人間または動物でもよい。これはペットや家畜(牛、羊、馬、雌牛、ブタ、ヤギ、ラマ、鶏、ダチョウ、エミューなど)および在来および新種の動物、野獣および野生動物を含む。

【0050】

「含む」という用語は上記と同じ意味である。

【0051】

免疫学的に有効な量とは、好ましくは1回の投与後に対象の免疫応答を生成するのに十分な量を指す。これは上に挙げたものを含む多数の要因、および対象がヒトか動物か、その年齢、体重などによって変わる。

【0052】

「抗原」および「結合した」という用語は上記と同じ意味である。

【0053】

「免疫応答」という用語は、上記の細胞性応答と体液性応答を指すと共に、免疫応答を開始(mounting)するか増幅するのを支援する細胞による上記のような応答も指す。免疫応答は、特に、樹状細胞、特にDEC205+、CD40+およびCD86+細胞の増殖および/または発達(expansion)によってもたらされるものでもよい。

10

【0054】

微粒子という用語は上記と同じ意味である。好ましくは、微粒子は、0.03と0.5 μm の間、より好ましくは0.03と0.15 μm 、さらに好ましくは約0.03と0.1 μm の間である。より好ましくは微粒子は約0.03と0.05 μm の間であり、さらに好ましくは約0.03と0.04 μm の間または約0.19と0.049 μm の間である。さらに好ましくは、抗原/微粒子組成物は強い細胞性および/または体液性の免疫応答を誘発するために特に適合したものである。

【0055】

好ましい実施形態では、本発明は、微粒子に結合した少なくとも1種の抗原を含む免疫学的に有効な量の組成物を対象に投与することを含む対象の免疫応答誘発方法であって、微粒子がウイルスと同じ範囲の大きさであり、免疫応答が樹状細胞の刺激および/または増殖を含む方法を提供する。好ましくは微粒子の大きさは約40nm～50nmであり、最も好ましくは40～49nmである。

20

【0056】

別の実施形態では、本発明は、一回の投与によって抗原に対する保護免疫応答を誘発する方法であって、微粒子に結合した少なくとも1種の抗原を含む免疫学的に有効な量の組成物を一度だけ対象に投与することを含み、微粒子がウイルスと同じ範囲の大きさであり、免疫応答が樹状細胞の刺激および/または増殖を含む方法を提供する。好ましくは微粒子の大きさは約40nm～50nmであり、最も好ましくは40～49nmである。

30

【0057】

別の実施形態では、本発明は、微粒子に結合した少なくとも1種の抗原を含む免疫学的に有効な量の組成物を対象に投与することを含む免疫応答を誘発するために樹状細胞にin vivoで抗原を送達する方法であって、微粒子がウイルスと同じ範囲の大きさであり、免疫応答が樹状細胞の刺激および/または増殖を含む方法を提供する。好ましくは微粒子の大きさは約40nm～50nmであり、最も好ましくは40～49nmである。

【0058】

また、本発明には、1種または複数の抗原を有し、大きさがウイルスと同じ範囲内である微粒子を、微粒子と抗原が結合するように接触させることを含む免疫原微粒子/抗原組成物を生産する方法が含まれる。当業者は、このような組成物を生産するために使用する技術はよく知っているであろう。

40

【0059】

【発明の実施の形態】

以下、実施例および図を参照して本発明を説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0060】

図1: パネルA-マクロファージによる異なる大きさの粒子の差別的取込みを樹状細胞の場合と比較して示したグラフである。0.02、0.1または1ミクロンのサイズの蛍光性ビーズを1細胞あたり1000個、C57BL/6マウスから得た培養腹膜浸出物マクロファージまたは骨髄由来樹状細胞と一夜インキュベートし、蛍光を発する細胞のパーセンテージをFACSCanによ

50

って評価した。3つの同様の実験のうちの1つを示してある。ビーズ濃度を10倍にして使用して、ビーズまたはBalb/c由来の抗原提示細胞による3時間パルスを行った場合でもビーズサイズの差異による同様の取込みにおける差異が得られた。パネルB-ウイルス・サイズ粒子は、in vivoではリンパ節細胞に優先的に見出される。LEFT C57BL/B6マウスの足の裏に、異なる大きさ(0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1および2ミクロン)の0.1%蛍光性ビーズ溶液50 μ lを皮内接種し、滲出膝下リンパ節を10日後に取り出し、ビーズを取り込んだ細胞のパーセンテージをFACScanによって評価した。データは、3回の試料における蛍光性の細胞 $\pm$ 標準誤差(SE)の平均パーセンテージとして示す。0.04および0.1ミクロンの粒子サイズは他のいずれのサイズの粒子よりも有意に高い取込みを示した($p>0.001$)。0.1または1ミクロンのビーズのみを使用した同様の実験では、接種後3、6または9日に回収したリンパ節中、0.1ミクロンのビーズ取込みが、1ミクロンビーズの取込みを有意に上回っていた。パネルCおよびD-ウイルス・サイズの粒子は、リンパ節NLDC145+(DEC205+としても知られている)(パネルC)およびF4/80+(パネルD)細胞によって優先的に取り込まれる。蛍光性粒子を取り込んだリンパ節細胞をFACScan分析によって調べ、樹状細胞マーカーNLDC145/DEC205またはマクロファージ/単球マーカーF4/80の同時発現量を評価した。データは、ビーズ取込みにより蛍光性になったNLDC145+またはF4/80+細胞のパーセンテージを示す。

【0061】

図2: パネルA-異なる大きさのビーズに結合したOVAによって免疫されたIFN γ 産生CD8およびCD4 T細胞の誘導。C57BL/B6マウスを、0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1または2ミクロン・サイズのビーズと結合したOVA100 μ gによって2度(10日の間隔)皮内に免疫し、追加刺激免疫の10日後に脾臓T細胞活性をIFN γ ELISPOTによって評価した。応答は、H-2Kb制限CD8 T細胞エピトープSIINFEKLまたは全OVAに対して測定した。OVAに対する反応性の評価の場合には、分析前に磁気ビーズ(Dynabeads)によって脾臓細胞をCD8 T細胞から除き、OVA応答性CD4 T細胞の定量を行った。SIINFEKLは2.5 μ g/mlで、OVAは25 μ g/mlで使用した。3回の同様の実験のうちの1回の結果を示す。1群当たり2匹のマウスがそれぞれの大きさのビーズで免疫された。ELISPOT培養を2回行い、試験した細胞100万個の当たりのスポット形成単位(SFU)の平均値を示す。標準偏差(SD)は常に平均値の20%未満であった。パネルB-SIINFEKLに応じた細胞傷害活性を有するT細胞とIFN γ 分泌T細胞とのELISPOTによる相関。C57BL/B6マウスを大きさの異なるビーズ-OVAで免疫し、SIINFEKLに対する応答性を上記IFN γ ELISPOTによって評価した。さらに、細胞傷害活性を有するSIINFEKL特異的T細胞の数を制限的希釈分析(limiting dilution analysis)により平行して測定した。クロム付与EL4細胞を単独でまたはSIINFEKL2.5 μ g/mlであらかじめパルス処理したものを標的として使用した。得られたデータは、これら2種の分析結果の間に強い相関($R^2=0.9254$)が存在することを示している。2回の同様の実験のうちの一方を示す。パネルC-異なる大きさのビーズに結合したOVAによる免疫によって誘導された抗体産生。パネルAに記載したマウスから血清を回収し、血清希釈物についてOVA特異的IgG応答性をELISAによって試験した。0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1または2ミクロンの大きさのOVAビーズ免疫を与えたマウスを個体ごとにプロットする。同様な2回の実験のうちの一方を示す。

【0062】

図3: 最適なT細胞応答を誘導するのに必要な抗原のビーズへの共有結合。パネルA-ビーズ結合OVAのみがMHCクラスI制限T細胞応答を説明する。C57BL/B6マウスを、事前透析を行わず(対照)または300Kd排除膜によってPBSに対して透析した後(透析)、0.04ミクロンのビーズに共有結合的に結合したOVAで免疫した。皮内免疫10日後にIFN γ 産生脾臓SIINFEKL特異的CD8 T細胞の誘導をELISPOTによって評価した。グループ当たり4匹のマウスについて複製ウェル中のELISPOTによって評価した平均 $\pm$ SEを示す。PANEL B-ビーズおよび可溶のOVAを同時投与した場合は最適なMHCクラスI制限T細胞応答を誘導するには十分ではない。C57BL/B6マウスを、0.1ミクロンのビーズに共有結合させたOVA(ビーズ結合OVA)、または注射に先立って混合したOVA(ビーズ/OVA混合物)で免疫した。皮内免疫10日後にIFN γ 産生脾臓SIINFEKL特異的CD8 T細胞の誘導をELISPOTによって評価した。グループ当たり2匹のマウスについて複製ウェル中のELISPOTによって評価した平均T細胞前駆体頻度を示す。

【 0 0 6 3 】

図4: ウイルス・サイズ・ビーズ-OVAによる単回免疫はMHCクラスI制限T細胞を長期間持続的に高レベルに誘導するのに十分である。パネルA-C57BL/6マウスを、ビーズ-OVA(0.1ミクロン)で、1、2または3回、14日の間隔をあけて皮内免疫し、それぞれの場合について最後の免疫の10日後にSIINFEKLに対するこれらのIFN γ 応答をELISPOTによって調べた。1群当たり3匹のマウスが免疫になった。また、データは、各マウスにおける2回の分析結果の平均値を示す。同様な2回の実験のうち的一方を示す。パネルB-マウスをビーズ-OVA(0.1ミクロン)で一度免疫し、12日または82日後にSIINFEKLまたはOVAに対するIFN γ 応答をELISPOTによって試験した。図2と同様に測定したOVAに対する抗体レベルは82日目でも維持された。

10

【 0 0 6 4 】

図5: 皮内免疫後に滲出リンパ節中においてビーズを取り込んだ細胞によるCD40発現の評価。未処理のC57BL/6マウス(左)または蛍光性の0.04 μ mフルオビーズ(fluo-beads)で足の裏の皮内に免疫されたマウス(右)から、注射48時間後に膝下のLN細胞を切除し、これらのマーカーに特異的な抗体に結合したPEで染色することによりCD40発現について分析した。FL-1=FITC陽性細胞(ビーズ+)およびFL-2=PE陽性細胞(マーカー+)。バックグラウンドの染色は無視できた(<1%)。左のパネルは、免疫していない動物から得た膝下LN細胞を表わし、右のパネルは、VSP-OVA免疫動物から得た同じタイプの細胞を表わす。

【 0 0 6 5 】

図6: 0.1 μ mOVAビーズに応じたマウスの未熟および成熟DC増殖の誘導。C57BL/6マウスの後脚の脛骨および大腿骨から抽出した骨髓細胞からDCを得てGM-CSFおよびIL-4を加えて培養した。培養5日後に、細胞を 1.25×10^6 細胞/1.25mlの実験条件に分け、1000ビーズ/細胞の割合でビーズ結合OVA(0.1 μ m)をパルス処理した。パルス処理4日目に、適当な培地にLPSおよびTNF α を添加した。細胞のインキュベーションを一夜続け、翌日、増殖チミジン分析をセット・アップし、一夜インキュベーションした。各値は3回の平均 $\pm$ SD(パルス処理しないDCと実験群間で $p < 0.00001$ 。対のないt-検定(unpaired t-test))を表わす。

20

【 0 0 6 6 】

図7: in vivoにおいて0.04 μ m粒子を取り込んだAPC表現型の同定(1 μ m粒子と比較)。0.04または1 μ mのフルオビーズ(fluobeads)-OVA50 μ lをC57/B6マウスの足の裏に注入した。48時間後に活性化と抗原提示細胞系の細胞マーカーを有するビーズ陽性細胞の同時染色を行うために膝下の滲出LNを分析した。3-14マウス/マーカーについて平均 $\pm$ SEを示す。0.04および1 μ mフルオビーズ+細胞は、DEC205、F4/80、CD40、CD80およびCD86の有意に異なる発現を有していた($p < 0.05$)。

30

【 0 0 6 7 】

図8A: DCによるウイルス・サイズ粒子取込みのメカニズム。骨髓由来の培養DCを、酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)[0(黒)、5(白)、10 μ M(灰色)]、アミロライド(amiloride(AML))[0(黒)、1(白)、3 μ M(灰色)]またはサイトカラシンD(CDD)[0(黒)、0.25(白)、0.5 μ g/ml(灰色)]と共に30分間および0.04 μ mOVA-蛍光性粒子を加えてさらに3時間インキュベーションした。カヴェオラ(caveolae)、クラスリン(clathrin)被覆ピット形成または食細胞運動の選択的な阻害は、10 μ M PMA、3mMアミロライドおよび0.5 μ g/ml CDDについてそれぞれ14、15で報告されている。PMAとAMLを共に使用する場合、PMAは10 μ Mで一定とし、AMLは1(白)または3mM(灰色)を加えた。蛍光を示す細胞数をFACSscanによって評価した。データは3回行った培養の平均 $\pm$ SDとして示す。

40

【 0 0 6 8 】

図8B: 取込みメカニズムの確認。DCを、何も加えず、あるいはCDD1 μ g/ml、フィリピン(filipin:FIL)1 μ g/mlまたは塩化アンモニウム(AC)40mMと共に30分間、および0.04 μ mまたは1 μ mの蛍光性ビーズを加えてさらに3時間インキュベーションした。カヴェオラ(caveolae)またはクラスリン(clathrin)被覆ピット形成の選択的な阻害は、1 μ g/mlフィリピンおよび4

50

0mM塩化アンモニウムについてそれぞれ14~17、29で報告されている。蛍光を示す細胞数をFACSscanによって評価した。データは3回行った培養の平均 $\pm$ SDとして示す。

【0069】

図9: 可溶OVAおよび1 μ m-OVAビーズは0.05 μ m-OVAビーズに匹敵する保護を誘導しない。C57/B6マウスを、0.05 μ mまたは1 μ mビーズに結合したOVA、可溶OVAで皮内(ID)に免疫するかまたは処理せず、次いで上記と同様に抗原に曝した。データは、各群8匹の10日目における個々の腫瘍サイズとして示す。2回行った同様の実験のうちの1回を示す。0.05 μ m-OVAビーズ群と他の群のそれぞれの間の腫瘍発生率の差は有意なものであった: 未処理(naive)に対し $P=0.0001$; 可溶に対し $p=0.0007$; 1 μ mビーズ-OVAに対して $p=0.0035$ 。

【0070】

図10: ウイルス・サイズ粒子は、初期エンドソームと同時局在しない(左)。骨髓由来DCを0.1ミクロンのビーズ-OVA(500ビーズ/細胞)と共に一夜インキュベートし、遊離ビーズを除くために穏やかに洗浄し、ガラス・スライド上にスピン・アウトして共焦点顕微鏡用に調製した。次いで、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、トリトンで浸透可能とし、初期エンドソーム・マーカーRab4の存在を、ビオチン結合モノクローナル抗体を用いて染色し、次いでストレプトアビジン-アレクサ(Alexa)で染色した。非結合0.04および0.1ミクロン・ビーズでも同様の結果を観察した。3回行った実験のうちの1回を示す。蛍光性0.1ミクロン・ビーズは、ビーズと共に30分または3時間インキュベートしたDCを使用したRab4染色では同様に同時局在を示さなかった。(右)マウスを、0.1ミクロンのビーズ-OVAを用いて後肢の足の裏に皮内注射し、48時間後、滲出膝下リンパ節を切除して上記と同様に共焦点分析を行った。Rab4マーカーおよびOVA結合または非結合0.1ミクロンまたは0.04ミクロンのビーズについて同時局在は全く観察されなかった。3回行った実験のうちの1回を示す。対照的に、1ミクロン・サイズの蛍光性ビーズで免疫した陽性コントロール・マウスでは同時局在が確認された。

【0071】

図11: 腫瘍からの保護。パネルA-C57/B6マウスを、OVA-VSSPで1回皮内(ID)免疫するか(免疫)、処理せず(未処理)、30日後に皮下注入によって 5×10^6 EG7(腫瘍細胞)でチャレンジした。腫瘍はカリパスを用いて測定した。1群当たり10匹の動物に対して個々の腫瘍成長曲線を示す。パネルB-上記と同様に腫瘍を誘導し、腫瘍成長8日目(免疫の日を0日目とする)に、6匹の動物を処理せず(未処理)、またはOVA-VSSPで皮内(ID)免疫した(免疫)。免疫後3~13日目の個々の成長曲線を示す。

【0072】

図12: VSSP免疫後に致死性マラリアの抗原投与を受けたマウスの存命。VSSP-OVA、VSSP溶解物または溶解物のみを100 μ gで皮内に1度免疫したC57/B6マウスを、500,000個の致死性マラリア原虫(*Plasmodium yoelii*)17XL感染C57/B6赤血球でチャレンジした。存命を毎日監視した。1群当たり5匹の動物が抗原に曝され、6回の代表的な実験のうちの1回を示す。同様の実験では、未処理マウスは2週間後に40%の存命率を示した(8/20匹のマウス)。溶解物は、標準のプロトコルを使用して、*P. yoelii* 17XL感染した赤血球の凍結解凍を繰り返し、超遠心分離し、VSPに結合させて生成した。

【0073】

図13: 抗原OVAについて前述したのと同様に抗原nm23を0.05 μ ビーズ(VSP)に結合し、100 μ g/マウスの割合でマウスに皮内注射し、10日後のIFNガンマ活性を免疫された動物の脾臓についてELISPOTによって評価した。データは、100万個の脾臓細胞についてnm23に応答する細胞の前駆体発生率をスポット形成単位(SFU/百万個) $\pm$ 平均値の標準偏差(SD)として示した。3匹のマウス(m1~m3)の個々の応答を示す。

【0074】

図14: ガン抗原nm23またはOVAを、標準プロトコルによりVSPに結合し100 μ g/マウスの割合で皮内注射した。10日後に、IL4分泌細胞の誘導をELISPOTによって評価した。データは、それぞれ免疫した3匹の個体マウスについてのSFU/100万 $\pm$ SDとして示す。

【0075】

10

20

30

40

50

図15A:OVAに結合した0.05 μm ビーズ(VSP-OVA)で1度皮内免疫したマウス血清中のOVAへの抗体応答性および非免疫対照群(Aグループ)と比較した90日後のELISAによるその評価(Bグループ)。

【0076】

図15B:図15Aのマウスと同じ血清について、2匹の未処理マウス(A2とA3)および3匹のVSP-OVAマウス(B2、3および5)中のOVA特異的IgE抗体の存在をELISAにより試験した。

【0077】

図16:パネルA-単回免疫による長期持続性抗体応答の誘導。C57/B6マウスを、0.04 μm ビーズに結合したOVAで1度免疫し、その血清を異なる時点で採取した。OVA特異的IgG ELISAにおける4匹の動物各群の血清の405nmの $\pm$ SE光学密度平均値を示す。未処理血清をネガティブ・コントロールとして示す。2回行った同様の実験のうちの1回を示す。全Igおよび非IgAまたIgMについても同様のELISA結果が検出された(図示していない)。OVAだけは、PBS免疫動物に対してIgG応答を誘導せず、完全フロイント・アジュバント(CFA)中のOVAは、単回投与0.05 μm ビーズ-OVA(図示していない)より対数的に高いIgG応答を誘導した。パネルB-0.04 μm ビーズ-OVAによる1度の免疫によるIFN γ 産生T細胞の長期持続的高レベル誘導。C57/B6マウスを、0.04 μm ビーズ結合OVA(黒または格子縞模様の縦棒)、PBA中可溶OVA(白い棒)または0.04 μm ビーズと混合したOVA(灰色の縦棒)で1度皮内免疫した。10日後(黒、白、灰色の縦棒)または12か月後(格子縞模様の縦棒)にIFN γ ELISPOTによってSI INFEKL応答的な脾臓T細胞前駆体発生率を評価した。1群当たり4匹のマウスを試験し、2回行った同様の実験のうちの1回を示す。各群について100万個の細胞当たりのスポット形成単位(SFU)の平均値 $\pm$ 標準偏差(SE)を示す。10分の1の抗原(10 μg VSP-OVA)を使用した同様の実験において、1度の免疫が102 $\pm$ 56のSI INFEKL特異的脾臓細胞(100万個当たり;n=4)を誘導した。標準的なクロム放出試験でも、1度の免疫後10日目に細胞傷害性T細胞応答が観察された(E:T比=20:1における3/3動物についての特異的溶解は50%を超過。図示していない)。

【0078】

図17:プライム/ブースト。C57/B6動物を未処理(処理なし)とするか、またはMUC1由来ペプチドcp13-32の100ugを完全フロイント・アジュバント中KLH700ugと結合したものの(cp13)、マンナンに結合した組換えMUC1-GST融合タンパク質(MFP)または0.1 μm VSPと結合したMUC1-GST融合タンパク質(VSP)で皮内に1度プライムした。14日後に動物を、100万のMUC1タンパク質発現感染性ワクシニアウイルスで追加刺激し、10日後にcp13-32中エピトープに対する応答性をIFN γ ELISPOTによって評価した。示すデータは、2~3匹の動物/群についての100万個の脾臓細胞当たりのIFN γ 産生細胞数の平均値 $\pm$ SEである。

【0079】

図18:ポリスチレンとガラスの0.05 μm VSP-OVA粒子の比較。前述のもの(PS)と同様に、ポリスチレン0.05 μm ビーズをOVAに結合し、同じ方法でOVAを結合したガラス・ビーズ(G1)と比較した。さらに、ガラス・ビーズについて様々な化学処理を比較した。簡単に言えば、ガラス・ビーズを秤量し、固形分2.5%のPBS溶液に懸濁し2度洗浄した。小型遠心器(microfuge)中5分間の遠心分離によってPBSを除いた。ビーズ小球をpH 7.4の8%グルタルアルデヒドPBS溶液に再懸濁し、室温で穏やかに一夜混合した。次いでビーズをPBSで3回洗浄し、PBSに再懸濁し、ml当たり500 μg のタンパク質を加え5時間穏やかに混合した。次いで、ビーズをペレットとし、ペレットを0.5Mエタノールアミンに再懸濁することにより反応を停止し30分間混合した。次いで、ビーズをPBSで洗浄し、免疫(G2)のために使用した。ポリスチレン(PS)またはガラス(G1またはG2) VSP-OVAを100ug/マウスの量で皮内に免疫し10日後にELISPOTによって脾臓からSI INFEKL特異的IFN γ 分泌T細胞を定量した。データは1群当たり3匹の動物について個々の平均値 $\pm$ SEを示す。

【0080】

図19:ビーズ結合および免疫性のモード。50mM MESバッファー(pH 6.0)に2mg/ml溶解させたオボアルブミンをポリスチレンカルボキシ変性0.05 μm ビーズ(固形分2%)と15分間混合した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジアミドを各調製物に4mg/ml(pH 6.5)加え、室温で2時間インキュベートした。標準(グリシン)は、7mg/mlグリシンまたは1

10

20

30

40

50

Mエタノールアミン(アミン)20 μ l (pH 7.4)、または1Mアミノアセタルデヒドジメチルアセタール(アルデヒド)20 μ l (pH 8.0)、または1Mエチレンジアミン(アルコール)20 μ l (pH 7.4)でクエンチした。調製物をおよそ16時間室温でインキュベートした。調製物はすべて、4 のPBSで一夜透析した。アルデヒド調製物は、1MHCLの20 μ lでさらにクエンチし4時間インキュベートし、40 のPBSで一夜透析した。2~3匹のC57/B6マウスを、これらのVSSP-OVA粒子の各100ugで皮内免疫し、CD8 T細胞エピソードSI INFEKLへのIFNg ELISPOTによって脾臓中で評価した。結果を各動物の100万脾臓細胞当たりのSFUの平均値+/-SEとして示す。

【0081】

【実施例】

実施例1: 使用した材料および方法

マウスおよび免疫: 6週齢から8週齢のC57BL/6およびBALB/cマウスをWalter and Eliza Hallから購入した。マウスは抗原結合ビーズ100 μ lを後肢の足の裏に皮内(ID)免疫した。

【0082】

試薬: 特に断らない限り、抗原オボアルブミン(OVA(等級III))および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミド(EDAC)を含む試薬はすべてSigmaから購入した。FACS canおよび共焦点分析用のモノクローナル抗体は、タンパク質Gカラム(Pharmacia)を用いて実験室でハイブリドーマ・ラインから取り出すか、またはPharmingenから購入した。FITC結合フルオスフェアおよびカルボキシル化フルオスフェア0.02~2 μ はMolecular Probesから、また、非蛍光性カルボキシル化ミクロスフェアはおよびPolysciencesから購入した。次のマーカーに対する略語を使用した: MHCII、MHCI、CD11c、CD11b、F4/80、NLD-145、CD8alpha、CD40、CD80およびCD86。共焦点分析で使用する抗Rab4モノクローナル抗体はラッセル博士(Peter McCallum Research Institute)から頂いた。

【0083】

抗原提示細胞: 樹状細胞は、以前に公表された方法[5]に小さな修正を加え骨髓単球から調製した。簡単に言えば、細胞を媒体を用いて骨穴から洗い流すことにより後肢の脛骨および長骨から収穫し、次いで赤血球を溶解させた。細胞は、10%の熱不活性化ウシ胎児血清(FCS)、4mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシン硫酸塩および100 μ M β -メルカプトエタノールを添加したRPMI (CSL、AUST)中 1×10^6 細胞/mlをプレート塗布し、1000単位/ml GM-CSFおよび0.2ng/mlのIL-4を加えた。10ml培養物を37 の高湿度CO₂インキュベーター内に置いた100mm直径のペトリ皿中で5~6日間成長させた。チオグリコレートを腹腔内注射してから3日後にマクロファージをマウス腹腔内(IP)から取り出し、記載されているように3日間培養して接着細胞分画を増やした[6]。

【0084】

ビーズ抗原結合はメーカー指示に従って行った。簡単に言えば、OVAを0.05M MESバッファーpH 6.0中2.0mg/mlに希釈し体積比1:1で固形分2%(体積)のビーズと混合した、混合物を15分間穏やかに揺り動かし、次いで、4mg/ml EDACを加えた。混合物のpHは希NaOHで6.5に調節し、混合物は2~3時間穏やかに揺り動かした。反応は、最終濃度100mMのグリシンで停止させた。30分間混合した後、調製物を冷PBS中で一夜透析した。調製物は直ちに使用したか、または後の使用のために0.01%のアジ化物を加えて4 で貯蔵した。

【0085】

細胞傷害性分析: これは記載されているようにして行った[3]。簡単に言えば、37 の高湿度CO₂インキュベーター内に置いた2mlのウェル・プレート中、ペプチド抗原10 μ g/mlを10%の熱不活性化ウシ胎児血清(FCS)、4mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシン硫酸塩および100 μ M β -メルカプトエタノールを添加したRPMI (CSL、AUST)培地を用い 2.5×10^6 /mlの条件で7日間脾臓細胞を培養することにより細胞傷害性分析用のエフェクター細胞を生成した。3日目にインターロイキン2(10U/ml、組換えヒトIL2、リンフォカルト(Lymphocult)HT、Biotest、英国)を加えた。標的は⁵¹Crを付与したEL4細胞であり、単独でまたは予め10 μ g/ml SI INFEKLLペプチドもしくはオボアルブミン変形EL4細胞系で1時間プレパルス処理した。特に断らない限り分析は20:1のエフェクター: 標的

10

20

30

40

50

比で2回行った。自然溶解(培地のみ)および最大溶解(5%トリトンを用いた)はすべての標的に対して4回セット・アップした。4時間後に上清を収穫した。溶解率(%Lysis)は $100 \times ((\text{実験放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出}))$ として計算した。特異的溶解率(%SL)はペプチドによる%Lysis-ペプチドによらない%Lysisとして計算した。

【0086】

細胞傷害性T細胞前駆体(CTLp)分析:CTLp分析は、以前に記述されるように行った[7]。CTLp発生率は、少なくとも6個のエフェクター細胞数(1×10^3 - 1.28×10^5)について、32のレプリケートの最小値から決定した。細胞はU-底マイクロタイター・トレイにおいて、 5×10^5 マイトマイシンC処理共通遺伝子(syngeneric)脾臓細胞と共に、10%のウシ胎児血清、 $5 \mu\text{M}$ SIINFEKLまたはOVAおよび 10 U/ml rhIL-2を添加したDMEM中で培養した。7日後、各マイクロカルチャーを、 $104 \text{ } ^{51}\text{Cr}$ 標識したEL4またはEG7を標的として含む $100 \mu\text{l}$ 標的細胞懸濁液で培地 100 ml を替えることにより細胞傷害性を分析した。各ウェルにおいて ^{51}Cr 放出が刺激剤のみと培養した 104 のエフェクターから、またはペプチドのみまたはrIL2のみを備えた刺激剤細胞からのアイソトープ放出量の平均値を標準偏差の3倍上回った場合、細胞傷害性が存在すると考えられた。線形の関係($0.987 \text{ } r^2 = 1$)が、応答者細胞の数(線形スケール)と陰性ウェル発生率(対数スケール)の間に存在した。CTLp発生率は37%陰性ウェルを生成するのに必要な応答者細胞投与量の逆数として決定した[8、9]。CTLp発生率分析は、3回実行した。また、個々の発生率は平均値と20%以上は異ならなかった。

【0087】

ELISPOT IFN γ 分析:これは記載されているのと同様にして実行した[3]。簡単に言えば、新たに分離した $5 \times 10^6/\text{ml}$ の脾臓細胞 $100 \mu\text{l}$ を、抗ネズミIFN γ mAb(R4)(EACC)でプレコートした混合酢酸塩プレート(MAHAミリポア)上で18時間所定の刺激をしながらインキュベートした。各条件について2重のウェルをセット・アップした。使用する培地は上記のように成分を添加したRPMI1640(CSL)であった。一夜インキュベートした後、細胞を洗浄し、別のビオチン結合抗ネズミIFN γ (XMG.21-ビオチン、Pharmigen、CA、USA)mAbプレートでインキュベートし、エクストラビジン(extravidin)アルカリフォスファターゼ(A-AP)を $1 \mu\text{g/ml}$ (シグマ)で結合した。アルカリフォスファターゼ活性のスポットは比色定量のAP検知キット(Biorad、ヘラクレス、CA(アメリカ))を使用して検出し、また解剖顕微鏡を利用して数えた。データは、100万個の細胞当たりのスポット形成単位(SFU)として示される。SIINFEKL-ペプチドは $2.5 \mu\text{g/ml}$ で利用した。

【0088】

統計分析:各群で保護されたマウス数をEpiInfoバージョン5.0パッケージのStatcalcプログラム中の χ^2 検定を使用して比較した。免疫性の研究では、ELISPOTおよびクロム放出応答を、Microsoft Excel・バージョン5.0aパッケージを用いた学生t検定を使用して群間で比較した。線形回帰分析を用いて、ウィンドウズ版統計プログラム・パッケージ用SPSSを使用して免疫性と保護の間の相関性を評価した。

【0089】

樹状細胞とマクロファージによるピーズ取込み:スライドガラス上で培養した3日齢マクロファージおよび5日齢樹状細胞培養物に5分から24時間までの間、異なるサイズの蛍光マイクロビーズを与えた。次いで、培養物を洗浄して遊離ピーズを除き、FACScanまたは共焦点分析のために調製した。

【0090】

ピーズをin vivoで取り込む細胞の分析:滲出リンパ節と脾臓を免疫後12時間から12日以内の様々な時間間隔でピーズ免疫マウスから回収した。細胞を回収後および赤血球を溶解し洗浄後、FACScanまたは共焦点分析のために調製した。

【0091】

細胞表面マーカー染色およびフロー・サイトメトリー:表面染色については、 5×10^5 細胞を、表面マーカーF4/80およびNLD-145、CDへのPE標識MoAbと共にインキュベートした。直接抗体に付けられないときは、細胞を2回の洗浄後、第1の抗体に特異的な別のPE標識抗体と共にインキュベートした。第2の抗体が加えられた種の未処理血清は第2の抗体を用

いたインキュベートの前にブロッキング・ステップで使用した。2回の洗浄後、細胞をPBS/0.2%パラホルムアルデヒドで洗浄し、FACScanフロー・サイトメーター(Becton-Dickinson)およびCellQuestソフトウェアで分析した。光散乱ゲートを設けて死細胞および非リンパ細胞を除外した。ビーズで免疫されているが何らの表面マーカーでも染色されていないものおよび表面マーカーに対するPE標識抗体で染色された未処理マウス由来の細胞を、FITCとPE放射スペクトルの間の重なりに対する補償量を決定するために使用した。

【0092】

細菌に取り込まれたFITC標識ビーズの共焦点顕微鏡分析:2重の蛍光発生および伝達検知部を備えたOlympus製の走査共焦点顕微鏡をクリプトン・アルゴン・レーザー光源と共に使用し、様々なサイズの蛍光化ビーズがマクロファージまたは樹状細胞の貪食によって取り込まれたかどうか判断した。食細胞運動を決定するために0.5~1.0ミクロン間のステップ・サイズで試料を通して連続する部分を得、Optiscanアナライザーで分析した。細胞は、フルオレセインとアレクサ(Alexa)594に対しそれぞれ488nmおよび568nmで起動され、530nmおよび610nmの帯域フィルターによってそれぞれ検出した。データ獲得の全プロセスにわたって、レーザー力は飽和レベル以下に維持し、利得およびオフセット・パラメーターは個々の実験内で維持した。

【0093】

ELISA分析:OVAに対する抗体反応はELISAを使用して測定した。ポリ塩化ビニル・マイクロタイター・プレートにOVA(10 µg/ml、0.2M NaHCO₃バッファー、pH 9.6)で4 時間で一夜覆った。プレートをPBS/0.05%Tween20で4回およびPBSで4回洗浄し、次いで、2%ウシ血清アルブミンで非特異的結合を室温1時間でブロックした。上記のように洗浄した後、マウス血清の連続希釈液を加えて室温でさらに1時間インキュベートした。非免疫マウス血清をネガティブ・コントロールとして使用した。プレートを洗浄し、ホースラディッシュペロキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIg(Selinus、AUS)および色原体基質2(2"-アジノ-ジ(3-エチルベンズチアゾリン)スルホネート(Amersham、英国)を用いて結合抗体を検出した。EL312eマイクロプレート・リーダーを使用して405nm吸収を記録した。

【0094】

実施例2:in vitroおよびin vivoでの抗原提示細胞によるVSSPの優先的取込み
マクロファージ/単球由来細胞を用いた多数の研究が、粒子サイズに依存する食細胞運動を示しており、その最適の取込みサイズは直径1ミクロンである[10、11]。取込みは樹状細胞中で観察されたが、粒子サイズは包括的には試験されていなかった。本発明者はタンパク質で覆ったウイルス・サイズ(0.03-0.1 µm)の粒子が樹状細胞またはマクロファージによって効率的に取り込まれるか否かを確証することに特に興味を持っていた。図1aはチオグリコレートが腹膜浸出物マクロファージが1 µmおよび0.1 µm両方のフルオレセイン標識粒子(fluo-ビーズ)を内部に取り込むことを示している。これに対し、骨髓由来の未熟な樹状細胞は、0.1 µmサイズのfluor-ビーズを優先的に取り込むことが見出された。共焦点顕微鏡を使用して粒子が細胞内(図示していない)にあることを確認した。このin vitroでのデータは、in vivoでウイルス・サイズの固体粒子(VSSP)が抗原提示細胞によって優先的に取り込まれることを示唆した。蛍光性ポリスチレンタンパク質を、一連のサイズ(0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1および2 µm)の粒子に結合させ、C57BL/6マウスの足の裏に皮内注射し、10日後にFACScan分析のために滲出膝下リンパ節から回収した。0.04~0.1 µmサイズの粒子は、リンパ節細胞によって優先的に取り込まれていた(図1b)。同様の結果は、非結合粒子と共に、粒子注入後1、3、6および10日目にリンパ節細胞を分析して得られた。VSSPは、マクロファージ表面マーカーおよび樹状細胞表面マーカー(図1b)の両方を発現する抗原提示細胞によって効率的に取り込まれた。骨髓由来樹状細胞もin vitroでさらにVSSPを取り込んだ。予想通り、これらの細胞は主に脊髄性の表現型であった[12]。

【0095】

実施例3:抗体および細胞傷害性およびIFN γ 分泌T細胞のVSSPプライム高前駆体発生率
In vivoでの樹状細胞による効率的なVSSP取込みは、標的抗原の送達のためにこれを使用することおよび新規なワクチンとして可能性を示唆した。C57/BLマウスを、オボアルブミ

10

20

30

40

50

ン(OVA)被覆を施した0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1または2 μ mの粒子で免疫し、15日後に追加刺激し、10日後に血清または脾臓細胞を回収した。図2aは、MHCクラスI制限SIINFEKLエピトープに対して0.04 μ mサイズの粒子を使用して達成されたIFN- γ 分泌CD8 T細胞誘導が最適の誘導となることを示す。CD4 T細胞のOVAへの応答は、0.04~1ミクロンを変動するOVAを結合した粒子を備えた同様の前駆体発生率でも見出された。IINFEKLに対する細胞傷害性T細胞もVSSPで誘導され、IFN γ 分泌T細胞前駆体発生率と相関している($R^2=0.92$) (図2b)。意外にも、0.04 μ m粒子で免疫し、次いで1 μ m粒子で免疫したマウスでは、OVA特異的IgGも最も高い前駆体発生率が見出された(図2c)。同様の免疫性結果はフルオレセインを含まないVSSPの使用でも見つかった。したがって、多くの免疫原およびアジュバントが細胞性または体液性応答の一方を優先的に促進するのは対照的にVSSPは、両者をハイ・レベルで誘導することができた。

【0096】

図2に示される結果は、結合後に残余の可溶抗原を除去せずに、同じ合計量の抗原を注入することに基づいている。図3aは、可溶抗原が透析または超遠心分離によって除去した後も同様のT細胞応答が0.04ミクロンのVSSPで得られたことを示す。したがって、観察されたT細胞応答に対し可溶抗原からの重要な貢献はなかった。これは、結合しているOVAと結合していないOVAとVSSP混合物との比較によってさらに支持された。図3bは、共有結合したVSSPのみがSIINFEKL特異的T細胞を高レベルで誘導したことを示す。したがって、VSSPが共有結合的に付着することが、*in vivo*でOVAをクラスI提示経路へと導きクラスI制限T細胞を誘導するのに必要であった。より大きな粒子と比較して小さな粒子では結合するタンパク質の量が多くなり、それによりVSSP免疫性が高くなるという議論も可能であろう。しかし、実際はそうではなかった。理由は以下の通りである。1)0.04 μ mおよび0.02 μ mにサイズのピークがあるビーズでは免疫応答をほとんど誘導しなかった(図2)。2)0.04~0.1ミクロンのVSSPは、抗原結合のレベルと無関係に1 μ m粒子より一貫して免疫原性が高かった。(3)1 μ m粒子の免疫濃度を100倍(1mg/マウス)まで増加させVSSP濃度以上としてもVSSPに結合した抗原の濃度範囲に見合う免疫原性の増強は得られなかった。および4)免疫において様々なサイズのビーズ上の結合タンパク質の量を等しくしても、あるいは、様々なサイズのビーズ数を同数としても、VSSPが一連の濃度範囲(全OVA 0.5~1000 μ g、結合OVA 0.5~50 μ g、動物1匹当たりのビーズ $10^3 \sim 10^8$)で一貫して、より大きな粒子より高い免疫原性を示した。

【0097】

実施例4: 粒子の取込みおよびプロセッシングの新規経路

外来抗原の消化に由来したペプチドはクラスII MHCプロセッシング経路を通して、逆流(*regurgitate*)するか、引き続いて、細胞表面で空のクラスIMHC分子に結合することが示唆されている[1、10]。クラスI提示のこの代替メカニズムは、TAP(抗原処理に関連したトランスポーター)によって仲介される小胞体(ER)への輸送からは独立している。B型肝炎表面タンパク質VLPは、TAP独立したメカニズム[2]によってマクロファージ中クラスI提示のためにプロセッシングを受ける。本発明者は、OVAを結合したVSSPを用いてTAPノックアウトC57/BLマウスを免疫にした。TAP-KO動物中ではSIINFEKLまたはOVAに対してはバックグラウンド・レベル以上のT細胞応答を検知することができず、VSSPのクラスI提示プロセッシングが示唆されたが、対照的に、TAP依存性であった。外来抗原のTAPの依存性クラスI提示メカニズムは、1 μ m粒子上に吸着されたタンパク質について、細胞質へ抗原の細胞内取込み(*endocytic*)小胞の「漏れやすさ」に基づき偶発的に抗原を細胞質に放出するものと記述されている[1、10]。食細胞運動によって取り込まれたこうした大きな粒子の処理は、Rab4アダプタータンパク質を発現するリゾソームとの初期の結合ステップを含んでいる[13]。本発明者は、VSSPがこの経路を経由しているかどうか決定するために共焦点顕微鏡を使用した。図4は、皮内のVSSP投与の24時間後、小胞を含むRab4およびVSSPフルオビーズが培養中の骨髄由来樹状細胞にも、*in vivo*のリンパ節細胞においても同時局在しなかったことを示す。したがって、VSSPは、Rab4独立かつTAP依存性であるという点において、VLPやこれより大きな粒子が使用するプロセッシング経路のいずれとも異なる経路を

使用するのであろう。このメカニズムについては、実施例7でさらに調査した。

【0098】

実施例5: VSSPはin vivoおよびin vitroで抗原提示細胞の発達を誘導する。

C57BL/6マウスを処理しないか(未処理)、蛍光性0.1 μm フルオビーズで足の裏を皮内免疫した。膝下のリンパ節(LN)を注射48時間後に切除し、このマーカーに特異的な抗体と結合したPEで染色することによりCD40発現を分析した。

【0099】

結果(図5)は、0.04、0.05および0.1 μm ポリスチレン・ビーズが、単独でもOVAに結合しても、皮内免疫後に滲出膝下リンパ節から回収される細胞総数を4倍まで増加することができたことを示している。さらに、それらは、NLDC145+(樹状細胞マーカー)の割合を1.5倍に増加させたがF4/80+(単級/マクロファージ・マーカー)細胞の割合は増加させなかった。また、それらは、活性化分子CD40およびCD86を発現するリンパ節細胞の割合を1.5倍以上に高めた。図5は、免疫後にFACScanによって観察されたCD40+細胞の増加(33%~63%)の例を示す。さらに、それは、これらの細胞の多くが0.04 μm ビーズを取り込んだことを示す(このケースでは、我々は、蛍光性の緑の核を備えた0.04 μm ビーズを使用した)。

【0100】

0.04、0.05 μm および0.1のポリスチレン・ビーズは単独でもOVAに結合しても、マウス骨髄からin vitroで精製された樹状細胞を増殖まで誘導することができた。未熟であって、成熟に至らない(LPSとTNF- α による活性化の後に)樹状細胞はVSSPのこの活性化効果を受けやすかった(図6)。

【0101】

これらのデータは、サイズが0.04~0.1 μm の粒子(VSSP)が、樹状細胞を含む抗原提示細胞、特にCD40とCD86などの共同刺激的な分子に対する効果を発現する細胞を刺激して増殖発達させる、これまで知られていなかった能力を疑いなく有することを示唆する。これは、なぜそれらがそれほどかくも強力かを説明する。さらに、それは、それら化学的に結合しない場合であっても、抗原に対する反応についてもVSSPがアジュバント効果(下記の実施例14を参照)を有するメカニズムを示唆する。

【0102】

実施例6: 注射後迅速にVSSPを取り込んだ細胞の表現型の展開

足の裏に皮内注射した際にどの細胞がVSSPを急速に取り込むか(したがって、その後の免疫活性化に寄与している可能性があるか)についてさらに評価するために、滲出膝下リンパ節を切除した。次いで、蛍光性のコアを備えた0.04 μm VSSP-OVAを取り込んだ細胞の表現型をFACScanによって分析し、同一の粒子ではあるがサイズが1 μm の粒子と比較した。図7は、0.04 μm ビーズ+または1 μm ビーズ+の割合が、個々の表現型のマーカーとして現れていることを示す。0.04 μm ビーズを取り込む細胞はほとんどNLDC145+、CD40+およびCD86+であった。さらに、より多くのCD11c+、CD4+およびCD8+細胞が、1 μm ビーズ+より0.04 μm ビーズ+であった。0.04 μm ビーズを取り込んだ細胞のこの高度に活性化されたDC表現型はさらに、なぜ我々が観察した免疫応答、特にCD8 T細胞応答がかくも有力かを説明するのであろう。

【0103】

実施例7: 微粒子の取込みおよびプロセッシング

樹状細胞(DC)による0.04 μm ビーズ-OVA取込みのメカニズムを検討するため、骨髄由来DCを、食細胞運動(サイトカラシンD、CDD)抑制剤; クラスリン・ピット抑制剤(アミロライド(amiloride、AML))またはカヴェオール仲介吸収抑制剤(ホルボール・ミリスチン酸酢酸塩、PMA)と共にインキュベートした[14、15]。DCを、所定の濃度で30分間、PMA、AML、CDD、フィリピン(FIL)または塩化アンモニウム(AM)(すべてSigma社から入手)を用いた培養を3重に行った。さらに3時間後、OVA蛍光0.04 μm ビーズを加え、FACScanによって定量した。

【0104】

PMAおよびAMLは両者ともDCによる0.04 μm ビーズ-OVA取込みを減少させた。しかし、CCDは

10

20

30

40

50

どのような阻害作用も引き起こさなかった(図8a)。PMAとAMILによる阻害は付加的(additive)であった(図8a)。このことは、クラスリン・ピットおよびカヴェオールが両方ともVSSP取込みに関係することを示唆している。

【0105】

受容体仲介エンドサイトーシスに必要な Na^+ - H^+ 交換を阻害することによりアミロライドは作用を及ぼす[14]。発明者はさらに、細胞質ゾル酸性化を妨害することによりクラスリン・ピットの組立てを阻害する塩化アンモニウム[14]を用いて試験した。塩化アンモニウムは、 $0.04\text{ }\mu\text{m}$ サイズのビーズの取込みを阻害したが $1\text{ }\mu\text{m}$ サイズではそのような効果を示しておらず(図8b)、クラスリン・ピットの役割がVSSP取込みに関与していることを裏付ける。カヴェオールはDCにおいてウイルス粒子取込みに新しいメカニズムを仲介していることが示唆されている[15]。本発明者はPMAの使用がカヴェオールがDCにおいてVSSP取込みに関係していることを示唆するものと結論する(図8a)。これを確認するために、発明者は、カヴェオールの別の阻害剤であるフィリピンを使用した。フィリピンはコレステロールの分離によって作用を及ぼし、PMAはカヴェオール吸収を規制するリン酸化イベントに影響する[14、15、16、17]。PMAと同様にフィリピンは、 $1\text{ }\mu\text{m}$ ビーズ取込みではなく $0.04\text{ }\mu\text{m}$ 取込みをブロックして発明者の仮説を確認した(図8b)。

10

【0106】

カヴェオールとクラスリン・ピットは核内性(endosomal)であり、リソソーム・コンパートメントへ分子を輸送することができる[14、16]。あるいは、カヴェオールは、抗原を直接細胞質ゾル[17]に送達して、MHCクラスIの提示のために、細胞質のプロセッシングおよびTAP依存性の小胞体内への輸送に結びついている可能性もある[1、18]。

20

【0107】

これらの結果は、実施例4において示したものと共に、本発明に従って示された抗原プロセッシング用の新規経路を示す。本発明の免疫原の組成物は、カヴェオールおよび/またはクラスリン・ピット(抗原はその後にRab4独立でTAP依存性のMHCクラスI提示経路によって処理される)経路で抗原提示細胞によって取り込まれるように見える。この観察結果は、カヴェオールのTAP依存性の抗原処理経路およびそのCD8細胞誘導能力は、これまでに報告されていなかったという点において新規である。

【0108】

100,000個のOVAを発現する腫瘍細胞(EL4)を用いた皮下の抗原投与からマウスを保護する能力について、 50nm (すなわち、 $0.05\text{ }\mu\text{m}$)(VSSP)OVA結合粒子をOVA単独と直接に、または、 1000nm (つまり $1\text{ }\mu\text{m}$)OVA結合粒子と比較した。マウスはすべて上記のいずれか $100\text{ }\mu\text{g}$ で1度皮内免疫し(または処理なし=未処理)、次いで、30日後に腫瘍で抗原投与した。図9aは、VSSP-OVAは完全にOVA発現腫瘍の成長を防いだが、OVA単独または 1000nm ビーズでは保護に有意な効果がなかったことを示す。

30

【0109】

実施例9:単回VSSP免疫が高レベルの免疫を誘導し、腫瘍抗原投与に対し保護する。OVA結合VSSPを用いた皮内免疫で $\text{IFN}\gamma$ 産生および細胞傷害性SIINFEKL特異的T細胞を誘導した(図10aおよび1aまたは1b)。追加的な免疫は応答性を増加させなかった(図10aおよび10c)。免疫82日後でも高い前駆体発生率でT細胞を維持することができる(図10d)。抗体応答も同様に維持された(図16)。単回VSSP免疫によって達成されたCD8 T細胞前駆体発生率レベルはVLP粒子の単回または多数回投与で観察される値よりも高く、高度に効率的な異種起源のブライム/追加刺激療法のみがこれに匹敵した[1、2、3、19、20]。高い $\text{INF}\gamma$ 産生および細胞傷害性T細胞前駆体発生率は、多くの細胞内病原体およびガンからの保護に関係している[21、22、23]。本発明者は、OVA結合VSSPの単回皮内投与によりC57/BLマウスを免疫にし、次に、EG7腫瘍細胞系(これは細胞質のOVAを発現し、細胞傷害性SIINFEKL特異的T細胞のin vitroでの標的である)でそれらに抗原投与した。結果は、VSSPで免疫にしたマウスが、完全に腫瘍の抗原投与から保護されたことを示す。一方、未処理の対照ではすべて腫瘍が成長した。さらに、図2cで観察したのと同様に、抗原結合VSSPの単回投与に引き続いて抗体レベルも増加した。

40

50

【0110】

VSSPワクチン例のさらなる検討

以下の実施例10～13は、VSSPが様々な抗原と共に使用することができ、INF産生およびIL4産生T細胞の両方を含む広い免疫を誘導することを公式に実証する。単回投与後、IgGは高レベルであるが、アレルギーと関わるIgE抗体は潜在的な量でしか誘導されない。

【0111】

VSSPの治療における有効性はさらに2つのモデルで示される。1)確立している腫瘍の100%の除去(実施例10参照)および2)ワクチンの単回投与後の致死マラリアからの保護(実施例11参照)。様々な疾病に対する単回投与ワクチンを開発するために、これらは、VSSPを極めて有力で柔軟なワクチン・プロトコルとしてさらに確認する。さらに、これらの発見に基づけば、ガンの予防および治療のためにもVSSPが使用できると発明者は信じる。

10

【0112】

実施例10: 確立した腫瘍の除去

本発明者は、ビーズ-OVAを用いた1度の免疫で、その後にOVAを発現する腫瘍による抗原投与に対して完全な保護がなされることを観察した。

【0113】

C57/B6マウスを、100 μ g ビーズ(0.05 μ m)-OVAで1度(皮内)免疫するか、または処理しないまま放置した(未処理)。30日後に、マウスは 5×10^6 EG7腫瘍細胞系で抗原投与した。免疫後3～13日目に腫瘍サイズをカリパスを用いて測定した。退縮状態を検討するため、マウスにEG7細胞を与え、8日後に同様の腫瘍サイズ分布のグループに分けた。1群は未処理のままとし、他方は3日後(つまり腫瘍細胞系投与後の11日目)にビーズ-OVAで免疫した。

20

【0114】

発明者は、腫瘍に罹患しているマウスを1度免疫するだけで、確立した腫瘍を治癒できることを以下に示す。腫瘍は1度の注射後2週以内に免疫したマウスから除かれた。この治療効果は、どのようなガンワクチンと比べても非常に特殊なことであり、このワクチン・ビヒクルを治療用ワクチンの開発において非常に有用なものとしている(図11B)。

【0115】

ムチン-1またはMuc1は乳ガンに伴う抗原である。VSSP-Muc1タンパク質で1度免疫した場合でも、さらに乳ガン抗原を発現する腫瘍細胞系で抗原投与したマウスにおいて腫瘍の形成が阻止された(図11A参照)。

30

【0116】

実施例11: マラリアからの保護

本発明者は、直径0.05 μ mのポリスチレン・ビーズがマウスにおいてマラリアからの保護を誘導するためのビヒクルとして使用できることを実証する。マラリア原虫(*Plasmodium yoelii*)からの溶解物を赤血球を感染させ、ビーズに結合してマウスの免疫に使用し、次いで、このマウスを致死量の寄生生物で抗原投与した。

【0117】

P. yoelii 17XLに50%の赤血球感染率(parasitaemia)で感染したC57BL/6マウスから血液を採取した。800gで15分間遠心分離した後に赤血球(RBC)を回収し、冷凍-解凍を3回繰り返した上、超音波で処理した(溶解物)。溶解物は上記のような0.05 μ m粒子に結合させた。ビーズ-溶解物、ビーズ-OVAまたは溶解物のみを皮内注射した。2週間後、免疫したC57BL/6マウスまたは未処理C57BLマウスを腹腔内注射により、1,000,000個の*P. yoelii* 17XL感染RBCで抗原投与した。

40

【0118】

動物はすべて抗原投与を生き残ったが、溶解物のみ(ビーズ結合なしで)免疫した動物の60%は、感染を抑えることができず死んだ(図12)。これは単回投与ワクチンで血液段階マラリアからの保護を実現した最初の例である。単回投与ワクチンは、マラリアや第3世界において広範囲に見られる他の伝染病に対して、ワクチンの投与および分配を単純化し広い人口をカバーできるので特に魅力的である。

【0119】

50

実施例12:細胞の免疫

1)ガン抗原nm23などのOVA以外の抗原を結合した直径0.05 μ mのポリスチレン・ビーズも、IFNガンマ分泌T細胞の高レベルの誘導によって証拠づけられるように強い細胞免疫を誘導する(図13)。

2)細胞免疫を誘導するのと同様に、ビーズ-OVAまたはビーズ-nm23は、IL4を高レベルで誘導する(図14)。このリンホカインは、他の抗体の産生を促進するが、これは、なぜ細胞性免疫(これはINNガンマを要求する)と同様に良好な抗体誘導も観察されたかを説明していると言えるだろう。

【0120】

実施例13:抗体免疫

1)OVAに結合した直径0.05 μ mのポリスチレン・ビーズは、1度の皮内(ID)注射後にIgG抗体を高い滴定濃度で誘導した(図15A)。

2)高いIgGレベルにもかかわらず、検知できるIgEレベルはない。したがって、このワクチンは(アレルギーに関係するため)潜在的に有害なIgE応答を誘導する危険を有しないことが公式に実証された(図15B)。

【0121】

実施例14:様々な投与ルートおよびIgGおよびIgA抗体の誘導

ワクチンのヒトへの有用な投与ルートを決する目的で、上記と同様な皮内経由の他、OVA結合VSSP(100 μ g/マウス)を、マウス腹膜内、皮下、鼻内、また直腸内に投与した。1群当たり3~4匹のマウスを1度の免疫の30日後に試験した。ELISPOT分析(1/50,000~1/2,000脾臓細胞)によって、皮内と同様にすべてのルートでSIINFEKLまたはOVAに対してIFN γ を分泌するT細胞が誘導された。意外にも、皮内注射を用いたこれまでの観察結果ではIgGが高レベルで誘導される反面IgAはほとんどないか全く誘導されなかったのに対して、これらの他のルートによるVSSP-OVAは血清IgA応答を誘導し、直腸内と、鼻内ルートでは検知できるIgGが誘導されなかった(滴定濃度<1/100)(表1)。したがって、直腸内、腹膜内、鼻内または皮下ルートによるVSSPは、粘膜の伝染病(例えば、肺、子宮頸部または腸内)などのIgAが保護機能を果たす場合にも疾病への保護免疫を誘導するために使用することができる。

【表1】

ルート	血清IgG滴定濃度	血清IgA滴定濃度
直腸内	<1/100、<1/100、 <1/100	1/1280、1/640、 1/1280
腹膜内	1/1640、1/100、 1/400	>1/5120、>1/5120、 >1,5120
鼻内	<1/100、<1/100、 <1/100、<1/100	1/160、1/320、 1/320、1/640
皮下	1/800、 1/200、1/6560	>1/5120、>1/5120、 >1/5120

【0122】

2回投与による異常に高いIgG応答:

VSSP-OVAで2度免疫(100 μ g/マウス;14日を隔てて)で驚くほど高い血清Igの生成が得られ、ELISAによって評価したIgG抗体滴定濃度は1/500,000を超えていた。乳ガン抗原nm23およびマラリア抗原MSP4/5をVSSPに結合して2度免疫した後、特異的IgG抗体についても同様の結果が得られた。

【0123】

実施例15:長期持続的応答

VSSP-OVAに対する応答は驚くほど持続的であった。図16は、1度の皮内免疫(100 μ g/マウス)の1年後でも、強いIgGOVA特異的抗体を示すELISA(パネルA)およびSIINFEKLに対するCD8 T細胞応答を示すIFNg ELISPOT(パネルB)が存在することを示す。さらにパネルBは、最適の免疫原性を得るためには固体粒子に抗原が共有結合しなければならないことを示す。

【0124】

実施例16:異種起源のプライム-ブースト

プライミングを行わなかったもの、完全フロイント・アジュバント(CFA)中のMUC1由来のペプチドcp13-32(cp13)、マンナン結合MUC1(組換えMUC1-GST融合タンパク質)(M-FP)または0.1 μ m VSSP-MUC1(組換えMUC1-GST融合タンパク質)(VSSP)によってプライミングを行った動物の応答をブースト(追加刺激)するために牛痘-MUC1を使用した。図17は、VSSP-MUC1でプライムされた牛痘-MUC1ブースト群では、MUC1のペプチド13~32領域に対する応答が、牛痘MUC1を単独で(無/V、VSSP/Vと比較)受け取った動物と比較して増強されたことを示す。したがって、VSSP抗原は異種起源のプライム-ブースト・プロトコルで使用するに適しているであろう。

【0125】

実施例17:VSSP用固体コアの材料組成

0.04-0.05 μ mサイズの固体コアVSSPが免疫原性の主要な決定要素であるという発明者の仮説からはポリスチレン以外の材料で作られた粒子も、このサイズ範囲内であれば高度に免疫原性を示すであろうと予測される。したがって、発明者は、ポリスチレン(PS)またはガラス(G1またはG2)で作られており、同じ化学的操作(G1)またはグルタルアルデヒド(G2)を使用してOVAに結合させた0.05 μ m粒子を用いて皮内に1度免疫したマウスの免疫原性を比較した。図18は、ポリスチレンまたはガラスで作られたVSSPが同様に高度に免疫原性であり、SIINFEKLに対するIFNg産生T細胞の前駆体発生率を高レベルで誘導することを示す(ELISPOTによる)。したがって、タンパク質結合用のVSSPの固体コアはポリスチレンによるばかりでなくガラスでも提供することができ、他の材料、例えば、PLGも固体コアとして機能を有することが予想される。

【0126】

実施例18:VSSPへの抗原の結合

0.05 μ m粒子と混合した抗原は抗原単独よりも高い免疫原性を示すが、共有結合による結合が最適の免疫原性に必要なことを結果が示している。したがって、VSSPに抗原を結合させるために使用する化学的操作が理論上免疫原性の決定要素となり得る。特に、粒子の全面的な帯電は、特異的血清または他の内在的なタンパク質との相互作用を促進することができた。これらは、その結果として、理論上樹状細胞による取込みを促進し、高い免疫原性を誘導することができる。このために試験するために、マウスを、表面帯電量が異なる50nm(つまり0.05 μ m)の粒子で免疫した。OVA-VSSPはカルボン酸塩で修飾したナノ粒子を使用しているため全体として負電荷を有しており、グリシンを備えたOVAとの結合後には活性化されたカルボン酸基がクエンチされる(グリシン、図19)。また、エタノールアミンとの反応をクエンチすることにより、結合後の電荷はOVAの純電荷を除いて中和することができる(アルコール、図19)。エチレンジアミンでクエンチすることによって、正電荷が導入される(アミン、図19)。アミノアセタルデヒドジメチルアセタールでクエンチすることによって、潜在的に有用なアルデヒド基を導入することができる(アルデヒド、図19)。結合プロトコルにおけるこれら3種の修飾はすべて免疫原性が高い粒子となるが、アミンとアルコールによる修飾はグリシンに匹敵し、アルデヒドはわずかに免疫原性が低くなる。したがって、粒子への反対の電荷の導入が同様の免疫性をもたらすと共に血清タンパク質の非特異性の吸着による限りではほとんどあり得ない程高い免疫性である。さらに、結合操作に若干の代替的修正を加えれば、免疫原性を減少させることなく電荷を変化させることができる。

【0127】

考察

上記の結果を考慮すれば、本発明の組成物は、様々な伝染病、ガンまたは他の疾病に適用

10

20

30

40

50

が可能なワクチンまたはワクチン戦略をさらに改善ないし最適化する方法を提供する。

【0128】

VSSPの最適のサイズは、ほとんどの既知のウイルス(30~150nm)のそれと一致する。従って、それはVSSPの使用が生物学上重要であると推測してもよいように思われる。上記の観察から、発明者は、VSSPのサイズ範囲の粒子に完全に反応するように、免疫系が適応し得ると信じる。本発明の前には、免疫応答の刺激はウイルスのサイズ範囲内の免疫の刺激物のサイズに大きく依存し、特に他の病原体(例えば、バクテリア、菌類)由来のエピトープは相当に大きいということは知られていなかったし理解されていなかった。実際に、この経路を通して誘発される標的抗原は、驚くほど広く(免疫応答の両腕である細胞性免疫と体液性免疫の両者を含む)かつ強い応答(長く持続的な高いエフェクターT細胞前駆体発生率を迅速に誘導する)は、免疫系がウイルスのサイズの粒子に完全に反応するために適応していることを示唆している。HepB表面タンパク質または酵母レトロトランスポゾン・タンパク質(Ty)で構成されたVIP(つまり粒子に結合されない純粋な抗原)を利用する従来の研究も単回免疫投与によって導入される広く長く持続的な免疫を示していたが、VSSPに比べれば、その応答はまだ10~100倍も低かった[1、2、3、19、20]。しかし、サイズ以外の要素、例えば、その脂質やマンナン成分、または膜結合タンパク質なども、VLPがクラスI制限T細胞応答を誘導するの能力の原因と考えられていた[1]。理論によって拘束されることを望むものではないが、本発明者は、*in vivo*におけるVSSPによる樹状細胞などの抗原提示細胞への効率的に標的とする組合せは、その後にタンパク質分解による潜在的な遅い抗原放出が続き、特に強力な免疫原性を生成したのではないかと考えている。

【0129】

新規ワクチンとしてのVSSPの使用は、OVAモデルにおいてガン細胞による抗原投与を引き続いて行った場合、これからの保護を果たす単回免疫投与の能力により実証された。本発明者は、乳ガンで発現する抗原であるムチン-1(MUC-1)に対する広く強い免疫原性および保護も観察した。それらの動物研究で利用した皮内投与ルートは、人間にも容易に実施することができる。VSSPは、このようにヒトのワクチン開発のために特に魅力的で単純な戦略を提示し、特に、体液性免疫と細胞性免疫の両者が保護生成に参加する、マラリア、ガンおよびウイルス性疾病、顕著には、AIDSおよび肝炎[10、12、21、25-28]などの疾病に対して有効である。また、組換え抗原をクラスI提示経路の標的とすることにより、多数のエピトープに対するT細胞応答誘導の可能性を提示し、したがって、MHCの様々な標的ヒト集団におけるそうしたワクチンの使用にも及び得るであろう。

【0130】

現在、CTLの有効な刺激のためのDCのプライミングは、DCの*ex vivo*でのパルス処理によって行われているが、これは高価で、物流的にも困難である。本発明は、効率的にDCに*in vivo*で抗原を送達し、これに続けて抗原特異的CD8 T細胞の多数の誘導および免疫保護をもたらす代替法を提供する。0.04-0.05 μm の狭いサイズ範囲内のVSSPがCD8 T細胞を誘導する能力は非常に高いが、これはMHC1処理経路および/またはAPC機能の直接刺激を標的として、APCによる、または有力な部分集合による効率的な取込みの結果であり得る。VSSIPの取込みは、他のサイズと比較して、リンパ節中で増強されると判明し、また、この増強は粒子陽性DEC205+細胞、すなわちDCマーカーの発生率が増加することによる。DCは強力なAPCであり、CD40およびCD86の発現はさらに効率的なCD8T細胞プライミングの有能な部分集合を特徴づける。これらのマーカーは、VSSP+細胞中に高い割合で見つかった。したがって、*in vivo*におけるこの有力なDC部分集合におけるVSSPの取込みおよび選択的な局在化は、発明による微粒子の免疫原性を説明する。

【0131】

本発明のVSSPの他の利点には、多数のルートを経由しての投与に続きIgA生産を含む免疫応答を誘導する能力およびプライム-ブースト・ワクチン戦略に適している点が含まれる。

【0132】

さらなる研究は、VSSPにユニークな免疫応答を誘発させる生理学的メカニズムを決定する

ためにVSSPを使用することを含むであろう。

【 0 1 3 3 】

ここに記載した本発明については、他の様々な実施形態が、本発明の基礎となる中心的概念から外れることなく当業者によってなされ得ることが理解されるべきである。

【 0 1 3 4 】

「参考文献」

REFERENCES

1. Reimann J, Shirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol.Rev.* 1999;172:131-152. 10
2. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur. J. Immunol.* 1995;25:1063-1070. 20
3. Plebanski M, Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, Layton G, Blanchard T, Becker M, Smith G, Butcher G, Sinden RE, Hill AV. Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur J Immunol* 1998;28:4345-55.
4. (P. Johansen, B. Gander, HP Merkle and D Sesardic, Ambiguities in the Preclinical Quality Assessment of Microparticulate Vaccines, *TIBTECH* 2000, 18:203). 30
5. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 1995;60:1539-45.
6. Plebanski. Preparation of lymphocytes and identification of lymphocyte subpopulations in *Lymphocytes: a practical approach* 1999;Edited by Rowland-Jones, SL and McMichael, AJ:1-26. 40
7. Pietersz GA, Li W, Popovski V, Caruana J-A, Apostolopoulos V, McKenzie IFC. Parameters for using mannan-MUC1 fusion protein to induce cellular immunity. *Cancer Immunol Immunother* 1998;45:321-326.

8. Fazekas de St. Groth S. The evaluation of limiting dilution assays. *J Immunol Methods* 1982; 49:R11.
9. Lefkovits I, Waldmann H. Limiting dilution analysis of the cells of the immune system. I. The clonal basis of the immune response. *Immunol Today* 1984; 5:265.
10. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369-96. 10
11. Faló LD, Jr., Kovacsovics-Bankowski M, Thompson K, Rock KL. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1995;1:649-53.
12. Robinson SP, Saraya K, Reid CD. Developmental aspects of dendritic cells in vitro and in vivo. *Leuk Lymphoma* 1998;29:477-90. 20
13. Mosleh IM, Hubers LA, Steinlein P, Pasquali C, Gunther D, Meyer TF. *Neisseria gonorrhoeae* porin modulates phagosome maturation. *J. Biol. Chem.* 1998;273:35332-35338.
14. Lamaze, Ch. & Schmid, S.L. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 573-80 (1995).
15. Werling, D. et al. Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cell. *J. Leukoc Biol* 66, 50-8 (1999). 30
16. Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E. & Allard, J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127, 1217-32 (1994).
17. Anderson, R.G. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10909-13 (1993). 40
18. Reimann, J. & Kaufmann, S.H. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity [see comments]. *Curr Opin Immunol* 9, 462-9 (1997).

19. Gilbert SC, Plebanski M, Harris SJ, Allsopp CE, Thomas R, Layton GT, Hill AV. A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes. *Nat Biotechnol* 1997;15:1280-4.
20. Gilbert SC, Schneider J, Plebanski M, Hannan CM, Blanchard TJ, Smith GL, Hill AV. Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 1999;380:299-303. 10
21. Plebanski M, Hill AVS. The immunology of malaria infection. *Curr.Opin.Immunol.* 2000;12:437-441.
22. Apostolopoulos V, McKenzie IF, Pietersz GA. Breast cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunol Cell Biol* 1996;74:457-64.
23. Cook G, Campbell JD. Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumour conflict. *Blood Rev* 1999;13:151-62. 20
24. Gupta RK, Singh M, OHagan DT. Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998;32:225-246.
25. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:29-60.
26. Pierson T, McArthur J, Siciliano RF. Reservoirs for HIV: mechanisms for viral persistence in the presence of anti-viral immune responses and anti-retroviral therapy. *Annu.Rev.Immunol.* 2000;18:665-708. 30
27. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18.
28. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C. Cellular responses to interferongamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-95. 40
29. Arnold-Schild, D. et al. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol* 162, 3757-60 (1999).

【図面の簡単な説明】

【図 1】 マクロファージによる異なるサイズの粒子の差別的取込みを樹状細胞の場合と比較して示したグラフである。

【図2】 異なるサイズのビーズに結合したOVAによって免疫されたIFN γ 産生CD8およびCD4 T細胞の誘導(パネルA)、SIINFEKLに応じた細胞傷害活性を有するT細胞とIFN γ 分泌T細胞とのELISPOTによる相関(パネルB)および異なるサイズのビーズに結合したOVAによる免疫によって誘導された抗体産生(パネルC)を示すグラフである。

【図3】 最適なT細胞応答を誘導するのに必要な結合が抗原のビーズへの共有結合であることを示すグラフである。

【図4】 C57BL/6マウスをビーズ-OVA(0.1ミクロン)で間隔をあけて皮内免疫した場合についてSIINFEKLに対するこれらのIFN γ 応答をELISPOTによって調べた結果(パネルA)およびマウスをビーズ-OVA(0.1ミクロン)で免疫しSIINFEKLまたはOVAに対するIFN γ 応答をELISPOTによって調べた結果(パネルB)を示すグラフである。

10

【図5】 皮内免疫後にビーズを取り込んだ滲出リンパ節中細胞によるCD40発現を示すグラフである。

【図6】 0.1 μ mOVAビーズに応じたマウスの未熟および成熟DC増殖の誘導を示すグラフである。

【図7】 *in vivo*において0.04 μ m粒子を取り込んだAPC表現型の同定を示すグラフである。

【図8A】 DCによるウイルス・サイズ粒子取込みのメカニズムを示すグラフである。

【図8B】 図8Aの結果を再確認したグラフである。

【図9】 可溶OVAおよび1 μ m-OVAビーズおよび0.05 μ m-OVAビーズの保護効果を示すグラフである。

20

【図10】 細胞の共焦点顕微鏡写真像である。

【図11】 C57/B6マウスを、OVA-VSSPで1回皮内(ID)免疫するか(免疫)、処理せず(未処理)、 5×10^6 EG7(腫瘍細胞)を皮下注入30日後に抗原投与した結果を示すグラフである。

【図12】 VSSP免疫後に致死性マラリアの抗原投与を受けたマウスの存命結果を示すグラフである。

【図13】 抗原nm23を0.05 μ ビーズに結合し(VSP)、100 μ g/マウスの割合でマウスに皮内注射し、10日後のIFNガンマ活性を免疫された動物の脾臓についてELISPOTによって評価した結果を示すグラフである。

【図14】 ガン抗原nm23またはOVAを、標準プロトコルによりVSPに結合し100 μ g/マウスの割合で皮内注射し、10日後に、IL4分泌細胞の誘導をELISPOTによって評価した結果を示すグラフである。

30

【図15A】 OVAに結合した0.05 μ mビーズ(VSP-OVA)で1度皮内免疫したマウス血清中のOVAへの抗体応答性および非免疫対照群(Aグループ)と比較した90日後のELISAによるその評価(Bグループ)を示すグラフである。

【図15B】 図15Aのマウスと同じ血清について、2頭の未処理マウス(A2とA3)および3頭のVSP-OVAマウス(B2、3および5)中のOVA特異的IgE抗体の存在をELISAにより試験した結果を示すグラフである。

【図16】 単回免疫による長期持続性抗体応答の誘導を示すグラフ(パネルA)および0.04 μ mビーズ-OVAによる1度の免疫によるIFN γ 産生T細胞の長期持続的高レベル誘導を示すグラフ(パネルB)である。

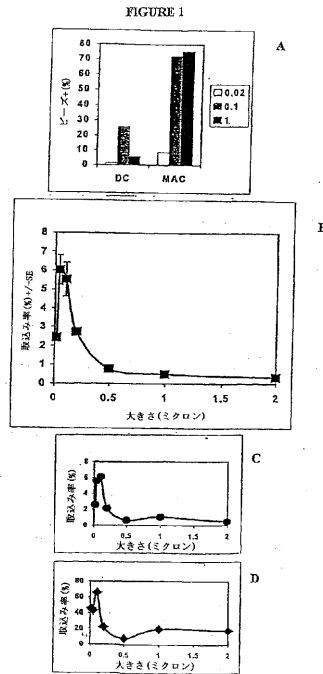
40

【図17】 C57/B6動物を未処理(処理なし)とするか、またはMUC1由来ペプチドcp13-32の100 μ gを完全フロイント・アジュバント中KLH700ugと結合したもの(cp13)、マンナンに結合した組換えMUC1-GST融合タンパク質(MFP)または0.1 μ m VSPと結合したMUC1-GST融合タンパク質(VSP)で皮内に1度プライムし、次いで追加刺激した結果を示すグラフである。

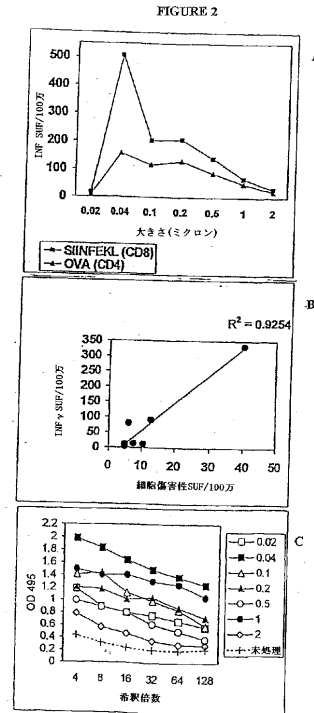
【図18】 ポリスチレンとガラスの0.05 μ mVSP-OVA粒子の比較を示すグラフである。

【図19】 C57/B6マウスをVSSP-OVA粒子で皮内免疫し、CD8 T細胞エピトープSIINFEKLへのIFN γ ELISPOTによって脾臓中で評価した結果を示すグラフである。

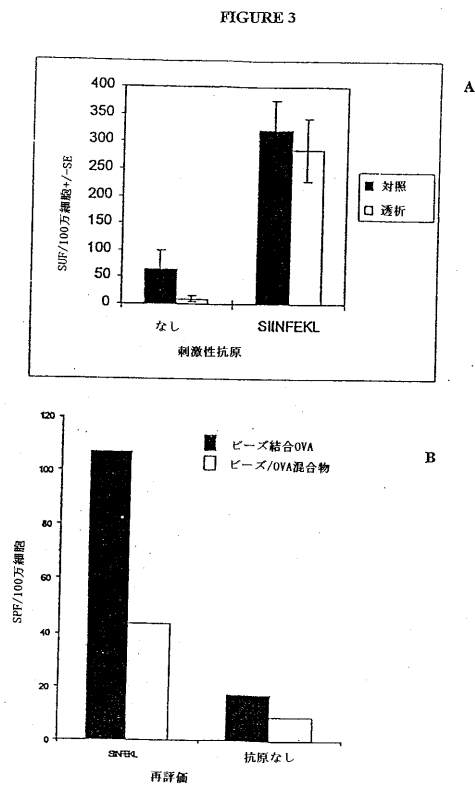
【図 1】



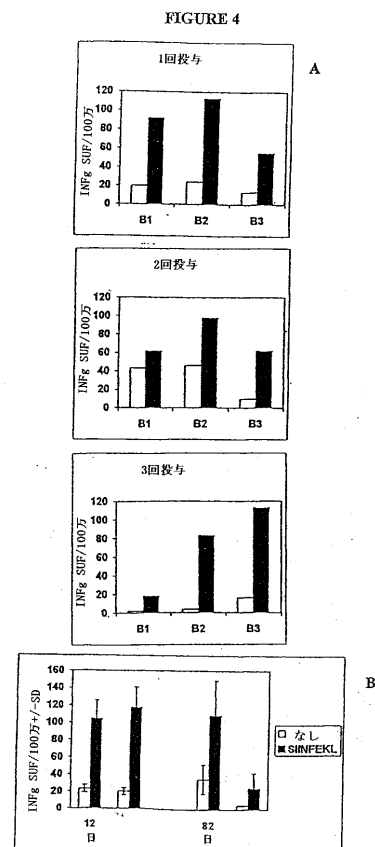
【図 2】



【図 3】

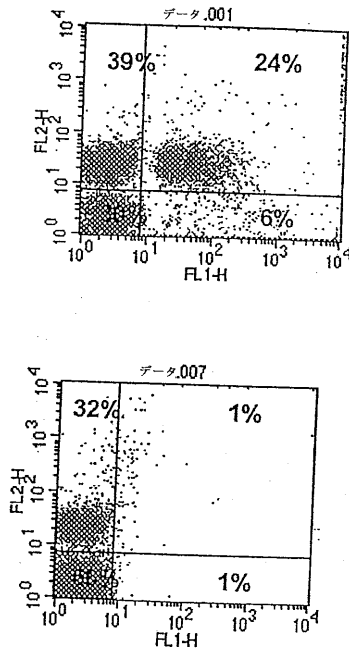


【図 4】



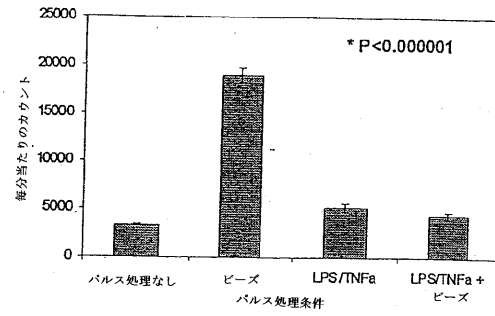
【図 5】

FIGURE 5



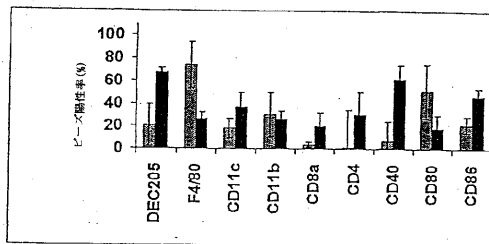
【図 6】

FIGURE 6



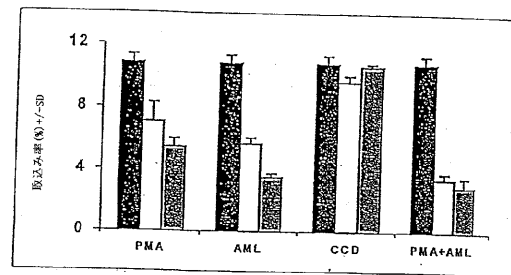
【図 7】

FIGURE 7

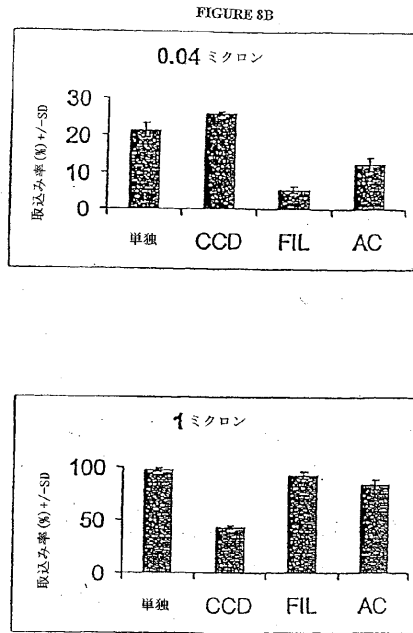


【図 8 A】

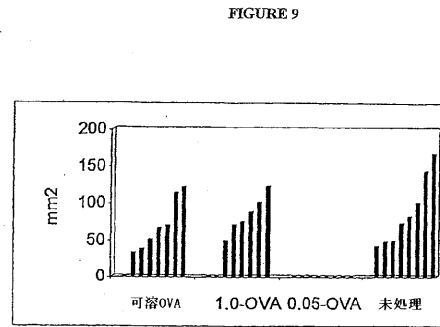
FIGURE 8A



【図 8 B】

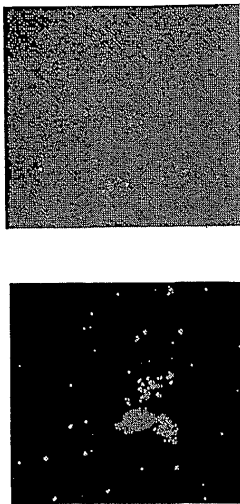


【図 9】



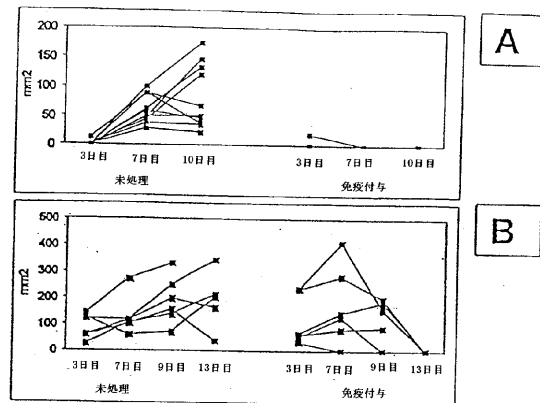
【図 10】

FIGURE 10



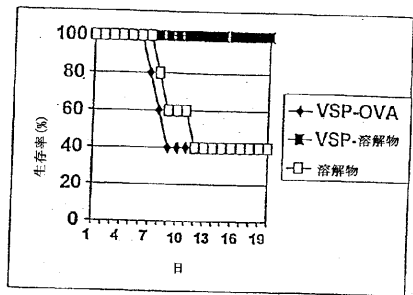
【図 11】

FIGURE 11



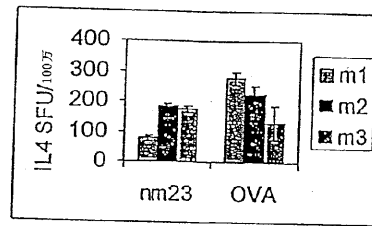
【図 1 2】

FIGURE 12



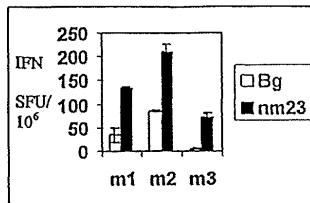
【図 1 4】

FIGURE 14



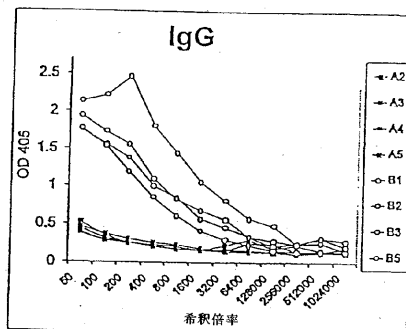
【図 1 3】

FIGURE 13



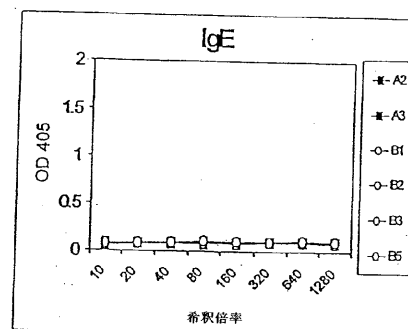
【図 1 5 A】

FIGURE 15A



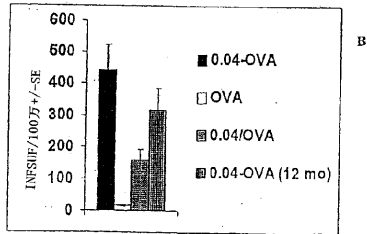
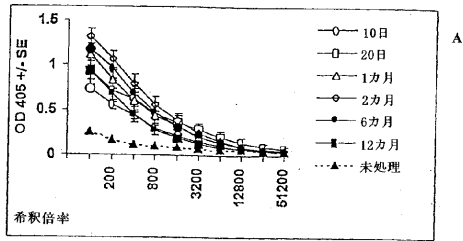
【図 1 5 B】

FIGURE 15B



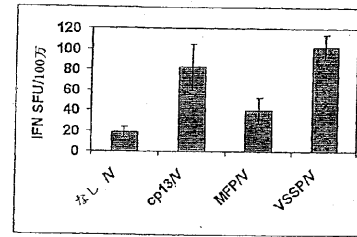
【図 16】

FIGURE 16



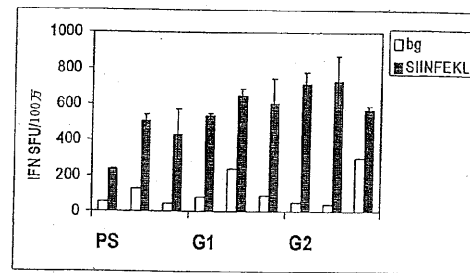
【図 17】

FIGURE 17



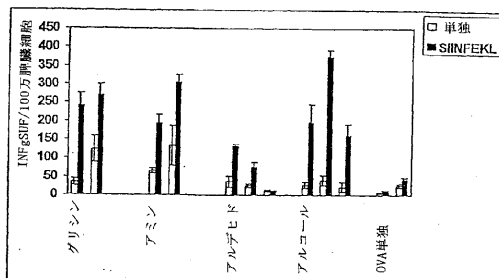
【図 18】

FIGURE 18



【図 19】

FIGURE 19



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(31)優先権主張番号 PR 4962

(32)優先日 平成13年5月14日(2001.5.14)

(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(74)代理人 100094400

弁理士 鈴木 三義

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 マグダレーナ・ブレバンスキ

オーストラリア・ビクトリア・3 0 6 8・クリフトン・ヒル・ラムズデン・ストリート・1 3 9

審査官 渡邊 倫子

(56)参考文献 特開平05-255111(JP,A)

特開昭51-118823(JP,A)

特表平04-507106(JP,A)

特表平08-505387(JP,A)

J Microencapsulation, 17[2] (2000 Mar) p.215-225

J Drug Targeting, 8[1] (2000 Jan) p.1-8

Pharmaceutical Res., 15[2] (1998) p.270-75

Vaccine, 14[17/18] (1996) p.1677-85

Eur J Immunol., 28 (1998) p.1401-07

J Virol., 72[7] (1998) p.5757-61

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00-39/44

A61K 38/00-38/58

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)