(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2007-509164
(P2007-509164A)
(43)公表日　平成19年4月12日(2007.4.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	Z	4C076
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 47/18	(2006.01)	A61K	47/18		4C085
A61K 47/20	(2006.01)	A61K	47/20		4H045
A61P 37/02	(2006.01)	A61P	37/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 79 頁）　最終頁に続く

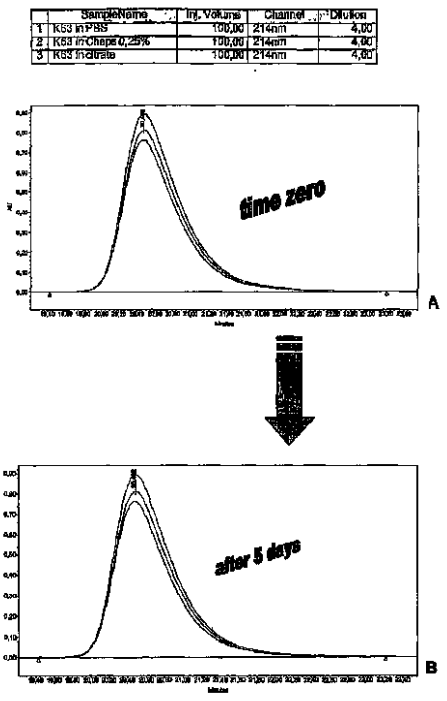
(21)出願番号　特願2006-536824 (P2006-536824)
(86)(22)出願日　平成16年10月22日 (2004.10.22)
(85)翻訳文提出日　平成18年5月30日 (2006.5.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/035039
(87)国際公開番号　WO2005/042016
(87)国際公開日　平成17年5月12日 (2005.5.12)
(31)優先権主張番号　60/514,307
(32)優先日　平成15年10月23日 (2003.10.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/561,999
(32)優先日　平成16年4月13日 (2004.4.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591076811
カイロン　コーポレイション
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４６０８，エミリービル，ホートン　ストリート　４５６０
(71)出願人　506131020
マガグノリ，　クラウディア
イタリア国　イ－５３１００　シエナ，ビア　フィオレンティーナ　１
(71)出願人　506131031
モランディー，　マウリジオ
イタリア国　イ－５３１００　シエナ，ビア　フィオレンティーナ　１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】安定化組成物

(57)【要約】
本発明は、細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素クラスのタンパク質（ｂＡＲＥ）の安定化、ｂＡＲＥクラスのタンパク質の分析法、ｂＡＲＥクラスの細菌タンパク質の安定化法、安定化ｂＡＲＥタンパク質を含んでなる組成物、実質的に完全なｂＡＲＥタンパク質を含んでなる組成物、前記のものを組み込んだ免疫原性組成物製剤に関する。本発明は、（ｉ）非解離条件下でｂＡＲＥタンパク質を分離する方法；（ｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質の完全性の程度を判断する方法；（ｉｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質を安定化できる安定化剤；（ｉｖ）ｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
実質的に完全なｂＡＲＥクラスのタンパク質を含有する、組成物。
【請求項２】
前記組成物が、安定化剤を含有する、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記安定化剤が、荷電アミノ酸またはそのアナログである、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記安定化剤が、アルギニンまたはリン酸アルギニンである、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記アルギニンまたはリン酸アルギニンが、約１００ｍＭ～約４００ｍＭの量で存在する、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
前記組成物が、非荷電物質またはそのアナログを含有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物が、両性イオン性物質を含有する、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
前記両性イオン性物質が、両性イオン性界面活性剤である、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記両性イオン性界面活性剤が、３－（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）である、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記両性イオン性界面活性剤が、約０．０５重量体積（ｗ／ｖ）％～約０．５重量体積（ｗ／ｖ）％の量で存在する、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記組成物が、請求項３～５のいずれか一項に記載の荷電アミノ酸またはアナログおよび請求項６～９のいずれか一項に記載の非荷電物質を含有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ｂＡＲＥクラスタンパク質の完全性が、完全性比を参照して決定される、請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記ｂＡＲＥタンパク質が、ＡＢ５タンパク質である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ｂＡＲＥタンパク質が、ＬＴＫ６３タンパク質またはＬＴＫ７２タンパク質である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
ｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法であって、ｂＡＲＥクラスタンパク質を提供する工程、および該ｂＡＲＥクラスタンパク質を安定化剤と合わせる工程を包含する、方法。
【請求項１６】
前記安定化剤が、荷電アミノ酸またはそのアナログである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記安定化剤が、アルギニンまたはリン酸アルギニンである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記アルギニンまたはリン酸アルギニンが、約１００ｍＭ～約４００ｍＭの量で存在する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記安定化剤が、非荷電物質である、請求項１５に記載の方法。
【請求項２０】
前記非荷電物質が、両性イオン性物質である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】
前記両性イオン性物質が、両性イオン性界面活性剤である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記両性イオン性界面活性剤が、３－（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記両性イオン性界面活性剤が、約０．０５重量体積（ｗ／ｖ）％～約０．５重量体積（ｗ／ｖ）％の量で存在する、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記安定化剤が、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の荷電アミノ酸、および請求項１９～２３のいずれか一項に記載の非荷電物質を含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項２５】
前記ｂＡＲＥクラスタンパク質の安定化が、完全性比を参照して決定される、請求項１５～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ｂＡＲＥタンパク質が、ＡＢ５タンパク質である、請求項１５～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＡＢ５タンパク質が、ＬＴＫ６３タンパク質またはＬＴＫ７２タンパク質である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
完全ｂＡＲＥクラスタンパク質と解離ｂＡＲＥクラスタンパク質とを識別する非解離条件下で、ｂＡＲＥクラスタンパク質を分析する、方法。
【請求項２９】
前記方法が、荷電ポリマー分離材上での分離工程を包含する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記ポリマー分離材が、ヒドロゲルモノマーである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記ヒドロゲルモノマーが、ヒドロキシル化ポリメタクリレート（ＨＥＭＡ）モノマーである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＨＥＭＡが、約６ミクロンの粒径を有する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＨＥＭＡが、約２５０Ａの多孔度を有する、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３４】
ｂＡＲＥクラスタンパク質を分析する方法であって、該方法は、以下：
（ｉ）解離ｂＡＲＥクラスタンパク質から完全ｂＡＲＥクラスタンパク質を分離するように構成された装置において、ｂＡＲＥクラスタンパク質を荷電ポリマー分離材に添加する工程；
（ｉｉ）該添加されたｂＡＲＥクラスタンパク質を含む分離材を、イオン性緩衝液で処理する工程；および
（ｉｉｉ）１種以上の完全または解離ｂＡＲＥクラスタンパク質を検出する工程、
包含する、方法。
【請求項３５】
前記分離材が、請求項３０～３３のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記イオン性緩衝液が、約７．０～約８．０のｐＨを有する生理学的に受容可能な緩衝液である、請求項３４または３５に記載の方法。
【請求項３７】

ｂＡＲＥクラスタンパク質の安定化剤を同定するための方法であって、該方法は、以下：
（ｉ）ｂＡＲＥクラスタンパク質を、候補安定化剤と合わせて、ｂＡＲＥタンパク質サンプルを形成する工程；
（ｉｉ）解離ｂＡＲＥクラスタンパク質から完全ｂＡＲＥクラスタンパク質を分離するように構成された装置において、該ｂＡＲＥタンパク質サンプルを荷電ポリマー分離材に添加する工程；
（ｉｉｉ）該添加されたｂＡＲＥクラスタンパク質を含む分離材を、イオン性緩衝液で処理する工程；
（ｉｖ）１種以上の完全または解離ｂＡＲＥクラスタンパク質を検出する工程；および
（ｖ）該候補安定化剤が、ｂＡＲＥタンパク質の安定化剤であるか否かを決定する工程、
を包含する、方法。
【請求項３８】
前記ｂＡＲＥタンパク質サンプルの完全性比を計算する工程を包含する、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ｂＡＲＥタンパク質サンプルの前記完全性比を、候補安定化剤を含まないコントロールの完全性比と比較する工程をさらに包含する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
請求項３７～３９のいずれか一項に記載の方法により同定される、安定化剤。
【請求項４１】
機能的安定化剤である、請求項４０に記載の安定化剤。
【請求項４２】
物理的安定化剤である、請求項４０に記載の安定化剤。
【請求項４３】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物を含有する、免疫原性組成物。
【請求項４４】
アジュバントをさらに含有し、該アジュバントが前記ｂＡＲＥタンパク質ではない、請求項４３に記載の免疫原性組成物。
【請求項４５】
前記アジュバントが、粘膜アジュバントである、請求項４４に記載の免疫原性組成物。
【請求項４６】
免疫疾患を予防および／または治療するための医薬の調製における、請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項４７】
請求項４３～４５のいずれか一項に記載の組成物を投与する工程を包含する、免疫疾患を予防および／または治療するために哺乳動物を処置する方法。
【請求項４８】
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
ｂＡＲＥタンパク質を物理的に安定化させるための荷電物質の使用。
【請求項５０】
前記荷電物質が、荷電アミノ酸塩基である、請求項４９に記載の使用。
【請求項５１】
前記荷電アミノ酸が、正に荷電したアミノ酸である、請求項５０に記載の使用。
【請求項５２】
前記正に荷電したアミノ酸が、アルギニンもしくはリン酸アルギニンまたはそれらのアナログである、請求項５１に記載の使用。
【請求項５３】
ｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化するための、非荷電物質またはそのアナログの使用。

【請求項５４】
前記非荷電物質が、両性イオン性物質である、請求項５３に記載の使用。
【請求項５５】
前記両性イオン性物質が、両性イオン性界面活性剤である、請求項５４に記載の使用。
【請求項５６】
前記両性イオン性界面活性剤が、３－（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）である、請求項５５に記載の使用。
【請求項５７】
ｂＡＲＥタンパク質を安定化するための、荷電物質および非荷電物質またはそれらのアナログの組合せの使用。
【請求項５８】
前記荷電物質が、請求項５０～５２のいずれか一項に定義されており、前記非荷電物質が、請求項５３～５６のいずれか一項に定義されている、請求項５７に記載の使用。
【請求項５９】
前記ｂＡＲＥタンパク質が、ＡＢ５タンパク質である、請求項４９～５８のいずれか一項に記載の使用。
【請求項６０】
前記ＡＢ５タンパク質が、ＬＴＫ６３またはＬＴＫ７２である、請求項６０に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素クラスのタンパク質（ｂＡＲＥ）の安定化、ｂＡＲＥクラスのタンパク質の分析法、ｂＡＲＥクラスの細菌タンパク質の安定化法、安定化ｂＡＲＥタンパク質を含んでなる組成物、実質的に完全なｂＡＲＥクラスタンパク質を含んでなる組成物、前記のものを組み込んだ免疫原性組成物製剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
（背景）
タンパク質治療薬開発の重要な部分は、タンパク質治療薬の用量および活性を慎重に制御できるように、活性を損失することなく長期間にわたって貯蔵することができる安定化された形態でタンパク質を調製することである。
【０００３】
ポリペプチド類は、変性、ならびに可溶性および不溶性凝集物の形成などの物理的不安定性、ならびに、加水分解、酸化、およびアミド分解などの種々の化学的不安定性の結果、生物学的活性を失い得る。液体製薬製剤におけるポリペプチドの安定性は、例えば、ｐＨ、イオン強度、温度、凍結－解凍の反復サイクル、および処理中などに生じる機械的せん断力の作用下などの因子によって影響され得る。凝集物の形成および生物学的活性の損失はまた、物理的攪拌ならびに溶液中および貯蔵バイアル内の液体－気体境界面におけるポリペプチド分子の相互作用の結果としても生じ得る。さらに、輸送中またはその他の状況下で攪拌から生じる境界面の圧縮－拡張時に気体－液体および固体－液体境界面に吸着されるポリペプチドに立体配置の変化が生じ得る。このような攪拌が原因で、タンパク質が絡み合い、凝集し、粒子を形成し、最終的に他の吸着タンパク質と沈殿し得る。タンパク質薬剤の安定性の一般的レビューに関しては、例えば、非特許文献１および非特許文献２を参照されたい。
【０００４】
多量体タンパク質治療薬の開発には、特に、多量体タンパク質の完全性が治療薬の最終産物の有効性にとって決定的である場合、さらなる課題が提起される。このような場合は、活性を損失させることなく、タンパク質を沈殿または凝集させることなく該タンパク質を確実に維持する必要があるだけでなく、治療薬の最終産物において、多量体タンパク質

の完全性が維持されているかどうかをチェックすることもまた重要である。

【０００５】

今まで、Ａ：Ｂ多量体として構成されている細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素クラスのタンパク質（ｂＡＲＥ）などの多量体タンパク質の安定化の分野における研究者は、このようなタンパク質を研究する際、少なくとも２つの異なったタイプの問題に直面してきた。特に、ｂＡＲＥタンパク質は、（ｉ）変性、ならびに可溶性および不溶性凝集物の形成などの物理的不安定性の結果として；および／または（ｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質がそのＡおよびＢサブユニット形態に部分的または完全に解離することにより、それらの生物学的活性を失い得る。

【０００６】

多量体タンパク質などのタンパク質は、凝集体または結晶粒子を形成し得るため、このようなタンパク質が溶液からいつ沈殿するかを知ることは容易であることもある。他方、例えばタンパク質アッセイでは、多量体タンパク質の元の形態および解離形態が識別されないため、該多量体タンパク質がサブユニット形態に、部分的にまたは完全に解離しているかどうかを判断することはそれほど容易ではない。

【０００７】

現在まで、ｂＡＲＥタンパク質多量体の完全性を、その多量体構造の完全性を失うことなしに、測定する方法についての知見は得られていない。多量体ｂＡＲＥクラスのタンパク質を特性化するために用いられる電気泳動、免疫ブロット法、質量分析、およびアミノ酸分析などの現在の分析法では、完全な多量体構造と解離した個々のサブユニット形態との間を識別することはできない。このように完全なｂＡＲＥタンパク質と解離したｂＡＲＥタンパク質とを識別できないのは、現在の分析法がＡおよびＢのサブユニット形態への解離を必要とし、そのため完全な多量体ｂＡＲＥ分子の構造体制が維持されないためである。また、これらの方法では、解離したサブユニット分子と比較して完全多量体ｂＡＲＥ分子を定量化することができない。したがって、現在の分析法は、多量体ｂＡＲＥタンパク質の経時的な解離（または完全性の喪失）の研究のためにも、また、多量体ｂＡＲＥタンパク質を安定化するための方法を探索するためにも有用ではない。また、単量体サブユニット形態への解離を必要としないゲル濾過法などの旧来の分離法が用いられたとしても、各サブユニット形態の保持時間が極めて近いため、これらの方法は、各サブユニット形態を良好に分離することができず、あまり有効ではない。

【０００８】

その結果、ｂＡＲＥ分子の特定のサンプルが完全な形態で存在するか、それとも解離した形態で存在するかを判断する信頼できる方法を、今まで、ｂＡＲＥ分子の分野における研究者は得ることができなかった。このような方法は、（ｉ）完全な多量体ｂＡＲＥ構造と、解離した別個のＡおよびＢサブユニットとの識別のために有用であるだけでなく、（ｉｉ）有効な安定化剤の同定を含め、ｂＡＲＥクラスのタンパク質の安定性に必要とされる条件の研究および決定のためにも有用であると考えられる。ｂＡＲＥクラスのタンパク質の安定性を評価、実現、および定量化する方法は、（ｉｉｉ）例えば免疫原性（例えば、ワクチン）組成物などの組成物の一部として、または単独でのｂＡＲＥクラスタンパク質の適切な製剤、ｂＡＲＥタンパク質の安定な貯蔵および送達の開発にとって、極めて有用であると考えられる。

【０００９】

上述したように、治療薬として、ｂＡＲＥタンパク質などのタンパク質ベースの薬剤の使用において克服しなければならないもう一つの主要な障害は、製薬製剤でのその不安定性から生じ得る薬剤的実用性の損失である。製薬組成物中でのポリペプチドの安定化は、いまだに試行錯誤の域を出ない（非特許文献３；非特許文献４によるレビュー）。ポリペプチド製薬製剤の安定性を増大させるためにそれらに添加される賦形剤としては、緩衝剤、糖類、界面活性剤、アミノ酸、ポリエチレングリコール類、およびポリマー類が挙げられるが、これらの化学的添加剤の安定化効果は、タンパク質に依って変化し得る。ポリペプチドの活性および有効性を脅かす物理的不安定性としては、変性、ならびに可溶性およ

び不溶性凝集物の形成が挙げられる。これらの変化のいくつかは、対象となっているｂＡＲＥタンパク質の薬剤活性の損失または低下をもたらすことが知られている。そのほかの変化については、これらの変化の正確な作用は不明だが、生じる分解産物に望ましくない副作用があり、このため、これら分解産物は、依然として薬剤的に許容できないものと考えられている。

【００１０】

製薬組成物の貯蔵中、ｂＡＲＥ分子などのポリペプチドによる凝集物の形成は、そのポリペプチドの生物学的活性に悪影響をおよぼし、該製薬組成物の薬剤活性または治療的有効性の損失または低下をもたらし得る。さらに、凝集物形成は、クロマトグラフィー法などの分析システムを用いてｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性を判断する場合、または、注入システムを用いてｂＡＲＥタンパク質ベースの製薬組成物が投与される場合、菅類、膜類、またはポンプ類の封鎖などの他の問題を引き起こし得る。また、タンパク質の凝集形態を含む製薬組成物の注入は、凝集タンパク質に対する免疫原性反応を生じさせる可能性がある。

【非特許文献１】Ｍａｎｎｉｎｇら、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．、１９８９年、第６巻、ｐ．９０３－９１８

【非特許文献２】ＷａｎｇおよびＨａｎｓｏｎ、Ｊ．Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ　Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈ．、１９８８年、第４２巻、ｐ．Ｓ１４

【非特許文献３】Ｗａｎｇ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．、１９９９年、第１８５巻、ｐ．１２９－１８８

【非特許文献４】ＷａｎｇおよびＨａｎｓｏｎ、Ｊ．Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ　Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈ．、１９８８年、第４２巻、ｐ．Ｓ３－Ｓ２６

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

したがって、（ｉ）ｂＡＲＥタンパク質の経時的安定性を判断する方法を見出す；（ｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質の経時的安定性を改善できる安定化剤を同定する；（ｉｉｉ）貯蔵時に安定で、経時的に長期の活性を有するｂＡＲＥ組成物を提供すること、もまた必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

（概要）

本発明は、（ｉ）非解離条件下でｂＡＲＥタンパク質を分離する方法；（ｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質の完全性の程度を判断する方法；（ｉｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質を安定化できる安定化剤；（ｉｖ）ｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法；（ｖ）安定化ｂＡＲＥタンパク質を含んでなる組成物；および（ｖｉ）実質的に完全なｂＡＲＥクラスのタンパク質を含んでなる組成物を提供する。

【００１３】

本発明は、当業界に重要な貢献をなす。なぜならば、今回初めて、（ｉ）ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性／完全性が、その多量体構造の完全性を失うことなく評価し得る；（ｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性が、ｂＡＲＥタンパク質の非解離形態および解離形態に関して決定し得る；および（ｉｉｉ）ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する安定化剤候補の影響が、（ｉ）および（ｉｉ）の点によって判断できるからである。

【００１４】

また、本発明は、タンパク質の凝集を減少させ、ｂＡＲＥタンパク質の物理的安定性および／または機能的安定性を増大させる安定化ｂＡＲＥ組成物および安定化ｂＡＲＥ組成物を調製する方法に対し長い間感じられてきた必要性を満足させる。また、本発明の分析方法により、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する物理的安定化剤の効果を評価することおよび／またはｂＡＲＥタンパク質の物理的安定性に対する機能的安定化剤の効果を評価することが、やはり初めて可能になる。この方法で、ｂＡＲＥタンパク質の物理的

安定性または機能的安定性のいずれかに選択的効果を有し得るか、またはｂＡＲＥタンパク質の物理的安定性と機能的安定性の双方に相乗効果を有し得るｂＡＲＥタンパク質安定化剤を同定することができる。したがって、一定の安定化剤を、単独で、または組み合わせて用いることにより、ｂＡＲＥタンパク質の凝集の減少、それによるｂＡＲＥタンパク質の物理的安定性の増大および／またはｂＡＲＥタンパク質の解離の減少、それによるｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性の増大を達成できるか、または経時的に維持できる。

【００１５】

本発明の第一の態様により、実質的に完全なｂＡＲＥクラスのタンパク質を含んでなる組成物が提供される。

【００１６】

ｂＡＲＥタンパク質の完全構造を失うことなく、該タンパク質の完全性を評価するための分析法が以前得られていないため、実質的に完全なｂＡＲＥタンパク質の存在が決定されたのは今回が初めてである。

【００１７】

本発明の第二の態様により、ｂＡＲＥクラスのタンパク質を提供し、該ｂＡＲＥクラスのタンパク質を安定化剤と組み合わせることを含んでなる、ｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法が提供される。本発明のこの態様の利点は、ｂＡＲＥタンパク質を経時的に安定化できることである。

【００１８】

本発明の第三の態様により、完全なｂＡＲＥクラスタンパク質と解離したｂＡＲＥクラスタンパク質とが識別される非解離条件下で、ｂＡＲＥクラスタンパク質の分析法が提供される。

【００１９】

上記で説明したとおり、今まで、ｂＡＲＥタンパク質の完全構造を損失することなく、ｂＡＲＥタンパク質の完全性を評価する方法は得られていなかったため、この方法は有利である。

【００２０】

本発明の第四の態様により、解離したｂＡＲＥクラスタンパク質から完全なｂＡＲＥクラスタンパク質を分析するように構成された装置において、ｂＡＲＥクラスタンパク質を、荷電したポリマー分離材に添加し、添加されたｂＡＲＥクラスタンパク質を含む該分離材をイオン性緩衝剤で処理すること；および１種以上の完全なまたは解離したｂＡＲＥクラスタンパク質を検出することを含んでなる、ｂＡＲＥクラスタンパク質の分析法が提供される。

【００２１】

本発明の他の態様において、ｂＡＲＥクラスタンパク質を安定化剤の候補と組み合わせてｂＡＲＥタンパク質サンプルを形成すること；解離したｂＡＲＥクラスタンパク質から完全なｂＡＲＥクラスタンパク質を分析するように構成された装置において、ｂＡＲＥタンパク質サンプルを、荷電したポリマー分離材に添加すること；添加されたｂＡＲＥクラスタンパク質を含む該分離材をイオン性緩衝液で処理すること；１種以上の完全なまたは解離したｂＡＲＥクラスタンパク質を検出すること；および安定化剤候補がｂＡＲＥタンパク質安定化剤であるかどうかを判断することを含んでなる、ｂＡＲＥクラスタンパク質安定化剤を同定する方法が提供される。

【００２２】

本発明のさらなる態様において、本明細書に定義された安定化ｂＡＲＥ組成物を含んでなる免疫原性組成物（例えば、ワクチン）が提供される。

【００２３】

本発明の他の態様は、添付の請求項および以下の説明および図面において提示される。これらの態様は、個々の節の見出しの下で提示される。しかし、各節の下での教示は必ずしもその特定の見出しに限定されないことを理解すべきである。

【００２４】

次に以下の発明を、以下の図を参照として、単に例として、さらに説明する。以下の例は、本発明を例示し、本発明の作製および使用において、通常の当業者を助ける目的でのみ提示される。これらの例は、他に本発明の範囲を限定することを決して意図するものではない。使用されている数値（例えば、量、温度など）に関する正確性を保証する努力はしたが、多少の実験的誤差および偏差は、当然考慮されるべきであろう。

【００２５】

ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名法委員会により推奨された１字のアミノ酸記号を、参照目的で提供してある３字の記号と共に下記に示してある。

Ａ	Ａｌａ	アラニン
Ｃ	Ｃｙｓ	システイン
Ｄ	Ａｓｐ	アスパラギン酸
Ｅ	Ｇｌｕ	グルタミン酸
Ｆ	Ｐｈｅ	フェニルアラニン
Ｇ	Ｇｌｙ	グリシン
Ｈ	Ｈｉｓ	ヒスチジン
Ｉ	Ｉｌｅ	イソロイシン
Ｋ	Ｌｙｓ	リジン
Ｌ	Ｌｅｕ	ロイシン
Ｍ	Ｍｅｔ	メチオニン
Ｎ	Ａｓｎ	アスパラギン
Ｐ	Ｐｒｏ	プロリン
Ｑ	Ｇｌｎ	グルタミン
Ｒ	Ａｒｇ	アルギニン
Ｓ	Ｓｅｒ	セリン
Ｔ	Ｔｈｒ	トレオニン
Ｖ	Ｖａｌ	バリン
Ｗ	Ｔｒｐ	トリプトファン
Ｙ	Ｔｙｒ	チロシン

【発明を実施するための最良の形態】

【００２６】

（詳細な説明）

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、具体的に例示した分子または処理パラメーターに限定されず、当然変化し得ることを理解する必要がある。また、本明細書に用いられている用語は、本発明の特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定の意図はないことも理解する必要がある。また、本発明の実施には、他に示さない限り、ウィルス学、微生物学、分子生物学、組み換えＤＮＡ法および免疫学の従来の方法が用いられ、それらは全て通常の当業技術の範囲内にある。これらの方法は、文献において十分に説明されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版、１９８９）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、ＩおよびＩＩ巻（Ｄ．Ｇｌｏｖｅｒ編集）；Ｏｌｏｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｎ．Ｇａｉｔ編集、１９８４）；Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；およびＦｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，第２版、Ｉ＆ＩＩ巻（Ｂ．Ｎ．ＦｉｅｌｄｓおよびＤ．Ｍ．Ｋｎｉｐｅ編集）を参照されたい。

【００２７】

本明細書の上記または下記に引用された全ての刊行物、特許および特許出願は、参照として、それらの全体が本明細書に組み込まれている。本明細書および添付の請求項に用いられている単数形の「１つの」および「その」は、その内容が他に明らかに指示されない限り、複数の指示物を含む。本出願に用いられている全ての科学用語および専門用語は、他に規定されない限り、当業界で一般に用いられている意味を有する。本出願において用

いられる以下の語句は、規定された意味を有する。

【００２８】

用語の「含んでなる」は、「含む」ならびに「成り立つ」を意味し、例えば、Ｘを「含んでなる」組成物は、もっぱらＸから成り立つこともあり得るし、また、追加のものを含み得、例えば、Ｘ＋Ｙであり得る。

【００２９】

数値、ｘに関連した用語の「約」は、例えば、ｘ±１０％を意味する。

【００３０】

他に注記されない限り、本明細書に用いられる用語は、当業者に理解されている通常の意味が与えられる。本発明の理解を助けるために、本発明の特定の要素を指示する多数の定義された用語が本明細書に用いられている。そのように用いられる場合、以下の意味が意図されている。

【００３１】

（細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素（ｂＡＲＥｓ））

本明細書に用いられる用語の「ｂＡＲＥ」は、関連細菌の外毒素のファミリーであるＡＤＰ－リボシル化細菌毒素のクラスを言い、ジフテリア毒素（ＤＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、コレラ毒素（ＣＴ）、大腸菌易熱性毒素（ＬＴ１およびＬＴ２）、シュードモナス内毒素Ａ、シュードモナス外毒素Ｓ、Ｂ．セレウス外酵素、Ｂ．ｓｐｈａｅｒｉｃｕｓ毒素、Ｃ．ボツリヌスＣ２およびＣ３毒素、Ｃ．ｌｉｍｏｓｕｍ外酵素、ならびにウェルシュ菌、Ｃ．ｓｐｉｒｉｆｏｒｍａおよびＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、黄色ブドウ球菌ＥＤＩＮ、ＣＲＭ$_{197}$、非毒性ジフテリア毒素変異菌などの細菌ＡＤＰリボシル化毒素変異菌の毒素が挙げられる。（例えば、Ｂｉｘｌｅｒら（１９８９）Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：１７５頁；およびＣｏｎｓｔａｎｔｉｎｏら（１９９２）Ｖａｃｃｉｎｅを参照）多くのＡＤＰ－リボシル化細菌毒素は、ＡサブユニットがＡＤＰ－リボシルトランスフェラーゼ活性と呼ばれる毒性酵素活性を含有し、Ｂサブユニットが結合部分として働くＡ：Ｂ多量体として構成されている。該毒素は、ＮＡＤ＋から標的タンパク質へのＡＤＰ－リボースユニットの転移を触媒する。

【００３２】

本明細書に用いられる用語の「安定化された」は、ｂＡＲＥタンパク質の物理的安定化および／または機能的安定化を言う。また、用語の「安定化された」は、物理的安定性および／または機能的安定性の維持である経時的な貯蔵安定性も言う。

【００３３】

本明細書に用いられる用語の「物理的に安定化すること」または「物理的安定化」は、ｂＡＲＥタンパク質の沈殿または結晶化または凝集または凝集物形成および予想される分解の抑制、低減、抑止、低下、減少、最少化または下降と同義で用いられる。用語の沈殿または結晶化または凝集または凝集物形成は、本明細書を通して交換可能に用いられる。本発明は、ｂＡＲＥ生物学的分子の凝集または凝集物形成を実質的に最少化する安定化剤を用いてｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法を含む。実質的な最少化とは、該安定化剤を含まない対象と比較して、約２５％から約１００％の凝集または凝集物形成の減少を言う。凝集または分解は、好ましくは約５０％、より好ましくは約７５％、さらにより好ましくは約１００％抑制される。

【００３４】

「凝集化」または「凝集物形成」により、可溶性のままであり得るか、または溶液から沈殿または結晶化し得るオリゴマーまたは他のより高次形態の形成をもたらし得るポリペプチド分子間の物理的相互作用が意図されている。本明細書に用いられている用語の「オリゴマー」は、約２つから約５つの多量体ｂＡＲＥユニットなどの複数の多量体ｂＡＲＥユニットを含んでなる分子を意味する。

【００３５】

本発明のｂＡＲＥ組成物の物理的安定性をモニタリングする方法は、本明細書に開示された実施例に記載された方法を含み、当業界で利用できるものである。したがって、本発

明の液体製薬組成物貯蔵中のＡＢ５凝集物形成などのｂＡＲＥ凝集物形成は、溶液中の可溶性ｂＡＲＥタンパク質の経時的変化を測定することによって容易に判断できる。溶液中の沈殿ポリペプチドの量は、肉視検査により定性的に測定できるか、または、沈殿ｂＡＲＥタンパク質の検出に適合化させた多数の分析アッセイにより定量的に測定できる。定量的測定のためのこのようなアッセイとしては、例えば、逆相（ＲＰ）－ＨＰＬＣおよびＵＶ吸収分光法が挙げられる。溶解度実験では、どれだけ多くのｂＡＲＥタンパク質が溶液中にあるかを判断できるが、該タンパク質の凝集状態を判断するには、他の方法が必要とされ得る。タンパク質が所与の製剤において、その天然構造で存在するかどうかを判断すること、およびどれだけ多くのタンパク質が凝集化形態などの高次形態において存在するか（存在する場合は）を判断することは重要であると考えられる。分析的超遠心分離は、タンパク質の凝集状態を解明するための最も強力な方法の１つである（ＬｉｕおよびＳｈｉｒｅ（１９９９）Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８８：１２３７－１２４１頁を参照）。貯蔵中の液体製剤における可溶性および不溶性双方の凝集物の判断は、例えば、分析的超遠心分離を用いて、可溶性凝集物として存在する可溶性ポリペプチド部分と非凝集の生物学的活性分子形態において存在する部分とを識別することによって達成できる。

【００３６】

用語の「機能的安定化」とは、ｂＡＲＥタンパク質の機能性にとって重要であるｂＡＲＥタンパク質の実質的に完全な形態の存在および／または維持を言う。本明細書に用いられている用語の「機能的に安定化すること」または「機能的安定化」は、ｂＡＲＥタンパク質分子の解離の抑制、低減、抑止、低下、減少、下降または最少化のい用語と同義で用いられる。本発明は、ｂＡＲＥ生物学的分子の解離を実質的に最少化する試剤を用いてｂＡＲＥタンパク質を安定化する方法に関する。解離の実質的な最少化とは、該安定化剤を含まない対象と比較して、約２５％から約１００％の解離の減少を言う。解離は、好ましくは約５０％、より好ましくは約７５％、さらにより好ましくは約１００％抑制される。

【００３７】

本明細書に用いられている用語の「実質的に完全な」は、ｂＡＲＥクラスタンパク質の元の、天然の非解離の構造またはコンホメーションを言う。

【００３８】

ｂＡＲＥタンパク質サンプルの機能的安定性は、本発明の分析方法を用いてｂＡＲＥサンプルを分析し、ｂＡＲＥサンプルの完全性比を用いて、ｂＡＲＥタンパク質の完全性の程度を算出することによって判断できる。

【００３９】

周知の原理により、クロマトグラムにおけるＡＢ$_5$タンパク質サブユニットおよびＢ$_5$タンパク質サブユニットを示すピークの相対的面積は、該サンプル中のＡＢ$_5$形態とＢ$_5$形態の相対比を示す。該サンプル中のＡＢ$_5$形態とＢ$_5$形態の相対比を用いて該サンプルの機能的安定性を判断できる。

【００４０】

本明細書に用いられている用語の「完全性比」とは、本発明の分析方法を用いてｂＡＲＥタンパク質の非解離形態および解離形態に関して得られたピーク下の面積パーセントにより測定されるサンプル中のｂＡＲＥタンパク質の解離したＡおよびＢサブユニット形態に対する完全ｂＡＲＥタンパク質の比を言う。すなわち、元の完全結合ｂＡＲＥタンパク質対部分的に解離したＡおよびＢ５五量体サブユニット形態および完全解離単量体Ｂ形態の比である。用語の「完全性比」は、本発明の分析的方法によるｂＡＲＥクラスタンパク質の機能的安定性の判断に関連して用いられる。ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥクラスタンパク質は、約１０：１から約２：１、または約８：１から約３．５：１、または約６：１から約４．５：１の完全性比を有する場合に、機能的に安定、または機能的に安定化されていると考えられる。本発明の分析的方法を用いては検出されないほど、サンプル中のＢ$_5$解離サブユニットの量が極めて少ない場合（例えば、約３％未満）、完全性比は有意味な測定値と考えられなくても、ｂＡＲＥタンパク質はやはり機能的に安定であると考えることができる。

【００４１】
好ましい一実施形態において、ｂＡＲＥタンパク質はＡＢ５タンパク質である。
【００４２】
（ＡＢ５タンパク質）
本発明の組成物に用いられる好ましいＡＤＰ－リボシル化細菌外毒素（ｂＡＲＥ類）としては、コレラ毒素（ＣＴ）および大腸菌易熱性毒素（ＬＴ）が挙げられる。ＣＴおよびＬＴ外毒素は、Ｂサブユニットの５分子からなるドーナツ状の環に囲まれたＡサブユニットの単一分子からなる六量体である。毒素原性大腸菌（ＥＴＥＣ）の易熱性毒素（ＬＴ）は、構造的に、機能的に、および免疫学的にＣＴと類似しており、これら２つの毒素は、免疫学的に交差反応する。ＣＴおよびＬＴタンパク質は、慣習的にＡＢ５タンパク質と称されている。完全な天然タンパク質はＡＢ５として示され、部分的に解離したサブユニットをＡ、および５つの同一のサブユニットからなるＢ５五量体およびＢｍと称される単量体のＢとして示される。
【００４３】
ＣＴは、基本型の細菌腸毒素である。これは２つのタイプのサブユニット：分子量２８，０００の単一のＡサブユニット、および各々が１１，６００の分子量を有する５つのＢサブユニットから構築されたタンパク質であり、およそ８４，０００の分子量を有するホロ毒素を与える。Ｂサブユニットは堅い非共有結合によって環状に集合しており；Ａサブユニットは、より弱い非共有的相互作用により、Ｂ五量体環に結合し、おそらく部分的に該環内に差し込まれている。これら２つのタイプのサブユニットは中毒過程で異なった役割を持っている：Ｂサブユニットは細胞結合を生じさせ、Ａサブユニットは直接的な毒性活性を生じさせる。Ａサブユニットは２つのドメインを含有する。Ａ１ドメインは Ａサブユニットの毒性を生じさせるＡＤＰ－リボシル化活性を有する。Ａ２ドメインはＢオリゴマーと相互作用する。酵素活性には、この２つのドメインの間のループの蛋白分解性開裂およびＡ１－ｃｙｓ１８７とＡ２－ｃｙｓ１９９との間のジスルフィドブリッジの還元が必要である。毒性Ａサブユニットは体液分泌および下痢をもたらす酵素変化（ＡＤＰ－リボシル化活性による）を誘導し、一方、非毒性Ｂサブユニットは腸上皮細胞上の、毒素に対するＧＭ－１ガングリオシド受容体に結合する免疫原性部分である（Ｈｏｌｍｇｒｅｎ Ｊ Ｎａｔｕｒｅ（１９８１）２９２；４１３頁）。
【００４４】
ＬＴはタイプＩの大腸菌易熱性腸毒素である。これは、（ｉ）毒性ＡＤＰ－リボシル化活性を含有し、約２７ｋＤａの分子量を有する２４０個のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖からなるＡサブユニットおよび（ｉｉ）ガングリオシド結合部位を含有し、各々が約５８．５ｋＤａの分子量を有する５つの同一の１０３個のアミノ酸の単量体により形成された五量体の環状Ｂ５複合体から構成されている。Ｂ５空隙の内側は、アミノ酸１９３～２４０に相当するＡサブユニットのＡ２ドメインと相互作用する荷電したアミノ酸からなる。Ａサブユニットの残り、Ａ１ドメインは、触媒活性を保持する。ＡおよびＢサブユニットの双方が、高パーセンテージの正に荷電したアミノ酸を含有する（サブユニットＡ，ＩＰ＝６．３、サブユニットＢ、ＩＰ＝８．８７およびＡＢ５、ＩＰ＝８．５）。
【００４５】
一定の好ましい実施形態において、細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素（ｂＡＲＥ）は、コレラ毒素（ＣＴ）または大腸菌易熱性腸毒素（ＬＴ）のＡＢ５タンパク質である。
【００４６】
特に好ましい実施形態において、ＡＤＰ－リボシル化外毒素ペプチドサブユニットコード配列は、コレラ毒素（ＣＴ）から得られるか、または誘導される。他の特に好ましい実施形態において、ＡＤＰ－リボシル化外毒素ペプチドサブユニットコード配列は、大腸菌易熱性腸毒素（ＬＴ）、例えば、ＬＴ１またはＬＴ２のＡＢ５タンパク質から得られるか、または誘導される。
【００４７】
（AB_5クラスタンパク質のAB_5およびB_5形態の分離）

完全なｂＡＲＥクラスタンパク質と解離したｂＡＲＥクラスタンパク質とを識別する非解離条件下で、$ＡＢ_5$クラスタンパク質の天然完全$ＡＢ_5$分子と部分的に解離した$Ｂ_5$形態などのｂＡＲＥクラスタンパク質を分離できることを、この度予想外に見出した。一般に、ＡＢ５分子などの天然の完全ｂＡＲＥ分子とその解離サブユニット形態とを分離するために好適な材料は、荷電ポリマー分離材であり、それによって、該分離材に適用されたｂＡＲＥ分子の異なる形態を、イオン性緩衝液によって分離できる。該荷電ポリマーカラム分離材はヒドロゲル分離材であることが好ましい。

【００４８】

ヒドロゲル組成物は、生物医学業界において周知であり、細胞および組織培養の基質、プロテーゼの型穴材、創傷閉塞材として、またはゲルろ過クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィー適用における固相材料として、一般的に用いられる。例えば高性能液体クロマトグラフィー法およびアフィニティークロマトグラフィー法において、非多孔性、変形および／または誘導化アガロースヒドロゲル組成物が用いられてきており（Ｌｉら（１９９０）Ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０：１０７－１２１頁）、また、超多孔性ヒドロゲルビーズが、疎水性相互作用クロマトグラフィーにおける支持体として用いられてきた（Ｇｕｓｔａｖｓｓｏｎら（１９９９）Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　８３０：２７５－２８４頁）。

【００４９】

本発明に有用なヒドロゲルは、天然のもの（例えば、アガロースおよびアルギン酸塩）であってもよいし、また合成的に作製したもの、または修飾したものであってもよい。ヒドロゲルは、水の存在下で膨張し、水の不在下で（またはその量の減少により）収縮するが、水に溶解しない高分子の三次元網状構造を含んでなる材料である。膨張、すなわち水の吸収は、高分子網状構造に結合したか、またはその中に分散した親水性官能基の存在の結果である。隣接した高分子間の架橋の結果、これらのヒドロゲルは水不溶性となる。該架橋は、化学的（すなわち、共有的）または物理的（すなわち、ファンデルワールス力、水素結合、イオン力など）結合によると考えられる。特に価値的なヒドロゲルの特徴は、この材料が、脱水しても水和してもその全体の形状を保持することがである。したがって、ヒドロゲルが脱水条件において、ほぼ球状を有している場合、水和条件でも球状である。

【００５０】

合成的に作製したヒドロゲルは一般に、単量体材料を重合化して骨格を形成し、この骨格を架橋剤によって架橋することによって作製される。一般的なヒドロゲル単量体としては。限定はしないが、以下のものが挙げられる：乳酸、グリコール酸、アクリル酸、１－ヒドロキシエチルメタクリレート（ＨＥＭＡ）、エチルメタクリレート（ＥＭＡ）、プロピレングリコールメタクリレート（ＰＥＭＡ），アクリルアミド（ＡＡＭ）、Ｎ－ビニルピロリドン、メチルメタクリレート（ＭＭＡ）、グリシジルメタクリレート（ＧＤＭＡ）、グリコールメタクリレート（ＧＭＡ）、エチレングリコール、フマル酸など。一般的な架橋剤としては、テトラエチレングリコールジメタクリレート（ＴＥＧＤＭＡ）およびＮ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミドが挙げられる。

【００５１】

いくつかの合成ヒドロゲルは、親水性ビニル単量体のフリーラジカル重合によって作製される。この最初の工程は、通常、２，２’－アゾビス（２－メチルプロパンニトリル）などのアゾタイプの開始剤またはベンゾイルペルオキシドなどのペルオキシド開始剤の添加によるフリーラジカルの形成である。紫外線またはガンマ線照射もまた、該反応を開始し得る。ビニル単量体基を用いたフリーラジカル反応により増殖が生じる。通常、該反応混合物の一部は、架橋の程度を規定する二官能性ビニル化合物から構成される。該ゲルの親水性は、通常、親水性ビニル単量体および疎水性ビニル単量体を該ゲルへと共重合化することによって制御される。ヒドロゲルの浸透性は、とりわけ、架橋の程度、ゲルの水和の程度、および浸透物の性質によって決定される。

【００５２】

該分離剤は、ヒドロキシル化ポリメタクリレート（ＨＥＭＡ）材であることが好ましい。

【００５３】

重合混合物に用いられる溶媒の量およびタイプは、作製されるゲルの性質に実質的に影響を与え得る。例えば、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ＨＥＭＡ）は、３５～４０重量％の水しか吸収せず、したがって、より多量の水を含有する重合反応混合物から作製されたポリ（ＨＥＭＡ）は、水の充満した空隙を含有するので、外観は半透明または不透明である。架橋により、通常、ポリマーの水吸収作用は減少する。

【００５４】

合成ヒドロゲル類のさらなる検討は、Ｒｉｃｈａｒｄ Ｂａｋｅｒによる「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ Ａｃｔｉｖｅ Ａｇｅｎｔｓ」、Ａ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１０１－１０４頁および１７８－１８３頁、ならびに米国公開特許出願第００２００６１３３６号に見ることができる。これらの参考文献は、参照として、本明細書に組み込まれている。該ポリマー分離材は、約４ミクロンから約１０ミクロンの粒径、ならびに約２５０Åからの多孔度を有し得る。粒径は約６ミクロンであることが好ましい。空隙のサイズは、分析されるｂＡＲＥ分子のサイズに依存し得る。緩衝液は、好適なイオン強度のものであり、該緩衝液系は、溶出緩衝液のｐＨを、約７．０から約８．０の範囲内に維持できる。溶出緩衝液のｐＨは、約７．０から約７．５の範囲にあることが好ましい。溶出緩衝液のｐＨは、約７．０から約７．２の範囲にあることがより好ましい。

【００５５】

特定の好ましい実施形態において、ゲル濾過－高性能液体クロマトグラフィーカラムは、例えば、マサチューセッツ州ミルフォード所在のＷａｔｅｒｓから入手できるＷａｔｅｒｓ Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ２５０ゲルろ過カラムなど、残留カルボキシル基を有するヒドロキシル化ポリメタクリレート分離材を含んでなる。Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ２５０は、約６ミクロンの粒径ならびに約２５０Åの空隙率を有する。該イオン緩衝液は、好適なイオン強度、組成およびｐＨを有し、例えば、約１００～４００ｍＭの実質的に中性のリン酸／硫酸緩衝液のものである。例えば、好ましい一実施形態において、該緩衝液は、例えば、リン酸カリウム（ＫＰｉ）およびNa_2SO_4，特に、ＫＰｉ２００ｍＭおよびNa_2SO_4 １００ｍＭ、ｐＨ７．２であり得る。好ましい一実施形態において、溶出緩衝液は、分析されるｂＡＲＥ分子と適合性の安定化剤を含んでなる。

【００５６】

Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ２５０／ＫＰｉ２００ｍＭおよびNa_2SO_4 １００ｍＭ、ｐＨ７．２システムでは、カラム寸法が７．８ｍｍ内径×３００ｍｍ長である。好適な溶出流速は、約０．２５ｍｌ／分から約０．７ｍｌ／分であり、好ましくは、例えば約０．５ｍｌ／分である。検出は、２１４および２８０ｎｍで操作するフォトダイオードアレー（ＰＤＡ）により実施できる。クロマトグラフィー操作時間は、一般に３０分以下である。

【００５７】

このようなクロマトグラフィーシステムを用いて、AB_5クラスタンパク質のAB_5形態とB_5形態との間の良好なピーク分離を得ることが可能である。良好なピーク分離により、AB_5クラスタンパク質のサンプルにおけるAB_5形態とB_5形態との高信頼の検出が可能となり、ひいては、該サンプルが実質的に完全形態、または結合形態にあるか、部分的な解離形態、または実質的に解離形態にあるかを判断することが可能となる。生じたクロマトグラムが、AB_5に相当する保持時間（ＲＴ）を有し、実質的に単一なピークによって表されたカラム溶離液中の元の（完全な）AB_5タンパク質の検出によって、カラムにかけたAB_5タンパク質サンプルの実質的な機能的安定性が示される。生じたクロマトグラムが、AB_5およびB_5に相当する保持時間（ＲＴｓ）を有し、２つの明確なピークによって表されたカラム溶離液中の元のAB_5タンパク質およびB_5タンパク質サブユ

ニットの双方の検出によって、ＡＢ５タンパク質サンプルの部分的解離が示される。生じたクロマトグラムが、B_5に相当する保持時間（ＲＴ）を有し、単一なピークによって表されたカラム溶離液中のB_5タンパク質サブユニットの検出によって、AB_5タンパク質サンプルの実質的解離が示される。

【００５８】

また、良好なピーク分離により、ＡＢ５クラスタンパク質サンプル中のAB_5形態とB_5決定との比率を高信頼で定量化することが可能になり、ひいては、AB_5クラスタンパク質の程度を判断することが可能になるか、または他の観点からは、該サンプルの機能的安定性の測定値決定が可能になる。周知の原理により、クロマトグラムにおいて、AB_5タンパク質およびB_5タンパク質サブユニットを表すピークの相対的面積は、該サンプル中のAB_5形態およびB_5形態の相対比を表す。該サンプル中のAB_5形態およびB_5形態の相対比は、該サンプルの機能的安定性を判断するために使用できる。

【００５９】

サンプル安定性のこの測定値は、完全性比として示すことができる。本明細書に用いられる用語の「完全性比」とは、サンプル中の完全AB_5タンパク質対B_5サブユニットの比率を言う。本発明により、AB_5タンパク質は、約１０：１から約２：１、または約８：１から約３．５：１、または約６：１から約４．５：１の完全性比を有する。ＡＢ５タンパク質の完全性比は、少なくとも５：１であることが好ましい。

【００６０】

本発明の分析的方法を用いては検出されないほど、サンプル中のB_5サブユニットの量が極めて少ない場合、完全性比は有意味な測定値と考えられなくても、ＡＢ５タンパク質は安定であると考えられる。しかし、該方法の感度は、本発明の分析方法を用いて、３％という低さの部分的に解離したＢ５サブユニット濃度が検出できるような感度である。対照的に、元のタンパク質の構造的完全性を維持しないＳＤＳ－ＰＡＧＥなどの先行技術の方法では、２０％未満の解離Ｂ５サブユニット形態は一般的に検出されない。

【００６１】

B_5タンパク質サブユニットからAB_5タンパク質を分析するように構成されたゲルろ過高速液体クロマトグラフィー材（ＧＦ－ＨＰＬＣ）などの液体クロマトグラフィー法などの非解離方法を用いてAB_5クラスタンパク質のAB_5形態とB_5形態を高信頼で定量的に分離する能力により、種々の有用なアッセイおよび薬剤、特に、ワクチンに有用な他の技術、タンパク質の構造および安定性についての開発および一般的研究が可能となる。高速水性ゲルろ過クロマトグラフィー（ＨＰＡＳＥＣ）は当業界に公知である（例えば、Ｐｅｒｅｚ－Ｐａｙａら（１９９１）Ｊ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ５４８：９３－１０４頁を参照）が、AB_5クラスタンパク質のAB_5およびB_5形態の分離に対するＨＰＡＳＥＣの適用は、開示されておらず、また、先行技術において提案されたこともない。理論に拘束されることは望まないが、ＨＰＡＳＥＣ支持体上の多くのバイオポリマー溶出機構は、主に、特定の溶質－マトリクス相互作用に由来するイオン排除およびイオン交換、疎水性相互作用および水素結合などの多数の副次的作用のため、純粋なサイズ排除機構から外れている。該分離システムの妥当性は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、見かけの分子量決定、光散乱（ＭＡＬＬＳ）および液体クロマトグラフィー等電収束質量分析（ＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ）などの方法のいずれか１つにより実施できるクロマトグラムピークの帰属によって確定できる。実際、実施例が示すように、ＡＢ５タンパク質の完全性が維持されているという証拠は、次元解析、光散乱分析（ＭＡＬＬＳ）およびＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ．Ｓなどの方法を用いて、検証されている。

【００６２】

（安定化剤アッセイおよび同定された安定化剤）

AB_5クラスタンパク質安定化剤などのｂＡＲＥタンパク質安定化剤を安定化できる試剤の同定により、元のｂＡＲＥタンパク質の完全性が治療用最終産物の有効性にとって重要であるワクチンなどの組成物におけるAB_5クラスタンパク質の利用が促進される。本発明の分離方法は、安定化剤候補同定のためのアッセイを提供する上で有利であると考え

られる。安定化剤候補のスクリーニングは周知の分野であり、スクリーニングアッセイのハイスループットの実施は、ある特定のスクリーニングの方法論が与えられれば、容易に開発できる。本発明は、そのような方法論を提供する。

【００６３】

本発明のスクリーニングアッセイは、AB_5タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質安定化剤を同定する方法である。ＡＢ５タンパク質に適用する場合、該アッセイは、安定化剤候補をAB_5クラスタンパク質と組み合わせて、AB_5タンパク質サンプルを形成することを含む。安定化剤候補は、ある一定の条件措置、例えば、ｐＨ，濃度などにおける単一の化合物、または化合物の組み合わせであり得る。例えば、安定化剤候補は、種々のｐＨ範囲で作用する安定化緩衝液候補、または非晶質糖類、結晶質糖類、または洗浄剤などの種々の荷電および非荷電の界面活性剤よりなる群から選択される安定化剤候補よりなる群から選択できる。AB_5タンパク質サンプルを安定化する、または物理的安定性を高める安定化剤候補は、AB_5タンパク質物理的安定化剤である。

【００６４】

例えば、AB_5タンパク質をB_5タンパク質サブユニットから分析するように構成されたゲルろ過高速液体クロマトグラフィーカラムにサンプルが適用される場合、該分離方法と関連させて、該カラムは上記のとおり、イオン緩衝液によって溶出される。また、上記のとおり、カラム溶出液中の１種以上の実質的に元の（非解離）AB_5タンパク質および／または部分的に解離したＢ５タンパク質サブユニットおよび／または実質的に解離したＢｍ単量体サブユニットが検出され、この検出結果に基づいて、安定化剤候補が、ＡＢ５タンパク質の機能的安定化に関して、AB_5タンパク質を安定化する能力があるかどうかが判断される。AB_5タンパク質サンプルを安定化する、または機能的安定性を高める安定化剤候補は、AB_5タンパク質機能的安定化剤である。

【００６５】

安定化剤候補がAB_5タンパク質を安定化するか、または安定性を高めるかどうかの決定には、実質的に完全なAB_5タンパク質対部分的に解離したB_5サブユニットおよび／または実質的に解離したＢｍ単量体サブユニットの比である完全性比を、タンパク質サンプルに関して算出し、サンプルの完全性比を、安定化剤候補無しの対照に関する完全性比と比較することが含まれる。完全性比はまた、同定された安定化剤によって与えられた安定化の程度を定量化するために使用できる。

【００６６】

効率的にAB_5タンパク質安定化剤を同定するために、本法にしたがい、ハイスループット様式で、安定化剤候補のライブラリーをアッセイできる。種々のAB_5タンパク質サンプルの中での所与の安定化剤候補の安定化能力および程度を判断するために、安定化剤候補を、AB_5タンパク質などの種々のｂＡＲＥタンパク質と組み合わせることができる。典型的には、ｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化する能力のある試剤を同定するために、本発明の分析方法は、安定化した、好ましくは物理的に安定化したｂＡＲＥタンパク質に用いられる。あるいは、同定された物理的安定化剤が、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に効果を有するかどうかを判断するために、本発明の分析方法を使用できる。

【００６７】

実施例で示されるとおり、酢酸塩、ｐＨ５．５、クエン酸塩、ｐＨ６．５、リン酸塩およびトリス緩衝液（約６～８のｐＨ）などの種々の緩衝液が選択された。ＮａＣｌ濃度は、０～０．５Ｍの範囲で変化し；ｐＨは、５．５～７．５の範囲で変化した。糖類、界面活性剤、キレート化剤およびアミノ酸などの種々の添加物が使用された。タンパク質の物理的安定化は、そのタンパク質濃度の関数であると考えられる（すなわち、ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の濃度が高くなるにつれ、タンパク質の沈殿または結晶化の傾向は増大する）ため、安定化剤候補の効果は、全ての使用された貯蔵緩衝液中、０．８～１．２ｍｇ／ｍｌの濃度範囲のタンパク質およびＬＴＫ６３（下記で検討される）などのＡＢ５変異体の精製濃縮バルクでは、約１ｍｇ／ｍｌから約４ｍｇ／ｍｌの濃度範囲のタンパク質を用いて評価された。

【００６８】
安定化剤として評価されたアミノ酸候補のいくつかは、以下の表８に記載してある。表８に示されるように、安定化剤候補としてのアミノ酸の選択は、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および／または両親媒性に基づいて行うことができる。例えば、負電荷アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。正電荷アミノ酸としては、リジンおよびアルギニンが挙げられる。同様のハイドロフィリシーを有する非電荷極性頭部基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。

【００６９】

【化１】

表８

性質		アミノ酸
小型		Ala, Gly
酸性／アミド		Asp, Glu, Asn, Gln
荷電	負	Asp, Glu
	正	Lys, Arg
極性		Ala, Gly, Ser, Thr, Pro
疎水性		Val, Leu, Ile, Met
大きさ	大	Glu, Gln, His, Ile, Lys, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr
	小	Ala, Asn, Asp, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val
脂肪族		Ile, Leu, Val
芳香族		His, Phe, Tyr, Trp

評価された糖類候補のいくつかは、デキストロース、蔗糖、乳糖、トレハロースおよびガラクトースなどの非晶質賦形剤から選択された。評価された他の糖類候補のいくつかは、マンニトール、ソルビトールおよびアリトールなどの糖アルコール類などの結晶質賦形剤から選択された。これらの糖類が、スプレー凍結乾燥法時および長期貯蔵時に、薬剤として使用されるタンパク質を安定化する能力があることが、当業界に公知であるため、これらの試剤候補が選択された（例えば、国際公開第０２／１０１４１２号を参照）。しかし、安定化の点で、非晶質賦形剤の利益については、いくつかの矛盾した報告がある。

【００７０】
実際、非晶質賦形剤をタンパク質溶液に添加すると、賦形剤とタンパク質との間の相互作用により、実際はタンパク質が不安定化され得ることが、いくつかの試験により示されている。（例えば、Ｐｉｋｅら、Ｂｉｏｐｈａｒｍ１９９０　３：２６２９頁および国際公開第０１／４１８００号を参照）。

【００７１】
実施例で示されるように、本発明のｂＡＲＥタンパク質の安定化に、全ての安定化剤候補が有用であるとは限らない。例えば、ＰＢＳに５％のサッカロースを添加することにより、凍結／解凍サイクルにおけるＬＴＫ６３などのＡＢ５変異体の解離は防がれると考えられたが、ＬＴＫ６３を、－２０℃でＰＢＳプラス５％サッカロース中、１年未満貯蔵す

ると、タンパク質の解離がいくらか生じる結果となった。しかし、いくつかの試剤は、本発明の方法を用いて決定されたとおり、ｂＡＲＥタンパク質を安定化する能力があることが同定された。

【００７２】

したがって、一態様において、ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質を安定化するために、非荷電物質またはそのアナログの使用非荷電物質またはそのアナログの使用が提供される。

【００７３】

非荷電物質またはそのアナログの使用が、ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化するためのものであることが好ましい。

【００７４】

本明細書に用いられる用語の「非荷電物質」は、正電荷または負電荷の正味量を有する試剤を意味する。用語の「非荷電物質」はまた、含む

「アナログ」により、１つ以上の置換、挿入、または欠失を有し得、かつ、ｂＡＲＥタンパク質の解離を最少化し、したがって、ある期間の貯蔵中に、ｂＡＲＥタンパク質の実質的な完全性を維持する所望の効果をもたらす非荷電物質の変異体、相同体、アナログ、誘導体またはそれらの断片が意図される。好適なアナログとしては、限定はしないが、下記の非荷電物質の誘導体が挙げられる。

【００７５】

AB_5タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化するために、非荷電物質を含めることは、サブユニット形態の安定な結合を増強するため、有利である。ｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化し得るか、またはｂＡＲＥタンパク質の機能的安定化を増強し得る試剤が同定されたのは、今回が初めてである。今まで、完全構造の損失なしに、ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性を評価するために利用できる方法は無かった。利用できる分析方法が無かったため、このような機能的安定化剤を同定することができなかった。

【００７６】

該非荷電物質は、両性イオン性物質であることが好ましい。

【００７７】

該両性イオン性物質は、両性イオン性界面活性剤および両性イオン性非界面活性剤化合物よりなる群から選択されることが好ましい。

【００７８】

該両性イオン性物質は、両性イオン性界面活性剤であることが好ましい。

【００７９】

両性剤としても知られている両性イオン性界面活性剤は、イオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤とを合わせた性質を提供する点で独特である。非イオン性界面活性剤と同様、両性剤は、正味の電荷を有さず、導電性および電気泳動性を欠き、イオン交換樹脂と結合しない。

【００８０】

該両性イオン性界面活性剤は胆汁酸塩誘導体であることが好ましい。

【００８１】

本明細書に用いられる用語の「胆汁酸塩誘導体」とは、カルボン酸によるコレステロールの誘導体を言う。胆汁酸塩誘導体の例としては、限定はしないが、コール酸およびデオキシコール酸が挙げられる。

【００８２】

両性剤としても知られている両性イオン性界面活性剤は、図１６に記載されているＡＳＢ－１４、ＡＳＢ－１６，ＣＨＡＰＳ、ＣＨＡＰＳＯ、ＤＤＭＡＢ、ＤＤＭＡＵ、Ｅｐｉｇｅｎ　ＢＢ界面活性剤、ラウリルジメチルアミンオキシド（ＬＤＡＯ）、両性剤３－０８、３－１０、３－１２、３－１４、および３－１６よりなる群から選択されることが好ましい。上記に略図化されたＣＨＡＰＳ、ＣＨＡＰＳＯおよび他の両性剤の構造は、Ｃａ

ｌｂｉｏｃｈｅｍ（文書番号ＣＢ００６８－４０１）から入手できる、ＳｒｉｒａｍａＭ Ｂｈａｉｒｉ（２００１）による「Ｄｅｔｅｒｇｅｎｔｓ－Ａ ｇｕｉｄｅ ｔｏ ｔｈｅ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ａｎｄ ｕｓｅｓ ｏｆ ｄｅｔｅｒｇｅｎｔｓ ｉｎ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｙｓｔｅｍｓ」から採用された図１７に記載されている。

【００８３】

該非荷電界面活性剤は、ＣＨＡＰＳ（３－（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルフォネート）などの両性剤であることが好ましい。ＣＨＡＰＳは、胆汁酸塩の両性イオン性合成誘導体である。ＣＨＡＰＳの構造は図１７に記載されている。ＣＨＡＰＳは、Ｍｅｒｃｋの関連会社であるＣａｌｂｉｏｃｈｅｍおよびＳｉｇｍａ、Ａｌｄｒｉｃｈなどの多数の商品供給元から入手できる。

【００８４】

理論に拘束されることは望まないが、ＣＨＡＰＳなどの両性剤は、おそらくそれらの堅固なステロイド環構造により、Ｚｗｉｔｔｅｒｇｅｎｔ（登録商標）３－Ｘシリーズよりも変性的でないため、有利である。したがって、ＣＨＡＰＳなどの両性剤は、ＡおよびＢサブユニットの安定な結合を増強し得る。

【００８５】

該非荷電界面活性剤は、ＣＨＡＰＳＯ（３－（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－２－ヒドロキシプロパンスルフォネート）などの両性剤であることが好ましい。ＣＨＡＰＳＯ構造もまた、図１７に記載されている。ＣＨＡＰＳＯは、Ｍｅｒｃｋの関連会社であるＣａｌｂｉｏｃｈｅｍおよびＳｉｇｍａ、Ａｌｄｒｉｃｈなどの多数の商品供給元から入手できる。

【００８６】

該両性イオン性物質は、非界面活性スルホベタイン（ＮＤＳＢ）であることが好ましい。

【００８７】

ＮＤＳＢは、両性イオン性化合物である。両性剤と同様に、ＮＤＳＢＳはスルホベタイン親水性頭部基を有する。しかし、両性剤とは対照的に、ＮＤＳＢ類は、界面活性剤のように挙動しない。最近、ＮＤＳＢ類が、膜タンパク質の単離など、いくつかの適用に用いられることが判明した。また、それらは、化学的、および熱的に変性したタンパク質の復元およびリホールディングにも用いられてきた。短いながらも疎水性基が、タンパク質の疎水性領域と相互作用し、復元時の凝集を防ぐと仮定されている。

【００８８】

本発明の他の実施形態において、当業者に公知の方法を用いて、両性イオン性化合物のアナログが調製され、ｂＡＲＥ組成物に使用できる。

【００８９】

開示されたプロトコルにしたがい、例えば、下記の実施例において、当業者は、本明細書に記載された両性イオン性物質の所望の濃度範囲を評価できる。該組成物に組み込まれた両性イオン性物質の量は、約０．０５容積重量（ｗ／ｖ）％から約０．５容積重量％の濃度範囲内であることが好ましく、好ましくは，約０．１％から約０．４％、より好ましくは、約０．２％から約０．３５％、さらに好ましくは、約０．２５％である。参照を容易にするために言うと、０．０５％（ｗ／ｖ）ＣＨＡＰＳは、０．８１ｍＭのＣＨＡＰＳと等価であり、０．２５％のＣＨＡＰＳは、４．０６ｍＭのＣＨＡＰＳと等価である。

【００９０】

さらなる態様により、ｂＡＲＥタンパク質、好ましくはＡＢ５タンパク質を安定化するために、荷電物質の使用が提供される。

【００９１】

該荷電物質は、荷電アミノ酸塩基であることが好ましい。

【００９２】

本明細書に用いられる用語の「荷電アミノ酸」は、アルギニン、リジン、アスアラギン酸、および／またはグルタミン酸などのアミノ酸に見られるような荷電側鎖を有するアミ

ノ酸を意味する。

【００９３】

「アミノ酸塩基」によって、所与のアミノ酸が、遊離塩基形態またはその塩形態において存在するアミノ酸またはアミノ酸の組み合わせが意図される。アミノ酸の組み合わせが用いられる場合、全てのアミノ酸がそれらの遊離塩基形態で存在してもよいし、全てがそれらの塩形態で存在してもよいし、いくらかがそれらの遊離塩基形態で存在し、他はそれらの塩形態で存在してもよい。

【００９４】

AB_5タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質を物理的に安定化するために荷電アミノ酸塩基を含めることは、それによって、安定化を増強し、および／または凝集および／または凝集物形成を最少化するため、有利である。

【００９５】

該荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸であることがさらに好ましい。

【００９６】

本明細書に用いられる用語の「正に荷電したアミノ酸」は、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸に見られるような正に荷電した側鎖を有するアミノ酸を意味する。

【００９７】

正に荷電したアミノ酸は、アルギニンであることが好ましい。

【００９８】

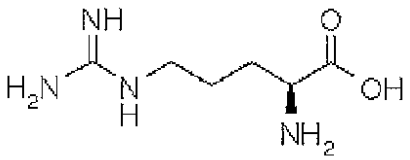
安定化剤としてのアルギニンの同定は予想外であるが、ｂＡＲＥ組成物にそれを組み入れることは、ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の溶解度を増大させると思われるため、有利である。

【００９９】

アルギニンは、正に荷電したグアニジノ基を有する必須アミノ酸である。アルギニンは、一般に、３文字記号のＡＲＧまたは１文字記号Ｒによって示される。そのＩＵＰＡＣ名は、２－アミノ－５－グアニジノペンタン酸である。側鎖のグアニジノ基は、ｐＨ７で正に荷電しており；したがってアルギニンは「塩基性」アミノ酸であり、極めて親水性である。アルギニンの直線構造は：ＨＮ＝Ｃ（ＮＨ２）－ＮＨ－（ＣＨ２）３－ＣＨ（ＮＨ２）－ＣＯＯＨ

【０１００】

【化２】



である。

【０１０１】

アルギニンの遺伝コードには６種のコドンがあり、それらは：ＡＧＡ、ＡＧＧ、ＣＧＡ、ＣＧＣ、ＣＧＧ、ＣＧＴである。

【０１０２】

本発明の組成物は、これらの好ましいアミノ酸のアナログによっても製剤化できる。

【０１０３】

「アミノ酸アナログ」によって、１つ以上のアミノ酸置換、挿入、または欠失を有し得、該組成物の貯蔵時にｂＡＲＥタンパク質の凝集物形成を最少化する所望の効果をもたらす天然アミノ酸の誘導体またはその断片が意図される。好適なアルギニンアナログとしては、例えば、アミノグアニジンおよびＮ－モノエチルＬ－アルギニンが挙げられる。他のアナログとしては、限定はしないが、アルギニンを含有するジペプチド類およびペプチド類を挙げることができる。好ましいアミノ酸と同様に、アミノ酸アナログは、それらの遊離塩基形態またはそれらの塩形態のいずれかにおいて該組成物に組み込まれる。

【０１０４】
用語の「アミノ酸アナログ」は、アミノ酸の立体異性体も含む。特定のアミノ酸がその遊離塩基形態またはその塩形態のいずれかにおいて存在する限り、該アミノ酸の任意の立体異性体（すなわち、Ｌ、Ｄ、またはＤＬ異性体）またはこれらの立体異性体の組み合わせが本発明のｂＡＲＥ組成物中に存在できる。
【０１０５】
開示されたプロトコルにしたがい、例えば、下記の実施例４～１２において、当業者は、本明細書に記載されたアミノ酸塩基の所望の濃度範囲を評価できる。該組成物中に組み込まれたアミノ酸塩基の量は、該組成物中に存在するタンパク質に依って、役１００ｍＭから約４００ｍＭの濃度範囲内であることが好ましく、好ましくは、約１３０ｍＭから約３７５ｍＭ、より好ましくは、約１５０ｍＭから約３５０ｍＭ、さらに好ましくは、約１７５ｍＭから約３２５ｍＭ、さらに好ましくは、約１８０ｍＭから約３００ｍＭ、さらにいっそう好ましくは、約１９０ｍＭから約２８０ｍＭ、最も好ましくは、約２００ｍＭから約２６０ｍＭの濃度範囲内である。
【０１０６】
ある状況において、ｂＡＲＥタンパク質は、機能的には安定であり得る（例えば、その完全性が維持できる）が、物理的には安定であり得ない（例えば、溶液から沈殿し得る）。他の状況において、ｂＡＲＥタンパク質は、物理的には安定であり得る（例えば、溶液において存在し得る）が、機能的には安定であり得ない（すなわち、ＡＢ５およびＢ５形態に部分的に解離し得る）。
【０１０７】
したがって、上記のとおり、一態様において、本発明は、物理的安定化または機能的安定化に関して、ｂＡＲＥタンパク質を選択的に安定化できる安定化剤を提供する。
【０１０８】
また、他の態様において、本発明は、ｂＡＲＥタンパク質を安定化するために、荷電安定化と非荷電安定化剤との組み合わせの使用も提供する。
【０１０９】
非荷電安定化剤は、両性イオン性物質、好ましくはＣＨＡＰＳであることが好ましい。
【０１１０】
荷電安定化剤は、荷電アミノ酸、好ましくはアルギニンであることが好ましい。
【０１１１】
実施例によって示されるように、Ｌ－アルギニンまたはリン酸アルギニンなどのＬ－アルギニンの誘導体などの荷電アミノ酸は、特に、約１００ｍＭから約４００ｍＭの濃度において、ＬＴＫ６３に対する有用な安定化剤であることが決定された。他の有用な安定化剤は、Ｌ－アルギニンまたはリン酸アルギニンなどの荷電アミノ酸とＣＨＡＰＳ（３－〔（３－コールアミドプロピル）－ジメチルアンモニオ〕－１－プロパンスルフォネート）などのスルホベタイン両性イオン性界面活性剤の組み合わせ、特に、約０．０５％ＣＨＡＰＳと約２００ｍＭリン酸アルギニンとを含んでなる。機能的安定化能力に関して、これらの安定化剤は、ＬＴＫ６３に対して、約１０：１から約２：１、または約８：１から約３．５：１、または約６：１から約４．５：１の完全性比を達成できる。ＬＴＫ６３に対する完全性比は、約１０：１であることが好ましい。
【０１１２】
理論に拘束されることは望まないが、アミノ酸を含むことによるｂＡＲＥ組成物の安定性増加は、ｂＡＲＥポリペプチドの安定性に及ぼすアミノ酸の影響、より具体的には、ｂＡＲＥタンパク質沈殿に及ぼすアミノ酸の影響によって達成できる。さらに、本明細書に定義された両性イオン性物質をｂＡＲＥポリペプチド組成物内に組み込むことにより、ｂＡＲＥタンパク質の完全な天然形態に実質的に維持されており、その完全性を本発明の分析方法を用いて測定できる、ｂＡＲＥタンパク質を含んでなる組成物がもたらされる。
【０１１３】
遊離塩基形態または塩形態におけるアミノ酸のアルギニン、リジン、アスパラギン酸、

またはグルタミン酸などの荷電アミノ酸と非電荷両性イオン性物質との組み合わせによって、これら２つの成分を組み合わせることなしに調製されたｂＡＲＥ組成物に比較して、安定性が増大する結果となるため、有利なｂＡＲＥ組成物となる。アミノ酸塩基と両性イオン性物質との組み合わせから得られる相乗的安定化効果は、先行技術における開示に関しては全く予想されない。さらに、この安定化組成物は、安定化剤および／または可溶化剤として、ヒト血清アルブミン（ＨＡＳ）の不在下で安定性を達成できるために有利である。

【０１１４】

アミノ酸塩基と両性イオン性物質によって本発明のｂＡＲＥポリペプチド組成物を調製する利点が確認されたので、該組成物貯蔵時のポリペプチド安定性の増大を達成するために、本明細書に記載された凝集物形成を示す治療的に活性な対象ｂＡＲＥポリペプチドを含んでなるｂＡＲＥ組成物中に組み込むこれらの成分各々の好ましい濃度を、過度の実験なしに決定することは当業技術の範囲内にある。

【０１１５】

例えば、下記の実施例１において、開示されたプロトコルにしたがい、当業者は、本明細書に記載されたアミノ酸塩基および両性イオン性物質の所望の濃度範囲を評価できる。該組成物に組み込まれるアミノ酸塩基の量は、該組成物中に存在するタンパク質に依って、約１００ｍＭから約４００ｍＭの濃度範囲内にあることが好ましく、好ましくは、約１３０ｍＭから約３７５ｍＭ、より好ましくは、約１５０ｍＭから約３５０ｍＭ、さらに好ましくは、約１７５ｍＭから約３２５ｍＭ、さらに好ましくは、約１８０ｍＭから約３００ｍＭ、さらにいっそう好ましくは、約１９０ｍＭから約２８０ｍＭ、最も好ましくは、約２００ｍＭから約２６０ｍＭの濃度範囲内にある。

【０１１６】

例えば、下記の実施例４～１２において、開示されたプロトコルにしたがい、当業者は、本明細書に記載された両性イオン性物質の所望の濃度範囲を評価できる。該組成物に組み込まれる両性イオン性物質の量は、約０．０５％から約０．５％の濃度範囲内にあることが好ましく、好ましくは、約０．１％から約０．４％、より好ましくは、約０．２％から約０．３５％、さらにいっそう好ましくは、約０．２５％である。

【０１１７】

したがって、本発明の他の実施形態において、該安定化組成物は、ｂＡＲＥタンパク質、約１５０ｍＭから約３５０ｍＭの濃度のアルギニン塩基、および約０．０５％から約０．５％の濃度の両性イオン性物質を含んでなる。好ましい一実施形態において、ｂＡＲＥ組成物中に、アルギニン塩基は、約２００ｍＭｎ濃度で存在し、ＣＨＡＰＳなどの両性イオン性物質は、約０．２５％の濃度で存在する。好ましいこのｂＡＲＥ組成物は、約７．２のｐＨを有する。これらの組成物中のｂＡＲＥタンパク質またはその変異体の濃度は、約０．０１ｍｇ／ｍｌから約２．０ｍｇ／ｍｌ、好ましくは、約０．０２ｍｇ／ｍｌから約１．０ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは、約０．０３ｍｇ／ｍｌから約０．８ｍｇ／ｍｌ、最も好ましくは、約０．０３ｍｇ／ｍｌから約０．５ｍｇ／ｍｌである。

【０１１８】

本発明の安定化組成物は、アミノ酸塩基および両性イオン性物質によって達成される安定化効果が悪影響を受けない限り、治療的有効成分として働く対象ｂＡＲＥポリペプチドの望ましい性質の有効性を増大するか、または促進する他の化合物を含有できる。該組成物は、選択される経路を経る投与にとって安全でなければならず、滅菌されていなければならず、その治療的活性を保持しなければならない。

【０１１９】

ｂＡＲＥ組成物は、本明細書に開示された低イオン性強度製剤を用いて得られる溶解度増強を超えて、タンパク質溶解度に寄与する可溶化剤または溶解度増強剤をさらに含んでなってもよい。さらなる好適な可溶化剤は、米国特許第４，８１６，４４０号；第４，８９４，３３０号；第５，００４，６０５号；第５，１８３，７４６号；第５，６４３，５６６号；およびＷａｎｇら（１９８０）Ｊ．Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ　Ｄｒｕｇ　Ａｓｓｏ

ｃ．３４：４５２－４６２頁において検討されており、これらは、参照として本明細書に組み込まれている。

【０１２０】

ｂＡＲＥ組成物は、さらに、非イオン性界面活性剤を含んでなり得る。非イオン性界面活性剤の例としては、限定はしないが、Ｂｒｉｊ（登録商標）およびＴｒｉｔｏｎ（登録商標）などのポリオキシエチレン部分（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ、ＮＰ－４０、Ｂｒｉｊ、Ｔｗｅｅｎなど）または限定はしないが、オクチルグリコシドおよびドデシルマルトシド類などのグリコシド基（例えば、オクチル－Ｂ－チオグルコピラノシドなど）のいずれかから構成される非荷電、親水性頭部基を含有する界面活性剤が、限定ではないが、挙げられる。理論に拘束されることは望まないが、非イオン性界面活性剤は、タンパク質を変性させることはめったにない一方、それらを可溶化するため、非変性的であると考えられ、膜タンパク質の生物学的活性形態における単離に広く用いられている「穏やかな」界面活性剤と考えられるため、有利である。

【０１２１】

（貯蔵安定性）

アミノ酸塩基、またはアミノ酸塩基プラス本明細書に記載された１種以上の追加安定化剤を両性イオン性物質と組み合わせて組み込むことによるｂＡＲＥタンパク質またはその変異体の安定性増大は、貯蔵時のｂＡＲＥタンパク質組成物の安定性増大をもたらす。したがって、本発明は、ｂＡＲＥ組成物が、貯蔵中に凝集物を形成するｂＡＲＥタンパク質を含んでなる場合、該ｂＡＲＥ組成物の貯蔵安定性を増大させる方法も提供する。

【０１２２】

「貯蔵安定性の増大」により、該ｂＡＲＥ組成物の貯蔵時のｂＡＲＥポリペプチドの凝集物形成および／または解離が、本明細書に記載された１種以上の安定化剤不在下での貯蔵時のｂＡＲＥポリペプチドの凝集物形成および／または解離に比較して最少化されることが意図される。

【０１２３】

アミノ酸塩基または両性イオン性物質の添加によるｂＡＲＥタンパク質の凝集物形成および／または解離の最少化は、濃度依存性の様式で生じ得る。すなわち、アミノ酸塩基および／または両性イオン性物質の不在下において、組成物中のｂＡＲＥポリペプチドが、貯蔵中に、通常、凝集物形成および／または解離を示す場合、アミノ酸塩基および／または両性イオン性物質の濃度が増加すると、組成物中のｂＡＲＥポリペプチドの安定性増加をもたらし得る。凝集物形成および／または解離を最少化し、それによって、ポリペプチドの安定性を増加させ、したがって、ｂＡＲＥ組成物の貯蔵安定性を増加させるために、該組成物に添加する具体的なアミノ酸塩基および／または両性イオン性物質の量の決定は、当業者に一般的に公知の方法を用いて、過度の実験無しに、任意の特定の対象ｂＡＲＥポリペプチドに関して、容易に決定できる。

【０１２４】

また、ｂＡＲＥ組成物の経時的貯蔵安定性を増大させることが望ましい。

【０１２５】

本発明のｂＡＲＥ組成物は、貯蔵安定性の増大を示す。

【０１２６】

貯蔵安定性の増大は、約４ヵ月から約８ヵ月の期間にわたって見られることが好ましい。

【０１２７】

貯蔵安定性の増大は、約１年の期間にわたって見られることが好ましい。

【０１２８】

ｂＡＲＥ組成物は、２－８で貯蔵された場合、少なくとも、１８ヵ月の貯蔵期限を有することが好ましく、より好ましくは、少なくとも２０ヵ月、さらに好ましくは、少なくとも約２２ヵ月、最も好ましくは、少なくとも約２４ヵ月の貯蔵期限を有する。

【０１２９】

本発明の方法にしたがって作製されたｂＡＲＥ組成物の貯蔵安定性は、当業界に公知の標準的な方法を用いて評価できる。典型的には、このような組成物の貯蔵安定性は、貯蔵安定性プロフィルを用いて評価される。下記の実施レベルに示されるとおり、ｐＨ濃度、安定化剤の安定化剤濃度などの対象の変数に応答した、非凝集、非解離の生物学的活性分子形態において存在するｂＡＲＥタンパク質の量の変化を、経時的にモニタリングすることによって、これらのプロフィルが経時的に得られる。これらの安定性プロフィルは、冷凍温度、冷蔵温度、室温、または４０～５０℃などの高温など、可能な貯蔵条件を代表するいくつかの温度において作成できる。次いで、例えば、対象ｂＡＲＥポリペプチドの非凝集、生物学的活性、非解離分子形態の半減期を測定することによって、プロフィル間での貯蔵安定性を比較できる。

【０１３０】

「半減期」によって、非凝集、生物学的活性分子形態における対象ポリペプチドの５０％減少に必要とされる時間が意図される。本発明の方法によって調製されたアルギニン塩基および両性イオン性物質を含んでなる組成物は、両性イオン性物質と組み合わせたアミノ酸塩基、またはアミノ酸塩基プラス本明細書に記載された１種以上の追加安定化剤の不在下で調整された組成物の半減期の少なくとも約２倍から約１０倍長く、好ましくは、少なくとも約３倍から約１０倍長く、より好ましくは、約４倍から約１０倍長く、最も好ましくは、約５倍から約１０倍長い。本発明の目的のため、本発明により調製される結果として貯蔵安定性の増大した組成物は、「安定化」組成物と考えられる。

【０１３１】

理論に拘束されることは望まないが、本発明の安定化ｂＡＲＥポリペプチド含有組成物の貯蔵安定性増大は、貯蔵時の理論上活性なｂＡＲＥポリペプチド内のグルタミン残基および／またはアスパラギン残基の脱アミドに及ぼすアミノ酸塩基の抑制効果にも関連し得る。貯蔵時のｂＡＲＥ組成物中のこれらの残基の脱アミドに及ぼす具体的なアミノ酸塩基の効果は、脱アミド形態において存在するｂＡＲＥポリペプチドの量を、経時的にモニタリングすることによって容易に測定できる。具体的なｂＡＲＥポリペプチドの天然または脱アミドの分子種の測定方法は、当業界で一般的に知られている。このような方法としては、分子種のクロマトグラフィー分離およびＲＰ　ＨＰＬＣによるなど、ポリペプチド分子量標準を用いた同定が挙げられる。

【０１３２】

（ｂＡＲＥタンパク質）

本明細書に用いられる用語の「ｂＡＲＥタンパク質」には、限定はしないが、タンパク質、核酸が含まれる。ｂＡＲＥタンパク質は、個々に、または他の生物学的分子と組み合わせて使用できる。

【０１３３】

本明細書に用いられている用語の「タンパク質」は、自然に生じる（天然）、合成、および組み換えポリペプチドおよびタンパク質、および本明細書の他所で定性化された生物学的に活性な変異体およびそれらのアナログを包含する。用語の「タンパク質」にはまた、他の生物学的分子に結合しているポリペプチド類およびペプチド類が含まれる。「治療的活性成分」によって、ｂＡＲＥ組成物が対象に投与された時、その対象内の疾病または病態の治療、予防、または診断に関して、所望の治療的応答をもたらすために本発明のｂＡＲＥ組成物に特に組み込まれるタンパク質またはポリペプチドが意図されている。

【０１３４】

本発明のポリペプチドは、種々の手段（例えば、組み換え発現、細胞培養からの精製、化学的合成など）によって、また、種々の形態（例えば、天然、融合、非グリコシル化、リピド化など）において調製できる。それらは、実質的に純粋な形態（すなわち、他の宿主細胞タンパク質が実質的に除去された）において調製されることが好ましい。また、本発明は、ポリペプチド発現を誘導する条件下で、本発明の核酸により形質転換された宿主細胞を培養するステップを含んでなる、本発明のポリペプチドを製造する方法を提供する。

【０１３５】
本明細書に用いられている用語の「核酸」は、オリゴヌクレオチド類およびポリヌクレオチド類を言い、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。用語の「ヌクレオチド配列（ＮＯＩ）」は、用語の「ポリヌクレオチド」または「核酸」と同義である。ＮＯＩは、ゲノムの、または合成の、または組み換え由来のＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。ＮＯＩは、センス鎖またはアンチセンス鎖またはそれらの組み合わせのいずれをも表す二本鎖または一本鎖であり得る。いくつかの適用のために、ＮＯＩは、ＤＮＡであることが好ましい。いくつかの適用のために、ＮＯＩは、組み換えＤＮＡ法の使用（例えば、組み換えＤＮＡ）によって調製されることが好ましい。いくつかの適用のために、ＮＯＩはｃＤＮＡであることが好ましい。いくつかの適用のために、ＮＯＩは、天然形態と同一であり得ることが好ましい。用語の「核酸」には、ＤＮＡおよびＲＮＡ、また、修飾骨格（例えば、ホスホロチオエート類など）を含有するものなどのそれらのアナログ、ならびにペプチド核酸（ＰＮＡ）が含まれる。本発明は、上記の配列に相補的な配列を含んでなる核酸を含む（例えば、アンチセンスまたはプロービング目的で）。

【０１３６】
本発明による核酸は、多くの方法で（例えば、化学的合成により、ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリーから、生物それ自体からなど）調製でき、また、種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブなど）をとり得る。それらは、実質的に純粋な形態（すなわち、他のタンパク質または宿主細胞核酸が実質的に除去された）において調製されることが好ましい。

【０１３７】
本発明の組成物中、治療的有効成分として働くｂＡＲＥタンパク質の生物学的に活性な変異体もまた、本明細書に用いられている用語の「ｂＡＲＥタンパク質」に包含される。対象に投与された際、変異体ポリペプチドを含んでなる組成物が天然ポリペプチドを含んでなる組成物と同じ治療効果を有するように、このような変異体は、天然ｂＡＲＥタンパク質の所望の生物学的活性を保持することが必要である。すなわち、変異体ポリペプチドは、天然ｂＡＲＥタンパク質で見られる様式と同じ様式で、治療的有効成分として働く。

【０１３８】
変異体は、限定はしないが、該ポリペプチドの第一級アミノ酸配列が、糖部分を用いる誘導体化により（グリコシル化）、または脂質、リン酸塩、アセチル基などの他の補足分子により増強できる状況を含み得る。それはまた、糖類との結合によっても増強できる。このような増強の一定の態様は、産生宿主の翻訳後処理系によって達成され；他のこのような修飾は、インビトロで導入できる。いずれの場合も、このような修飾は、該ポリペプチドの活性が無効にされない限り，本明細書に用いられるポリペプチドの定義に含まれる。種々のアッセイにおいて、このような修飾は、該ポリペプチドの活性を増強、または減少することにより、定量的に、または定性的に該活性に影響を与え得ることが予想される。さらに、鎖中の個々のアミノ酸残基を、酸化、還元、または他の誘導体化によって修飾でき、また、該ポリペプチドを開裂して、活性を保持する断片を得ることができる。活性を無効にしないこのような変更によって、本明細書で用いられる対象ポリペプチドの定義から該ポリペプチド配列が除外されることはない。

【０１３９】
当業技術により、ポリペプチド変異体の調製および使用に関する実際的な指針が提供されている。ポリペプチド変異体の調製において、天然タンパク質ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に対するどの修飾が、本発明の製薬組成物の治療的有効成分として使用するために好適な変異体を生じさせるか、また、アミノ酸塩基および塩形態が実質的に無い酸、酸の塩形態、または酸とその塩形態との混合物の存在により、どんな凝集物形成が減少するかを、当業者は容易に決定できる。例えば、変異体ポリペプチドが、所望の生物学的活性を保持しているかどうか、したがって、該組成物中の治療的有効成分として働くかどうかを決定する方法が当業界で利用できる。本発明に記載されたアッセイなど天然ポリペプチドまたはタンパク質の活性を測定するために特にデザインされたアッセイを用いて、生物

学的活性を測定することができる。さらに、生物学的に活性な天然ポリペプチドに対して増加させた抗体を、変異体ポリペプチドに対するそれらの結合能力に関して試験することができ、ここで効果的な結合は、天然ポリペプチドのコンホメーションと同様なコンホメーションを有するポリペプチドを示す。

【０１４０】

天然の、または自然に生じる対象ポリペプチドの好適な生物学的活性変異体は、そのポリペプチドの断片、アナログ、および誘導体であり得る。「断片」により、完全ポリペプチド配列と構造の部分のみから構成されているポリペプチドが意図されることもあるし、また、天然ポリペプチドのＣ末端欠失またはＮ末端欠失でもあり得る。

【０１４１】

「アナログ」により、１つ以上のアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する天然ポリペプチド配列および構造を含んでなる、天然ポリペプチドの、または天然ポリペプチドの断片のアナログが意図されている。本明細書に記載されたものなどの「突然変異タンパク質」および１つ以上のペプトイド（ペプチド模擬物）を有するペプチドもまた、アナログと言う用語に包含される（例えば、国際公開第９１／０４２８２号を参照）。

【０１４２】

「誘導体」により、対象天然ポリペプチドの所望の生物学的活性が保持される限り、該天然ポリペプチドの、該天然ポリペプチド断片の、または、それら各々のアナログの、グリコシル化、リン酸化、または外来部分の他の付加などの好適な修飾が意図されている。ポリペプチドの断片、アナログおよび誘導体を作製する方法は、当業界で一般的に利用できる。例えば、ポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、対象の天然ポリペプチドをコードするクローン化ＤＮＡ配列における変異によって調製できる。

【０１４３】

変異誘発およびヌクレオチド配列変更の方法は、当業界に周知である。例えば、参照として、本明細書に組み込まれているＷａｌｋｅｒおよびＧａａｓｔｒａ編集（１９８３）Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（ニューヨーク所在のＭａｃＭｉｌｌａｎ出版社）；Ｋｕｎｋｅｌ（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８２：４８８－４９２頁；Ｋｕｎｋｅｌら（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５４：３６７－３８２頁；Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（ニューヨーク州コールドスプリングハーバー）；米国特許第４，８７３，１９２号；およびそれらに引用された文献を参照されたい。対象のポリペプチドの生物学的活性に影響を与えない適切なアミノ酸置換についての指針は、参照として本明細書に組み込まれているＡｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（ワシントンＤ．Ｃ．所在のＮａｔｌ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．）におけるＤａｙｈｏｆｆらのモデル（１９７８）に見ることができる。

【０１４４】

１つのアミノ酸の、同様な性質を有する他のアミノ酸による交換などの保存的置換が好ましいと考えられる。保存的置換の例としては、限定はしないが、ＧｌｙからＡｌａ、ＶａｌからＩｌｅからＬｅｕ、ＡｓｐからＧｌｕ、ＬｙｓからＡｒｇ、ＡｓｎからＧｌｎ、およびＰｈｅからＴｒｐからＴｙｒが挙げられる。対象ポリペプチドの変異体構築においては、変異体が所望の活性を保持し続けるように、修飾がなされる。変異体ポリペプチドをコードするＤＮＡにおいてなされる変異は、リーディングフレーム外に配列を配置してはならないことは明白であり、また、二次的なｍＲＮＡ構造を生み出し得る相補的領域を生成しないことが好ましい。欧州特許出願公開第７５，４４４号を参照されたい。

【０１４５】

対象となるポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、比較の基準として働く対照ポリペプチド分子のアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは約９０％から９５％以上、最も好ましくは約９８％以上のアミノ酸配列同一性を、一般に有する。対象の天然ポリペプチドの生物学的活性変異体は、１～１５個

のアミノ酸だけ、１～１０個だけ、例えば、６～１０個、５個だけ、４、３、２個だけ、またはさらに１個のアミノ酸残基だけ、天然ポリペプチドと異なり得る。

【０１４６】

本発明に用いられるタンパク質（タンパク質抗原を含めて）は、天然形態との相同性および／または配列同一性を有し得る。このようなタンパク質を発現する能力のある同様なコード配列は、天然の配列との相同性および／または配列同一性を、一般に有する。核酸およびアミノ酸の「配列同一性」を決定する方法もまた、当業界に公知である。典型的には、このような方法は、ある遺伝子に関するｍＲＮＡのヌクレオチド配列を決定すること、および／またはそれによってコードされたアミノ酸配列を決定すること、およびこれらの配列を第２のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と比較することを含む。

【０１４７】

一般に、用語の「同一性」とは、２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列それぞれの、ヌクレオチド対ヌクレオチド、またはアミノ酸対アミノ酸の完全な対応を言う。２つ以上の配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）を、それらの「同一性パーセント」を決定することによって比較することができる。核酸配列でもアミノ酸配列でも、２つの配列の同一性パーセントは、整列した２つの配列間の完全対合数を短鎖の長さで割り、１００をかけたものである。

【０１４８】

２つの配列の最適な整列のため、変異体のアミノ酸配列の連続セグメントは、対照分子のアミノ酸配列に関して、追加のアミノ酸残基または欠失アミノ酸残基を有し得る。対照アミノ酸配列との比較のために用いられる連続セグメントは、少なくとも２０個の連続アミノ酸残基を含んでなり、また、３０個、４０個、５０個、１００個、またはそれ以上の残基であり得る。変異体のアミノ酸配列におけるギャップ含有に関連した配列同一性増大の補正は、ギャップペナルティーを割り当てることによって実施できる。配列整列の方法は、アミノ酸配列に関しても、アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に関しても、当業界に周知である。

【０１４９】

したがって、任意の２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的演算法を用いて達成することができる。配列比較に利用される数学的演算法の１つの好ましい非限定的な例は、ＭｙｅｒｓとＭｉｌｌｅｒ（１９８８）ＣＡＢＩＯＳ４：１１－１７頁の演算法である。このような演算法は、ＧＣＧ配列整列ソフトウェアーパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）において利用される。アミノ酸配列を比較する際は、ＡＬＩＧＮプログラムと共に、ＰＡＭ１２０重量残基表、１２のギャップ長さペナルティー、および４のギャップペナルティーが使用できる。２つの配列比較に使用される数学的演算法の他の好ましい非限定的な例は、ＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：２２６４頁をＫａｒｌｉｎとＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：５８７３－５８７７頁で修正したものである。このような演算法は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３頁のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている。対象のポリペプチドをコードするヌクレオチドに対して相同性のヌクレオチド配列を得るために、ＮＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２を用いて、ＢＬＡＳＴヌクレオチド探索を実施することができる。対象のポリペプチドをコードするヌクレオチドに対して相同性のアミノ酸配列を得るために、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３を用いて、ＢＬＡＳＴタンパク質探索を実施することができる。比較目的で、ギャップ化整列を得るために、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２５：３３８９頁に記載されているＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを利用することができる。あるいは、分子間の遠隔関係を検出する累次探索を実施するために、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを使用することができる。上記、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）を参照されたい。ＢＬＡＳＴ、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ、およびＰＳＩ－ＢＬＡＳＴプログラムを利用する際は、それぞれのプログラム（例えば、

ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメータを使用できる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照されたい。また、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ５：Ｓｕｐｐｌ．３（ワシントンＤ．Ｃ．所在のＮａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）におけるＡＬＩＧＮプログラム（Ｄａｙｈｏｆｆ（１９７８）およびＷｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、第８版（ウィスコンシン州マジソン所在のＧｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐから入手できる）におけるプログラム、例えば、プログラムのデフォルトパラメータが利用されているＧＡＰプログラムを参照されたい。

【０１５０】

また、核酸配列に関する近似整列がＳｍｉｔｈとＷａｔｅｒｍａｎ、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ２：４８２－４８９頁（１９８１）の局所相同性演算法により提供されている。この演算法は、Ｄａｙｈｏｆｆ、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ編集、５ｓｕｐｐｌ．３：３５３－３５８，米国、ワシントンＤ．Ｃ．所在のＮａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎによって開発され、Ｇｒｉｂｓｋｏｖ、Ｎｕｃｌ．ＡｃｉｄｓＲｅｓ．１４（６）：６７４５－６７６３頁（１９８６）によって正規化されたスコアリングマトリクスを使用することによって、アミノ酸配列に適用できる。配列の同一性パーセントを決定するためのこの演算法の例示的実施は、「ＢｅｓｔＦｉｔ］ユーティリティーの適用において、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ウィスコンシン州マジソン所在）により提供されている。この方法に関するデフォルトパラメータは、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｍａｎｕａｌ、第８版（１９９５）（ウィスコンシン州マジソン所在のＧｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐから入手できる）に記載されている。本発明の文脈における同一性パーセント確立の好ましい方法は、Ｊｏｈｎ Ｆ．ＣｏｌｌｉｎｓおよびＳｈａｎｅ Ｓ．Ｓｔｕｒｒｏｋによって開発され、ＩｎｔｅｌｌｉＧｅｎｅｔｉｃｓ社（カリフォルニア州マウンテンビュー所在）によって配給され、エディンバラ大学が版権を有しているプログラムのＭＰＳＲＣＨパッケージを使用することである。このパッケージ一式から、スコアリング表に関してデフォルトパラメータが使用されている（例えば、１２のギャップオープンペナルティー、１のギャップ拡張ペナルティー、６のギャップ）Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ演算法を使用することができる。該データから「対合値反映」配列同一性」が作成された。配列間の同一性または類似性パーセントを算出するための他の好適なプログラムは、一般的に当業界に公知であり、例えば、他の整列プログラムは、デフォルトパラメータと共に用いられるＢＬＡＳＴである。例えば、以下のデフォルトパラメータを用いて、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴＰが使用できる：遺伝コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝双方；カットオフ＝６０；予想＝１０；マトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２；表示＝５０配列；選別＝ＨＩＧＨ ＳＣＯＲＥ；データベース＝非重複；ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋＣＤＳ翻訳＋Ｓｗｉｓｓタンパク質＋Ｓｐｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲ。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスで見ることができる：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴ。

【０１５１】

アミノ酸配列同一性のパーセンテージを考える場合、保存的アミノ酸置換の結果、いくつかのアミノ酸残基の位置が異なり得るが、これは、タンパク質機能の性質には影響しない。これらの場合、配列同一性パーセントは、保存的に置換されたアミノ酸における類似性のために上方へ調整し得る。このような調製は、当業界に周知である。例えば、ＭｙｅｒｓおよびＭｉｌｌｅｒ（１９８８）ＣｏｍｐｕｔｅｒＡｐｐｌｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｓｃｉ．４：１１－１７頁を参照されたい。

【０１５２】

ポリペプチドの正確な化学的構造は、多くの因子に依存する。分子内にイオン化できるアミノ基またはカルボキシル基が存在する時、酸性塩または塩基性塩として、または中性形態で、特定のポリペプチドを得ることができる。好適な環境に置かれた場合に生物学的活性を保持するこのような調製物は全て、本明細書に用いられるポリペプチドの定義に含まれる。

【０１５３】

あるいは、相同性領域間の安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、引き続き、一本鎖特異的ヌクレアーゼ（１つまたは複数）による消化、および消化された断片のサイズ決定により、相同性が決定できる。２つのＤＮＡ配列，または２つのポリペプチド配列が、上記の方法を用いて決定された該分子の規定された長さにわたって、少なくとも約８０％～８５％、好ましくは少なくとも約９０％、最も好ましくは少なくとも約９５％～９８％の配列同一性を示す場合、該配列は互いに「実質的に相同性」である。

【０１５４】

本明細書に用いられる、実質的に相同性または相同性はまた、指定されたＤＮＡ配列またはポリペプチド配列に対して、完全な同一性を示している配列も言う。実質的に相同性または相同性のＤＮＡ配列は、サザンハイブリダイゼーション実験において、例えば、その特定のシステムに関して規定されたストリンジェントな条件下で、同定できる。例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、５０％ホルムアミド、５×デンハート液、５×ＳＳＣ，０．１％ＳＤＳおよび１００ｐｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡを挙げることができ、洗浄条件としては、３７℃における、２×ＳＳＣ，０．１％ＳＤＳ、続いて６８℃における、１×ＳＳＣ，０．１％ＳＤＳを挙げることができる。適切なハイブリダイゼーション条件の規定は、当業技術の範囲内にある。

【０１５５】

同一性の程度は、５０％超（例えば、６５％、８０％、９０％、またはそれ以上）であることが好ましく、変異体および対立遺伝子変異体を含むことが好ましい。タンパク質間の配列同一性は、ギャップオープンペナルティー＝１２およびギャップ拡張ペナルティー＝１のパラメータで、アフィンギャップ探索を用いるＭＰＳＲＣＨプログラム（Ｏｘｆｏｒｄ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ）において実施されているＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性探索演算法によって決定することが好ましい。

【０１５６】

（$ＡＢ_5$タンパク質）

本発明の好ましい一実施形態において、ｂＡＲＥ生物学的分子は免疫原である。

【０１５７】

本明細書に用いられている用語の「免疫原」とは、細胞と接触した際、細胞のおよび／または液性の免疫応答を誘発する能力のある任意の化合物を言い、限定はしないが、ワクチンなどの免疫原性組成物および免疫原を含んでなる組成物が挙げられる。抗体応答およびＴ細胞応答が誘発されることが好ましい。このような免疫原は、予防的および治療的適用ならびに抗体の創製などの研究適用に有用であることが期待されよう。

【０１５８】

コレラ毒素（ＣＴ）および関連する大腸菌易熱性腸毒素（ＬＴ）は、それらそれぞれの腸毒性細菌株の分泌産物であるが、強力な免疫原であり、全身的に、経口で、または経粘膜で投与された場合、強力な毒性を示す。さらに、ＣＴおよびＬＴは、筋肉内または経口経路により投与された場合、抗原に対してアジュバント効果を提供できる。これら２つの毒素は極めて類似した分子であり、アミノ酸レベルで、少なくとも約７０～８０％相同性である。アジュバント活性に対するＡおよびＢサブユニットの相対的重要性には議論の余地がある。Ａサブユニットの毒性活性がＢサブユニットに関連したアジュバント効果を調節できるとの推測が、当分野でなされている。いくつかの試験は、Ａサブユニットにおける変異によってアジュバント活性が取り消されることを実証しているが、他の試験は、ＡＤＰ－リボシラーゼ活性を遮断するＡサブユニット変異は、アジュバント活性に影響しな

いことを示している。他の報告は、アジュバント濃度を変化させることによって、精製Ｂサブユニットまたは組み換えＢサブユニットの調製が達成されることを示している。ＡおよびＢサブユニットは、アジュバント活性に独立して寄与する別個の機能を有している可能性が大きい。これらの機能は、それぞれ、ＡＤＰ－リボシラーゼ活性および受容体トリガリング活性である。

【０１５９】

好ましい一実施形態において、ｂＡＲＥタンパク質はＡＢ５タンパク質である。

【０１６０】

好ましい一実施形態において、ｂＡＲＥ組成物は治療的有効剤として、修飾ＡＢ５タンパク質を含んでなる。

【０１６１】

修飾AB_5タンパク質は、修飾腸毒素サブユニットコード領域を有することが好ましい。

【０１６２】

修飾AB_5タンパク質は、修飾腸毒素Ａサブユニットコード領域を有することが好ましい。

【０１６３】

修飾Ａサブユニットは、Ａサブユニットコード領域が発現された産物において、ＡＤＰ－リボシルトランスフェラーゼ活性を破壊または不活化するように修飾されるように修飾されることが好ましい（例えば、国際公開第０３／００４０５５号を参照）。

【０１６４】

周知のように、コレラ毒素（ＣＴ）およびＬＴ毒素の毒性は、Ａサブユニットに存在する。Ａサブユニットの修飾は、毒性の酵素活性を除去する一方、免疫原性を保持する重要活性部位残基の部位指向的変異誘発であることが好ましい。好ましいさらなる一実施形態において、ｂＡＲＥタンパク質は変異ＡＢ５タンパク質である。

【０１６５】

Ａサブユニットに点変異を含んでなる、ＣＴおよびその相同体、ＬＴの多数の変異体が当業界に知られている。例えば、国際公開第９２／１９２６５号は、Ａｒｇ－７、Ａｓｐ－９、Ａｒｇ－１１、Ｈｉｓ－４４、Ｈｉｓ－７０およびＧｌｕ－１１２におけるＣＴＡサブユニットの変異を開示している。国際公開第９３／１３２０２号は、１つ以上のアミノ酸、Ｖａｌ－５３、Ｓｅｒ－６３、Ｖａｌ－９７、Ｔｙｒ－１０４またはＰｒｏ－１０６における置換を有する免疫原性解毒ＣＴおよびＬＴタンパク質に関する。国際公開第９５／１７２１１号は、Ｌｙｓ－７変異を有するＬＴ変異体（ＬＴ－Ｋ７）を開示している。国際公開第９６／０６６２７号は、１９２位のアルギニンがグリシンで置換されているＬＴ変異体（ｍＬＴ　Ｒ１９２Ｇ）を開示している。変異は組み合わせることができる。例えば、ＣＴまたはＬＴの変異は、２つ以上の変異を有してもよい。

【０１６６】

特に好ましい実施形態において、ＡＢ５タンパク質は、Ａサブユニットの６３位において、セリン（Ｓ）からリジン（Ｋ）への置換を有するＬＴ（ＬＴＫ６３）および、Ａサブユニットの７２位において、アラニン（Ａ）からアルギニン（登録商標）への置換を有するＬＴ（ＬＴＲ７２）よりなる１群以上から選択される大腸菌易熱性毒素（ＬＴ）の解毒変異体Ａサブユニットである。

【０１６７】

さらにいっそう好ましい実施形態において、生物学的分子はＬＴＫ６３である。

【０１６８】

例えば、野生型毒素をコードするＤＮＡの部位指向的変異などの、ＣＴ、ＬＴおよびＣＴならびにＬＴ相同体の変異体のデザインおよび製造のための方法は当業界に公知である。例えば、解毒ＡＤＰ－リボシル化毒素を調製および使用するための好適な方法は、粘膜アジュバントとしては、国際公開第９５／１７２１１号に、また、非経口アジュバントとしては、国際公開第９８／４２３７５号、ならびに国際公開第９３／１３２０２号、国際

公開第９２／１９２６５号に記載されており、これらの開示は、参照として、本明細書に組み込まれている。

【０１６９】

アジュバントとしてのＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体、特に、ＬＴ－Ｋ６３およびＬＴ－Ｒ７２の使用は、各々参照として、それらの全体が具体的に本明細書に組み込まれている以下の参考文献に見ることができる。（Ｂｅｉｇｎｏｎら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２００２）７０（６）：３０１２－３０１９頁；Ｐｉｚｚａら、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２５３４－２５４１頁；Ｐｉｚｚａら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ（２０００）２９０（４－５）：４５５－４６１頁；Ｓｃｈａｒｔｏｎ－Ｋｅｒｓｔｅｎら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２０００）６８（９）：５３０６－５３１３頁；Ｒｙａｎら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）６７（１２）：６２７０－６２８０頁；Ｐａｒｔｉｄｏｓら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．（１９９９）６７（３）：２０９－２１６頁；Ｐｅｐｐｏｌｏｎｉら、Ｖａｃｃｉｎｅｓ（２００３）２（２）：２８５－２９３頁；およびＰｉｎｅら、Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ（２００２）８５（１－３）：２６３－２７０頁）。アミノ酸置換の数値基準は、参照として、その全体が具体的に本明細書に組み込まれている、Ｄｏｍｅｎｉｇｈｉｎｉら、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ（１９９５）１５（６）：１１６５－１１６７頁に記載されたＡＤＰ－リボシル化毒素のＡおよびＢサブユニットの整列に基づくことが好ましい。

【０１７０】

ＣＴおよびＬＴの粘膜アジュバント活性は、多数の実験および経口、鼻腔内および直腸内経路により投与される抗原に関して十分に記載されているが、これらの投与経路を用いたＡサブユニット活性に関連した毒性可能性およびそれによって生じる下痢の可能性によって、ヒト用ワクチンにおけるそれらの使用は限られてきた。一方、当分野の研究者は、ＣＴなどの局所的（皮膚の穿孔なしの外表皮または経皮投与など）適用は、その経口、鼻腔内および非経口使用において生じる副作用をもたらさないようであることを示してきた。例えば、外表皮に適用されたコレラ毒素（ＣＴ）、大腸菌の易熱性腸毒素（ＬＴ）、シュウドモナス外毒素（ＥＴＡ）、百日咳毒素（ＰＴ）などのＡＤＰ－リボシル化外毒素は、皮膚を通過し、免疫応答を誘導できたことを当分野の研究者は示している。また、ＣＴ、ＬＴ、ＥＴＡおよびＰＴは、皮膚に同時投与された抗原に対する免疫応答を誘導するアジュバントとして作用することが示されている。（例えば、国際公開第９８／２０７３４号、国際公開第９９／４３３５０号、国際公開第００／６１１８４号および国際公開第０２／０６４１６２号を参照）ＬＴに加えて、ＬＴ変異体（ＬＴＲ １９２Ｇ、ＬＴＲ７２およびＬＴＫ６３）もまた、経皮免疫化のための強力なアジュバントとして作用することが示されている（Ｓｃｈａｒｔｏｎ－Ｋｅｒｓｔｅｎら、（２０００）Ｉｎｆｅｃｔ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ６８：５３０６－５３１３頁）。

【０１７１】

腸毒素Ｂサブユニットは、免疫調節剤として（例えば、国際公開第９７／０２０４５号および米国特許第２００１００３６９１７号を参照）、アジュバントとして（例えば、国際公開第９９／５８１４５号を参照）、および担体として（例えば、国際公開第０３／００８９９９号を参照）作用できることは、当業界に公知である。

【０１７２】

本発明による免疫原性組成物（例えば、ワクチン類）は、ヒト対象に該免疫原性組成物を投与することにより、細菌感染を予防または軽減するためのヒト対象を処置する方法に使用できる。

【０１７３】

（アジュバント）

本発明の組成物および／またはｂＡＲＥタンパク質は、他の免疫調節剤と関連させて投与できる。特に、本発明の組成物は、アジュバントと共に投与できる。アジュバント、特に、遺伝的アジュバントを含めることは、ＣＭＩ応答のさらなる増強または調整に有用で

あり得る。アジュバントは、免疫化された対象において、同時投与された抗原の免疫原性を増強することにより、また、同時投与抗原に対するＴｈ１様免疫応答を誘導することによってＣＭＩ応答を増強でき、このことは、免疫原性組成物製品において有利である。

【０１７４】

免疫応答および特にＣＭＩ応答は、抗原の組み合わせまたは抗原の組み合わせをコードするヌクレオチド配列にアジュバントを加えることによって改良でき、これによって、長命で持続性のＣＭＩ応答増強を誘導する上で特に効果的な組成物がもたらされる。

【０１７５】

本明細書に用いられている用語の「アジュバント」とは、特異的にまたは非特異的に、抗原特異的免疫応答を変更、増強、指示、再指示、相乗化または開始する能力を有する任意の物質または組成物を言う。

【０１７６】

用語の「アジュバント」には、限定はしないが、抗原、抗原組成物またはそのような抗原をコードするヌクレオチド配列と共に投与した際、抗原または抗原の組み合わせのみを投与した際に生じるＣＭＩ応答に比較して、ＣＭＩ応答を増強または相乗化または調整する、細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素、生物学的活性因子、免疫調整分子、生物学的応答調節剤またはサイトカイン、インターロイキン、ケモカインなどの免疫刺激分子またはリガンドまたはエピトープ（ヘルパーＴ細胞エピトープなど）および最適には、それらの組み合わせが含まれる。該アジュバントは、ヒトまたは動物の使用にとって適切な、当業界に公知の任意のアジュバントであり得る。

【０１７７】

サイトカイン類（ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－６、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＩＬ－２）、および共刺激および補助的分子（Ｂ７－１、Ｂ７－２）は、種々の組み合わせにおいて、アジュバントとして使用できる。一実施形態において、ＧＭ－ＣＳＦは、投与措置の前、最中または後に、対象に投与されない。対象抗原の発現部位における免疫調整分子と対象抗原の同時産生により、ＣＭＩ応答を増強する助けとなり得る特定のエフェクターの生成が増強され得る。ＣＭＩ応答の増強および／または調整に関して、種々の免疫刺激分子が、種々の機構を誘導するため、ＣＭＩ応答増強の程度は、使用される特定の免疫刺激分子および／またはアジュバントに依存すると考えられる。例えば、種々のエフェクター機構／免疫調整分子としては、限定はしないが、ヘルプシグナルの増強（ＩＬ－２）、専門ＡＰＣの動員（ＧＭ－ＣＳＦ）、Ｔ細胞頻度の増加（ＩＬ－２）、抗原処理経路への影響およびＭＨＣ発現（ＩＦＮ－ガンマおよびＴＮＦ－アルファ）ならびにＴｈ１応答からＴｈ２応答への免疫応答の転換（ＬＴＢ）が挙げられる（国際公開第９７／０２０４５号を参照）。非メチル化ＣｐＧ含有オリゴヌクレオチド類（国際公開第９６／０２５５５号を参照）もまた、Ｔｈ１応答の優先的な誘導物質であり、本発明の使用に好適である。

【０１７８】

理論には拘束されないが、アジュバントは、Ｔｈ２応答をＴｈ１応答へ、および／または発現エピトープへの特定エフェクター関連機構へと転換し、その結果、ＣＭＩ応答の増強を引き起こし維持することによって、発現抗原に対するＣＭＩ応答の増強を補助し得るため、アジュバントを含めることは有利である（例えば、国際公開第９７／０２０４５号における教示を参照）。

【０１７９】

抗原または抗原をコードするヌクレオチド配列と共にアジュバントを含めることはまた、抗原または抗原をコードするヌクレオチド配列を投与される対象において所望のＣＭＩ応答を得るために必要な抗原／抗原の組み合わせの用量の低下または投与回数の減少をもたらすため、有利である。アジュバントの有効性は、抗原単独と並行して、抗原と共にアジュバントを動物に投与し、放射免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡｓＣＤ８＋Ｔ細胞アッセイなど、全て当業界で周知の標準的アッセイを用いて、２つの群における抗体および／または細胞媒介免疫を比較することによって判断できる。典型的には、１つの分子（例えば、ＣＴＢまたはＬＴＢなど、そのアナログなど）が、アジュバントの性質と抗原の性質の双方

を有し得るが、アジュバントは抗原とは別個の部分である。

【０１８０】

本明細書に用いられている用語の「遺伝的アジュバント」とは、ヌクレオチド配列によってコードされているアジュバントを言い、抗原と共に投与された場合、抗原単独で投与された際に生じるＣＭＩ応答に比較して、ＣＭＩ応答を増強する。

【０１８１】

細菌のＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体は、本発明におけるアジュバントとして使用できる。該タンパク質は、大腸菌（すなわち、大腸菌易熱性腸毒素「ＬＴ」）、コレラ（「ＣＴ」）、または百日咳（「ＰＴ」）由来であることが好ましい。

【０１８２】

好ましい一実施形態において、遺伝的アジュバントは細菌のＡＤＰ－リボシル化外毒素である。

【０１８３】

上記で説明したように、ＡＤＰ－リボシル化細菌外毒素は、関連する細菌の外毒素のファミリーであり、ジフテリア毒素（ＤＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、コレラ毒素（ＣＴ）、大腸菌易熱性毒素（ＬＴ１およびＬＴ２）、シュードモナス内毒素Ａ、シュードモナス外毒素Ｓ、Ｂ．セレウス外酵素、Ｂ．ｓｐｈａｅｒｉｃｕｓ毒素、Ｃ．ボツリヌスＣ２およびＣ３毒素、Ｃ．ｌｉｍｏｓｕｍ外酵素、ならびにウェルシュ菌、Ｃ．ｓｐｉｒｉｆｏｒｍａおよびＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、黄色ブドウ球菌ＥＤＩＮ、ＣＲＭ$_{197}$、非毒性ジフテリア毒素変異菌などのＡＤＰリボシル化細菌毒素変異菌が挙げられる。（例えば、Ｂｉｘｌｅｒら（１９８９）Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：１７５頁；およびＣｏｎｓｔａｎｔｉｎｏら（１９９２）Ｖａｃｃｉｎｅを参照）多くのＡＤＰ－リボシル化細菌毒素は、Ａサブユニットがａｄｐ－リボシルトランスフェラーゼ活性活性を含有し、Ｂサブユニットが結合部分として働くＡ：Ｂ多量体として構成されている。本発明の組成物に使用される好ましいＡＤＰ－リボシル化細菌毒素としては、コレラ毒素および大腸菌易熱性毒素が挙げられる。

【０１８４】

コレラ毒素（ＣＴ）および関連した大腸菌易熱性腸毒素（ＬＴ）は、強力な免疫原であり、全身的に、経口で、または経粘膜で投与された場合、強力な毒性を示す、それらそれぞれの腸毒素細菌株の分泌産物である。ＣＴおよびＬＴは双方とも、筋肉内または経口経路で投与された場合、抗原に対するアジュバント効果を提供することが知られている。これらのアジュバント効果は、毒性に必要な用量以下の用量で見られている。これら２つの毒素は極めて類似した分子であり、アミノ酸レベルで、少なくとも約７０～８０％相同性である。

【０１８５】

遺伝的アジュバントは、コレラ毒素（ＣＴ）、腸内毒素原性大腸菌易熱性腸毒素（ＬＴ）、またはアジュバント活性を保持するＣＴまたはＬＴの誘導体、サブユニット、または断片であることが好ましい。さらに好ましい実施形態において、遺伝的アジュバントはＬＴである。他の好ましい実施形態において、遺伝的アジュバントはＣＴＢまたはＬＴＢであり得る。

【０１８６】

腸毒素は非毒性腸毒素であることが好ましい。

【０１８７】

解毒化ＡＤＰ－リボシル化毒素の使用は、粘膜アジュバントとしては、国際公開第９５／１７２１１号に、非経口アジュバントとしては、国際公開第９８／４２３７５号に記載されている。毒素またはトキソイドは、ＡサブユニットおよびＢサブユニットを含んでなるホロトキシンの形態であることが好ましい。Ａサブユニットは解毒性変異を含有することが好ましく；Ｂサブユニットは変異されていないことが好ましい。アジュバントは、ＬＴ－Ｋ６３、ＬＴ－Ｒ７２、およびＬＴＲ１９２Ｇなどの解毒化ＬＴ変異体であることが好ましい。アジュバントとしてのＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒化誘導体、

特に、ＬＴ－Ｋ６３およびＬＴ－Ｒ７２の使用は、各々、参照として、それらの全体が具体的に本明細書に組み込まれている以下の文献に見ることができる（Ｂｅｉｇｎｏｎら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２００２）７０（６）：３０１２－３０１９頁；Ｐｉｚｚａら、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２５３４－２５４１頁；Ｐｉｚｚａら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（２０００）６８（９）：５３０６－５３１３頁；Ｒｙａｎら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）６７（１２）：６２７０－６２８０頁；Ｐａｒｔｉｄｏｓら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．（１９９９）６７（３）：２０９－２１６頁；Ｐｐｏｌｏｎｉら、Ｖａｃｃｉｎｅｓ（２００３）２（２）：２８５－２９３頁；およびＰｉｎｅら、Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ（２００２）８５（１－３）：２６３－２７０頁）。アミノ酸置換に関する数値基準は、参照として、その全体が具体的に本明細書に組み込まれているＤｏｍｅｎｉｇｈｉｎｉら、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（１９９５）１５（６）：１１６５－１１６７頁に記載されているＡＤＰ－リボシル化毒素のＡおよびＢサブユニットの整列に基づくことが好ましい。

【０１８８】

さらに、例えば、腸毒素サブユニットコード領域の少なくとも１つを、それによってコードされるサブユニットペプチドを解毒化するために、遺伝的に修飾でき、例えば、サブユニットペプチド発現産物におけるＡＤＰ－リボシル化トランスフェラーゼ活性を破壊または不活化するために、切断Ａサブユニットコード領域が遺伝的に修飾されている（例えば、国際公開第０３／００４０５５号を参照）。

【０１８９】

したがって、ＣＭＩ応答をさらに増強することが望まれる場合、この遺伝的アジュバントが特に望ましいことが、これらの結果によって実証されている。他の望ましい遺伝的アジュバントとしては、限定はしないが、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、インターフェロン類（ＩＦＮｓ）（例えば、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ｓｓ、およびＩＦＮ－ガンマ）をコードするヌクレオチド配列、およびそれらの好ましい組み合わせが挙げられる。ＣＭＩ応答を増強させるさらに他のこのような生物学的活性因子は、当業者により容易に選択でき、これらを含有する好適なプラスミドベクターは、公知の方法により構築できる。

【０１９０】

このように、本発明の組成物（例えば、ワクチン類）は、他の免疫調節剤と関連させて投与できる。特に、組成物は通常、アジュバントを含む。本発明と共に使用されるアジュバントとしては、限定はしないが、下記に記載される以下のものの１つ以上が挙げられる：

（Ａ．無機物含有組成物）

本発明のアジュバントとして使用される好適な無機物含有組成物としては、アルミニウム塩およびカルシウム塩などの無機塩が挙げられる。本発明には、水酸化物（例えば、オキシヒドロキシド類）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシホスフェート、オルトホスフェート）、硫酸塩など（例えば、Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ．．．（１９９５）、編集者ＰｏｗｅｌｌおよびＮｅｗｍａｎ．ＩＳＢＮの第８章および９章：０３０６４４８６７Ｘ．Ｐｌｅｎｕｍを参照）、または種々の無機化合物（例えば、任意でリン酸塩過剰の、リン酸塩および水酸化物のアジュバント混合物）が含まれ、該化合物は、任意の好適な形態をとっており（例えば、ゲル、結晶、非晶質）、また、塩（１種または複数種）に吸着されていることが好ましい。また、無機物含有組成物は、金属塩の粒子として製剤化することもできる（国際公開第００／２３１０５号）。

【０１９１】

本発明のワクチン類に、アルミニム塩を、Al^{3+}が１投与量当たり、０．２ｍｇと１．０ｍｇの間であるように、含めることができる。

【０１９２】

（Ｂ．油乳液）

本発明のアジュバントとしての使用に好適な油乳液組成物としては、ＭＦ５９（マイクロフリューダイザーを用いて、サブミクロン粒子に製剤化した５％スクアレン、０．５％ツウィーン８０、および０．５％スパン８５）が挙げられる。国際公開第９０／１４８３７号を参照されたい。また、Ｐｏｄｄａ、「Ｔｈｅ ａｄｊｕｖａｎｔｅｄ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｖａｃｃｉｎｅｓ ｗｉｔｈ ｎｏｖｅｌ ａｄｊｕｖａｎｔｓ：ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＭＦ５９－ａｄｊｕｖａｎｔｅｄ ｖａｃｃｉｎｅ」、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２６７３－２６８０頁；Ｆｒｅｙら、「Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｓａｆｅｔｙ，ｔｏｌｅｒａｂｉｌｉｔｙ，ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ ｏｆ ａ ＭＦ５９－ａｄｊｕｖａｎｔｅｄ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｖａｃｃｉｎｅ ａｎｄ ａ ｎｏｎ－ａｄｊｕｖａｎｔｙｅｄ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｖａｃｃｉｎｅ ｉｎ ｎｏｎ－ｅｌｄｅｒｌｙ ａｄｕｌｔｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００３）２１：４２３４－４２３７頁を参照されたい。ＭＦ５９は、ＦＬＵＡＤ（商標）インフルエンザウィルス三価サブユニットワクチンにおけるアジュバントとして用いられる。

【０１９３】

該組成物に使用される特に好ましいアジュバントは、サブミクロン水中油乳液である。本明細書に用いられる好ましいサブミクロン水中油乳液は、４～５％ｗ／ｖスクアレン、０．２５～１．０％ｗ／ｖツウィーン８０（商標）（ポリオキシエルチレンソルビタンモノオレアート）および／または０．２５～１．０％スパン８５（商標）（ソルビタントリオレアート）、および任意に、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルアトミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－フイドロキシホスホフォリルオキシ）エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）を含有するサブミクロン水中油乳液などの、変化する量のＭＴＰ－ＰＥを任意に含有するスクアレン／水乳液、例えば、「ＭＦ５９」として知られているサブミクロン水中油乳液である（参照として、それらの全体が本明細書に組み込まれている国際公開第９０／１４８３７号；米国特許第６，２９９，８８４号および第６，４５１，３２５号；ならびに、Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ：Ｔｈｅ Ｓｕｂｕｎｉｔ ａｎｄ Ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｏｗｅｌｌ，Ｍ．Ｆ．およびＮｅｗｍａｎ，Ｍ．Ｊ．編集）ニューヨーク所在、Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ、１９９５年、２７７－２９６頁におけるＯｔｔら、「ＭＦ５９－Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｓａｆｅ ａｎｄ Ｐｏｔｅｎｔ Ａｄｊｕｖａｎｔ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」）。ＭＦ５９は、１１０Ｙマイクロフリューダイザーモデル（マサチューセッツ州、ニュートン所在、Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）などのマイクロフリューダイザーを用いてサブミクロン粒子に製剤化された ４～５％ｗ／ｖスクアレン（例えば、４．３％）、０．２５～０．５％ｗ／ｖツウィーン８０（商標）および０．５％ｗ／ｖスパン８５（商標）、および任意に、種々の量のＭＴＰ－ＰＥを含有する。例えば、ＭＴＰ－ＰＥは、約０～５００μｇ／用量、より好ましくは０～２５０μｇ／用量、最も好ましくは０～１００μｇ／用量の量で存在できる。本明細書に用いられている用語の「ＭＦ５９－０」とは、ＭＴＰ－ＰＥを欠いた、上記のサブミクロン水中油乳液を言い、一方、用語のＭＦ－５９－ＭＴＰは、ＭＴＰ－ＰＥを含有する製剤を意味する。例えば、「ＭＦ５９－１００」は、１用量当たり、１００μのＭＴＰ－ＰＥを含有するなどである。本明細書に用いられる他のサブミクロン水中油乳液、ＭＦ６９は、４．３％ｗ／ｖスクアレン、０．２５％ｗ／ｖツウィーン８０（商標）および０．７５％ｗ／ｖスパン８５（商標）、および任意に、ＭＴＰ－ＰＥを含有する。さらに他のサブミクロン水中油乳液は、やはりサブミクロン乳液にマイクロ流動化された、１０％ｗ／ｖスクアレン、０．４％ツウィーン８０（商標）、５％プルーロニックブロックポリマー、およびｔｈｒ－ＭＤＰを含有する、ＳＡＦとしても知られているＭＦ７５である。ＭＦ７５－ＭＴＰは、１用量当たり、１００～４００μｇのＭＴＰ－ＰＥなどのＭＴＰを含むＭＦ７５製剤を意味する。

【０１９４】

該組成物に使用されるサブミクロン水中油乳液、その作製方法およびムラミルペプチド

などの免疫刺激剤は、参照として、それらの全体が本明細書に組み込まれている、国際公開第９０／１４８３７号および米国特許第６，２９９，８８４号、および第６，４５１，３２５号に、詳細に記載されている。

【０１９５】

完全フロインドアジュバント（ＣＦＡ）および不完全フロインドアジュバント（ＩＦＡ）もまた、本発明のアジュバントとして使用できる。

【０１９６】

（Ｃ．サポニン製剤）

サポニン製剤もまた、本発明のアジュバントとして使用できる。サポニンは、広範囲の植物種の樹皮、葉、幹、根そして花にも見られるステロールグリコシド類およびトリテルペノイドグリコシド類の異種グループである。Ｑｕｉｌｌａｉａ ｓａｐｏｎａｒｉａ Ｍｏｌｉｎａ ｔｒｅｅの樹皮のサポニンは、アジュバントとして広く研究されてきた。サポニンはまた、Ｓｍｉｌａｘ ｏｒｎａｔａ（サルサプリラ）、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌｌａ ｐａｎｉｃｕｌａｔａ（ブライデス膜）、およびＳａｐｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉａｎａｌｉｓ（ソープ根）から商品としても入手できる。サポニンアジュバント製剤としては、ＱＳ２１などの精製製剤、ならびに、ＩＳＣＯＭ類などの液体製剤が挙げられる。

【０１９７】

サポニン組成物は、高速薄層クロマトグラフィー（ＨＰ－ＬＣ）および逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）を用いて精製されている。これらの方法を用いて、ＱＳ７、ＱＳ１７、ＱＳ１８、ＱＳ２１、ＱＨ－Ａ、ＱＨ－ＢおよびＱＨ－Ｃなどの特定の精製画分が同定されている。サポニンは、ＱＳ２１であることが好ましい。ＱＳ２１の製造方法は、米国特許第５，０５７，５４０号に開示されている。サポニン製剤はまた、コレステロールなどのステロールを含み得る（国際公開第９６／３３７３９号を参照）。

【０１９８】

サポニンとコレステロール類との組み合わせは、免疫刺激性複合体（ＩＳＣＯＭｓ）と呼ばれる独特の粒子を形成するために使用できる。ＩＳＣＯＭｓは、典型的には、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も含む。任意の公知のサポニンが、ＩＳＣＯＭｓに使用できる。ＩＳＣＯＭは、ＱｕｉｌＡ、ＱＨＡおよびＱＨＣの１種以上を含むことが好ましい。ＩＳＣＯＭｓは、欧州特許第０１０９９４２号、国際公開第９６／１１７１１号および国際公開第９６／３３７３９号に、さらに記載されている。任意に、ＩＳＣＯＭＳは、追加の界面活性剤を欠いていてもよい。国際公開第００／０７６２１号を参照されたい。

【０１９９】

サポニンベースのアジュバントの開発に関するレビューは、Ｂａｒｒら、「ＩＳＣＯＭｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ｓａｐｏｎｉｎ ｂａｓｅｄ ａｄｊｕｖａｎｔｓ」、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ（１９９８）３２：２４７－２７１頁に見ることができる。また、Ｓｊｏｌａｎｄｅｒら、「Ｕｐｔａｋｅ ａｎｄ ａｄｊｕｖａｎｔ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｏｒａｌｌｙ ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ ｓａｐｏｎｉｎ ａｎｄ ＩＳＣＯＭ ｖａｃｃｉｎｅｓ」、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ（１９９８）３２：３２１－３３８頁も参照されたい。

【０２００】

（Ｄ．ビロゾームおよびウィルス様粒子（ＶＬＰｓ））

ビロゾームおよびウィルス様粒子（ＶＬＰｓ）もまた、本発明におけるアジュバントとして使用できる。これらの構造は任意にリン脂質と組み合わせた、またはリン脂質と共に製剤化した１種以上のタンパク質を一般に含有する。それらは一般に非病原性であり、非複製性であり、一般に天然のウィルスゲノムを含有しない。ウィルスタンパク質は組み換え製造できるか、ウィルス全体から単離できる。ビロゾーム類またはＶＬＰ類における使用に好適なこれらのウィルスタンパク質としては、インフルエンザウィルス（ＨＡまたはＮＡなど）、Ｂ型肝炎ウィルス（コアタンパク質またはカプシドタンパク質など）、Ｅ型

肝炎ウィルス、はしかウィルス、シンドビスウィルス、ロタウィルス、口蹄病ウィルス、レトロウィルス、ノーウォークウィルス、ヒトパピローマウィルス、ＨＩＶ、ＲＮＡファージ、ＱＢファージ（外殻タンパク質など）、ＧＡファージ、ｆｒファージ、ＡＰ２０５ファージ、およびＴｙ（レトロトランスポゾンＴｙタンパク質ｐ１など）に由来するタンパク質が挙げられる。ＶＬＰ類は、国際公開第０３／０２４４８０号、国際公開第０３／０２４４８１号、およびＮｉｋｕｒａら、「外来エピトープを表す経口ワクチン担体としてのキメラ組み換えＥ型肝炎ウィルス様粒子」、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（２００２）２９３：２７３－２８０頁、Ｌｅｎｚら、「Ｐａｐｉｌｌｏｍａｒｉｖｕｒｓ－Ｌｉｋｅ Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ Ｉｎｄｕｃｅ Ａｃｕｔｅ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｅｎｄｒｉｃ Ｃｅｌｌｓ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００１）５２４６－５３５５頁；Ｐｉｎｔｏら、「Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｏ Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ（ＨＰＶ）－１６Ｌ１ Ｈｅａｌｔｈｙ Ｖｏｌｕｎｔｅｅｒｓ Ｉｍｍｕｎｉｚｅｄ ｗｉｔｈ ＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔＨＰＶ－１６Ｌ１ Ｖｉｒｕｓ－Ｌｉｋｅ Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ（２００３）１８８：３２７－３３８頁；およびＧｅｒｂｅｒら、「Ｈｕｍａｎ Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｒｉｓｕ Ｖｉｒｕｓ－Ｌｉｋｅ Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ ＡｒｅＥｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｏｒａｌ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｓ ｗｈｅｎ Ｃｏａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｅｄ ｗｉｔｈ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｈｅａｔ－Ｌａｂｉｌｅ Ｅｎｔｅｒｔｏｘｉｎ ＭｕｔａｎｔＲ１９２Ｇ ｏｒ ＣｐＧ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（２００１）７５（１０）：４７５２－４７６０頁でさらに検討されている。ビロゾーム類は、例えば、Ｇｌｕｃｋら、「Ｎｅｗ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇ Ｐｌａｔｆｏｒｍｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｖａｃｃｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ」、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００２）２０：Ｂ１０－Ｂ１６でさらに検討されている。免疫増強再構成インフルエンザビロゾーム類（ＩＲＩＶ）は、鼻腔内三価ＩＮＦＬＥＸＡＬ（商標）製品｛Ｍｉｓｃｈｌｅｒ＆Ｍｅｔｃａｌｆｅ（２００２）Ｖａｃｃｉｎｅ２０ Ｓｕｐｐｌ５：Ｂ１７－２３｝およびＩＮＦＬＵＶＡＣＰＬＵＳ（商標）製品におけるサブユニット抗原送達システムとして使用されている。

【０２０１】

（Ｅ．細菌または微生物の誘導体）

本発明における使用に好適なアジュバントとしては、以下のような細菌または微生物誘導体が挙げられる。

【０２０２】

（（１）腸内細菌リポ多糖体（ＬＰＳ）の非毒性誘導体）

このような誘導体としては、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）および３－Ｏ－脱アセチル化ＭＰＬ（３ｄＭＰＬ）が挙げられる。３ｄＭＰＬは、４つ、５つまたは６つのアセチル化鎖を有する３Ｄｅ－Ｏ－アセチル化モノホスホリル脂質Ａの混合物である。３Ｄｅ－Ｏ－アセチル化モノホスホリル脂質Ａの好ましい「小型粒子」形態は、欧州特許第０６８９４５４号、欧州特許第０６８９４５４号、欧州特許第０６８９４５４号に開示されている。３ｄＭＰＬのこのような「小型粒子」は、０．２２ミクロン膜を通してろ過滅菌する上で十分小さい（欧州特許第０６８９４５４号を参照）。他の非毒性ＬＰＳ誘導体としては、リン酸アミノアルキルグルコサミド、例えばＲＣ－５２９などのモノホスホリル脂質Ａ模擬物が挙げられる。Ｊｏｈｎｓｏｎら、（１９９９）Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ Ｌｅｔｔ９：２２７３－２２７８頁を参照されたい。

【０２０３】

（（２）脂質Ａ誘導体）

脂質Ａ誘導体としては、ＯＭ－１７４などの大腸菌の脂質Ａ誘導体がが挙げられる。ＯＭ－１７４は、例えば、Ｍｅｒａｌｄｉら、「ＯＭ－１７４，ａ Ｎｅｗ Ａｄｊｕｖａｎｔ ｗｉｔｈ ａ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｕｓｅ，Ｉｎｄｕｃｅｓ ａ Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｗｉｔｈ Ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒ

ed with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei」、Vaccine（2003）21：2485-2491頁；およびPajakら、「The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo」、Vaccine（2003）21：836-842頁に記載されている。

【0204】

（（3）免疫刺激性オリゴヌクレオチド）

本発明におけるアジュバントとしての使用に好適な免疫刺激性オリゴヌクレオチドとしては、CpGモチーフ（非メチル化シトシンに続いてグアノシンを含有し、リン酸結合で結合されている配列）を含有するヌクレオチド配列が挙げられる。細菌の二本鎖RNAまたは反復性またはポリ（dG）配列を含有するオリゴヌクレオチドもまた、免疫刺激性であることが示されている。

【0205】

CpGのものとしては、ホスホロチオエート修飾体などのヌクレオチド修飾体／アナログが挙げられ、二本鎖または一本鎖であり得る。任意に、グアノシンを、2'-デオキシ-7-デアザグアノシンに置換してもよい。可能なアナログ置換の例としては、Kandimallaら、「Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern：design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agent with distinct cytokine induction profiles」、Nucleic Acids Research（2003）31（9）：2393-2400頁；国際公開第02／26757号および国際公開第99／62923号を参照されたい。CpGoligoヌクレオチドのアジュバント効果は、Krieg、「CpG motifs：the active ingredient in bacterial extracts?」、Nature Medicine（2003）9（7）：831-835頁；McCluskieら、「Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitisB surface antigen and CpGDNA」、FEMS Immunology and Medical Microbiology（2002）32：179-185頁；国際公開第98／40100号；米国特許第6，207，646号；米国特許第6，239，116号および米国特許第6，429，199号で、さらに検討されている。

【0206】

CpG配列は、モチーフGTCGTTまたはTTCGTTなどのTLR9に関するものであり得る。Kandimallaら、「Toll-like receptor9：modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs」、Biochemical Society Transactions（2003）31（part3）：654-658頁を参照されたい。CpG配列は、CpG-A ODNなどのTh1免疫応答誘導に対して特異的であり得るか、または、CpH-B ODNなどのB細胞応答の誘導に対してより特異的であり得る。CpG-AおよびCpG-B ODN類は、Blackwellら、「CpG-A-Induced Monocyte Ifn-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha」、J. Immunol.（2003）170（8）：4061-4068頁；Krieg、「From A to Z on CpG」、TRENDS in Immunology（2002）23（2）：64-65

頁および国際公開第０１／９５９３５号において検討されている。ＣｐＧは、ＣｐＧ－ＡＯＤＮであることが好ましい。

【０２０７】

ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、５’末端が受容体認識のために接近できるように構築されていることが好ましい。任意に、２つのＣｐＧオリゴヌクレオチド配列はそれらの３’末端で結合して、「イムノマー類」を形成できる。例えば、Ｋａｎｄｕｍａｌｌａら、「Ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｉｎ ＣｐＧ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｆｆｅｃｙ ｉｍｍｕｎｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ」、ＢＢＲＣ（２００３）３０６：９４８－９５３頁；Ｋａｎｄｉｍａｌｌａら、「Ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ９：ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｂｙ ｎｏｖｅｌ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ＣｐＧ ＤＮＡｓ」、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ（２００３）３１（ｐａｒｔ３）：６６４－６５８頁；Ｂｈａｇａｔら、「ＣｐＧ ｐｅｎｔａ－ａｎｄ ｈｅｘａｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ ｐｏｔｅｎｔ ｉｍｍｕｎｏｍｏｄｕｌａｔｏｒｙａｇｅｎｔｓ」ＢＢＲＣ（２００３）３００：８５３－８６１頁および国際公開第０３／０３５８３６号を参照されたい。

【０２０８】

（（４）ＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体）

上記のとおり、細菌のＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体は、本発明におけるアジュバントとして使用できる。該タンパク質は、大腸菌（すなわち、大腸菌易熱性腸毒素「ＬＴ）、コレラ（「ＣＴ」）または百日咳（「ＰＴ」）由来であることが好ましい。解毒ＡＤＰ－リボシル化毒素の使用は、粘膜アジュバントとしては、国際公開第９５／１７２１１号に、また、非経口アジュバントとしては、国際公開第９８／４２３７５号に記載されている。該アジュバントは、ＬＴ－Ｋ６３、ＬＴ－Ｒ７２、およびＬＴＲ１９２Ｇなどの解毒ＬＴ変異体であることが好ましい。ＡＤＰ－リボシル化毒素およびそれらの解毒誘導体、特に、ＬＴ－Ｋ６３およびＬＴ－Ｒ７２のアジュバントとしての使用は、各々が参照として、それらの全体が本明細書に具体的に組み込まれている以下の文献において見ることができる：Ｂｅｉｇｎｏｎら、「Ｔｈｅ ＬＴＲ７２ Ｍｕｔａｎｔ ｏｆ Ｈｅａｔ－Ｌａｂｉｌｅ Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｎ ｏｆ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｅｎｈａｎｃｅｓ ｔｈｅ Ａｂｉｌｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ｔｏ Ｅｌｉｃｉｔ ＣＤ４＋ＴＣｅｌｌｓ ａｎｄ Ｓｅｃｒｅｔｅ Ｇａｍｍａ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ａｆｔｅｒ Ｃｏａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｎｔｏ Ｂａｒｅ Ｓｋｉｎ」、Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２００２）７０（６）：３０１２－３０１９頁；Ｐｉｚｚａら、「Ｍｕｃｏｓａｌ ｖａｃｃｉｎｅｓ：ｎｏｎｔｏｘｉｃ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ ＬＴ ａｎｄ ＣＴ ａｓ ｍｕｃｏｓａｌ ａｄｊｕｖａｎｔｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２５３４－２５４１頁；Ｐｉｚｚａら、「ＬＴＫ６３ ａｎｄ ＬＴＲ７２，ｔｗｏ ｍｕｃｏｓａｌ ａｄｊｕｖａｎｔｓ ｒｅａｄｙ ｆｏｒ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ」Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（２０００）２９０（４－５）：４５５－４６１頁；Ｓｃｈａｒｔｏｎ－Ｋｅｒｓｔｅｎら、「Ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ ＡＤＰ－Ｒｉｂｏｓｙｌａｔｉｎｇ Ｅｘｏｔｏｘｉｎｓ，Ｓｕｂｕｎｉｔｓ，ａｎｄ Ｕｎｒｅｌａｔｅｄ Ａｄｊｕｖａｎｔｓ」、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２０００）６８（９）：５３０６－５３１３；Ｒｙａｎら、「Ｍｕｔａｎｔｓ ｏｆ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｈｅａｔ－Ｌａｂｉｌｅ Ｔｏｘｉｎ Ａｃｔ ａｓ Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ Ｍｕｃｏｓａｌ Ａｄｊｕｖａｎｔｓ ｆｏｒ Ｎａｓａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ａｎ Ａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ Ｖａｃｃｉｎｅ：Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｏｎｔｏｘｉｃ ＡＢ Ｃｏｍｐｌｅｘ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｎ Ｔｈ１ ａｎｄ Ｔｈ２ Ｃｅｌｌｓ」Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９９）６７（１２）：６２７０－６

２８０頁；Ｐａｒｔｉｄｏｓら、「Ｈｅａｔ－Ｌａｂｉｌｅ ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｎ ｏｆ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ａｎｄ ｉｔｓ ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｎｔ ＬＴＫ６３ ｅｎｈａｎｃｅ ｔｈｅ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ａｎｄ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ－ｃｅｌｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｏ ｉｎｔｒａｎａｓａｌｌｙ ｃｏ－ｉｍｍｕｎｉｚｅｄ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｐｅｐｔｉｄｅｓ」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．（１９９９）６７（３）：２０９－２１６頁；Ｐｅｐｐｏｌｏｎｉら、「Ｍｕｔａｎｔｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｈｅａｔ－ｌａｂｉｌｅ ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｎ ａｓ ｓａｆｅ ａｎｄ ｓｔｒｏｎｇ ａｄｊｕｖａｎｔｓ ｆｏｒ ｉｎｔｒａｎａｓａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｖａｃｃｉｎｅｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅｓ（２００３）２（２）：２８５－２９３頁；およびＰｉｎｅら、（２００２）「Ｉｎｔｒａｎａｓａｌ ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｖａｃｃｉｎｅ ａｎｄ ａ ｄｅｔｏｘｉｆｉｅｄ ｍｕｔａｎｔ ｏｆ ｈｅａｔ ｌａｂｉｌｅ ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｎ ｆｒｏｍ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（ＬＴＫ６３）」Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ（２００２）８５（１－３）：２６３－２７０。アミノ酸置換に関する数値基準は、参照として、その全体が本明細書に具体的に組み込まれているＤｏｍｅｎｉｇｈｉｎｉら、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（１９９５）１５（６）：１１６５－１１６７頁に記載されているＡＤＰ－リボシル化毒素のＡおよびＢサブユニットの整列に基づくことが好ましい。

【０２０９】

（Ｆ．生体接着剤および粘膜接着剤）

生体接着剤および粘膜接着剤もまた、本明細書におけるアジュバントとして使用できる。好適な生体接着剤としては、エステル化ヒアルロン酸ミクロスフェア類（Ｓｉｎｇｈら（２００１）Ｊ．Ｃｏｎｔｌ．Ｒｅｌｅ７０：２６７－２７６頁）またはポリ（アクリル酸）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類およびカルボキシメチルセルロースの架橋誘導体などの粘膜接着剤が挙げられる。キトサンおよびその誘導体もまた、本発明におけるアジュバントとしても使用できる。例えば、国際公開第９９／２７９６０号。

【０２１０】

（Ｇ．微粒子）

微粒子もまた、本明細書におけるアジュバントとして使用できる。ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）を有する生分解性かつ非毒性（例えば、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアンヒドリド、ポリカプロラクトンなど）である材料から形成された微粒子（すなわち、直径が約１００ｎｍから約１５０μｍ、より好ましくは直径が約２００ｎｍから約３０μｍ、最も好ましくは直径が約５００ｎｍから約１０μｍ）が好ましく、負に荷電した表面（例えば、ＳＤＳによる）または正に荷電した表面（例えば、ＣＴＡＢなどのカチオン性界面活性剤による）を有するように任意に処理される。

【０２１１】

（Ｈ．リポソーム類）

アジュバントとしての使用に好適なリポソーム製剤の例は、米国特許第６，０９０，４０６号、米国特許第５，９１６，５８８号、および欧州特許出願第０　６２６　１６９号に記載されている。

【０２１２】

（Ｉ．ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル製剤）

本発明の使用に好適なアジュバントとしては、ポリオキシエチレンエーテル類およびポリオキシエチレンエステル類が挙げられる。国際公開第９９／５２５４９号。このような製剤としては、さらにオクトキシノールと組み合せたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（国際公開第０１／２１２０７号）ならびにオクトキシノールなどの少なくとも１種のさらなる非イオン性界面活性剤と組み合せたポリオキシエチレンアルキルエーテル類またはエステル界面活性剤（国際公開第０１／２１１５２号）が挙げられる。

【０２１３】
好ましいポリオキシエチレンエーテル類は、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン－９－ラウリルエーテル（ラウルエテ－９）、ポリオキシエチレン－９－ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン－８－ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン－４－ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン－３５－ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン－２３－ラウリルエーテル。
【０２１４】
（Ｊ．ポリホスファゼン（ＰＣＰＰ））
ＰＣＰＰ製剤は、例えば、Ａｎｄｒｉａｎｏｖら、「Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｙｄｒｏｇｅｌ ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ ｂｙ ｃｏａｃｅｒｖａｔｉｏｎ ｏｆ ａｑｕｅｏｕｓ ｐｏｌｙｐｈｏｐｈａｚｅｎｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ」、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ（１９９８）１９（１－３）：１０９－１１５頁およびＰａｙｎｅら、「Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｌｅａｓｅ ｆｒｏｍ ｐｏｌｙｐｈｏｓｐｈａｚｅｎｅ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ」、Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗ（１９９８）３１（３）：１８５－１９６頁に記載されている。
【０２１５】
（Ｋ．ムラミルペプチド類）
本発明におけるアジュバントとしての使用に好適なムラミルペプチド類の例としては、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニル－ｄ－イソグルタミン（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、およびＮ－アセチルムラミル－ｌ－アラニル－ｄ－イソグルタミニル－ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミンＭＴＰ－ＰＥ）が挙げられる。
【０２１６】
（Ｌ．イミダゾキノロン化合物）
本発明におけるアジュバントとしての使用に好適なイミダゾキノロン化合物の例としては、Ｓｔａｎｌｅｙ、「Ｉｍｉｑｕｉｍｏｄ ａｎｄ ｔｈｅ ｉｍｉｄａｚｏｑｕｉｎｏｌｏｎｅｓ：ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ」Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｄｅｒｍａｔｏｌ（２００２）２７（７）：５７１－５７７頁およびＪｏｎｅｓ、「Ｒｅｓｉｑｕｉｍｏｄ ３Ｍ」、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ Ｄｒｕｇｓ（２００３）４（２）：２１４－２１８頁にさらに記載されたイミカモドおよびその同族体が挙げられる。
【０２１７】
本発明はまた、上記に同定された１種以上のアジュバント態様の組合せを含み得る。例えば、以下のアジュバント組成物を、本発明に使用できる：
（１） サポニンと水中油乳濁液（国際公開第９９／１１２４１号）；
（２） サポニン（例えば、ＱＳ２１）＋非毒性ＬＰＳ誘導体（例えば、３ｄＭＰＬ）（国際公開第９４／００１５３号を参照）；
（３） サポニン（例えば、ＱＳ２１）＋非毒性ＬＰＳ誘導体（例えば、３ｄＭＰＬ）＋コレステロール；
（４） サポニン（例えば、ＱＳ２１）＋３ｄＭＰＬ＋ＩＬ－１２（任意に＋ステロール）（国際公開第９８／５７６５９号）；
（５） ２ｄＭＰＬと、例えば、ＱＳ２１および／または水中油乳濁液との組合せ（欧州特許出願公開第０８３５３１８号、欧州特許出願公開第０７３５８９８号および欧州特許出願公開第０７６１２３１号を参照）；
（６） より大きな粒径乳濁液を生成するためにサブミクロン乳濁液にマイクロ流動化されたか、または渦巻かせた、１０％スクワレン、０．４％ツウィーン８０、５％プルロニック－ブロックポリマーＬ１２１、およびｔｈｒ－ＭＤＰを含有するＳＡＦ；
（７） ２％スクワレン、０．２％ツウィーン８０、およびモノホスホリリピドＡ（ＭＰＬ）、トレハロースジミコレート（ＴＤＭ）、および細胞壁骨格（ＣＷＳ）好ましくはＭ

ＰＬ＋ＣＷＳ（Ｄｅｔｏｘ（商標））よりなる群から１種以上の細胞壁成分を含有するＲｉｂｉ（商標）アジュバントシステム（ＲＡＳ）（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ）；
（８）　１種以上の無機塩（アルミニウム塩など）＋ＬＰＳの非毒性誘導体（３ｄＰＭＬなど）；および／または
（９）　１種以上の無機塩（アルミニウム塩など）＋免疫刺激性オリゴヌクレオチド（ＣｐＧモチーフを含むヌクレオチド配列など）。

【０２１８】

（Ｍ．ヒト免疫調節剤）

本発明におけるアジュバントとしての使用に好適なヒト免疫調節剤としては、インターロイキン類（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１２など）などのサイトカイン類、インターフェロン類（例えば、インターフェロン－γ）、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子が挙げられる。

【０２１９】

アルミニウム塩類とＭＦ５９は、注射用インフルエンザワクチン類との使用に好ましいアジュバントである。細菌毒および生体接着剤は、鼻用ワクチンなどの粘膜送達ワクチンとの使用に好ましいアジュバントである。

【０２２０】

本発明の組成物は、明礬および／またはＣｐＧ配列と共に投与される。

【０２２１】

（製剤）

本発明の組成物は、種々の形態で調製できる。例えば、該組成物は、液体溶液などの注射剤として調製できる。注射前の液体媒体中の溶液または懸濁液に好適な固形形態もまた調製できる（例えば、凍結乾燥組成物）。該組成物は、例えば、軟膏、クリームまたは粉剤として局所投与用に調製できる。該組成物は、例えば、錠剤またはカプセル剤、スプレー剤、またはシロップ剤（任意に風味付けされた）として経口投与用に調製できる。該組成物は、例えば、微粉末またはスプレーを用いて吸入剤として肺投与用に調製できる。該組成物は、座薬またはペッサリーとして調製できる。該組成物は、例えばドロップ剤として、鼻投与、耳投与または眼投与用に調製できる。該組成物は、組合せ組成物が、患者への投与直前に再構成されるようにデザインされたキット形態であり得る。このようなキットには、液体形態で１種以上の抗原および１種以上の凍結乾燥抗原を含んでなり得る。

【０２２２】

本発明の組成物は、免疫原性組成物であることが好ましく、ワクチン組成物であることがさらに好ましい。該組成物のｐＨは、６と８との間が好ましく、約７であることが好ましい。ｐＨは、緩衝液の使用により維持できる。該組成物は、無菌および／または発熱物質の無い状態であり得る。該組成物は、ヒトに関して等張であり得る。

【０２２３】

ｂＡＲＥ組成物は、１種以上の抗原を含んでなることが好ましい。

【０２２４】

「抗原」とは、個体における免疫応答を誘発できる何らかの試剤、一般には高分子を称す。この用語は、個体の高分子または抗原性高分子の均一あるいは不均一な集団を称するために用いることができる。本明細書に用いられる用語の「抗原」とは、一般に１種以上のエピトープを含んでなる蛋白分子またはその一部を称するために用いることができる。本発明の目的のために、抗原は、任意の公知のウィルス、細菌、寄生虫または真菌病原体から得られるか、または誘導できる。またこの用語は、任意の種々の腫瘍特異的抗原および自己免疫疾患と関連する抗原を意図している。

【０２２５】

さらに、本発明の目的のための「抗原」としては、タンパク質が十分な免疫原性を維持する限り、天然の配列に対する削除、付加および置換（一般に性質は保存）などの修飾を有するタンパク質が挙げられる。これらの修飾は、例えば、部位特異的突然変異などによる計画的なものであり得るか、または抗原を産生する宿主の突然変異などによる偶発的な

ものであり得る。

【０２２６】

本発明の種々の態様において、抗原は、１種以上のＴ細胞エピトープを含有する。「Ｔ細胞エピトープ」は、一般にＴ細胞応答を誘導することができるペプチド構造の特徴を称す。この点において、Ｔ細胞エピトープは、ＭＨＣ分子のペプチド結合間隙内でコンフォメーションを拡張すると思われる線状ペプチド決定群を含んでなることが当業界に受け入られている（Ｕｎａｎｕｅら、（１９８７）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３６：５５１－５５７頁）。本明細書に用いられるＴ細胞エピトープは、一般に少なくとも３～５つのアミノ酸残基、好ましくは少なくとも５～１０またはそれ以上のアミノ酸残基を有するペプチドである。細胞媒介免疫応答を刺激するための特定抗原の能力は、リンパ球増殖（リンパ球活性）アッセイ、ＣＴＬ細胞毒細胞アッセイ、または感作された対象における抗原特異性Ｔリンパ球に関するアッセイによるなど、多くの周知のアッセイにより決定できる。例えば、Ｅｒｉｃｋｓｏｎら（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：４１８９－４１９９頁；およびＤｏｅら（１９９４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２３６９－２３７６頁を参照されたい。

【０２２７】

本発明の他の態様において、抗原は、１種以上のＢ細胞エピトープを含有する。「Ｂ細胞エピトープ」とは、特異的抗体分子が結合する抗原上の部位を一般に称す。抗体応答を誘発できるエピトープ類の決定は、当業界に周知の技法を用いて容易に達成される。例えば、Ｇｅｙｓｅｎら（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１ ３９９８－４００２頁（所与の抗原における免疫原性エピトープ類の位置を決定するためにペプチド類を迅速に合成する一般法）；米国特許第４，７０８，８７１号（抗原のエピトープ類を同定し、化学的に合成する方法）；およびＧｅｙｓｅｎら（１９８６）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２３：７０９－７１５頁（所与の抗体に対して高親和力を有するペプチド類を同定する技術）を参照されたい。

【０２２８】

対象となる抗原は、ウィルス、細菌または寄生虫病原体などの病原体と関連することが好ましく、または該抗原は腫瘍特異的抗原であり得る。抗原は、完全長タンパク質であり得る。あるいは、抗原は、本質的に抗原のＢ細胞エピトープまたはＴ細胞エピトープだけからなり得る。

【０２２９】

腫瘍特異的抗原としては、限定はしないが、ＭＡＧＥ１、ＭＡＧＥ２、ＭＡＧＥ３（ＨＬＡ－Ａ１ペプチド）、ＭＡＧＥ４など任意の種々のＭＡＧＥ類（メラノーマ関連抗原Ｅ）；任意の種々のチロシナーゼ類（ＨＬＡ－Ａ２ペプチド）；変異体ｒａｓ；変異体ｐ５３；およびｐ９７黒色腫抗原が挙げられる。他の腫瘍特異的抗原としては、進行癌と関連するＲａｓペプチドおよびｐ５３ペプチド、子宮頚癌と関連するＨＰＶ１６／１８およびＥ６／Ｅ７抗原、大腸癌と関連するＣＥＡ（癌胎児性抗原）、黒色腫と関連するｇｐ１００またはＭＡＲＴ１抗原、および前立腺癌と関連するＰＳＡ抗原が挙げられる。ｐ５３遺伝子配列は、公知であり（例えば、Ｈａｒｒｉｓら（１９８６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：４６５０－４６５６頁を参照）、登録番号Ｍ１４６９４でＧｅｎＢａｎｋに寄託されている。

【０２３０】

好適なウィルス抗原としては、限定はしないが、インフルエンザファミリーのウィルス（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｌｕ．ｌａｎｌ．ｇｏｖ／ｒｅｖｉｅｗ／ａｎｎｕａｌ．ｔｈｍｌにおけるインフルエンザ配列のデータベースを参照）から、Ａ型肝炎ウィルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウィルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウィルス（ＨＣＶ）、デルタ型肝炎ウィルス（ＨＤＶ）、Ｅ型肝炎ウィルス（ＨＥＶ）およびＧ型肝炎ウィルス（ＨＧＶ）などの肝炎ファミリーのウィルスからの抗原をコードするポリヌクレオチド配列が挙げられる。例として、ＨＢＶのウィルスゲノム配列が公知であり、それから抗原コード配列を得る方法も公知である。例えば、Ｇａｎｅｍら（１９８７）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏ

ｃｈｅｍ．５６：６５１－６９３頁；Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ，Ｆ．Ｂ．（１９９０）Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒｕｓ、ＩＩ巻、２１７１２３５頁、Ｆｉｅｌｄｓら（編集者）、Ｖｉｒｏｌｏｇｖ、第２版、Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州ニューヨーク所在；およびＶａｌｅｎｚｕｅｌａら（１９８０）、Ｔｈｅ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒａｌ Ｇｅｎｏｍｅ ａｎｄ ｔｈｅ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｍａｊｏｒ Ｖｉｒａｌ Ｇｅｎｅｓ、５７－７０頁、Ｆｉｅｌｄｓら（編集）、Ａｎｉｍａｌ Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、ニューヨーク州ニューヨーク所在のＡｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）、を参照されたい。ＨＢＶゲノムは、大型、中型および主要な表面抗原ポリペプチド類、Ｘ－遺伝子ポリペプチド、およびコアポリペプチドなどの数種のウィルスタンパク質をコードする。例えば、Ｙｏｋｏｓｕｋａら（１９８６）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３１５：１１８７－１１９２頁；Ｉｍａｚｅｋｉら（１９８７）Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：７５３－７５７頁；Ｋａｎｅｋｏら（１９８８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６２：３９７９－３９８４頁；およびＯｕら（１９９０）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：４５７８－４５８１頁、を参照されたい。同様の様式おいて、ＨＣＶのウィルスゲノム配列は公知であり、配列を得る方法も公知である。例えば、国際公開第８９／０４６６９号；国際公開第９０／１１０８９号；および国際公開第９０／１４４３６号、を参照されたい。ＨＣＶゲノムは、Ｅ１およびＥ２などの数種のウィルスタンパク質をコードする。例えば、Ｈｏｕｇｈｔｏｎら（１９９１）Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ１４：３８１－３８８頁を参照されたい。これらのＨＢＶおよびＨＣＶタンパク質ならびにそれらの抗原性断片をコードする配列が、該方法の使用により見出される。同様に、ＨＤＶの８－抗原に対するコード配列が公知である（例えば、米国特許第５，３７８，８１４号を参照）。

【０２３１】

同様の様式において、ＨＳＶ－１およびＨＤＶ－２糖タンパク質ｇＢ、ｇＤならびにｇＨなどの単純ヘルペスウィルス（ＨＳＶ）タイプ１および２に由来する抗原；水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）およびＣＭＶ ｇＢおよびｇＨなどのサイトメガロウィルス（ＣＭＶ）の抗原；およびＨＨＶ６およびＨＨＶ７などの他のヒトヘルペスウィルス類の抗原などヘルペスウィルスファミリーの多種多様のタンパク質抗原をコードする配列を、本発明において用いることができる。（例えば、Ｃｈｅｅら（１９９０）を参照）。サイトメガロウィルス（Ｊ．Ｋ．ＭｃＤｏｕｇａｌｌ編集、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、１２５１６９頁；ＭｃＧｅｏｃｈら（１９８８）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６９：１５３１－１５７４頁；米国特許第５，１７１，５６８号；Ｂａｅｒら（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ３１０：２０７－２１１頁；およびＤａｖｉｓｏｎら（１９８６）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６７：１７５９－１８１６頁）多数のＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２単離体に関するｇｐ１２０などのＨＩＶ抗原はＨＩＶの種々の遺伝子サブタイプのメンバーを含めて公知であって報告されており（例えば、Ｍｙｅｒｓら、Ｌｏｓ Ａｌａｍｏｓ Ｄａｔａｂａｓｅ、ニューメキシコ州ロスアラモス所在のＬｏｓ Ａｌａｍｏｓ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、（１９９２）；およびＭｏｄｒｏｗら（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：５７０－５７８頁を参照）、これら任意の単離体に由来する抗原は、本法に用いられる。

【０２３２】

さらに、本発明は、任意の種々のエンベロープのプロレオウィルス科；ビルナウィルス科；ラボドウィルス科（例えば、狂犬病ウィルスなど）；フィロウィルス科；パラミキソウィルス科（例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウィルス、呼吸器合胞体ウイルスなど）；ブニアウィルス科；アレナウィルス科；レトロウィルス科（例えば、限定はしないが、単離体ＨＩＶ，，ＨＩＶ、ＨＩＶｖ、ＨＩＶ、ＨＩＶ－からの抗原を含む、ＨＴＬＶ－Ｉ；ＨＴＬＶ－１１；ＨＩＶ－１（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、ＡＲＶ、ｈＴＬＲなどとしても知られている））；その他の中でもＨＩＶ－１，，ＨＩＶ、ＨＩＶ－２など、任意の種々のＨＩＶ単離体に由来する他の免疫原性部分に等しく適用できる。これらおよび他のウィルスの記載に関しては、例えば、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、第３版（Ｗ．Ｋ．Ｊｏｋｌ

ｉｋ編集１９８８年）；Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、第２版（Ｂ．Ｎ．ＦｉｅｌｄｓおよびＤ．Ｍ．Ｋｎｉｐｅ編集１９９１年）を参照されたい。

【０２３３】

好適な細菌抗原および寄生虫抗原をコードする配列は、ジフテリア、百日咳、破傷風、結核、細菌性または真菌性肺炎、コレラ、腸チフス、ペスト、細菌性赤痢またはサルモネラ症、レジオネラ病、ライム病、ハンセン病、マラリア、鉤虫、回旋糸状虫症、住血吸虫症、トリパマソーマ症、レスマニア症（Ｌｅｓｍａｎｉａｓｉｓ）、ジアルジア虫症、アメーバ症、糸状虫症、ボレリア（Ｂｏｒｅｌｉａ）、および旋毛虫症などの疾患を招く公知の原因物質から得られるか、または誘導される。なおさらなる抗原は、クールー、クロイツフェルト－ヤコプ病（ＣＪＤ）、スクラピー、伝染性ミンク脳症、および慢性消耗症の原因物質などの非通常性ウィルスまたはウィルス様物質、または狂牛病に関連するプリオンなどのタンパク質様感染性粒子から得られるか、または誘導できる。

【０２３４】

最小のプロモーターの配列および対象となるコード配列の双方が、公知の方法を用いて得られるか、および／または調製することができる。例えば、実質的に純粋な抗原調製を、標準的な分子生物学的手段を用いて得ることができる。すなわち、上記抗原をコードするポリヌクレオチド配列を、その遺伝子を発現する細胞からのｃＤＮＡおよびゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、またはその遺伝子を含むことが知られているベクターからの誘導によるなど、組換え法を用いて得ることができる。さらに、所望の遺伝子またはプロモーター配列は、フェノール抽出およびｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡのＰＣＲなどの標準技法を用いて、前記のものを含有する細胞および組織から直接単離できる。例えば、ＤＮＡを単離して得るために使用される技法の記載に関しては上記のＳａｍｂｒｏｏｋらを参照されたい。ポリヌクレオチド配列はまた、クローン化ではなくて合成的にも生成できる。

【０２３５】

特定の核酸分子を単離するためのさらなる他の従来法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によるものである。Ｍｕｌｌｉｓら（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５５：３３５－３５０頁。この技法は、ＤＮＡの所望の領域を複製するために、ＤＮＡポリメラーゼ、通常耐熱性のＤＮＡポリメラーゼを用いる。複製されるＤＮＡの領域は、複製反応をプライムするための所望のＤＮＡの反対端および反対鎖に相補的な特定の配列のオリゴヌクレオチド類により同定される。第１ラウンドの複製生成物は、それ自体引き続く複製のテンプレートであり、したがって複製の反復連続サイクルにより、使用されるプライマー対により区切られるＤＮＡ断片の幾何増幅がもたらされる。

【０２３６】

組成物中の抗原は、各々少なくとも１μｇの濃度で典型的に存在する。一般に、任意の所与の濃度は、前記抗原に対する免疫応答を誘発するのに十分な濃度である。本発明の組成物中のタンパク質抗原を用いる代替法として、抗原をコードする核酸を使用できる：Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ＆ Ｔｏｒｒｅｓ（１９９７）Ｓｅｍｉｎａｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ９：２７１－２８３頁；Ｄｏｎｎｅｌｌｙら（１９９７）Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５：６１７－６４８頁；Ｓｃｏｔｔ－Ｔａｙｌｏｒ ＆ Ｄａｌｇｌｅｉｓｈ（２０００）Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ Ｄｒｕｇ ９：４７１－４８０頁；Ａｐｏｓｔｏｌｏｐｏｕｌｏｓ ＆ Ｐｌｅｂａｎｓｋｉ（２０００）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２：４４１－４４７頁；Ｉｌａｎ（１９９９）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １：１１６－１２０頁；Ｄｕｂｅｎｓｋｙら（２０００）Ｍｏｌ Ｍｅｄ ６：７２３－７３２頁；Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ＆ Ｐｅｒｔｍｅｒ（２０００）Ａｄｖ Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ ５５：１－７４頁；Ｄｏｎｎｅｌｌｙら（２０００）Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ１６２（４Ｐｔ２）：Ｓ１９０－１９３頁およびＤａｖｉｓ（１９９９）Ｍｔ．Ｓｉｎａｉ Ｊ．Ｍｅｄ．６６：８４－９０頁。したがって、本発明の組成物のタンパク質成分は、タンパク質をコードする核酸（例えば、プラスミドの形態で好ましくはＤＮＡ）により置換できる。

【０２３７】
本発明の組成物は、対象となるポリペプチドの組み込み前に、安定化剤と緩衝剤ならびに任意の他の賦形剤を予め混合することにより調製することが好ましい。本発明の組成物をさらに安定化するために加え得る追加賦形剤はいずれも、第１の安定化剤、すなわち本明細書に開示されている新規な組成物を得るために使用される緩衝剤、すなわち実質的にその塩形体ではない酸、酸の塩形体、または酸とその塩形体の混合物と組合せて、アミノ酸塩基の安定化効果に悪影響を与えてはならない。対象となるポリペプチドの凝集体形成の減少を達成するための好ましい量のアミノ酸塩基の添加後、液体組成物のｐＨは、緩衝剤を用いて、好ましくは本明細書に開示された範囲、より好ましくは対象となるポリペプチドに最適なｐＨに調整される。対象となるポリペプチドの添加後、ｐＨは、組成物中で調製できるが、このポリペプチドの添加前に調整されることが好ましく、これによりポリペプチド変性の危険性を減じることができる。

【０２３８】
したがって、構成成分に適した混合を達成するために、適切な機械装置が用いられる。

【０２３９】
本発明のｂＡＲＥ組成物は、液体組成物とその乾燥形態を包含する。本発明の目的で、製薬組成物または製剤に関する用語の「液体」とは、用語の「水系」を含むことが意図され、凍結している液体製剤を含む。「乾燥形態」とは、液体、製薬組成物または製剤が、冷凍乾燥（すなわち、凍結乾燥；例えば、ＷｉｌｌｉａｍｓおよびＰｏｌｌｉ（１９８４）Ｊ．Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．３８：４８－５９頁を参照）、Ｓｐｒａｙ－Ｄｒｙｉｎｇ Ｈａｎｄｂｏｏｋ（第５版；Ｌｏｎｇｍａｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ、英国Ｅｓｓｅｚ）、４９１－６７６頁；Ｂｒｏａｄｈｅａｄら（１９９２）Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌ．Ｉｎｄ．Ｐｈａｒｍ．１８：１１６９－１２０６頁）；およびＭｕｍｅｎｔｈａｌｅｒら（１９９４）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１１：１２－２０頁を参照）におけるスプレー乾燥（Ｍａｓｔｅｒｓ（１９９１）、または風乾（ＣａｒｐｅｎｔｅｒおよびＣｒｏｗｅ（１９８８）Ｃｒｙｏｂｉｏｌｏｇｙ ２５：４５９－４７０頁；およびＲｏｓｅｒ（１９９１）Ｂｉｏｐｈａｒｍ．４：４７－５３頁）により乾燥されていることを意図している。

【０２４０】
「水性」とは、水を含有するか、水中に溶解させて調製された組成物を意図しており、水が混合物中の主要物質である混合物を含む。主要物質は、混合物の他の成分よりも大量に存在する。「非水」とは、水以外の物質または水が混合物中の主要物質ではない混合物を含有するか、溶解させて調製された組成物を意図している。「溶液」とは、固体、液体、気体またはそれらの間の組合せであり得る２種以上の物質の均一な調製物を意図している。

【０２４１】
ｂＡＲＥタンパク質製剤に関して用語の「凍結乾燥する」とは、各々がその中に本発明の１単位用量のｂＡＲＥタンパク質製剤を含有する複数のバイアルの、減圧下での迅速な冷凍乾燥を言うことが意図されている。上記の凍結乾燥を実施する凍結乾燥機は、商品として入手でき、当業者により容易に操作できる。本発明の一実施形態において、液体組成物は、凍結乾燥組成物として調製される。

【０２４２】
本発明のｂＡＲＥタンパク質組成物は、「安定化された」組成物である。「安定化された」とは、組成物が貯蔵中、実質的にその多量体状態にｂＡＲＥポリペプチドを保持していることを意図されており、それ故、このｂＡＲＥポリペプチドの治療的有効性は、凝集物形成またはサブユニット形態への解離により損なわれない。「貯蔵中」とは、調製された組成物または製剤が、直ちに対象に投与されないことを意図している。むしろ、調製後、それは、液体形態で、凍結状態で、または後で液体形態への再構成のために乾燥形態で、あるいは対象への投与に好適な他の形態での貯蔵のために包装される。本発明の組成物は、製剤が静菌剤と適合するならば、液体形態での貯蔵安定性を有する利便性、再構成せ

ずに投与する容易性、予め充填されたシリンジの即時使用または複数投与用製剤としての製剤を供給できる能力を十分に利用するために、液体形態で直接貯蔵することが好ましい。本発明の安定化されたｂＡＲＥ組成物は、２～８℃で貯蔵された場合、好ましくは少なくとも約６ヵ月、１２ヵ月、１８ヵ月、より好ましくは少なくとも約２０ヵ月、さらにより好ましくは少なくとも約２２ヵ月、最も好ましくは少なくとも約２４ヵ月の貯蔵期限を有する。

【０２４３】

ｂＡＲＥタンパク質を含んでなる安定化組成物は、１単位用量で製剤化されていてもよく、また溶液のような注射剤形態または輸液形態であってもよい。さらに、それは、凍結貯蔵できるか、または経口もしくは非経口の投与経路を含む任意の種々の方法により投与前に、液体溶液に再構成できる凍結乾燥粉剤などの乾燥形態で調製できる。

【０２４４】

それは、下記に概説された本発明の方法によって達成された貯蔵安定性の増加を利用するために液体形態で貯蔵されるのが好ましい。安定化された組成物は、膜ろ過により滅菌されることが好ましく、密封バイアルまたはアンプルなどの単位用量または複数用量の容器内で貯蔵される。一般に当業界に公知の組成物を製剤化するさらなる方法は、本発明の方法に開示された好ましい安定化剤および緩衝剤の有益な効果に悪影響を与えないという条件で、本明細書に開示された液体組成物の貯蔵安定性をさらに高めるために使用できる。製薬的に許容できる担体、安定化剤などの製剤化と選択についての十分な検討は、本明細書に参照として組み込まれているＲｅｍｉｎｇｔｏｎ‘ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９０）（第１８版、ペンシルバニア州イートン所在のＭａｃｋ　Ｐｕｂ．社、）に見ることができる。

【０２４５】

本発明の組成物は、典型的に上述の組成物に加えて、例えば、それ自体が組成物を投与される個体に有害な抗体産生を誘導しない任意の担体など、１種以上の「製薬的または免疫学的に許容できる担体」を含んでなる。好適な担体は、典型的にはタンパク質類、多糖類、ポリアクチン酸類、ポリグリコール酸類、高分子アミノ酸類、アミノ酸コポリマー類、および脂質凝集体（油滴またはリポソーム類など）などの大型で徐々に代謝される高分子である。このような担体は、通常の当業者に周知である。該組成物には、水、生理食塩水、グリセロールなどの希釈剤を含有することもできる。さらに、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝化物質などの補助物質が存在し得る。製薬的に許容できる賦形剤についての十分な検討は、Ｇｅｎｎａｒｏ（２０００）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ第２０版、ＩＳＢＮ：０６８３３０６４７２を利用できる。

【０２４６】

本発明のｂＡＲＥタンパク質は、製薬組成物または免疫治療組成物またはワクチン組成物に製剤化できる。このような製剤は、滅菌水または滅菌等張生理食塩水などの製薬的に許容できる担体と組み合わせたｂＡＲＥタンパク質などの生体分子を含んでなる。このような製剤は、ボーラス投与または連続投与に好適な形態で調製、包装または販売できる。注射液製剤は、保存剤を含有するアンプル内または複数用量容器内など、単位用量形態で調製、包装または販売できる。製剤としては、限定はしないが、懸濁液剤、液剤、油または水媒体中の乳液剤、ペースト剤、および移植可能な徐放性製剤または生分解性製剤が挙げられる。このような製剤はさらに、限定はしないが、懸濁剤、安定化剤、または分散剤などの１種以上の追加成分を含んでなり得る。非経口投与用製剤の一実施形態において、有効成分は、再構成組成物の非経口投与前に好適な媒体（例えば、無菌発熱物質のない水）との再構成のために乾燥（例えば、粉剤または顆粒剤）形態で提供される。製薬組成物は、滅菌水性注射液または油性懸濁液または溶液の形態で調製、包装または販売できる。この懸濁液または溶液は、公知の技術に従って製剤化でき、有効成分に加えて、本明細書に記載された分散剤、湿潤剤、または懸濁剤などの追加成分を含んでなり得る。このような滅菌注射液製剤は、例えば、水または１，３－ブタンジオールなどの非毒性の非経口的

に許容できる希釈剤または溶媒を用いて調製できる。他の許容できる希釈剤または溶媒としては、限定はしないが、リンゲル液、等張塩化ナトリウム液、合成モノ－またはジ－グリセリド類などの不揮発性油が挙げられる。有用な他の非経口的投与可能な製剤としては、微結晶形態で、リポソーム製剤中、または生分解性ポリマー系の成分として有効成分を含んでなるものが挙げられる。徐放性または移植用組成物は、乳液、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、または難溶性塩などの製薬的に許容できるポリマーまたは疎水性材料を含んでなり得る。

【０２４７】

（投与）

本発明の組成物は、一般に患者に直接投与される。直接送達は、非経口的注射（例えば、皮下、腹腔内、静脈内、または組織の間質空間に）により、あるいは直腸、経口（例えば、錠剤、スプレー）、膣、局所、経皮（例えば、国際公開第９９／２７９６１号を参照）または経皮的（例えば、国際公開第０２／０７４２４４号および国際公開第０２／０６４１６２号）鼻腔内（例えば、国際公開第０３／０２８７６０号を参照）眼球、耳、肺または他の粘膜投与により達成できる。本発明は、全身および／または粘膜免疫性を誘発するために使用できる。

【０２４８】

本発明の組成物は、種々の異なる経路を経て単独または組成物の一部として投与できる。ある一定の組成物にとって、ある一定の経路は、より有効な免疫応答、好ましくは細胞媒介免疫（ＣＭＩ）応答の発生をもたらすか、または副作用を誘導しにくくするか、または投与がより容易であるために好ましいと考えられる。

【０２４９】

例として、本発明の組成物は、全身経路または粘膜経路または経皮経路を経て投与できるか、あるいは特定の組織に直接投与できる。本明細書に用いられる用語の「全身投与」としては、限定はしないが、任意の非経口投与経路が挙げられる。特に非経口投与としては、限定はしないが、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、または胸骨内注射、静脈内輸液法、動脈内輸液法、または腎透析輸液法が挙げられる。好ましくは、全身、非経口投与は、筋肉内注射である。

【０２５０】

好ましい一実施形態の方法において、本発明の組成物は、経皮経路を経て投与される。この点に関して、理論に拘束されることはないが、組成物の経皮投与は、免疫系の細胞媒介免疫（ＣＭＩ）群をより効率的に活性化するので好ましいと考えられる。

【０２５１】

用語の「経皮」送達とは、皮内（例えば、真皮または表皮）投与、経皮（例えば、「経皮的」）投与および経粘膜投与、すなわち皮膚または粘膜組織中またはそれらを通した薬剤の通過による送達を意図している。例えば、Ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ：Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｉｓｓｕｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｉｔｉａｔｉｖｅｓ、ＨａｄｇｒａｆｔおよびＧｕｙ（編集者）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ社（１９８９）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、ＲｏｂｉｎｓｏｎおよびＬｅｅ（編集者）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ社（１９８７）；およびＴｒａｎｓｄｅｒｍａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ、１～３巻、ＫｙｄｏｎｉｅｕｓおよびＢｅｒｎｅｒ（編集者）、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、（１９８７）を参照されたい。このように、この用語は、米国特許第５，６３０，７９６号に記載されているものなどの粒子送達装置（例えば、針なしシリンジ）を用いる薬剤の送達ならびに米国特許第５，８６５，７９６号に記載されているものなどの粒子媒介送達装置を用いる送達を包含している。

【０２５２】

本明細書に用いられる用語の「粘膜投与」としては、限定はしないが、経口投与、鼻腔内投与、膣内投与、直腸内投与、気管内投与、腸管内投与および眼投与が挙げられる。

【０２５３】

粘膜経路、特に鼻腔内、気管内、および眼は、ＲＳＶ、インフルエンザウィルスおよびカゼウィルスなどの環境病原体、または草およびブタ草花粉ならびにハウスダストダニなどのアレルゲンへの自然曝露に対する保護に好ましい。

【０２５４】

免疫応答、好ましくはＣＫＩ応答の増強により、アレルゲンまたは微生物などの引き続き遭遇する標的抗原に対する保護効果を高める。

【０２５５】

本発明の他の好ましい実施形態において、本発明の組成物は、宿主対象から分離された細胞に投与できる。この好ましい実施形態において、該組成物を、樹状細胞などの専門的抗原提供細胞（ＡＰＣ）類に投与することが好ましい。ＡＰＣ類は、宿主対象から由来し、関心のある抗原を発現するためにエキソビボで修飾してから、増強されたＣＭＩ応答を誘導するために宿主対象に戻して移入させることができる。関心のある抗原の発現エピトープ類が、増強ＣＭＩ応答を誘導するために専門的ＡＰＣ類からＴ細胞（Ｔｈ１およびＴｈ２の双方ならびにＣＤ８＋Ｔ細胞）により獲得、処理および提供されなければならないので、樹状細胞は、増強ＣＭＩ応答を刺激するために最も強力なＡＰＣ類であると考えられている。

【０２５６】

（粒子投与）

本発明の組成物を送達する粒子媒介法は、当業界に公知である。したがって、調製および好適に精製されたら、同じくコードする上記抗原またはＮＯＩは、当業界に公知の種々の技法を用いてコア担体粒子上にコーティングできる。担体粒子は、遺伝子銃装置からの細胞内送達に典型的に用いられる粒径範囲内で好適な密度を有する材料から選択される。最適の担体粒径は、もちろん、標的細胞の直径に依存する。

【０２５７】

「コア担体」とは、規定された粒径を付与し、ならびに十分に高い密度が細胞膜透過に必要な運動量を達成するために、ゲスト抗原またはゲスト核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）がコーティングされる担体を意味し、その結果、該ゲスト分子は、粒子媒介技法を用いて送達できる（例えば、米国特許第５，１００，７９２号を参照）。コア担体としては、典型的にはタングステン、金、白金、フェライト、ポリスチレンおよびラテックスなどの材料が挙げられる。例えば、Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ、（１９９４）Ｙａｎｇ，Ｎ．編集、ニューヨーク州ニューヨーク所在のオックスフォード大学プレス、１０－１１頁を参照されたい。タングステンおよび金粒子が好ましい。タングステン粒子は、直径が０．５ミクロンから２．０ミクロンの平均サイズで容易に入手できる。金粒子または微結晶性金（例えば、ニュージャージー州ニューアーク所在のＥｎｇｅｌｈａｒｄ社から入手できる金粉末Ａ１５７０）もまた、本発明に使用される。金粒子は、均一なサイズで提供される（１～３ミクロンの粒径でＡｌｐｈａ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓから入手できるか、または０．９５ミクロンなどの粒径範囲でニュージャージー州サウスプレインフィールド所在のＤｅｇｕｓｓａから入手できる）。微結晶性金は、典型的には０．５～５ミクロンの範囲内で種々の粒径分布を提供する。しかしながら、微結晶性金の不規則表面積は、核酸による高効率的なコーティングを提供する。多くの方法が公知であり、金粒子またはタングステン粒子上にＮＯＩ類をコーティングまたは沈着させるために記載されている。このような方法の大部分は、予め決められた量の金またはタングステンとプラスミドＤＮＡ、$CaCl_2$およびスペルミジンとを一般に組み合わせる。生じた溶液は、反応混合物の均一性を確保するためにコーティング手法時に連続して撹拌する。ＮＯＩの沈着後、コーティング粒子は、好適な膜に移すことができ、使用前に乾燥させるか、サンプルモジュールまたはカセットの表面上にコーティングさせるか、または特に遺伝子銃装置の使用のために送達カセットに装填させる。

【０２５８】

粒子組成物またはコーティング粒子は、剤形と適合した様式で、また本発明の目的に有

効な量で個体に投与される。送達される組成物量（例えば、約０．１ｍｇから１ｍｇ、より好ましくは１ｕｇから５０ｕｇの抗原またはアレルゲン）は、試験を受ける個体に依存する。必要とされる正確な量は、試験を受ける個体の年齢および一般状態に依って変わり、適切な有効量は、本明細書を読んだ当業者により容易に決定できる。

宿主哺乳動物対象

本明細書に用いられる用語の「宿主哺乳動物対象」とは、限定することなく、ヒトおよびチンパンジーおよび他の類人猿などの非ヒト霊長類ならびにサル種などの他の霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどのペット；マウス、ラットおよびモルモットなどのげっ歯類を含む実験室動物；ニワトリ、七面鳥および他のキジ鳥類、アヒル、雌ガチョウなどの家畜鳥、野生鳥およびゲーム鳥を含む鳥類などの亜門コルデータ（ｃｏｒｄａｔａ）を意味する。この用語は、特定の年齢を意味しない。したがって、成人および新生児双方の個体を包含するように意図されている。全てこれらの脊椎動物の免疫系が同様に操作されることから、本明細書に記載された方法は、上記のいずれの脊椎動物種の使用が意図されている。哺乳動物の場合、対象は、ヒトであることが好ましいが、家畜類、実験室対象またはペット動物もまたあり得る。

【０２５９】

哺乳動物は、ヒトであることが好ましい。免疫原性組成物（例えば、ワクチン）は、予防使用のためであるが、ヒトは、小児（例えば、よちよち歩きの子供または乳児）または１０代の若者であることが好ましく；ワクチンは、治療使用のためであるが、ヒトは、１０代の若者または成人であることが好ましい。小児用に意図されている免疫原性組成物（例えば、ワクチン）はまた、例えば、安全性、用量、免疫性などを評価するために成人に投与され得る。

【０２６０】

（予防および／または治療）

本発明はまた、薬剤（例えば、ワクチン類などの免疫原性組成物）または診断試薬としての使用のために本発明の組成物を提供する。本発明はまた：（ｉ）免疫原性疾患を治療または予防するための薬剤、の製造に該組成物の使用を提供する。本発明はまた、本発明による治療的有効量の組成物を患者に投与することを含んでなる、患者を治療する方法を提供する。

【０２６１】

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を上げるか、調整するか、または増強させる薬剤の製造において本発明の組成物の使用を提供する。薬剤は、ワクチンなどの免疫原性組成物であることが好ましく、また免疫原性疾患を予防および／または治療するような組成物の調製であることが好ましい。治療に対する本明細書中の全ての引用文献は、治癒的治療、緩和治療および予防的治療を含むことを認識すべきである。

【０２６２】

本明細書に用いられる用語の「免疫応答」とは、宿主哺乳動物対象において抗原に対する体液性免疫応答および／または細胞免疫応答の発生を称す。本明細書に用いられる用語の「体液性免疫応答」とは、抗体分子により媒介される免疫応答を称す。体液性免疫により発生する抗体は、細胞外感染性物質に対して主として有効である。

【０２６３】

本明細書に用いられる用語の「細胞媒介免疫（ＣＭＩ）応答」は、Ｔリンパ球および／または他の白血球により媒介されるものである。抗原が後日出現する場合、記憶Ｔ細胞は、活性化されて細胞表面上に対応する抗原またはその一部を有する標的細胞を破壊し、それによって感染性病原体を破壊するＣＭＩ応答を生じる様式で、ＣＭＩ機構はＴ細胞をプライムするため、ＣＭＩ免疫機構は、細胞内感染および疾患に対して一般により有効である。ＣＭＩ応答は、直接的細胞－細胞間の接触により、および／または抗ウィルス活性を有するサイトカイン類などの分子の放出により宿主の感染細胞を破壊するエフェクター細胞によって媒介される感染源の破壊に焦点が合わせられる。このように、特異的Ｔリンパ球細胞応答を特徴とするＣＭＩ応答は、癌、ウィルス、病原性微生物および他の細胞内微

生物によって引き起こされる疾患に対する抵抗性を生じるために重要である。

【０２６４】

本発明のｂＡＲＥ組成物の投与は、「予防」または「治療」目的のためであり得る。本明細書に用いられる用語の「治療的」または「治療」とは、以下のいずれかを含む：感染または再感染の予防；症状の軽減または緩和または排除；および病原体の減少または完全排除。治療は、予防的（感染前）または治療的（感染後）に有効であり得る。

【０２６５】

予防または治療としては、限定はしないが、有効な免疫応答、好ましくはＣＭＩ免疫応答を誘発すること、および／またはＴ細胞媒介免疫疾患から生じる症状および／または合併症を緩和、軽減、治癒または少なくとも部分的に阻止することが挙げられる。予防的に提供される場合、本発明のｂＡＲＥ組成物は、典型的にある症状の進行中に提供される。本発明のｂＡＲＥ組成物の予防的投与は、引き続く感染症または疾患の予防または寛解することである。治療的に提供される場合、本発明の組成物は、典型的に例えば、実際の症状を減衰させるために感染症または疾患症状の発症時に（またはその直後に）提供される。したがって、本発明の組成物は、疾患原因物質への予想曝露前または疾患状態または感染症もしくは疾患開始後のいずれかに提供できる。

【０２６６】

予防または治療投与（単独または組成物の一部として）のいずれかがより適切であるかどうかは、通常疾患の性質に依存する。例として、本発明の組成物は、ワクチン接種により免疫を積極的に誘導する免疫療法プロトコルにおいて使用できるであろう。この後者の使用形態は、免疫性が持続されるので有益である。一方、必ずしも必要ではないが、組成物は、予防的に使用されることが好ましく、引き続き遭遇する抗原または標的抗原に関連するその一部分（エピトープ類など）に対して有効なＣＭＩ応答を誘導する。

【０２６７】

本発明の文脈において宿主対象に投与されるｂＡＲＥ組成物の用量は、通常、対象において経時的に有利な予防的または治療的免疫応答、好ましくはＣＭＩ応答を達成する上で十分な量である。

【０２６８】

本発明はまた、本発明の組成物の有効量を投与するステップを含んでなる哺乳動物において免疫応答を上げる方法を提供する。免疫応答は防護的であることが好ましく、抗体免疫および／または細胞媒介免疫を伴うことが好ましい。この方法は、ブースター応答を上げることができる。

【０２６９】

本発明に用いられる用語の「予防的または治療的有効用量」とは、例えば、ｂＡＲＥ組成物の一部として、および／またはＴ細胞媒介免疫疾患から生じる症状および／または合併症を緩和、軽減、治癒または少なくとも部分的に阻止するために投与される場合、１種以上の抗原またはエピトープに対して増強された免疫応答、好ましくはＣＭＩ応答を誘発させるのに十分な量の用量を意味する。

【０２７０】

本明細書に記載される免疫原性組成物は、抗原（１種または複数種）ならびに必要とされる任意の他の成分の免疫学的に有効量を含んでなる。「免疫学的に有効量」とは、単回投与または一連の一部として個体に対するその量の投与が、治療または予防に有効であることを意味する。この量は、治療を受ける個体の健康および身体的状態、年齢、治療を受ける個体の分類群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類など）、個体の免疫系の抗体を合成する能力、所望の防護度、ワクチンの形成、医療状態の治療医師の評価、および他の関連する因子に依って変化する。その量は、ルーチンの試験を通して決定できる比較的広範囲内に入ると予想される。本発明の組成物は、宿主、例えばヒトへの投与前にインビトロおよびインビボ動物モデルにおいて評価できる。

【０２７１】

（投与量）

予防または治療は、単回時点または複数回時点における単独の直接投与により達成できる。点眼を経る粘膜投与などの幾つかの投与経路は、より高い用量を必要とし得る。当業者は、特定の送達経路に適合させるために投与量と濃度を調整できる。

【０２７２】

一実施形態において、投薬治療は、単回投与計画または複数回投与計画であり得る。複数回用量は、主要な免疫化計画および／または　ブースター免疫化計画に使用できる。複数回投与計画において、種々の用量は、限定はしないが、非経口プライムおよび粘膜プライムおよび非経口ブーストなどの同一または異なる経路により与えることができる。

【０２７３】

（変異体AB_5分子）

本発明による安定化ｂＡＲＥタンパク質および安定化AB_5タンパク質は、ヒトにおける感染症および／または疾患の予防または治療に用いることができる。ＬＴＫ６３などの変異体AB_5分子はまた、ヒトにおける感染症および／または疾患の予防または治療に用いることができる。特に、安定化ＬＴＫ６３は、第２の抗原との混合物における非毒性粘膜アジュバントとして有用である。ＬＴＫ６３変異体の調製および粘膜アジュバントとしてこれらの変異体のワクチン類への製剤化は、Ｔｉｅｒｎｅｙら、Ｊ　Ｉｎｆｅｃｔ　Ｄｉｓ　１８８（２００３）７５３－８頁；およびＢａｕｄｎｅｒら、Ｖａｃｃｉｎｅ　２１（２００３）３８３７－３８４４頁；およびビオシンＳｐＡ（現在キロンＳｐＡ）の国際特許出願国際公開第９３／１３２０２号および国際公開第９７／０２３４８号などの出願者の先の刊行物および特許出願に詳細に記載されており、これらの開示は、それらの全体および全ての目的のために、参照としてその全体が本明細書に組み込まれている。

【０２７４】

本出願および先の参照出願に提供された開示に記載されているように、本発明による適切な安定化AB_5タンパク質、特に遺伝子的にＬＴＫ６３などの解毒化されたAB_5細菌毒が組み込まれているワクチン製剤の調製法は、当業者にとって容易に明らかとなるであろう。

【０２７５】

このように、ある一定の態様において、本発明は、特にAB_5クラスタンパク質が、ＬＴＫ６３などの遺伝子的に解毒化された免疫原性細菌毒である、安定化AB_5クラスタンパク質を含んでなる免疫原性組成物を提供する。ある一定の態様において、免疫原性組成物はヒトワクチンである。安定化AB_5クラスタンパク質は、組成物の抗原性剤、または組成物の他の抗原性剤に関するアジュバントであり得る。特定の一実施形態において、安定化AB_5クラスタンパク質は、粘膜アジュバントである。

【０２７６】

（疾患状態）

本発明の組成物は、限定はしないが、肺炎、心臓血管病、アテローム性動脈硬化症、気管支炎、咽頭炎、喉頭炎、静脈洞炎、閉塞性肺疾患、喘息、慢性閉塞性肺疾患、反応性関節炎、中耳炎、腹大動脈瘤、結節性紅斑、ライター症候群、類肉腫、アルツハイマー病、多発性硬化症、性病性リンパ肉芽種、眼トラコーマ、骨盤炎症性疾患、封入体結膜炎、性器トラコーマ、乳児肺炎、初発性トラコーマ、角膜炎、乳頭肥大、角膜浸潤、外陰部膣炎、粘液膿性鼻炎、耳管炎、子宮頚炎、子宮頚部濾胞、前立腺炎、直腸炎、尿道炎、鼠径リンパ肉芽腫、気候性横痃、熱帯性横痃、および／またはエスチオメーヌなどの疾患を予防および／または治療するために使用できる。

【０２７７】

（キット類）

本発明のｂＡＲＥ組成物を含んでなるキットもまた、本発明に含まれる。キットはまた、アジュバントを含むことができ、生体分子を投与する使用説明書により遺伝子アジュバントは、ｂＡＲＥ組成物と、またはその一部と共に投与されることが好ましい。キットの他の好ましい成分は、ｂＡＲＥ組成物を投与するためのアプリケーターを含む。本明細書に用いられる用語の「アプリケーター」とは、限定はしないが、皮下注射器、遺伝子銃、

粒子加速装置、ネブライザー、ドロッパー、気管支鏡、座薬、タンポンなどの含浸またはコーティングされた膣挿入可能な材料、圧注剤、膣洗浄液、滞留浣腸製剤、座薬、または全身的または粘膜的または経皮的にｂＡＲＥ組成物を宿主対象に適用するための直腸または結腸洗浄液などの任意の医療用具を称す。

【０２７８】

キットとしては、さらに１つ以上の以下のものを含んでなる第２の成分が挙げられる：使用説明書、シリンジまたは他の送達装置、アジュバントまたは製薬的に許容できる製剤化溶液。本発明はまた、本発明のｂＡＲＥ組成物により予め充填された送達装置を提供する。

【実施例】

【０２７９】

本発明の材料および関連技法および装置を、幾つかの実施形態を参照にしてここに記載する。記載された実施形態の重要な性質および特性は、本文中の構成に説明されている。本発明は、これらの実施形態と関連して記載されているが、本発明を、これらの実施形態に限定するつもりはないことを解すべきである。逆に、添付の請求項により定義されている本発明の精神と範囲内に含まれ得る変法、修飾および等価物を包含することが意図されている。以下の説明において、本発明の十分な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が記載されている。本発明は、これらの具体的な詳細の幾つかまたは全部を用いなくても実施できる。他の場合、周知の処理操作は、本発明を不必要に曖昧にしないために詳細には記載されなかった。

【０２８０】

（実施例１　ＧＦ－ＨＰＬＣにおけるＬＴＫ６３のＡＢ$_5$体およびＢ$_5$体の分離）

ＬＴＫ６３、約８２ＫＤａのオリゴマータンパク質は、天然分子の構造的構成を保持するサブユニットＡ上の部位特異的変異誘発により得られる、ＬＴ（易熱性腸毒素）の非毒性変異体である。ＬＴＫ６３のサブユニットＡは、２７ＫＤａのＭＷを有する２４０のアミノ酸のポリペプチド単鎖により構成される。サブユニットＢは、５５ＫＤａのＭＷを有する各々１０３のアミノ酸の５つの同一モノマーにより形成されるペンタマーである。両サブユニットは、正荷電アミノ酸を高いパーセントで含有する（サブユニットＡ　ＩＰ＝６．３；サブユニットＢ$_5$、ＩＰ＝９．１；完全ＡＢ$_5$ ＩＰ＝８．５）。

【０２８１】

ＬＴＫ６３タンパク質を特性化するために従来から用いられる分析法（電気泳動法、免疫ブロット法、質量分析法およびアミノ酸分析法）は、解離ＡまたはＢ$_5$サブユニット体から分子の完全体であるＡＢ$_5$体を区別することができない。従来のＧＦ－ＨＰＬＣシステムでは、保持時間が極めて近接しているため、ＡＢ$_5$ピークとＢ$_5$ピークとを良好に分離することができない。新規なＧＦ－ＨＰＬＣシステムは、有効な分離を可能にする。

【０２８２】

比較例は以下の通りである：

ＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷｘｌに対する従来のＧＦ－ＨＰＬＣ分析
装置：Ａｌｌｉａｎｃｅ　２６９５　Ｗａｔｅｒｓ
緩衝液：ＫＰｉ　１００ｎＭ＋Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$　１００ｍＭ　ｐＨ７．２
流量：０．５ｍｌ／分
検出：ＰＤＡ９９６（登録商標）２１４ｎｍおよび２８０ｎｍ
カラム：ＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　Ｔｏｓｏｈ
材料：シリカゲル
表面修飾：残りの－ＯＨ基
粒径：５μｍ
多孔度：２５０Ａ。

【０２８３】

３種の公知の従来の緩衝液（ＰＢＳ、０．２５％　ＣＨＡＰＳおよびクエン酸）中、ＬＴＫ６３（ＡＢ$_5$タンパク質）のサンプルをこのクロマトグラフィシステムに流した。こ

のシステムを用いたときのAB_5体およびB_5体の保持時間（ＲＴ）差は極めて小さく、ピークの分離は良好ではなく、ＬＴＫ６３サンプル中のB_5サブユニット体含量の測定は困難となる。

【０２８４】

図１Ａを参照すると、ゼロ時間（サンプル調製直後）において、完全AB_5を表すと思われる単一ピークがクロマトグラム中にあるのがわかる。ＲＴとピークプロフィルを示した３つのサンプルの各クロマトグラムを重ね合わせるとほぼ同じになる。５日後の図１Ｂを参照すると、恐らくB_5体に相当し、ＡＢ５タンパク質がある程度解離している証拠となる第２のピークが、右にシフトして現れる。しかしながら、分離は極めて低く、AB_5分子の解離度を定量的に測定することはできない。

【０２８５】

Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ　２５０に対する新規ＧＦ－ＨＰＬＣ分析
装置：Ａｌｌｉａｎｃｅ　２６９５　Ｗａｔｅｒｓ
緩衝液：ＫＰｉ　１００ｎＭ＋Na_2SO_4　１００ｍＭ　ｐＨ７．２
流量：０．５ｍｌ／分
検出：ＰＤＡ９９６（登録商標）２１４ｎｍおよび２８０ｎｍ
カラム：Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ　２５０　Ｗａｔｅｒｓ
材料：ヒドロキシル化ポリメタクリレート
表面修飾：残りの－ＣＯＯＨ基
粒径：６μｍ
多孔度：２５０Ａ。

【０２８６】

図１Ｃは、同じ５日後のサンプルを本発明に従って新規なクロマトグラフィシステム上で繰り返されたクロマトグラムを示しており、それぞれB_5（左ピーク）およびAB_5（右ピーク）を表す２本のピークが良好に分離されて示されている。サンプルの実質的な分解は、３種全ての従来の緩衝液、特にクエン酸緩衝液に見られる。

【０２８７】

図１Ｄは、ＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷｘｌおよびＵｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ　２５０ならびにＳＤＳ－ＰＡＧＥ上のＬＴＫ６３サンプルの比較を示す。Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ　２５０カラムを用いたときの短い方の保持時間（ＲＴ）を有するピークは、Ｂ５サブユニットピークであると思われる。この分離は、分離機構が、純粋にゲルろ過機構ではないこと、または分子の相対寸法がそれらの分子量（ＭＷ）に比例していないことを示唆している。図１Ｄはまた、同一の分析条件下で異なるカラムを用いて、同じＬＴＫ６３サンプルに関して得られた面積値および面積％の比較を示す。Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ　２５０カラム上で分離されたＬＴＫ６３サンプルに関する面積％は、１６％Ｂ５：８３％ＡＢ５であり、これはＢ５：ＡＢ５に対する完全性比が約１：５であることを示す。

【０２８８】

（実施例２　最適溶出条件）

表１は、部分的に解離されたAB_5サンプル（AB_5体およびB_5体の双方を含有する）を、実施例１に記載されたＵｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌカラム分離システムから溶出するために使用される４種の緩衝液の組成物を示している。

【０２８９】

【表１】

表 1

サンプル名	入手日	溶離液	注入量	チャネル	希釈
1. PBS 5gg agotazione	09/04/2003 9.55.19	KPi 50 mM + Na2SO4 50 mM ph 7.2	100,00	214 nm	4,00
2. PBS 5gg agotazione	08/04/2003 13.53.06	KPi 100 mM + Na2SO4 100 mM ph 7.2	100,00	214 nm	4,00
3. PBS 5gg agotazione	09/04/2003 15.07.11	KPi 250 mM + Na2SO4 100 mM ph 7.2	100,00	214 nm	4,00
4. PBS 5gg agotazione	10/04/2003 9.51.42	KPi 200 mM + Na2SO4 200 mM ph 7.2	100,00	214 nm	4,00

図２Ａ～Ｄは、該システムにおけるＡＢ$_5$体およびＢ$_5$体の選択性についてイオン強度の効果を例証するクロマトグラムを示す。生理食塩水濃度が２００ｍＭに達する場合、ＡＢ$_5$の部分的分解まで、より高いイオン強度は、２本のピークについてより大きな最終分離を生じる。ＡＢ$_5$ピークは、イオン強度の変化量によりさらに影響を受けるが、Ｂ$_5$ピークのＲＴは、イオン強度を変えても実質的に変化しないままである。

【０２９０】

図３は、以下の溶出緩衝液：ＫＰｉ　２００ｍＭ＋Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$　１００ｍＭ；ｐＨ７．２中のＬＴＫ６３サンプルのクロマトグラフィプロフィルを例証している。この緩衝液は、このクロマトグラフィシステムにおいて理想的なＡＢ$_5$／Ｂ$_5$分離を提供する。

【０２９１】

（実施例３　ＡＢ$_5$ピークおよびＢ$_5$ピークの帰属）

（分画およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

本発明によるＧＦ－ＨＰＬＣ分離で得られたピークのタンパク質のＡＢ$_5$体およびＢ$_5$体への帰属を立証するために、部分的解離のＬＴＫ６３サンプルを、図４のクロマトグラムに示されたとおり分離した。さらなる調査のためにサンプルを分画した。分画のために、サンプルを、実施例１に記載された新規クロマトグラフィシステムに３回注入し、５００μｌ容量の６つのフラクションを、１３．８分から１９．８分の各操作において採取した。次いで各操作の同じフラクションを集めて１．５ｍｌ／フラクションの最終容量を得た。次にフラクション０～５を、ＨＰＬＣシステムに再注入し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。この結果は、図５Ａと図５Ｂに示され、ＬＴＫ６３サンプルの分離が図４に示されるフラクションについて、それぞれのクロマトグラムおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥプロフィルを示している。フラクション１および２に存在するより短い保持時間（ＲＴ）を有するピークは、Ｂ$_5$のみを含有するが、フラクション３および４に存在するより長いＲＴを有するピークは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいてＡＢ$_5$を表すＡおよびＢ$_m$の２本の明瞭なバンドとして移動する。

【０２９２】

（寸法特性決定：見かけの分子量）

Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌカラムの検量線を、公知のＭＷの標準タンパク質により作成した。対応するＲ２は０．９５であった（図５Ｃ）。

【０２９３】

曲線上のＣＲＭ１９７参照タンパク質のピークの保持時間は、５７ＫＤａ（理論的には５６．９）の見かけのＭＷを得；同一曲線上のＢ$_5$の見かけのＭＷは、６５ＫＤａ（理論的には５５）に帰着した。ＡＢ$_5$のＭＷは、９．６ＫＤａ（理論的には８２ｋＤａ）を生じ、この場合ゲルろ過以外の分離機構が作用することを確かめた（図５Ｄを参照）。

【０２９４】
（寸法特性決定：光散乱分析）
ＧＦ－ＨＰＬＣピークのさらなる特性決定は、ＧＦ－ＨＰＬＣ：１８度Ｄａｗｎ　ＥＯＳ　Ｗｙａｔｔ（図５Ｅを参照）に連結されたオンライン光散乱（ＭＡＬＬＳ）検出器の使用により得られた。このインタセプトは、ＭＷを得る。初発スロープは、各スライスに関する半径値を得る。
【０２９５】
下表２は、３種のＬＴＫ６３サンプルおよび対照として用いられたＢＳＡに関するＭＡＬＬＳデータを分類している。以下のパラメータは：ドルトンでの絶対ＭＷ；ピーク多分散（単分散分子＝タンパク質について１の値）；ｎｍでの旋回半径（分子寸法の測定；感度下限値＝１０ｎｍ）；各値に最も近いパーセントは、装置のばらつきを示す。
【０２９６】
全てのサンプルにおいて、より高いＲＴ（AB_5）を有するピークは、B_5と比較してより小さな値の旋回半径を示す。AB_5分子のこの異常なクロマトグラフィ的挙動の可能な説明は、そのより重いＭＷにもかかわらず、そのコンホメーションは、B_5単独よりもコンパクトであることである。この結果は、全てのＬＴＫ６３サンプルに関して全く同様である：２本の単分散ピークは、B_5およびAB_5に関する予想値と一致して、それぞれ約５７ＫＤａおよび８５ＫＤａのＭＷを有して存在する。
【０２９７】
【表２】

表 2

サンプル	ピーク	分子量理論値	分子量実験値	%	多分散 MwMn	%	Rz	%
BSA	モノマー	66.800	65.970	0,3	1,000	0,5	6,5	5

サンプル	ピーク	分子量理論値	分子量実験値	%	多分散 MwMn	%	Rz	%
20mMリン酸中のK63	AB_5	82.000	85.450	0,3	1,001	0,4	5,1	5
0,05% chaps中のK63	AB_5	82.000	85.300	0,3	1,001	0,5	6,5	6
0,25% chaps中のK63	AB_5	82.000	85.470	0,3	1,000	0,4	4,3	5

サンプル	ピーク	分子量理論値	分子量実験値	%	多分散 MwMn	%	Rz	%
20mMリン酸中のK63	B_5	55.000	58.030	0,4	1,000	0,6	16,5	3
0,05% chaps中のK63	B_5	55.000	57.030	0,4	1,000	0,6	15,2	5
0,25% chaps中のK63	B_5	55.000	57.530	0,5	1,000	0,6	19,9	5

（寸法特性決定：ＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ）
天然のＬＴＫ６３およびＧＦ－ＨＰＬＣ分画により得られた３種のサンプルを、ピーク帰属を確認するためにＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ上で分析した。使用される装置の詳細は以下のとおりである：

装置：Ａｌｌｉａｎｃｅ　２６９５　Ｗａｔｅｒｓ
検出：　ＰＤＡ　９９６　Ｗａｔｅｒｓ
　　ＭＳ　ＺＱ　４０００　Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ
ＲＰカラム：Ｊｕｐｉｔｅｒ　Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｃ４
　　３００Å。

【０２９８】

図５Ｆ（ｂ）は、Ｂモノマーに対応する約１１．７９３ＤａのＭＷを有するピーク１が、天然ＬＴＫ６３および全てのフラクションに存在することを示している。図５Ｆ（ｂ）はまた、サブユニットＡに対応する２７．８５５／６６ＤａのＭＷを有するピーク２が、天然ＬＴＫ６３フラクションおよびフラクション５に存在することを示している。

【０２９９】

（実施例１～３の結果のまとめ）
（新旧ＨＰＬＣ技法間の比較実施例）

AB_5タンパク質など、ｂＡＲＥタンパク質の機能的完全性は、その完全多量体構造を損失することなく評価できるため、当業界への貢献が重要となる新規ＧＦ－ＨＰＬＣ法が開発された。

【０３００】

AB_5タンパク質など、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性は、ＡＢ５タンパク質の非解離形態および解離形態について判断でき；ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する候補安定化剤の効果を判断できる。特にＡＢ５タンパク質など、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する物理的安定化剤の効果およびその安定性の可能性を判断できる。

【０３０１】

実施例で説明されるように、ＧＦ－ＨＰＬＣ法を用いる溶出条件が最適化され、溶出緩衝液に対するイオン強度の効果が調査され、イオン強度は、カラム上のＡＢ５タンパク質の保持時間に影響を及ぼすように思われた。

【０３０２】

ＧＦ－ＨＰＬＣカラムから溶出されたピークは、多くの方法で特性決定された；先ず第１に、ピーク帰属は、溶出されたＢ５およびＡＢ５ピークを同定するために分画およびＳＤＳ－ＰＡＧＥの双方により確かめられた。

【０３０３】

第２に、寸法特性決定は、ゲルろ過以外の分離機構がＡＢ５タンパク質の溶出に関して最小に作用していることを示した見かけの分子量（ＭＷ）測定を用いて実施された。

【０３０４】

第３に、オンライン光散乱（ＭＡＬＬＳ）を用いる寸法測定は、絶対的ＭＷの結果が、ＡＢ５およびＢ５サブユニットに関する理論値と一致しているかどうかをチェックするために実施された。

【０３０５】

これらの結果は、ピークが同種の材料から構成されていることを示した。しかしながら、寸法値は、ＡＢ５が、Ｂ５サブユニット単独よりもコンパクトなコンホメーションであることを示唆した。ＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳを用いて得られた寸法特性決定はまた、ピーク帰属のさらなる証拠を提供した。

【０３０６】

（実施例４　安定化剤に関するスクリーンにおいて本発明の新規分析法（ＧＦ－ＨＰＬＣ）の適用）

本発明の分析法および安定化剤の同定ならびに物理的および／またはｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性の開発前に、安定性の問題は、種々の緩衝液中、種々の貯蔵温度で変異体ＬＴ　Ｋ６３など、ｂＡＲＥタンパク質の純粋濃縮バルクの長期保存中に見られた。

【０３０７】

例として、２．８ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でＰＢＳ中４℃で貯蔵１ヵ月後のＬＴＫ６３バルクは、ボトル壁に数個の「結晶」形成を示した。

【０３０８】
また、１～１．５ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度で、ｐＨ７．７のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中、２～８℃の貯蔵温度で貯蔵５ヵ月後、ＬＴ　Ｋ６３沈殿が明白であった。
【０３０９】
ＰＢＳ中－２０℃で貯蔵されたＬＴ　Ｋ６３バルクは、沈殿を示さないが、ＨＰＬＣ分析において、ＡＢ５タンパク質が、ＡおよびＢ５サブユニット形態に解離されいることを示唆する、Ｂ５複合体の外観が観察された。さらに、本発明の新規なＧＦ－ＨＰＬＣ分析法の適用は、１．２ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でＰＢＳ＋５％ショ糖中－２０℃で貯蔵１０ヵ月後、ＨＰＬＣにより検出されたＬＴ　Ｋ６３の損失が明白であることを示した。
【０３１０】
５％ショ糖のＰＢＳへの添加は、凍結／解凍サイクル中の解離によりＬＴ　Ｋ６３を保護するように思えた。しかしながら、ＰＢＳ＋５％ショ糖中ＬＴ　Ｋ６３の－２０℃で長期貯蔵において再度タンパク質解離を生じた。
【０３１１】
したがって、本発明の目的の１つは、１ｍｇ／ｍｌと４ｍｇ／ｍｌとの間のタンパク質濃度に対して２～８℃でＬＴ　Ｋ６３の純粋濃縮バルクを安定化させるために、ｂＡＲＥ組成物貯蔵の改善、特にＡＢ５組成物貯蔵の改善を提供することであった。
【０３１２】
（方法論）
沈殿／結晶化を避けてＬＴ　Ｋ６３を安定化させる第１の試みは、タンパク質安定性に影響を及ぼす幾つかのパラメータの変動と共に４℃で実施された。酢酸、クエン酸、リン酸およびトリス緩衝液などの種々の緩衝液が選択された。ＮａＣｌ濃度は、０～０．５Ｍの範囲で変化させ；ｐＨは、５．５～７．５の範囲で変化させ；糖類、界面活性剤、キレート化剤およびアミノ酸などの種々の添加物が使用された。タンパク質濃度は、用いられる貯蔵用緩衝液の全てにおいて０．８～１．２ｍｇ／ｍｌの範囲で維持された。この実験は、静止条件下および４℃でロータ撹拌機でサンプルを振とうすることにより実施された。振とう実験は、貯蔵条件に応力をかけ、ＬＴ　Ｋ６３の沈殿を促進するように設定された。
【０３１３】
（スクリーニング結果４（ａ））
【０３１４】
【表３】

表3

緩衝液	沈殿	
	振とう	静止
PBS	有り	有り
PBS＋ガラクトース 0,1 mM	有り	無し
PBS＋トレハロース5%	有り	有り
PBS + CHAPS 0, 25 %	無し	無し
PBS＋アミノカプロン酸5%	有り	有り
Pi 20 mM pH 7,4	有り	有り
Pi 50 mM, NaCl 0,3 M,ガラクトース0,2M p	有り	有り
Pi 20 mM pH 7,4 + L-アルギニン0,4M	無し	無し
酢酸　50 mM, NaCl 300 mM pH 5,5	有り	有り
クエン酸 50 mM pH 6,5	有り	無し
Tris 50 mM, 1 mM EDTA pH 7,5	有り	有り
Tris 50 mM, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl	有り	無し
NaCl 500 mM pH 5,8	有り	無し

表３の分析結果は、振とうサンプルの沈殿が２、３日以内で生じるが、一方、静止条件下では、沈殿は数ヵ月かかる。静止および振とう条件下の双方でＬＴ　Ｋ６３の沈殿を防いだ２種の添加物、ＣＨＡＰＳおよびＬ－アルギニンが選択された。

【０３１５】
（スクリーニング結果４（ｂ））
振とう１日目および６日目におけるペレット（示されていない）および上澄液（図６を参照）のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析が実施された。静止サンプルとは異なり、振とう条件において、貯蔵緩衝液に依ってＡＢ５の部分解離が生じ、この上澄液は、Ｂモノマー（B_m）またはＢサブユニット（B_X）のオリゴマー体に富んでいる。
【０３１６】
（実施例５）
実施例４（ｂ）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果により、振とう条件下のＬＴ　Ｋ６３タンパク質は不安定であり、ＡとＢのサブユニットは、解離することを示した。ＬＴＫ６３タンパク質の安定性に対する２種の貯蔵用緩衝液、ＣＨＡＰＳおよびＬ－アルギニンの効果を調べた。２種の貯蔵用緩衝液は：ｐＨ７．７の２０ｍＭリン酸とＣＨＡＰＳおよびｐＨ７．７の２０ｍＭリン酸とＬ－アルギニンが選択された。
【０３１７】
（結果５（ａ））
図７は、静止条件および振とう条件の双方において、１．５～２．０ｍｇ／ｍｌまでタンパク質濃度を増加させることは、ＬＴ　Ｋ６３の沈殿に影響を及ぼし；一方、０．０５％～０．５％範囲のＣＨＡＰＳ濃度は、ＬＴ　Ｋ６３挙動に有意に影響を及ぼさず；ＣＨＡＰＳ沈殿サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥは、静止条件および振とう条件の双方においてＬＴ　Ｋ６３解離を示さなかったことを示している。
【０３１８】
（結果５（ａ）の概要）
１．５ｍｇ／ｍｌ以上のタンパク質濃度に関して、ＣＨＡＰＳの包含は、ＬＴ　Ｋ６３の沈殿に対して保護効果を有するとは思われない。しかしながら、ＣＨＡＰＳの包含は、ＡＢ５タンパク質をそのサブユニット体への解離から保護するように思われる。
【０３１９】
（結果５（ｂ））
図８は、静止条件下で、１７ｍｇ／ｍｌまでタンパク質濃度を増加させても、タンパク質沈殿に影響を及ぼさなかったが、一方、振とう条件下では、ＬＴ　Ｋ６３の沈殿が、２．０ｍｇ／ｍｌの濃度でさえも生じ；５０ｍＭ～４００ｍＭの範囲のＬ－アルギニン濃度は、有意にＬＴ　Ｋ６３沈殿に影響を及ぼさず；一方、振とう条件下でＬ－アルギニン沈殿サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥは、ＬＴ　Ｋ６３解離を示しているように思えることが示されている。
【０３２０】
（結果５（ｂ）のまとめ）
Ｌ－アルギニンは、極めて高いタンパク質濃度までタンパク質沈殿を防止できたが、Ｌ－アルギニンは、ＬＴ　Ｋ６３解離に対する効果を有するように思われる。
【０３２１】
（実施例６　新旧ＨＰＬＣ法を用いた振とう３０日後のＬ－アルギニン振とうサンプルの比較分析）
（結果６）
旧ＨＰＬＣ法（図９（ａ）では、天然の多量体ＡＢ５タンパク質とその解離Ｂ５サブユニット形態とを識別できないが、一方、新規ＨＰＬＣ法では、種々の濃度のアルギニン（０．２Ｍ、０．３Ｍおよび０．４Ｍ）を使用し、本発明の分析方法を用いて得られたピーク下の面積パーセントを算出することによって、ＡＢ５形態とＢ５形態との分離だけでなく、解離形態と非解離形態との相対量の定量化が可能になることが、図９（ａ）および９（ｂ）の解析により示される。
【０３２２】
（結果６のまとめ）
ＬＴ　Ｋ６３の解離の程度により、非沈殿サンプルでも生じるＢ５サブユニット体の出

現が判断され、これはＬ－アルギニン濃度に依存していると考えられる。

【０３２３】

（実施例７）

Ｌ－アルギニン濃度に対するＬＴ　Ｋ６３解離の依存性を、種々のＬＴ　Ｋ６３濃度（１．４ｍｇ／ｍｌと４．０ｍｇ／ｍｌ）における静止サンプル下で本発明の新規なＨＰＬＣ分析法を用いて検討された。

【０３２４】

（結果７）

B_5の増加は、静止サンプルにおいてさえも生じ、Ｌ－アルギニン濃度に依存することが、図１０（ａ）および図１０（ｂ）の分析により示される。直線回帰分析のスロープは、ＡＢ５タンパク質の解離の程度が、ＡＢ５タンパク質濃度に依存しないことを示している。

【０３２５】

（実施例８）

（方法論）

静止条件下でのＬＴ　Ｋ６３解離に対するＣＨＡＰＳ効果を、本発明の新規なＨＰＬＣ法を用いて評価した。ＣＨＡＰＳの包含により、ＬＴ　Ｋ６３（図１１（ａ））に対する解離作用が示されないこと；Ｌ－アルギニン処理サンプルにおけるB_5の増加が、０．０５％ＣＨＡＰＳの添加により部分的に阻止される（図１１（ｂ））ことが、図１１（ａ）と１１（ｂ）の解析により示された。

【０３２６】

（結果４～８の総合的まとめ）

ＬＴ　Ｋ６３の不安定性は、２つの異なる現象に依る：結晶化／沈殿。２種の添加物、ＣＨＡＰＳおよびＬ－アルギニンが、ＬＴ　Ｋ６３タンパク質を相乗的に安定化させるために選択された。ＣＨＡＰＳは、高いＬＴ　Ｋ６３濃度（約２ｍｇ／ｍｌ）でＬＴ　Ｋ６３沈殿を防止することができないが、解離作用は見られなかった。Ｌ－アルギニンは、極めて高いＬＴ　Ｋ６３濃度（約１７ｍｇ／ｍｌ）でタンパク質沈殿を防止するが、Ｌ－アルギニンは、ＡＢ５解離作用を有し得る。

【０３２７】

安定化添加物としてのＣＨＡＰＳ＋Ｌ－アルギニンの組合せに関しては、ＣＨＡＰＳの包含は、Ｌ－アルギニンサンプルにおけるB_5サブユニット形成を部分的に阻止し、Ｌ－アルギニンと組み合わせて含まれる場合、１２ヵ月間に亘るＢ５濃度の予想増加は、１．５％付近であった。これらの観察に基づいて、ＣＨＡＰＳとＬ－アルギニンとの組合せの使用は、経時的にＬＴＫ６３の沈殿および解離の双方を防止することによって相乗的効果を提供するように思われる。特に、組合せて用いられる場合の最適Ｌ－アルギニン（１００～２００ｍＭ）およびＣＨＡＰＳ（０．０５～０．２５％）濃度を決定する安定性実験により、安定性に関する肯定的結果は、添加濃度に係りなく３ヵ月後にも得られることが示された。

【０３２８】

（実施例９　ある期間に亘る１．３ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でのＬＴＫ　６３の安定性に対するＬ－アルギニンおよびＣＨＡＰＳの効果）

１．３ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度のＬＴＫ　６３を、Ｌ－アルギニンおよびＣＨＡＰＳの種々の濃度を含有する貯蔵用緩衝液中２～８℃に維持してタンパク質解離および沈殿に対するこれら２種の安定化剤の効果をチェックした。サンプル中のＢ５パーセンテージを、貯蔵８ヵ月までＨＰＬＣ分析により測定した。

【０３２９】

（結果９）

表４（ａ）および図１２は、ある期間に亘る１．３ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でのＬＴＫ　６３の安定性に対するＬ－アルギニン（５０ｍＭ～４００ｍＭ）およびＣＨＡＰＳ（０．２５％）の効果を示す。タンパク質沈殿（ｐｐｔ）は、対照サンプルおよび約４ヵ

月に相当する１１８日後の振とうサンプルに見られた。１１８日後の静止サンプルのいずれにも沈殿は見られなかった。しかしながら、約８～９ヵ月に相当する２４６日後の５つの静止サンプルのうち２つに沈殿が見られた。

【０３３０】

【表４ａ】

表4(a)

緩衝液	% $B_{5\ 214\ nm}$							
	0 日目	1 日目	6 日目	13 日目	27 日目	55 日目	118 日目	246 日目
リン酸 20 mM, pH 7.4	2,90	2,80	2,83	2,56	2,79	2,64	**ppt**	
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋50 mM アルギニン静止	2,99	2,56	2,82	2,50	2,87	2,82	3,04	**ppt**
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋100 mM アルギニン静止	3,03	2,86	2,94	2,69	2,94	3,08	3,29	4,26
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋200 mM アルギニン静止	3,12	3,13	3,09	2,92	3,3	3,36	3,79	4,65
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋400 mM アルギニン静止	3,64	3,58	3,53	3,40	3,80	4,11	4,80	5,71
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋ CHAPS 0,25% 静止	2,61	2,31	2,33	2,30	2,18	2,20	2,17	**ppt**
リン酸 20 mM, pH 7.4 ＋ CHAPS 0,25% 振とう	2,61	2,21	2,23	2,20	2,12	2,13	**ppt**	

Ｂ５パーセンテージの時間経過の線形フィッティングをプロットした。

【０３３１】

【表４ｂ】

表 4(b)

緩衝液	線形フィッティング	
リン酸 20 mM , pH 7.4	y = -0,0033x + 2,8087	R2 = 0,291
リン酸 20 mM , pH 7.4 + 50 mM アルギニン静止	y = 0,0025x + 2,7218	R2 = 0,2749
リン酸 20 mM , pH 7.4+ 100 mM アルギニン静止	y = 0,0054x + 2,8192	R2 = 0,9181
リン酸 20 mM , pH 7.4+ 200 mM アルギニン静止	y = 0,0065x + 3,0439	R2 = 0,9708
リン酸 20 mM , pH 7.4 + 400 mM アルギニン静止	y = 0,0092x + 3,5354	R2 = 0,9718
リン酸 20 mM , pH 7.4 + CHAPS 0,25% 静止	y = -0,0022x + 2,3684	R2 = 0,3759
リン酸 20 mM , pH 7.4+ CHAPS 0,25% 振とう	y = -0,0049x + 2,3334	R2 = 0,3239

（実施例１０）

（方法論）

タンパク質解離と沈殿に対するＣＨＡＰＳ（０．２５％）およびＬ－アルギニン（５０ｍＭ～４００ｍＭ）の効果を、経時的（０日、２日、５日、１２日、２７日、５５日、１１８日および２５６日）に調べた。

【０３３２】

４．０ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でのＬＴＫ　６３を、Ｌ－アルギニンおよびＬ－アルギニン＋ＣＨＡＰＳの種々の濃度を含有する貯蔵用緩衝液中に２～８℃に維持した。２４６日後、１つのサンプルだけにタンパク質沈殿（ｐｐｔ）が見られた。サンプル中のＢ５パーセンテージは、貯蔵８ヵ月間までＨＰＬＣ分析により測定された。Ｂ５パーセンテージの時間経過を実施し、線形フィッティングをプロットした（表５（ａ）、５（ｂ）および図１３）。

【０３３３】

【表５】

表 5(a)

	% $B_{5\ 214\ nm}$							
緩衝液	0 日目	2 日目	5 日目	12 日目	27 日目	55 日目	118 日目	246 日目
リン酸　20 mM , pH 7.4 ＋50 mM アルギニン静止	3,57	2,65	3,24	2,95	3,54	3,40	3,53	ppt
リン酸　20 mM , pH 7.4 ＋100 mM アルギニン静止	3,51	2,68	3,27	2,92	3,6	3,41	3,76	3,94
リン酸　20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン静止	3,65	2,73	3,12	3,16	3,79	3,67	3,94	4,21
リン酸　20 mM , pH 7.4 ＋400 mM アルギニン静止	3,93	3,27	3,9	3,64	4,36	4,42	4,89	5,80
リン酸 20 mM , pH 7.4＋200 mM アルギニン+ CHAPS 0,05% 静止	2,72	2,78	2,78	2,74	2,91	2,98	3,15	3,41

表 5(b)

緩衝液	線形フィッティング	
リン酸＋50 mM アルギニン静止	y = 0,0037x + 3,1542	R2 = 0,1999
リン酸＋100 mM アルギニン静止	y = 0,0035x + 3,1827	R2 = 0,5089
リン酸＋200 mM アルギニン静止	y = 0,0043x + 3,2841	R2 = 0,565
リン酸＋400 mM アルギニン静止	y = 0,0087x + 3,7714	R2 = 0,8792
リン酸＋200 mMアルギニン+CHAPS 0,05% 静止	y = 0,0027x + 2,7739	R2 = 0,9544

（結果９および結果１０の考察）

ＬＴＫ　６３の安定性に対するＬ－アルギニンの効果が、Ｌ－アルギニンが、タンパク質沈殿に対して保護する意味で確かめられた。５０ｍＭ以上のＬ－アルギニン濃度が含まれた場合、ＬＴＫ６３沈殿に対する保護は、ＬＴＫ６３貯蔵の８ヵ月間まで得られた（表４と表５）。一方、Ｌ－アルギニンは、ＬＴＫ　６３に対して僅かな解離作用を有する（図１２と図１３を参照）。時間経過のＢ５パーセンテージにより得られた線形フィッティングのスロープ比較により、その解離はＬ－アルギニン濃度に依存していることを示している。すなわち、Ｌ－アルギニン濃度が高くなるほど、その解離が速くなる（表４および表５を参照）。しかしながら、Ｂ５パーセンテージの増加は、１ヵ月当たり約０．１％から約０．２７％の間の範囲であるので、その解離作用は許容できるものである。ＬＴＫ６３の解離に対するＣＨＡＰＳの効果もまた確認されたが（表４（ｂ）および表５（ｂ））、ＣＨＡＰＳは、タンパク質沈殿に対して完全には保護しない（表４（ａ）を参照）。ＬＴＫ　６３の濃度は、タンパク質解離および／または沈殿に対して影響が少ないと考えられる。

【０３３４】

（実施例１１　緩衝液を含有するＬ－アルギニン＋ＣＨＡＰＳ中のＬＴＫ６３安定性に対する貯蔵条件の効果）

２．０ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でのＬＴＫ　６３を、種々の濃度のＣＨＡＰＳと組み合わせた２００ｍＭＬ－アルギニンを含有する貯蔵用緩衝液中、２～８℃で静止条件および振とう条件で維持した。サンプル中のＢ５パーセンテージを、貯蔵８ヵ月間までＨＰＬＣ分析により測定した。Ｂ５パーセンテージの時間経過を実施し、線形フィッティングをプロットした。幾つかのサンプルにおいて、ＬＴＫ　６３の沈殿（ｐｐｔ）が見られた。

【０３３５】

【表６】

表 6(a)

	% $B_{5\ 214\ nm}$					
緩衝液	3 日目	10 日目	24 日目	52 日目	115 日目	243 日目
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mMアルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	3,28	3,4	3,49	3,56	3,81	4,31
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,05% 振とう	3,29	3,35	3,42	3,53	3,77	**ppt**
リン酸 20 mM , pH 7.4＋ 200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,25% 静止	3,29	3,39	3,45	3,57	3,78	4,18
リン酸 20 mM , pH 7.4＋ 200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,25% 振とう	3,24	3,37	3,4	3,55	3,83	**ppt**

表 6(b)

緩衝液	線形フィッティング	
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	y = 0,004x + 3,342	R2 = 0,9875
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋CHAPS 0,05% 振とう	y = 0,0041x + 3,3033	R2 = 0,9915
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,25% 静止	y = 0,0035x + 3,348	R2 = 0,9852
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,25% 振とう	y = 0,0049x + 3,2784	R2 = 0,9751

（結果１１の考察）

Ｌ－アルギニンおよびＣＨＡＰＳの存在下でもＬＴＫ　６３は、長期振とう貯蔵、すなわち８ヵ月後に沈殿する（表６（ａ）を参照）。しかしながら、振とうによるタンパク質解離作用はなく（図１４）、ＣＨＡＰＳ濃度（０．０５％～０．２５％の範囲で）の包含は、線形フィッティングのスロープにより測定されたとおり（表６（ｂ））、解離に対するＬＴＫ　６３の主要な保護効果を有さない。

【０３３６】

（実施例１２　Ｌ－アルギニンおよびＬ－アルギニン＋ＣＨＡＰＳ貯蔵用緩衝液におけるＬＴＫ６３安定性の比較）

２．０ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度でＬＴＫ　６３を、２００ｍＭＬ－アルギニン単独を含有する貯蔵用緩衝液中、または０．０５％ＣＨＡＰＳと組み合わせて、２～８℃で静

止条件および振とう条件で維持した。サンプル中のＢ５パーセンテージを、貯蔵７ヵ月間までＨＰＬＣ分析により測定した。Ｂ５パーセンテージの時間経過をプロットし、線形フィッティングを実施した。

【０３３７】

【表７】

表 7(a)

緩衝液	% $B_{5\ 214\ nm}$ 3 日目	18 日目	65 日目	209 日目	
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mMアルギニン静止	6,97		7,02	8,08	CHAPS無しのダイアフィルトレーション
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	5,62	5,8	5,86	6,62	
リン酸 20 mM , pH 7.4＋200 mM アルギニン＋CHAPS 0,05% 振とう	5,67	5,84	5,09	6,7	
リン酸 20 mM , pH 7.4＋200 mMアルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	5,3		6,27	7,11	CHAPS有りのダイアフィルトレーション
リン酸 20 mM , pH 7.4＋200 mMアルギニン＋ CHAPS 0,05% 振とう	5,35	6,09	6,34	7,29	

表 7(b)

緩衝液	線形フィッティング		
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン 静止	y = 0,0057x + 6,827	R2 = 0,935	CHAPS無しのダイアフィルトレーション
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	y = 0,0046x + 5,6321	R2 = 0,976	
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mMアルギニン＋ CHAPS 0,05% 振とう	y = 0,0051x + 5,4493	R2 = 0,516	
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mMアルギニン＋ CHAPS 0,05% 静止	y = 0,0083x + 5,4634	R2 = 0,930	CHAPS有りのダイアフィルトレーション
リン酸 20 mM , pH 7.4 ＋200 mM アルギニン＋ CHAPS 0,05% 振とう	y = 0,008x + 5,6758	R2 = 0,885	

（結果１２の考察）

タンパク質解離に対するＣＨＡＰＳの保護効果は、スロープの比較により示される（表６（ｂ））。しかしながら、ダイアフィルトレーションステップ時のＣＨＡＰＳの存在は、ＬＴＫ　６３の解離に対して負の効果を示しているように思われる（表６（ｂ））。

【０３３８】

（実施例４～１２の結果の概要）
我々の安定性試験により、ＬＴＫ　６３の純粋濃縮バルクは、２～８℃での沈殿および－２０℃での解離が貯蔵数ヵ月後に生じたという意味で長期不安定性（１年以上の期間に亘る）を示すことが立証された。５０ｍＭ以上の濃度での貯蔵用緩衝液中のＬ－アルギニンの包含により、８ヵ月間に亘り２～８℃の範囲の貯蔵温度でＬＴＫ　６３の沈殿が防止された。Ｌ－アルギニン自体から生じる解離作用は、極めて僅かであると思われ、Ｌ－アルギニン濃度（１ヵ月当たり約０．１％から約０．２７％の間の範囲でＢ５パーセンテージの増加）に依存する。ＣＨＡＰＳの包含により、長期貯蔵に亘るＬＴＫ　６３の沈殿は防止されない。しかしながら、少なくとも０．０５％のＣＨＡＰＳの包含により、回帰分析スロープの比較により測定された約６０～８０％のＬ－アルギニンによって生じた解離作用を減じることができる（表５（ｂ）および７（ｂ））。ＬＴＫ　６３の解離に対するＣＨＡＰＳの保護作用は、０．０５％と０．２５％との間の範囲のＣＨＡＰＳ濃度に依存するようには思われない。２種の安定化剤の組合せにより、タンパク質沈殿の防止（物理的安定化）およびタンパク質解離の防止（機能的安定化）に関して相乗効果が提供されると考えられる。

【０３３９】
（総合的概要）
新規分析法は、完全ｂＡＲＥクラスタンパク質と解離ｂＡＲＥクラスタンパク質との間を識別する非解離条件下でｂＡＲＥタンパク質サンプルを分析するために開発された。この分析法は：
（ｉ）ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の機能的完全性は、完全多量体構造の損失なしで評価でき；
（ｉｉ）ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性は、ＡＢ５タンパク質の非解離形態および解離形態について測定でき；
（ｉｉｉ）ＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する候補安定化剤の影響を測定できることから、当業界への貢献が重要となり得る。特にＡＢ５タンパク質などのｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性に対する物理的安定化剤の影響を測定できる。

【０３４０】
このような分析法の開発は、以下の理由で有利となる。

【０３４１】
第１に、現在までｂＡＲＥタンパク質の完全性を、その完全構造の損失なしで評価する分析法を利用できなかった。したがって、これは、実質的に完全ｂＡＲＥタンパク質存在を測定できる初めての方法である。

【０３４２】
第２に、これは、ｂＡＲＥタンパク質に対する機能的安定化剤が同定された初めての方法である。完全ｂＡＲＥクラスタンパク質と解離ｂＡＲＥクラスタンパク質との間を識別する非解離条件下でｂＡＲＥ分子の機能的安定性を測定する方法が、以前には利用できなかったので、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定性または完全性を維持できる安定化剤を同定できなかった。

【０３４３】
第３に、これは、選択的ｂＡＲＥ安定化剤が同定された初めての方法である。特に、ｂＡＲＥタンパク質の機能的安定化に影響を及ぼすことなくｂＡＲＥタンパク質を物理的に安定化できる安定化剤は、本明細書に開示されている。同様に、該タンパク質の物理的安定化に影響を及ぼすことなくｂＡＲＥタンパク質を機能的に安定化できる安定化剤も、開示されている。

【０３４４】
治療的有効成分として安定化ｂＡＲＥポリペプチドを含んでなる組成物およびそれらの調製に有用な方法が提供される。該組成物は、治療的有効成分としてその有効性が、ｂＡＲＥポリペプチドの凝集結果として貯蔵時に損なわれ得るｂＡＲＥタンパク質を含む安定

化されたｂＡＲＥ組成物である。したがって、本発明の安定化ｂＡＲＥ組成物は、液体製剤での貯蔵時に凝集形成を示し得るｂＡＲＥタンパク質に加えて、貯蔵時にｂＡＲＥタンパク質の凝集形成を減少させるのに十分なアミノ酸塩基量を含んでなり、該アミノ酸塩基は、任意の所与のアミノ酸が、その遊離塩基形体またはその塩形体のいずれかで存在するアミノ酸またはアミノ酸類の組合せである。該組成物は、さらにｂＡＲＥタンパク質に対して機能的安定性を付与するために有効な濃度での両性イオン性物質をさらに含んでなり得る。

【０３４５】

アミノ酸塩基は、組成物貯蔵時の凝集形成に対してｂＡＲＥポリペプチドを安定化させるのに寄与するが、両性イオン性物質の包含は、ｂＡＲＥタンパク質の完全性を保存することによって機能的安定性を付与する。ｂＡＲＥ組成物は、ｂＡＲＥポリペプチドの安定性をさらに増大させるために、他の安定化剤をさらに組み込むことができる。両性イオン性物質と組み合わせたアミノ酸塩基の添加が、これら２種の成分の組合せが無い状態で製剤化された組成物と比較して貯蔵安定性が増大したｂＡＲＥ組成物を生じるので、このようなｂＡＲＥ組成物は安定化されると言われる。

【０３４６】

組成物におけるｂＡＲＥポリペプチドの安定性増大法およびこのような組成物の貯蔵安定性増大法もまた提供される。この方法は、組成物の貯蔵時にｂＡＲＥポリペプチドの凝集形成を減少させるのに十分なアミノ酸塩基量および両性イオン性物質を組成物に組み込むことを含んでなる。この方法は、本発明の組成物調製に使用される。

【０３４７】

本明細書に引用された全ての文献は、全ての目的のために参照としてその全体が本明細書に組み込まれている。前述の発明は、理解を明瞭にする目的で幾らか詳細に記載されているが、ある一定の変更および修飾が、添付の請求項の範囲内で実行され得ることは明白である。本発明の処理および組成物双方を実施する多くの別法が存在することに注意すべきである。したがって、本実施形態は、例証として考えるべきで、限定と考えるべきではなく、また本発明は、本明細書に記載された詳細に限定すべきではなく、添付の請求項の範囲内および等価物内で修飾できる。

【図面の簡単な説明】

【０３４８】

【図１－１】図１Ａ～Ｂは，ＬＴＫ６３（AB_5タンパク質）のサンプルの調製直後およびサンプル調製５日後に、従来のＧＦ－ＨＰＬＣシステムで操作した該サンプルのクロマトグラムを示す。

【図１－２】図１Ｃは、ＬＴＫ６３サンプル調製５日後に、本発明によるＧＦ－ＨＰＬＣシステムで操作した該サンプルのクロマトグラムを示す。

【図１－３】図１Ｄは、ＴＳＫＧ３０００ＳＷｘ１での「古い」ＧＦ－ＨＰＬＣ分析およびＵｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ２５０での「新しい」ＧＦ－ＨＰＬＣ分析の２つの異なったカラムにおいて、同一の分析条件下で操作した際の、同じＬＴＫ６３サンプルに関して得られた面積および面積％の値を比較している。

【図２】図２Ａ～Ｄは、本発明によるクロマトグラフィーシステムにおけるAB_5形態およびB_5形態の選択性に及ぼすイオン強度の効果を示すクロマトグラムを示している。

【図３】図３は、以下の溶出緩衝液：ＫＰｉ２００ｍＭ＋$Na_2SO_4$１００ｍＭ；ｐＨ７．２を用いた、本発明によるクロマトグラフィーシステムにおける、部分的に解離したＬＴＫ６３サンプルのクロマトグラフィープロフィルを示している。

【図４】図４は、本発明によるクロマトグラフィーシステムにおける、部分的に解離したＬＴＫ６３サンプルのクロマトグラムを示している。特に、図４は、単一分画操作の２１４ｎｍクロマトグラムを示している。

【図５－１】図５Ａおよび５Ｂは、それぞれ、ＬＴＫ６３サンプルの画分のクロマトグラムおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥオートラジオグラムを示しており、その分離により、図４において、該タンパク質のAB_5形態およびB_5形態へのＧＦ－ＨＰＬＣ分離で得られたピー

クの帰属を検証していることが示される。
【図５－２】図５Ｃおよび５Ｄは、ＭＷが知られている標準的なタンパク質によって作成されたＵｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌカラムの検量線を示している。相当するＲ２は０．９５であった。図５Ｃは、明確なＭＷ決定のために用いられた標準的なタンパク質、ＣＲＭ１９７参照、ＬＴＫ６３、および検量線のスーパーインポジションを示している。
【図５－３】図５Ｅは、AB_5ピークの光散乱（ＬＳ）分析に相対的なデバイプロットを示している。切片はＭＷを示し、一方、最初の勾配は各スライスの半径値を示す。
【図５－４】図５Ｆ（ａ）および図５Ｆ（ｂ）は、ピークの帰属を確認するための、天然のＬＴＫ６３およびＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳにおけるＧＦ－ＨＰＬＣ分画により得られた３つのサンプルの分析を示している。
【図５－５】図５Ｇは、ピーク１のＭＳスペクトルを示している。
【図６】図６は、振とうＬＴＫ６３サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。各レーンに用いられたサンプルは、以下のとおりである：１　ＰＢＳ　Ｔ０中、ＬＴＫ６３；２　ＰＢＳ上澄み液Ｔ１中、ＬＴＫ６３；３　ＰＢＳ上澄み液Ｔ６中、ＬＴＫ６３；４　ＭＷ；５　ＮａＣｌ０．５Ｍ上澄み液Ｔ０中、ＬＴＫ６３；６　ＮａＣｌ０．５Ｍ上澄み液Ｔ１中、ＬＴＫ６３；７　ＮａＣｌ０．５Ｍ上澄み液Ｔ６中、ＬＴＫ６３；８　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．２５％　Ｔ０中、ＬＴＫ６３；９　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．２５％上澄み液Ｔ１中、ＬＴＫ６３；１０　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．２５％上澄み液Ｔ６中、ＬＴＫ６３；および１１　ＬＴＫ６３標準。
【図７】図７は、種々の濃度でのＣＨＡＰＳにより処理されたＬＴＫ６３サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。各レーンに用いられたサンプルは、以下のとおりである：１　ＭＷ検量マーカー；２　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．１％上澄み液Ｔ３中、ＬＴＫ６３；３　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．１％ペレットＴ３中、ＬＴＫ６３；４　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．２５％上澄み液Ｔ３中、ＬＴＫ６３；５　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．２５％ペレットＴ３中、ＬＴＫ６３；６　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．５％上澄み液Ｔ３中、ＬＴＫ６３；７　リン酸塩２０ｍＭ、ＣＨＡＰＳ０．５％ペレットＴ３中、ＬＴＫ６３。
【図８】図８は、１００ｍＭ　Ｌ－アルギニンによって処理されたＬＴＫ６３サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。各レーンに用いられたサンプルは、以下のとおりである：１　ＭＷ；２　リン酸塩２０ｍＭ、Ｌ－アルギニン１００ｍＭ上澄み液Ｔ１中、ＬＴＫ６３　２ｍｇ／ｍｌ；３　リン酸塩２０ｍＭ、Ｌ－アルギニン１００ｍＭペレットＴ１中、ＬＴＫ６３　２ｍｇ／ｍｌ；４　リン酸塩２０ｍＭ、Ｌ－アルギニン１００ｍＭ上澄み液Ｔ１中、ＬＴＫ６３　４ｍｇ／ｍｌ、リン酸塩２０ｍＭ、Ｌ－アルギニン１００ｍＭペレットＴ１中、ＬＴＫ６３　４ｍｇ／ｍｌ。
【図９ａ】図９（ａ）は、古くから知られたＨＰＬＣ法を用いたＬ－アルギニン振とうＬＴＫ６３サンプルの分析を示している。
【図９ｂ】図９（ｂ）は、新しいＨＰＬＣ法を用いたＬ－アルギニン振とうＬＴＫ６３サンプルの分析を示している。
【図１０ａ】図１０（ａ）は、新しいＨＰＬＣ法を用いた、Ｌ－アルギニンサンプル中のＡＢ５の解離および１．３ｍｇ／ｍｌでのＬＴＫ６３におけるＢ５％の決定を示している。
【図１０ｂ】図１０（ｂ）は、新しいＨＰＬＣ法を用いた、Ｌ－アルギニンサンプル中のＡＢ５の解離および４．０ｍｇ／ｍｌでのＬＴＫ６３におけるＢ５％の決定を示している。
【図１１ａ】図１１（ａ）は、ＬＴＫ６３の解離に及ぼすＣＨＡＰＳを含める効果を示している。
【図１１ｂ】図１１（ｂ）は、ＬＴＫ６３の解離に及ぼすＬ－アルギニンと組み合わせてＣＨＡＰＳを含める効果を示している。
【図１２】図１２は、１．３ｍｇのタンパク質濃度における、ＬＴＫ６３の安定性に及ぼすＬ－アルギニンおよびＣＨＡＰＳの効果を示している。

【図１３】図１３は、４．０ｍｇのタンパク質濃度における、ＬＴＫ６３の安定性に及ぼすＬ－アルギニンＬ－アルギニン／ＣＨＡＰＳの組み合わせの効果を示している。
【図１４】図１４は、Ｌ－アルギニン＋ＣＨＡＰＳ含有緩衝液中のＬＴＫ６３安定性に及ぼす貯蔵条件の効果を示している。
【図１５】図１５は、Ｌ－アルギニンおよびＬ－アルギニン＋ＣＨＡＰＳ貯蔵緩衝液におけるＬＴＫ６３安定性の比較を示している。
【図１６】図１６は、ＣＨＡＰＳやＣＨＡＰＳＯなどの両性イオン性界面活性剤の構造を示している。
【図１７】図１７は、多くの両性イオン性界面活性剤についての知見を示している。

【図１－１】

	サンプル名	注入量	チャネル	希釈
1	PBS中のK63	100,00	214nm	4,00
2	Chaps 0,25%中のK63	100,00	214nm	4,00
3	クエン酸中のK63	100,00	214nm	4,00

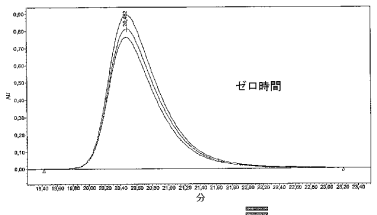


Figure 1A

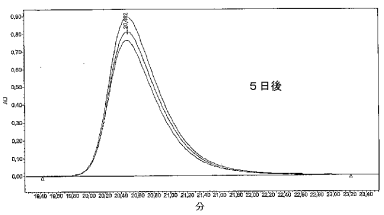
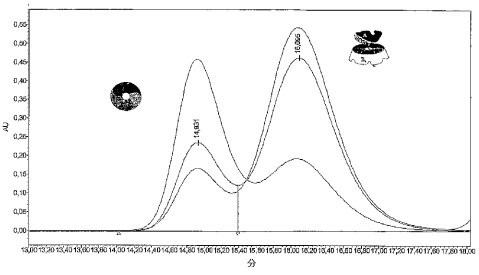


Figure 1B

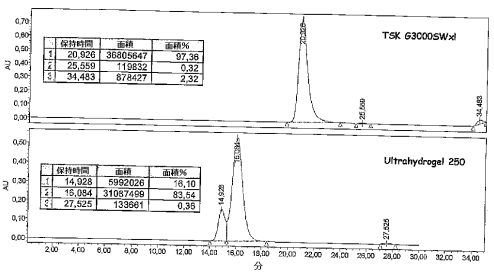
【図１－２】

Figure 1C



【図１－３】

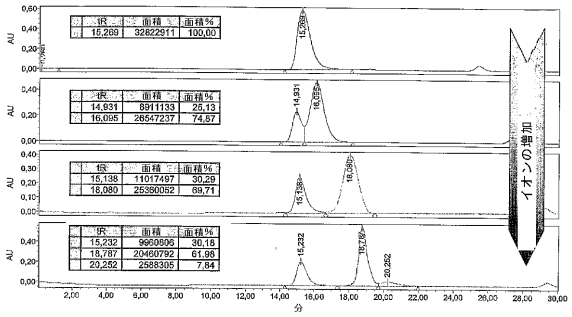
Figure 1D



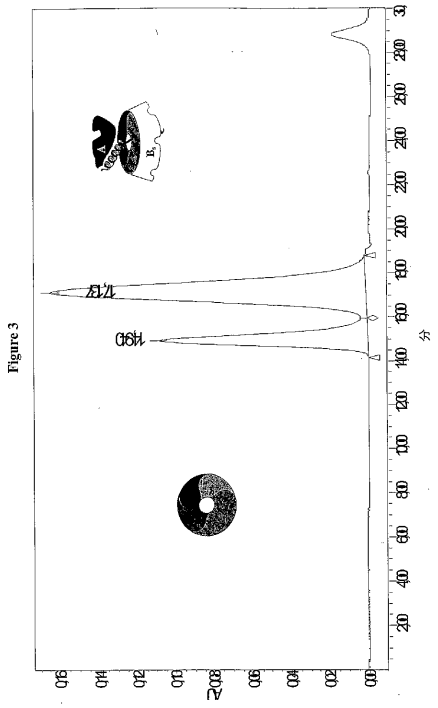
【図２】

Figures 2A-2D

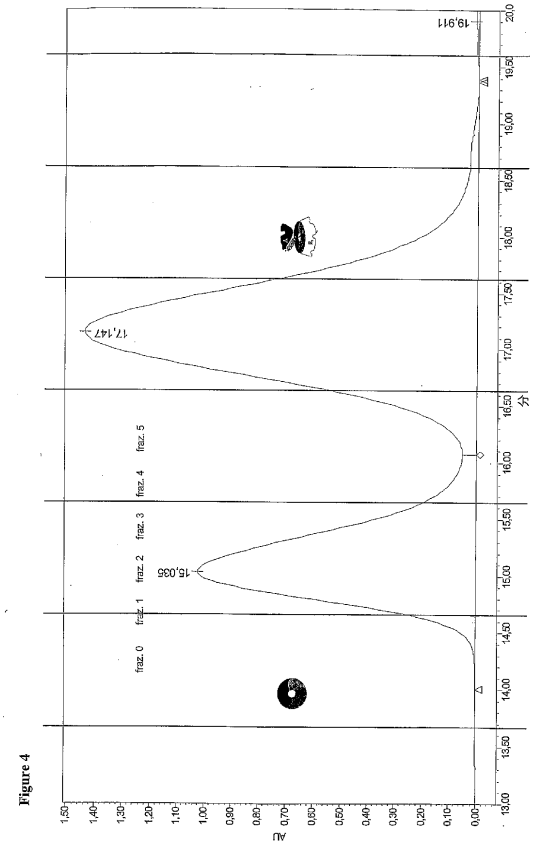
	サンプル名	入手日	溶離液	注入量	チャネル	希釈
1	PBS 6gg agitazione	08/04/2003 9.55.19	KPI 50 mM + Na2SO4 50 mM pH 7,2	100,00	214nm	4,00
2	PBS 6gg agitazione	08/04/2003 13.53.06	KPI 100 mM + Na2SO4 100 mM pH 7,2	100,00	214nm	4,00
3	PBS 5gg agitazione	09/04/2003 15.07.11	KPI 250 mM + Na2SO4 100 mM pH 7,2	100,00	214nm	4,00
4	PBS 5gg agitazione	10/04/2003 9.51.42	KPI 200 mM + Na2SO4 200 mM pH 7,2	100,00	214nm	4,00



【図３】



【図４】



【図５－１】

Figure 5A

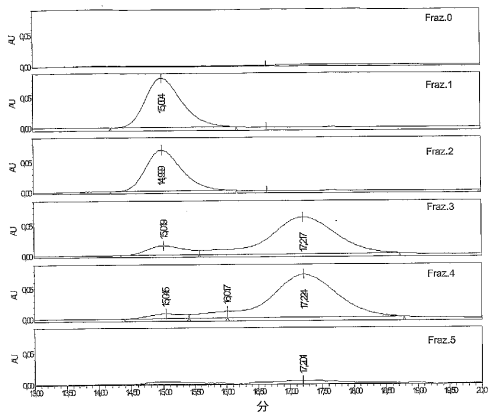
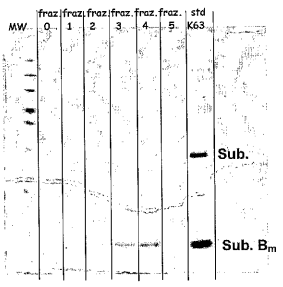


Figure 5B

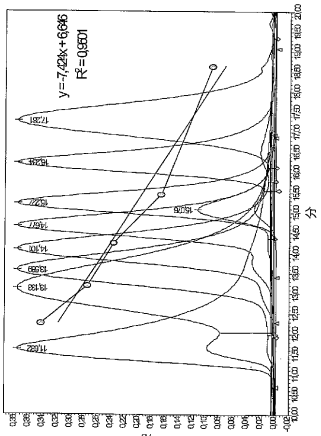


【図５－２】

Figure 5D

標準タンパク質	保持時間（分）	分子量(Da)
チログロブリン（ウシ）	11,62	669.000
アポフェリチン	13,13	476.316
Ｂ－アミラーゼ	13,58	224.340
アルコールデヒドロゲナーゼ	14,10	146.980
BSA	14,67	66.800
炭酸脱水酵素	16,22	29.023
サンプルタンパク質	保持時間（分）	分子量実験値
CRM	15,23	57.099
K63 AB_5	17,26	9.611
K63 B_5	15,07	65.607

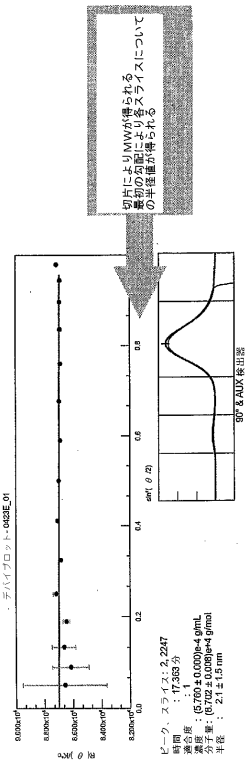
Figure 5C



標準蛋白質のスーパーインポジション、CRM197参照（青太字）、K63（赤太字）
見かけの分子量決定に用いられた保量線

【図５－３】

Figure 5E



【図５－４】

Figure 5F(b)

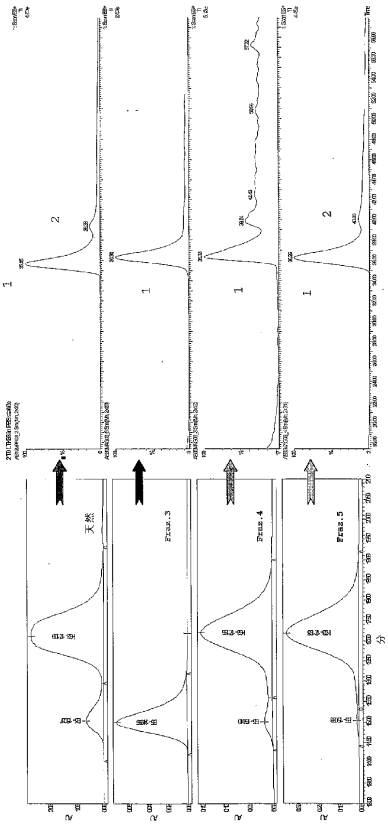
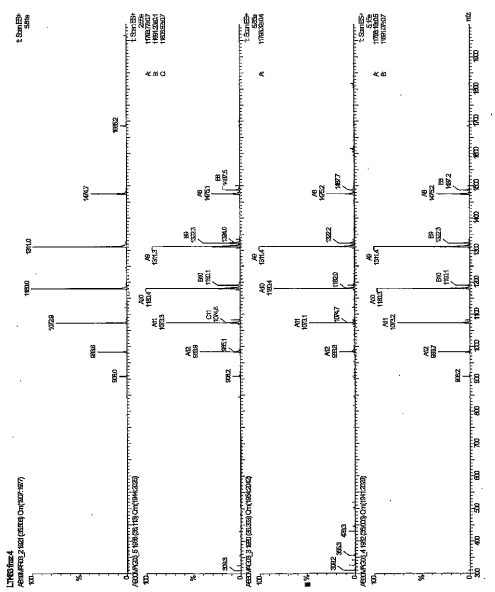


Figure 5F (a)

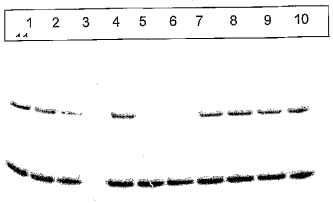
【図５Ｇ】

Figure 5G



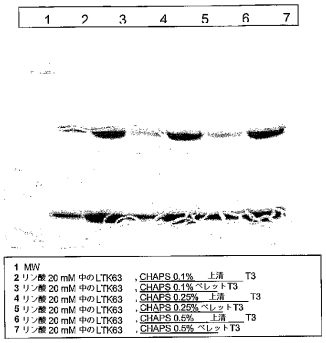
【図６】

Figure 6: LTK 63振とうサンプルのSDS-PAGE分析



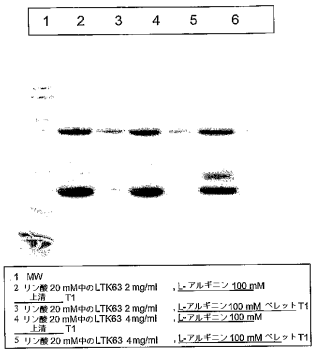
【図７】

Figure 7: CHAPSで処理されたLTK 63サンプルのSDS-PAGE分析



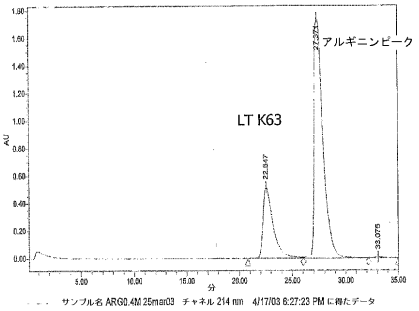
【図８】

Figure 8: Ｌ－アルギニンで処理されたLTK63サンプルのSDS-PAGE



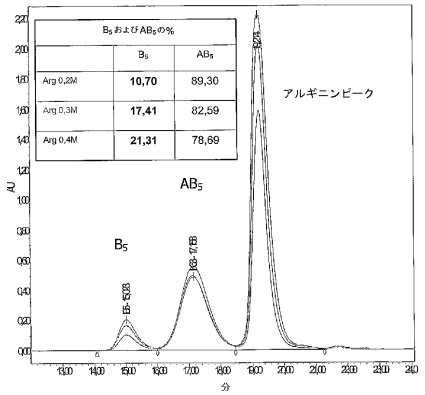
【図９ａ】

Figure 9(a): Ｌ－アルギニン処理サンプルを分析するための旧ＨＰＬＣ法



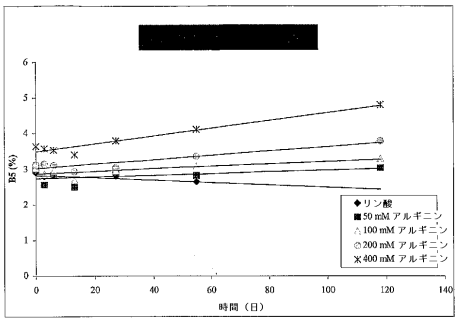
【図９ｂ】

Figure 9(b): Ｌ－アルギニン処理サンプルを分析するための新ＨＰＬＣ法



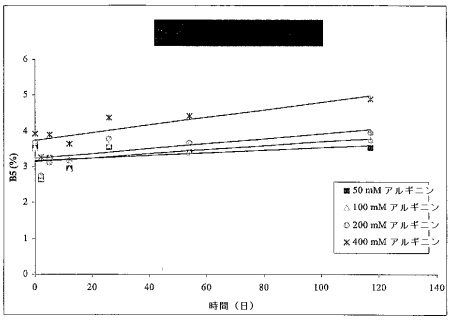
【図１０ａ】

Figure 10(a): Ｌ－アルギニン処理サンプル中のＡＢ５解離の測定および１．３ｍｇ／ｍｌのＬＴＫ６３中のＢ５％



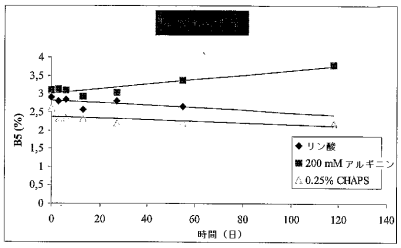
【図１０ｂ】

Figure 10(b): Ｌ－アルギニン処理サンプル中のＡＢ５解離の測定および４．０ｍｇ／ｍｌのＬＴＫ６３中のＢ５％



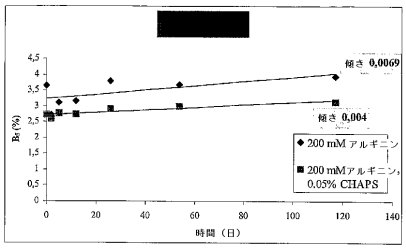
【図１１ａ】

Figure 11(a): LTK63 解離に対するCHAPS効果



【図１１ｂ】

Figure 11(b): LT K63 解離に対する、Ｌ－アルギニンと組み合わせたCHAPS効果



【図１２】

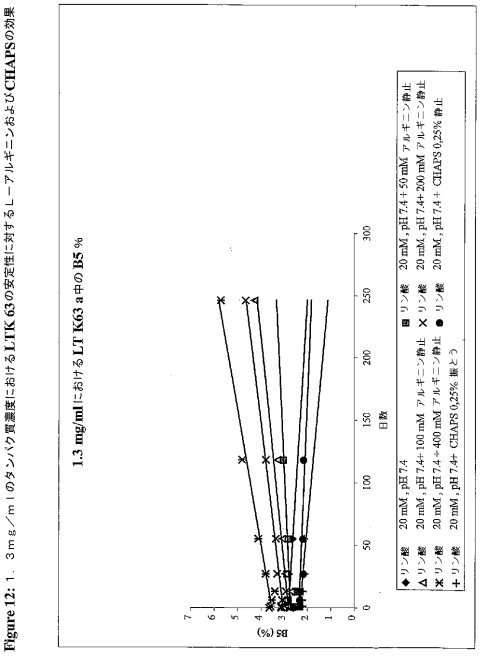


Figure 12: １．３ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度におけるLTK 63の安定性に対するＬ－アルギニンおよびCHAPSの効果

【図１３】

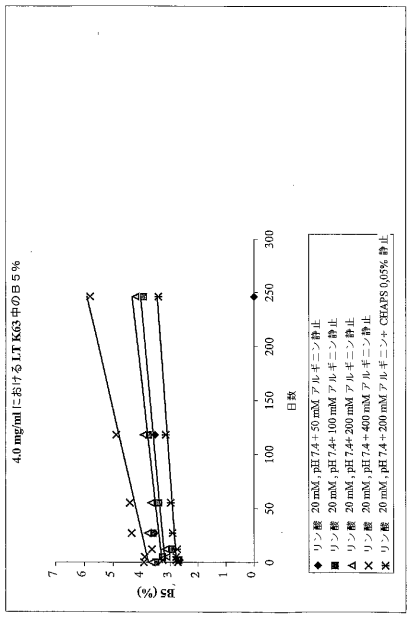
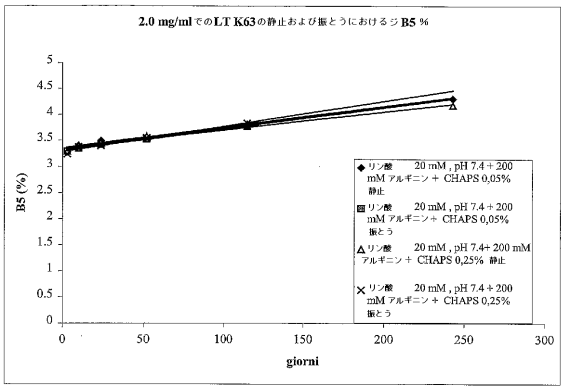


Figure 13: ４．０ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度におけるLTK 63 安定性に対するＬ－アルギニンおよびＬ－アルギニン／ＣＨＡＰＳ組合せの効果

【図１４】

Figure 14 Ｌ－アルギニン＋CHAPS含有緩衝液中のLTK 63 安定性に対する保存条件の効果



【図１５】

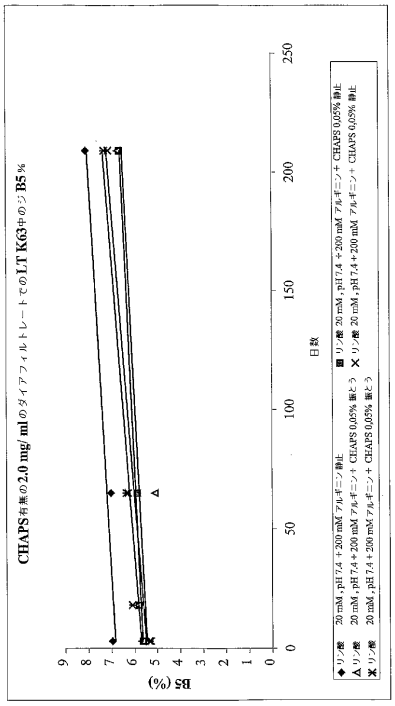
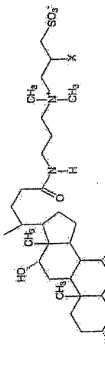


Figure 15: L－アルギニンおよびL－アルギニン＋CHAPS保存緩衝液に対するLTK 63安定性の比較

【図１６】

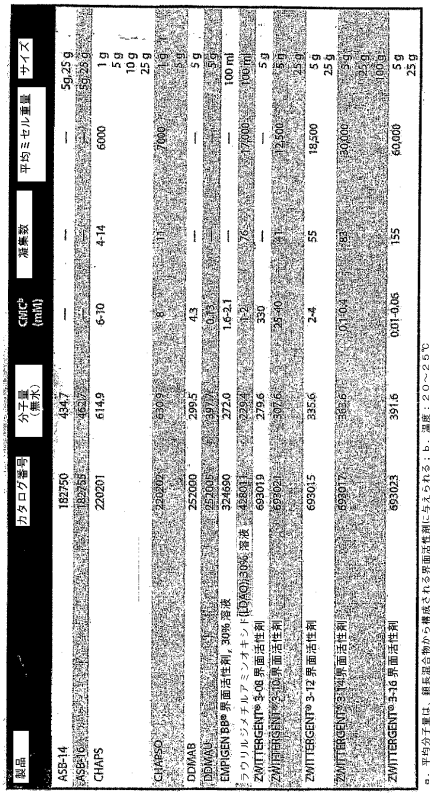
Figure 16

表２．界面活性剤の構造および分類（続き）

両性界面活性剤		EMPIGEN BB®（n－ドデシル－N,N－ジメチルグリシン）
		x = 7, ZWITTERGENT® 3-08 x = 9, ZWITTERGENT® 3-10 x = 11, ZWITTERGENT® 3-12 x = 13, ZWITTERGENT® 3-14 x = 15, ZWITTERGENT® 3-16
		x = H, CHAPS x = OH, CHAPSO

【図１７】

Figure 17



製品	約多ロブ番号	分子量（概算）	CMC[a] (mM)	凝集数	平均ミセル重量	サイズ
ASB-14	182750	434.7	—	—	—	5g-25 g
ASB-16	182765	462.7	—	—	—	5g-25 g
CHAPS	220201	614.9	6-10	4-14	6000	1 g 5 g 10 g 25 g
CHAPSO	220205	630.9	8	11	7000	1 g 5 g
DDMAB	252000	299.5	4.3	—	—	5 g
DDMAO	252005	327.5	0.13	—	—	5 g
EMPIGEN BB® 界面活性剤，30%溶液	324690	272.0	1.6-2.1	—	—	100 ml
ラウリルジメチルアミンオキシド（LDAO）30%溶液	436011	229.4	1-2	75--	17000	100 ml
ZWITTERGENT® 3-08 界面活性剤	693010	279.4	330	—	—	5 g
ZWITTERGENT® 3-10 界面活性剤	693021	307.5	35-40	41	12,500	5 g
ZWITTERGENT® 3-12 界面活性剤	693015	335.6	2-4	55	18,500	5 g 25 g
ZWITTERGENT® 3-14 界面活性剤	693017	363.6	0.1-0.4	183	60000	5 g 25 g
ZWITTERGENT® 3-16 界面活性剤	693023	391.6	0.01-0.06	155	60,000	5 g 25 g

a．平均分子量は、銘柄混合物から構成される界面活性剤に与えられる；b．温度：20～25℃

商標

BRIJ® および TWEEN® は、ICI Americas, Inc. の登録商標である。
EMPIGEN BB® は、Albright & Wilson の登録商標である。
GENAPOL® は、Hoechst AG の登録商標である。
ULTROL® PROTEIN GRADE® および ZWITTERGENT® は、Calbiochem-Novabiochem Corporation の登録商標である。
CALBIOSORB™ 吸着剤 および ELUGENT™ 界面活性剤 は、Calbiochem-Novabiochem Corporation のトレードマークである。
LUBROL® は、Imperial Chemical Inc. の登録商標である。
PLURONIC® は、Wyandotte Chemicals Corporation. の登録商標である。
TRITON X® は、Rohm and Haas. の登録商標である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/035039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/195 C07K14/245 A61K39/39 A61K39/02 G01N33/483

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K G01N

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/044939 A1 (PIZZA MARIAGRAZIA ET AL) 18 April 2002 (2002-04-18)	1,2,7, 12-15, 19, 25-28, 43-48
A	paragraph '0030! the whole document	3-6, 8-11, 16-18, 20-24, 29-39, 49-60

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
14 April 2005	02/05/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Favre, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/035039

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRONK S E ET AL: "HEAT-LABILE ENTEROTOXIN OF ESCHERICHIA-COLI CHARACTERIZATION OF DIFFERENT CRYSTAL FORMS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 260, no. 25, 1985, pages 13580-13584, XP002323951 ISSN: 0021-9258 abstract; table II	1,2,7, 12-15, 19, 25-28, 43-48
A	the whole document	3-6, 8-11, 16-18, 20-24, 29-39, 49-60
A	WANG WEI: "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (AMSTERDAM), vol. 185, no. 2, 20 August 1999 (1999-08-20), pages 129-188, XP002323952 ISSN: 0378-5173 cited in the application page 177, column 2, paragraph 3 - page 178, column 2, paragraph 2	1-39, 43-60
A	GLENN G M ET AL: "Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 67, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 1100-1106, XP002110054 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-39, 43-60
A	KRUEGER K M ET AL: "THE FAMILY FO BACTERIAL ADP-RIBOSYLATING EXOTOXINS" CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, WASHINGTON, DC, US, vol. 8, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 34-47, XP001146599 ISSN: 0893-8512 the whole document	1-39, 43-60

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/035039

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 47-48
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 47 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 40-42
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004 /035039

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 47 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 40-42

Claims 40-42, which relate to stabilising agents identified by the (screening) methods of claims 37-39, are "reach-through" claims which attempt to define a product by an effect to be achieved. Such a definition is in fact a mere statement of the problem underlying the claims and is not considered to be a clear definition in the sense of Article 6 PCT. Moreover, the skilled person would have to characterise all potential agonists / antagonists, without any effective pointer to their identity and to test every known compound, as well as every conceivable future compound, for this activity to see if it falls within the scope of the claims. Moreover, the description does not provide any meaningfull disclosure of suitable compounds identified by the method of claims 37-39.
Hence, it cannot ascertain whether or not a particular product falls within the scope of claims 40-42, so that a meaningfull search of the subject-matter of said claims 40-42 is not possible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/035039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2002044939 A1	18-04-2002	IT	1253009 B	10-07-1995
		US	2004137017 A1	15-07-2004
		AU	6238896 A	05-02-1997
		EP	0835314 A1	15-04-1998
		WO	9702348 A1	23-01-1997
		AT	177145 T	15-03-1999
		AT	277183 T	15-10-2004
		AU	3347693 A	28-07-1993
		CA	2127091 A1	08-07-1993
		DE	69228563 D1	08-04-1999
		DE	69228563 T2	29-07-1999
		DE	69233417 D1	28-10-2004
		DK	620850 T3	27-09-1999
		WO	9313202 A1	08-07-1993
		EP	1484404 A1	08-12-2004
		EP	0620850 A1	26-10-1994
		EP	0869181 A1	07-10-1998
		ES	2127808 T3	01-05-1999
		GR	3029556 T3	30-06-1999
		JP	7506240 T	13-07-1995
		JP	3394774 B2	07-04-2003
		JP	2003000287 A	07-01-2003
		MX	9207685 A1	31-05-1994
		SG	48217 A1	17-04-1998
		SG	93200 A1	17-12-2002
		US	6149919 A	21-11-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 31/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 31/00		
Ａ６１Ｐ 11/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 9/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 9/00		
Ａ６１Ｐ 9/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 9/10	１０１	
Ａ６１Ｐ 9/14	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 9/14		
Ａ６１Ｐ 11/06	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 19/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 27/16	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 27/16		
Ａ６１Ｐ 35/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 25/28	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 25/28		
Ａ６１Ｐ 25/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 27/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｐ 15/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 15/00		
Ａ６１Ｐ 13/08	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 13/08		
Ａ６１Ｐ 1/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 1/00		
Ａ６１Ｐ 13/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 13/02		
Ａ６１Ｋ 39/39	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 39/39		
Ｃ０７Ｋ 14/195	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ 14/195		

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

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 マガグノリ, クラウディア
イタリア国 イ－５３１００ シエナ, ビア フィオレンティーナ １
(72)発明者 モランディー, マウリジオ
イタリア国 イ－５３１００ シエナ, ビア フィオレンティーナ １

Ｆターム(参考) 4C076 AA11 CC06 CC07 CC31 DD51Q DD57 FF11 FF36 FF63
4C084 AA02 AA03 BA44 CA04 NA03 ZA02 ZA16 ZA33 ZA36 ZA44
ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZB07 ZB11 ZB26 ZB32
4C085 AA03 BA07 BB11 CC07 DD13 EE01
4H045 AA30 BA72 CA11 DA83 DA86 EA29 EA31 FA71 GA45