

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4620251号
(P4620251)

(45) 発行日 平成23年1月26日 (2011. 1. 26)

(24) 登録日 平成22年11月5日 (2010. 11. 5)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 39/39 (2006. 01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 51 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2000-564661 (P2000-564661)	(73) 特許権者	504371365
(86) (22) 出願日	平成11年8月6日 (1999. 8. 6)		アンチジェニックス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2002-522510 (P2002-522510A)		ANTIGENICS INC.
(43) 公表日	平成14年7月23日 (2002. 7. 23)		アメリカ合衆国02421マサチューセツ州レキシントン、フォーブス・ロード3番
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/017956		
(87) 国際公開番号	W02000/009159	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成12年2月24日 (2000. 2. 24)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成18年8月4日 (2006. 8. 4)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	60/095, 913		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成10年8月10日 (1998. 8. 10)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	60/128, 608	(74) 代理人	100127638
(32) 優先日	平成11年4月8日 (1999. 4. 8)		弁理士 志賀 美苗
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C P Gおよびサポニンアジュバントの組成物並びにその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 抗原；

(b) 免疫アジュバント活性を有するキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(c) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、
を含むワクチン組成物。

【請求項 2】

サポニンが1以上の実質上純粋なサポニンである、請求項1に記載のワクチン組成物。

【請求項 3】

1以上の実質上純粋なサポニンがQ S - 7、Q S - 1 7、Q S - 1 8、Q S - 2 1、Q S - 2 1 - V 1またはQ S - 2 1 - V 2またはそれらの2以上の組合せである、請求項2に記載のワクチン組成物。

【請求項 4】

実質上純粋なサポニンがQ S - 2 1である、請求項3に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが修飾されている、請求項1 - 4いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが少なくとも1つのホスホロチオエート修飾されたヌク

10

20

レオチドで修飾されている、請求項 5 に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、式 $5' X_1 C G X_2 3'$ を有する CpG モチーフ
[ここで、少なくとも 1 つのヌクレオチドが連続する CpG を分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである] を含む、請求項 1 - 6 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

CpG モチーフが

T C T C C C A G C G T G C G C C A T

または

T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T

を含む、請求項 7 に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

該組成物が抗原に対する免疫応答をさらに増大させる、請求項 1 - 8 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

該組成物がさらに抗原に対する抗体産生を増強する、請求項 1 - 8 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

該組成物が正の相乗作用で抗原に対する抗体の産生をさらに増強する、請求項 1 - 8 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

該組成物が細胞性免疫をさらに増強する、請求項 1 - 8 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 13】

抗原が、蛋白、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、磷脂質、または該蛋白もしくはペプチドをコードしている核酸を含む、請求項 1 - 12 いずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

個体における抗原に対する免疫応答を増大させるために使用するための請求項 1 - 13 いずれかに記載のワクチン組成物を含む医薬。

【請求項 15】

個体に、非経口、静脈内、筋肉内、または皮下により投与される請求項 14 に記載の医薬。

【請求項 16】

(a) 免疫アジュバント活性を有する キラヤ・サポナリア サポニン；および、
(b) 少なくとも 1 つの非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、
を含み、ここで、免疫刺激性オリゴヌクレオチドが DNA ワクチンベクターの一部ではない、免疫アジュバント組成物、または、

(a) 免疫アジュバント活性を有する キラヤ・サポナリア サポニン；および、

(b) 少なくとも 1 つの非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、
を含み、ここで、サポニンが 1 以上の実質上純粋な QS-7、QS-17 または QS-18 である、免疫アジュバント組成物、または、

(a) 免疫アジュバント活性を有する キラヤ・サポナリア サポニン；および、

(b) 少なくとも 1 つの非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、
を含み、ここで、免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、

T C T C C C A G C G T G C G C C A T

または

10

20

30

40

50

T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T

を含む、免疫アジュバント組成物、または、

(a) 免疫アジュバント活性を有し、化学的に修飾されているキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(b) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

を含む、免疫アジュバント組成物。

【請求項17】

(a) 免疫アジュバント活性を有するキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(b) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

を含み、ここで、免疫刺激性オリゴヌクレオチドがDNAワクチンベクターの一部ではない、請求項16に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項18】

(a) 免疫アジュバント活性を有するキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(b) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

を含み、ここで、サポニンが1以上の実質上純粋なQ S - 7、Q S - 17またはQ S - 18である、請求項16に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項19】

(a) 免疫アジュバント活性を有するキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(b) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

を含み、ここで、免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、

T C T C C C A G C G T G C G C C A T

または

T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T

を含む、請求項16に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項20】

(a) 免疫アジュバント活性を有し、化学的に修飾されているキラヤ・サポナリアサポニン；および、

(b) 少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

を含む、請求項16に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項21】

サポニンが化学的に修飾されているサポニンである、請求項17または18に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項22】

サポニンが請求項1、2、3、または4のいずれかに規定されるものである、請求項17および19 - 21のいずれかに記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項23】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが請求項7または8に規定されるものである、請求項17、18、20 - 22のいずれかに記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項24】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが修飾されている請求項17 - 23のいずれかに記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項25】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが少なくとも1つのホスホロチオエート修飾されたヌクレオチドで修飾されている、請求項24に記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項26】

10

20

30

40

50

ヒトに投与される場合、該組成物が投与された抗原に対するヒトの免疫応答を増大させるか、または、動物に投与される場合、該組成物が投与された抗原に対する動物の免疫応答を増大させる、請求項 1 6－2 5 いずれかに記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項 2 7】

抗原が、蛋白、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、磷脂質、または該蛋白もしくはペプチドをコードしている核酸を含む、請求項 1 6－2 6 いずれかに記載の免疫アジュバント組成物。

【請求項 2 8】

抗原が投与された個体において抗原に対する免疫応答を増大するために用いられる請求項 1 6－2 7 いずれかに記載の免疫アジュバント組成物を含む医薬。

10

【請求項 2 9】

個体に、非経口、静脈内、筋肉内、または皮下により投与される請求項 2 8 に記載の医薬。

【請求項 3 0】

(i) 抗原、

(i i) 免疫アジュバント活性を有する キラヤ・サポナリアサポニン、および、

(i i i) 少なくとも 1 つの非メチル化 C p G ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド、

の、個体における該抗原に対する免疫応答を増大させるためのワクチン組成物の調製のための使用。

20

【請求項 3 1】

サポニンが請求項 1、2、3、または 4 のいずれかに規定されるものである、請求項 3 0 に記載の使用。

【請求項 3 2】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが修飾されており、ワクチン組成物が、個体に、非経口、静脈内、筋肉内、または皮下により投与される請求項 3 0 または 3 1 に記載の使用。

【請求項 3 3】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つのホスホロチオエート修飾されたヌクレオチドで修飾されている、請求項 3 2 に記載の使用。

【請求項 3 4】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが請求項 7 または 8 に規定されるものである、請求項 3 0－3 3 のいずれかに記載の使用。

30

【請求項 3 5】

抗原が、蛋白、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、磷脂質、または該蛋白もしくはペプチドをコードしている核酸を含む、請求項 3 0－3 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 6】

ワクチン組成物が、抗原に対する抗体産生を増強するために用いられる請求項 3 0－3 5 いずれかに記載の使用。

【請求項 3 7】

ワクチン組成物が、正の相乗作用で抗体の産生をさらに増強するために用いられる、請求項 3 6 に記載の使用。

40

【請求項 3 8】

ワクチン組成物が、細胞性免疫をさらに増強する、請求項 3 0－3 5 いずれかに記載の使用。

【請求項 3 9】

(i) 免疫アジュバント活性を有する キラヤ・サポナリアサポニン、および、

(i i) 少なくとも 1 つの非メチル化 C p G ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドの、

抗原が投与された個体における抗原に対する免疫応答を増大させるための免疫アジュバント組成物を調製するための使用。

50

【請求項 40】

サポニンが請求項 1、2、3、または 4 のいずれかに規定されるものである、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが修飾されており、免疫アジュバント組成物が、個体に、非経口、静脈内、筋肉内、または皮下により投与される請求項 39 または 40 に記載の使用。

【請求項 42】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つのホスホロチオエート修飾されたヌクレオチドで修飾されている、請求項 41 に記載の使用。

10

【請求項 43】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、式 $5' X_1 C G X_2 3'$ を有する CpG モチーフ [ここで、少なくとも 1 つのヌクレオチドが連続する CpG を分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである] を含む、請求項 39 - 42 のいずれかに記載の使用。

【請求項 44】

CpG モチーフが

T C T C C C A G C G T G C G C C A T

または

T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T

20

を含む、請求項 43 に記載の使用。

【請求項 45】

抗原が、蛋白、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、磷脂質、または該蛋白もしくはペプチドをコードしている核酸を含む、請求項 39 - 44 のいずれかに記載の使用。

【請求項 46】

免疫アジュバント組成物が抗原の投与の 2 日以内に個体に投与されるものであり、免疫アジュバント組成物が、個体に、非経口、静脈内、筋肉内、または皮下により投与される請求項 39 - 45 のいずれかに記載の使用。

【請求項 47】

免疫アジュバント組成物が抗原と同時に個体に投与される請求項 46 に記載の使用。

30

【請求項 48】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが 5 - 40 塩基長である、請求項 1 - 13 のいずれかに記載のワクチン組成物、請求項 17 - 27 のいずれかに記載の免疫アジュバント組成物、請求項 14、15、28、または 29 の何れかに記載の医薬、あるいは、請求項 30 - 47 のいずれかに記載の使用。

【請求項 49】

サポニンが化学的に修飾されたサポニンである請求項 1 - 13 のいずれかに記載のワクチン組成物、または、請求項 30 - 47 のいずれかに記載の使用。

【請求項 50】

ヒトに投与される場合、該組成物が抗原に対するヒトの免疫応答を増大させるか、または、動物に投与される場合、該組成物が抗原に対する動物の免疫応答を増大させる、請求項 1 - 13 のいずれかに記載のワクチン組成物、または、請求項 30 - 47 のいずれかに記載の使用。

40

【請求項 51】

個体がヒトである、請求項 14、15、28、または 29 の何れかに記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、免疫アジュバントおよびワクチンの分野におけるものである。本発明に係る組成物は、免疫を刺激し、細胞性免疫を増強し、そして抗体産生を増強する。

50

【0002】

発明の背景

アジュバントサポニンとは、南アメリカ産の樹木 *Quillaja saponaria* Molina の樹皮の水溶性抽出物から同定され精製された。分離可能であった22のサポニンのピークのうち、より支配的な精製サポニンが、QS-7、QS-17、QS-18、およびQS-21（各々、QA-7、QA-17、QA-18、およびQA-21としても知られる）として同定された。これらのサポニンは高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）、低圧液体シリカクロマトグラフィー、および親水性相互作用クロマトグラフィー（「HILIC」）を包含する様々な方法によって実質上精製されている。実質上純粋なサポニンは、個体の免疫反応を増強するための免疫アジュバントとして有用であることが判明している（Kensil等、米国特許第5057540号；Kensil等、J. Immunol. 148：2357（1991）；Marciani等、Vaccine 9：89（1991））。

10

【0003】

近年、特定の配列部分またはモチーフ中の非メチル化シトシン-グアニン（「CpG」）ジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが、インビトロにおいて幾つかのタイプの免疫細胞の強力な刺激物質であることが示された（Weiner等、Proc. Natl. Acad. Sci. 94：10833（1997））。非メチル化CpGモチーフを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、免疫刺激反応を常に誘発しサイトカインを放出する、このオリゴヌクレオチド内のジヌクレオチドである。CpGモチーフは、Tヘルパー1（「Th1」）サイトカインインターロイキン（「IL」）12を包含する幾つかのサイトカインを産生することのできる、単球、マクロファージ、および樹状細胞を刺激することができる（Carson等、J. Exp. Med. 186：1621（1997））。この効果はナチュラルキラー細胞によるIFN- γ 分泌の誘導を引き起こし、次いでこれがマクロファージを活性化し、Tヘルパー細胞免疫および分化の特徴である、免疫グロブリンイソタイプのIgG2aへの切り替えを促進する（Chu等、J. Exp. Med. 186：1623（1997））。Klinman等は、2個の5'プリン（GpAまたはApA）および2個の3'ピリミジン（TpCまたはTpT）の隣接している非メチル化CpGジヌクレオチドで構成されるDNAモチーフが、インビトロおよびインビボの両方で、B細胞を最適に刺激してIL-6およびIL-12を産生させ、そしてCD4+ T細胞を刺激してIL-6およびIFN- γ を産生させることを示した（Klinman等、Proc. Natl. Acad. Sci. 93：2879（1996））。Davis等は、少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む核酸は、対象の免疫反応に影響を及ぼし得ることを発見した（Davis等、WO98/40100、PCT/US98/04703）が、この内容は引用により本明細書の一部とする。

20

30

【0004】

発明の要約

免疫は、或る種の微生物による感染に対する防御反応において重要な役割を演じることから、免疫を安全に誘導する他の新規なアジュバントの特性解明に対する必要性が存在する。このようなアジュバントは将来人間のワクチンに組み入れられる可能性があり得る。驚くべき事に、少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドおよびサポニンアジュバントの組み合わせが、いずれのアジュバント単独に比較しても強力な細胞性免疫の刺激物質であることが判明した。ワクチン接種に応答した抗体価（抗原特異的）は、サポニンまたはCpGのいずれか単独と比較して、CpG含有オリゴヌクレオチド/サポニンアジュバント配合物を含むワクチンについて著しく高く、正の相乗的アジュバント効果を示した。総合すると、これらの結果は、少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびサポニンアジュバントを含む免疫アジュバント組成物は、免疫を誘導するワクチンのための候補アジュバント組成物であることを立証している。従って、本発明は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、サポニンアジュバント、および抗原を含む新規なワクチン組成物を提供するものである。本発明に係るワクチン組成物および/または免疫アジュバント組成物を投与することによる

40

50

、抗原に対する免疫反応を増大させる方法は、本明細書に記載する別の態様である。

【0005】

図面の説明

図1は、CTL誘導によって証明される、QS-21およびCpGオリゴヌクレオチド／QS-21配合物による、細胞性免疫反応の増強を示すグラフを示している。

【0006】

図2は、CTL誘導によって証明される、QS-21およびCpGオリゴヌクレオチド／QS-21配合物による、細胞性免疫反応の増強を示すグラフを示している。

【0007】

図3は、増強された抗体産生、特にTh1サイトカインにより影響を受けるIgG2aのような抗体サブクラスの産生増強の棒グラフを示している。 10

【0008】

図4は、0日目に最初の免疫を行った後、21日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG1力価の棒グラフを示している。

【0009】

図5は、0日目に最初の免疫を行った後、21日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG2a力価の棒グラフを示している。

【0010】

20

図6は、0日目に最初の免疫を行った後、21日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG3力価の棒グラフを示している。

【0011】

図7は、最初の免疫の28日後に行われた2回目の免疫の14日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG1力価の棒グラフを示している。

【0012】

図8は、最初の免疫の28日後に行われた2回目の免疫の14日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG2a力価の棒グラフを示している。 30

【0013】

図9は、最初の免疫の28日後に行われた2回目の免疫の14日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および／または配合のQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌14型多糖類に対し特異的なIgG3力価の棒グラフを示している。

【0014】

好ましい態様の説明

本明細書中使用する「サポニン」という語は、水溶液において泡を生成し、殆どの場合溶血性を有し、そして免疫アジュバント活性を有する、グリコシド性トリテルペノイド化合物を包含する。本発明は、サポニン自体、並びに天然のおよび薬学上許容し得る塩および薬学上許容し得る誘導体を包含する。「サポニン」という語はさらに、生物学的に活性なそのフラグメントをも包含する。 40

【0015】

本発明に係るサポニンは、樹木Quillaja saponaria Molinaから取得することができる(Dalsgaard、Acta Veterinaria Scandinavica、69：1(1978))。Dalsgaardによる記載のように製造された部分精製されたサポニンに富む抽出物(「Quil-A」)はアジュバント活性を有する。このような抽出物はさらに分離することができる。分離可能であった22のサポニンのピークのうち、より支配的な精製サポニンが、QS-7、QS-17、QS-18、およびQS-21(各々、QA-7、QA-17、QA-18 50

、およびQ A-21としても知られる)として同定された(Kensil等、米国特許第5057540号)。これらのサポニンは、HPLC、低圧液体シリカクロマトグラフィー、およびHILICを包含する様々な方法によって実質上精製された。

【0016】

Kensil等の米国特許第5057540号(これは引用によりその全内容を本明細書の一部とする)に記載のように、このようなサポニンのアジュバント活性は、当業者にとって既知の幾つかの方法のいずれかによって測定することができる。アジュバントを投与した時の特異的抗原に対する抗体の抗体価の増加を、アジュバント活性の基準として使用することができる(Bomford、Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 77:409(1985))。簡潔に述べると、かかる試験の一つは、CD-1マウスに、アジュバントの可能性のあるものを様々な量で混合した抗原(例えば、牛血清アルブミン(「BSA」))を皮内注射することを含む。2週間後にこのマウスから血清を採取し、ELISAによって抗BSA抗体について検査する。

10

【0017】

もう一つのこのような試験は、C57BL/6またはBalb/cのような純系マウスに、アジュバントの可能性のあるものを混合した、卵白アルブミン(「OVA」)のような蛋白抗原、または肺炎球菌多糖類のような多糖類抗原を皮下経路で注射することを含む。

1、2、または3回の免疫後にこのマウスから血清を採取し、ELISAによって抗原特異的抗体(総免疫グロブリン)または特異的マウスIgGサブクラス、例えば、IgG1またはIgG2aについて検査する。もう一つのこのような方法は、C57BL/6マウスにOVAを注射し、1、2、または3回の免疫後に脾臓を取得し、脾臓細胞を抗原で刺激し、次いでOVA-ペプチド-発現標的細胞の細胞溶解性(cytolytic)Tリンパ球活性(「殺滅」)について検定することを含む。これに代わる増殖的反応を、免疫された動物から取得した抗原刺激脾臓細胞による³H-チミジンの取り込みを測定することによるインビトロ検定で測定することもできる。

20

【0018】

「QS-21」は、メタノール/水(58/42、v/v)中の40mM酢酸を用いるVydac C4(粒子径5μm、300Å孔、4.6mm ID x 25cm長)上での逆相HPLCで単一ピークを表す、QS-21-V1およびQS-21-V2という成分の混合物を表すものである。さらに精製した成分について実施される実験を記述する場合、この画分は、特別にQS-21-V1およびQS-21-V2と称する。

30

【0019】

Kensil等の米国特許第5583112号(これは引用によりその全内容を本明細書の一部とする)によれば、Quillaja saponaria Molinaのグルクロン酸上のカルボキシ基は、蛋白、ペプチド、または第一アミンを含む小分子とコンジュゲートすることができる。従って、本発明はQuillaja saponaria Molinaの粗製抽出物から取得し得る化学的に修飾されたサポニンアジュバントまたはその画分に関連するものであり、ここで、化学的に修飾されたサポニンまたはその画分は、QS-17、QS-18、QS-21、QS-21-V1、およびQS-21-V2のうち少なくとも一つを含み、そして、修飾されたサポニンはアジュバント活性を保持している。

40

【0020】

「部分的に純粋な」という語は、天然の状態でサポニンに通常付随している化合物から部分的に分離されたサポニンを意味する。

【0021】

「実質上純粋な」という語は、天然の状態でサポニンに通常付随している化合物を実質上含まず、そして一定の且つ再現性のあるクロマトグラフィー上の応答、溶離プロファイル、および生物活性を示すことを意味する。「実質上純粋な」という語は、他の化合物とサポニンとの人工的または合成の混合物を除外することを意図するものではない。

【0022】

本発明はさらに、他の植物種から単離される免疫刺激性サポニンを使用することもできる

50

。例えば、Dolichos lablab由来のサポニンがアジュバントとして有用であることが示されている（Katayan等、Vaccine 17：2733（1999））。

【0023】

「少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド」という語は、免疫系を活性化することが示されているオリゴヌクレオチドを意味する。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む。「CpGモチーフ」とは、特定の配列内に1またはそれ以上のCpGジヌクレオチドを含む一区切りのDNAである。CpGモチーフを含むこのオリゴヌクレオチドは、5-40塩基対長という長さであってよい。CpGモチーフを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、モノマーまたは多量体の一部であってよい。これに代わりCpGモチーフは、これもまたDNAワクチンを表すベクターの配列の一部であってもよい。それは一本鎖または二本鎖であってよい。それは合成により製造し、またはプラスミド中で大規模に製造することができる。本発明の一つの態様は、式 $5'X_1CGX_23'$ [式中、少なくとも1個のヌクレオチドが連続するCpGを分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである] を有するCpGモチーフを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドを包含する。好ましい態様において、CpGモチーフは、

TCTCCAGCGTGCGCCAT（「1758」としても知られる）

または

TCCATGACGTTCTGACGTT（「1826」としても知られる）を含む。

【0024】

或る隣接する配列の部分に非メチル化CpGジヌクレオチドモチーフを含んでいるDNAは、インビトロで幾つかのタイプの免疫細胞の強力な刺激物質であることが判明している（Ballas等、J. Immunol. 157：1840（1996）；Cowdrey等、J. Immunol. 156：4570（1996）；Krieg等、Nature 374：546（1995））。

その隣接する配列に応じて、或るCpGモチーフは、B細胞の反応に対してまたはT細胞の反応に対して、より免疫刺激性であり、そして或る種を専ら刺激し得る。体液性反応が望まれる場合には、非メチル化CpGモチーフを含む好ましい免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、B細胞の反応を専ら刺激するものとなるであろう。細胞性免疫が望まれる場合には、少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む好ましい免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、CD8+ T細胞反応を促進することが知られているサイトカインの分泌を刺激するものとなるであろう。

【0025】

本発明に係る免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、内因性エンドヌクレアーゼに対して該オリゴヌクレオチドを安定化するために、幾つかの方法で化学的に修飾することができる。例えば、このオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合以外を含んでいるかも知れず、その場合、該オリゴヌクレオチドの5'末端および/または3'末端のヌクレオチドが任意の数の非常套的塩基または化学原子団、例えば、モノチオリン酸修飾されたヌクレオチドに置換されている。少なくとも1個の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも1個のかかるモノチオリン酸修飾されたヌクレオチドによって修飾されている。モノチオリン酸修飾された結合を有するオリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト（Agrawal等、Proc. Natl. Acad. Sci. 85：7079（1988））またはH-ホスホナート（Froehler等、Tetrahedron Lett. 27：5575（1986））といったような当分野で周知の方法を用いて製造することができる。その他の化学的修飾原子団の例は、アルキルホスホナート、ジチオリン酸、アルキルモノチオリン酸、ホスホロアミダート、2-O-メチル、カルバメート、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、カルボナート、およびホスファートトリエステルを包含する。これらの結合を有するオリゴヌクレオチドは、既知の方法に従って製造することができる（Goodchild、Chem. Rev. 90：543（1990）；Uhlmann等、

10

20

30

40

50

Chem. Rev. 90 : 534 (1990) ; および Agrawal 等、Trends Biotechnol. 10 : 152 (1992)) 。

【0026】

本明細書中使用する「免疫アジュバント」という語は、個体に投与されまたはインビトロで試験される時、抗原が投与されている個体または試験系においてその抗原に対する免疫反応を増大させる化合物を指す。好ましくは、かかる個体は哺乳動物であり、より好ましくはその哺乳動物は人間であるが、本発明はそれに限定されることを意図していない。本発明に係るワクチンの有益な効果を経験し得る任意の動物が、本発明に従って処置され得る動物の範囲内にある。幾つかの抗原は、単独で投与される場合、免疫原性が弱い、即ち、誘導される抗体価または細胞性免疫反応が無い、または弱い。免疫アジュバントは、抗体価および／または細胞性免疫を増大させることにより、個体の免疫反応を増強することができる。アジュバントの効果はまた、個体の免疫反応を達成するために有効な抗原の用量を低くすることもできる。

【0027】

本発明の第一の態様では、サポニンアジュバントおよび免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む免疫アジュバント組成物を投与することができる。より好ましくは、かかる免疫アジュバント組成物は、抗原が投与されている試験系または個体においてその抗原の免疫反応を増大させることができる。好ましくは、このサポニンアジュバントは *Quillaja saponaria* Molina 由来のサポニンである。より好ましくは、このサポニンアジュバントは、*Quillaja saponaria* Molina 由来の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンである。好ましくは、部分的に純粋なサポニンは、QS-7、QS-17、QS-18、および／または QS-21 を含み得、且つその他のサポニンを含んでよい。好ましくは、実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-7、QS-17、QS-18、または QS-21 である。最も好ましくは、実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-21 である。これに代わり、該免疫アジュバント組成物は、1 以上の実質上純粋なサポニンアジュバントを免疫刺激性オリゴヌクレオチドと共に含むことができる。さらに好ましい態様において、このサポニンアジュバントは、粗製の *Quillaja saponaria* Molina 抽出物から取得できる化学的に修飾されたサポニンアジュバントまたはその画分 [ここで、化学的に修飾されたサポニンまたはその画分は、QS-17、QS-18、QS-21、QS-21-V1、および QS-21-V2 のうち少なくとも 1 個を含み、そして、化学的に修飾されたサポニンはアジュバント活性を保持している] を包含し得る。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも 1 個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含んでいる。CpG ジヌクレオチドは好ましくはモノマーまたは多量体である。CpG モチーフの別の好ましい態様は、DNA ワクチンをも表す、ベクターの配列の一部としてである。免疫アジュバント組成物のさらに別の態様は、その免疫刺激性オリゴヌクレオチドが修飾されている、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを目的としている。特別な修飾は少なくとも 1 個のモノチオリン酸修飾されたヌクレオチドを含み得る。さらに、少なくとも 1 個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、式 $5'X_1CGX_23'$ を有する CpG モチーフ [ここで、少なくとも 1 個のヌクレオチドが連続する CpG を分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである] を含む。CpG モチーフは、優先的に

TCTCCACAGCGTGCGCCAT

または

TCCATGACGTTCTTGACGTT

であってよい。

【0028】

第二の態様において、本発明は、抗原が投与される試験系または個体においてその抗原に対する免疫反応を増大させる方法であって、サポニンアジュバントおよびさらに免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む免疫アジュバント組成物の有効量を投与することを含む方法を目的としている。好ましくは、該サポニンアジュバントは *Quillaja saponaria* Molin

a由来のサポニンである。より好ましくは、該サポニンアジュバントは *Quillaja saponaria* Molina由来の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンである。この方法はさらに、1以上の実質上純粋なサポニンアジュバントおよび免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む免疫アジュバント組成物を具体化することができる。実質上純粋なサポニンアジュバントは好ましくは QS-7、QS-17、QS-18、または QS-21 である。最も好ましくは、実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-21 である。さらに好ましい態様において、該サポニンアジュバントは、粗製の *Quillaja saponaria* Molina抽出物から取得できる化学的に修飾されたサポニンアジュバントまたはその画分〔ここで、化学的に修飾されたサポニンまたはその画分は、QS-17、QS-18、QS-21、QS-21-V1、および QS-21-V2のうち少なくとも1個を含み、そして、化学的に修飾されたサポニンはアジュバント活性を保持している〕を包含し得る。本方法の好ましい態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは少なくとも1個の非メチル化 CpGジヌクレオチドを含んでいる。CpGモチーフは好ましくはモノマーまたは多量体である。本方法のもう一つの好ましい態様は、DNAワクチンを表す、ベクターの配列の一部としての CpGモチーフを包含する。さらに別の態様は、その免疫刺激性オリゴヌクレオチドが少なくとも1個の非メチル化 CpGジヌクレオチドを含み、そしてさらにその免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、内因性エンドヌクレアーゼに対してこのオリゴヌクレオチドが安定化されるよう化学的に修飾されている、方法を目的としている。修飾は少なくとも1個のモノチオリン酸修飾されたヌクレオチドを含み得る。さらにこの方法は、式 5'X₁CGX₂3'を有する CpGモチーフ〔ここで、少なくとも1個のヌクレオチドが連続する CpGを分離し、そしてX₁はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そしてX₂はシトシン、チミン、またはアデニンである〕を含む、少なくとも1個の非メチル化 CpGジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドを部分的に目的とし得るものである。別の好ましい方法において、この非メチル化 CpGモチーフは、

TCTCCCAAGCGTGCGCCAT

または

TCCATGACGTTCTTGACGTT

である。

【0029】

本明細書中の「ワクチン組成物」という語は、免疫反応を生み出すことのできる組成物を指す。ワクチン組成物は、本発明によれば、個体において疾病に対する免疫を産む。本発明に係るサポニンおよび免疫刺激性オリゴヌクレオチドの組み合わせは、個体に投与して任意の抗原に対する免疫反応を増強することができる。好ましくは、このワクチン組成物は免疫を刺激する。より好ましくは、このワクチン組成物は、抗原に対する抗体産生を増強し、そして抗原に対する細胞性免疫反応を増強する。

【0030】

本発明に係るワクチン組成物は、正の相乗作用で抗原に対する抗体産生を増強することができる。本明細書に記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびサポニンアジュバントの相乗的アジュバント効果は幾つかの方法で示することができる。例えば、相乗的アジュバント効果は、最大予想免疫反応の増大として証明することができる。二つのアジュバントを合する時、相加的效果が予想できる。即ち、或るアジュバントが最適用量で使用された場合に「X」の抗体を産生し、別のアジュバントがやはり最適用量で使用された場合に「Y」の抗体を産生するならば、これらの組み合わせは、もしその結果が相乗的ではなく相加的であるならば、「X+Y」を産生すると予想できる。「X+Y」よりかなり高い最大反応レベルは相乗効果であると考えられ、これは予想外のものである。相乗作用の第二の適応は、アジュバント効果の産生が通常予想されない用量で実質的なアジュバント効果が現れることである。相乗作用の第三の適応は、いずれかのアジュバント単独に対して予想されるよりも動力学的に早期に免疫反応が現れることである。

【0031】

さらに、増強された免疫反応にとって好適な典型的抗原は、以下のもののいずれかに由来

する抗原を包含する：ウイルス、例えば、インフルエンザ、ネコ白血病ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、H I V - 1、H I V - 2、狂犬病、麻疹、B型肝炎、または口蹄疫；細菌、例えば、炭疽、ジフテリア、ライム病、肺炎球菌、または結核；または原生動物、例えば、Babesiosis bovisまたはマラリア原虫。抗原は、好ましくは蛋白、ペプチド、多糖類、脂質、糖脂質、磷脂質、または抗原蛋白もしくは興味深いペプチドをコードしている核酸であってよい。抗原は、天然原料から精製され、固相合成によって合成され、または遺伝子工学手段によって取得することができる。

【0032】

従って、第三の態様において、本発明はさらに、サポニンアジュバント、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、および抗原を含むワクチン組成物を包含する。該サポニンアジュバントは *Quillaja saponaria* Molina 由来の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンであってよい。このワクチン組成物はさらに、1以上の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンアジュバント、少なくとも1個の非メチル化 CpG モチーフをさらに含んでいる免疫刺激性オリゴヌクレオチド、および抗原を含むことができる。好ましくは、部分的に純粋なサポニンアジュバントは QS-7、QS-17、QS-18、および／または QS-21 を含み、そして他のサポニンを含むことができる。好ましくは、実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-7、QS-17、QS-18、または QS-21 である。さらに好ましい態様は、粗製の *Quillaja saponaria* Molina 抽出物から取得できる化学的に修飾されたサポニンアジュバントまたはその画分〔ここで、化学的に修飾されたサポニンまたはその画分は、QS-17、QS-18、QS-21、QS-21-V1、および QS-21-V2 のうち少なくとも1個を含み、そして、化学的に修飾されたサポニンはアジュバント活性を保持している〕を包含する。最も好ましくは、このワクチン組成物中の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-21 である。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含んでいる。CpG モチーフは好ましくはモノマーまたは多量体である。CpG モチーフのもう一つの好ましい態様は、DNA ワクチンをも表す、ベクターの配列の一部としての CpG モチーフである。本明細書に記載するワクチン組成物のさらに別の態様は、少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドが化学的修飾を含む、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを目的としている。より詳細には、この免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のモノチオリン酸修飾されたヌクレオチドで修飾されているかも知れない。さらに、このワクチン組成物中の、少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、式 $5'X_1CGX_23'$ を有する CpG モチーフ〔ここで、少なくとも1個のヌクレオチドが連続する CpG を分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである〕を含む。本発明のこの態様に従う非メチル化 CpG モチーフは、優先的に

TCTCCAGCGTGCGCCAT

または

TCCATGACGTTCTGACGTT

を含む。

【0033】

本発明の第四の態様は、個体において抗原に対する免疫を刺激する方法であって、抗原、部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンアジュバント、および免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含むワクチン組成物の有効量を投与することを含む方法を包含する。この方法はさらに、1以上の部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンアジュバント、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、および抗原を含むワクチン組成物を具体化するものである。好ましくは、部分的に純粋なサポニンアジュバントは QS-7、QS-17、QS-18、および／または QS-21 を含み、そして他のサポニンを含むことができる。好ましくは、実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-7、QS-17、QS-18、または QS-21 を含み。最も好ましくは、この方法によれば、部分的に純粋なまたは実質上純粋なサポニンアジュバントは QS-21 である。このサポニンアジュバントは、好ましくは、粗

製の *Quillaja saponaria* Molina 抽出物から取得できる化学的に修飾されたサポニンアジュバントまたはその画分 [ここで、化学的に修飾されたサポニンまたはその画分は、Q S-17、Q S-18、Q S-21、Q S-21-V1、および Q S-21-V2 のうち少なくとも1個を含み、そして、化学的に修飾されたサポニンはアジュバント活性を保持している] であってよい。好ましくは、本方法は、少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドをさらに含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドを投与することを含む。ここに記載の CpG ジヌクレオチドはモノマーまたは多量体である。本方法のもう一つの好ましい態様は、DNA ワクチンをも表す、ベクターの配列の一部としての CpG モチーフを包含する。本明細書に開示する方法のさらに別の態様は、少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド [ここでこの免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、内因性エンドヌクレアーゼに対する安定性を増大させるため、化学的に修飾されているかも知れない] を目的としている。このような修飾は、少なくとも1個のモノチオリン酸修飾されたヌクレオチドを含むかも知れない。さらに、少なくとも1個の非メチル化 CpG ジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、式 $5'X_1CGX_23'$ を有する CpG モチーフ [ここで、少なくとも1個のヌクレオチドが連続する CpG を分離し、そして X_1 はアデニン、グアニン、またはチミンであり、そして X_2 はシトシン、チミン、またはアデニンである] を含み得る。もう一つの好ましい態様において、この非メチル化 CpG モチーフは、
TCTCCCAAGCGTGCGCCAT
または
TCCATGACGTTCTTGACGTT
である。

【0034】

該ワクチン組成物のためのその他の有用な方法は、或る抗原に対する抗体の産生を増強し、そして細胞性免疫を増強することを包含する。より好ましくは、このワクチン組成物は或る抗原に対する抗体の産生を増強し、そして細胞性免疫を増強する。最も好ましくは、このワクチン組成物は、正の相乗的方法で抗原に対する抗体の産生を増強する。

【0035】

本発明に係る組成物の投与は、非経口的、静脈内、筋肉内、皮下、経鼻、経口、経粘膜、または他の任意の適当な手段によるものとすることができる。投与される用量は、年齢、体重、もし現在治療を受けているとすればその治療の種類、および投与された抗原の性質に依存し得る。初回投与の後、約4週間後に免疫原性反応を増強するためにブースター投与を行うことができる。さらなるブースター用量を投与することもできる。該組成物は、サポニン、オリゴヌクレオチド、および抗原の混合性剤の一回注射として、または短期間（即ち0-2日間）のうちに同一部位に別々の注射として投与することができる。

【0036】

本発明に係る有効な組成物は、経口投与のためのカプセル剤、液体溶液、懸濁液またはエリキシル、または無菌液体剤型、例えば、溶液もしくは懸濁液のような剤型で 사용할ことができる。好ましくは、許容し得る任意の不活性担体、例えば、食塩水、もしくは PBS、または本発明に係る組成物が本発明に係る用途にとって好適な溶解性を有する、任意の許容し得る担体を使用することができる。

【0037】

実施例

CpG オリゴヌクレオチドおよび Q S-21 を合した製剤が免疫アジュバントとして機能し得るかどうかを評価するために、良好に確立された動物モデルを使用した。簡潔に述べると、最近報告されたアジュバント CpG モチーフと Q S-21 を比較するために実験を計画した。マウスにおける B 細胞リンパ腫イディオタイプ K L H ワクチンのためのアジュバントとしての働きを有することが報告された CpG 配列（例えば、1758）を選択した。一つの実験は、CpG モチーフが、単独または Q S-21 と組み合わせた時にマウスにおける CTL 反応誘発の際、サブユニットワクチン、例えば、OVA のためのアジュ

バントとして働き得るかどうかを評価した。この仕事は、最適用量を決定するためのCpGによる用量範囲実験を含んでいた。

【0038】

アジュバントとしてのCpGおよびQS-21の比較に加えて、CpGオリゴヌクレオチドがQS-21のアジュバント効果に影響を及ぼし得るかどうかを評価するため、CpGオリゴヌクレオチドを最適用量以下のQS-21（例えば、1.25 µg）と合して第二の実験を実施した。

【0039】

さらに、CpGおよびQS-21の組み合わせが抗体産生、特に抗原特異的抗体反応のイソタイププロフィールを増強し得るかどうかを判定するための実験を行った。

10

【0040】

最後に、CpGオリゴヌクレオチドおよびサポニンの組み合わせが正の相乗作用で抗体産生を増強するかどうかを判定するために一連の実験を実施した。この仕事は、肺炎球菌14型多糖類およびQS-21およびCpGオリゴヌクレオチドのワクチン製剤を使用し、0日目および28日目に免疫した後の21日目および42日目にマウスから採取した特異的抗体価を評価した。マウスにおいて鶏卵ライソザイムのためのアジュバントとしての働きを有すると報告されている、別のCpG配列（例えば、1826）を選択した。

【0041】

以下の供給者由来の材料を用いて実験を行った：OVA、VI等級（Sigma）；肺炎球菌14型多糖類（ATCC）；QS-21（Aquila）；モノチオリン酸修飾された配列1758 TCTCCCAAGCGTGCGCCAおよびモノチオリン酸修飾された配列1826 TCCATGACGTTCTGACGTTを含むCpGオリゴヌクレオチド（Life Technologies（Gibco））。

20

【0042】

実施例1

QS-21およびCpG/QS-21により誘導されたCTL

C57BL/6マウス（1群当たり5匹、雌、8-10週齢）を、1、15、および29日目に皮下経路により免疫した。ワクチンは、総体積0.2 mLのリン酸緩衝食塩水に入れた、示された用量のアジュバントを加えたOVA抗原25 µgであった。この実験に使用したCpGモチーフは、配列

30

TCTCCCAAGCGTGCGCCA

を有するモノチオリン酸修飾されたオリゴヌクレオチド1758であった（Weiner等、Proc. Natl. Acad. Sci. 94:10833（1997））。CTL検定でエフェクター細胞として使用するため、脾臓細胞を42日目に摘出した。これを、マイトマイシンCで処理したE.G7-OVA細胞で6日間インビトロで刺激し、次いで標準的⁵¹Cr放出CTL検定に使用した。E.G7-OVA細胞（⁵¹Crをロード）を標的細胞として使用した。EL4細胞（OVAによりトランスフェクトされていない）のバックグラウンド溶解(lysis)をE.G7-OVA細胞の溶解から差し引き、抗原特異的溶解のパーセント（%）を得た。

【0043】

40

図1に示すように、この結果は、アジュバント不在下、任意の用量のCpG、または1.25 µgのQS-21（最適用量以下）では、溶解が観察されなかったことを示している。しかしながら、CpGと組み合わせた最適用量以下のQS-21は、著明なCTLを誘導した。この結果は、通常このようなアジュバント効果を生み出すとは予想されない用量での実質的なアジュバント効果を示している。この、正の相乗効果は、より高いCpGの用量（50 µg）で最も顕著であった。このアジュバント効果は、最適な10 µgのQS-21対照で達成された効果に匹敵した。

【0044】

実施例2

QS-21およびCpG/QS-21により誘導されたCTL

50

図1に記載のように免疫されたマウスの脾臓細胞をCTL検定に使用した。脾臓細胞はCTL検定に使用する前に、変性させたOVAで6日間インビトロで刺激した。この検定は実施例1に記載のようにE.G7-OVA細胞に対して実施した。

【0045】

図2の結果から明らかなように、アジュバント不在下、任意の用量のCpG、または1.25 µgのQS-21（最適用量以下）では、溶解が観察されなかった。しかしながら、CpGと組み合わせた最適用量以下のQS-21は、著明なCTLを誘導した（最適な10 µgのQS-21対照に匹敵する）。この結果は、最適用量以下では予想されないCpGおよびQS-21の間の正の相乗作用を示すものである。

【0046】

実施例3

抗原特異的血清IgG1およびIgG2a

実施例1に記載のように免疫されたマウスから42日目に採取した血清上のEIAにより、OVAに対する血清力価を決定した。IgGサブクラスIgG1およびIgG2aの力価を個々のマウス（1群当たり5匹のマウス）について測定し、幾何平均力価としてプロットした。図3に示すように、IgG1力価は、QS-21のみ（10 µg用量）または10もしくは50 µgのいずれかと組み合わせたQS-21 10 µgが投与された群で最も高かった（非アジュバント群のおよそ10倍の増強）。IgG2a反応は、10または50 µg CpGと10 µg QS-21（最適用量）の組み合わせ、および、50 µg CpGと1.25 µg QS-21（最適用量以下）の組み合わせ以外では、いかなる群でも検出できなかった。IgG2aは、単独で使用した任意のCpG用量、単独で使用した任意のQS-21用量、または非アジュバント群において検出されなかった。

【0047】

実施例4

肺炎球菌多糖類抗原に対してQS-21およびQS-21/CpG

により誘導された抗体

BALB/cマウス（1群当たり5匹のマウス、雌、8-10週齢）を、0日目のみ、または0および28日目に皮下経路で免疫した。ワクチンは、総体積0.2 mLのリン酸緩衝化食塩水に入れた、示された用量のアジュバントを加えた肺炎球菌14型多糖類0.5 µgであった。この実験に使用した免疫刺激性モチーフCpGは、配列

TCCATGACGTTCCCTGACGTT

を有するモノチオリン酸修飾されたオリゴヌクレオチド1826であった（Chu等、J. Exp. Med. 186:1623-1631（1997））。QS-21は1.25 µgまたは10 µgの用量で使用した。CpG ODN 1826は10 µgの用量のみで使用した。

【0048】

1回免疫を受けたマウス由来の血清を21日目に採取した。2回の免疫を受けたマウス由来の血清は42日目に採取した。14型多糖類に対し特異的な抗体価をこの血清について決定した。IgGサブクラスIgG1、IgG2a、およびIgG3を、各群のマウス由来の等用量の血清プールについて決定した。1回免疫を施した後、10 µg QS-21 / 10 µg CpGの組み合わせのIgG1力価は、QS-21のみの66倍高く、CpGのみの43倍高かった（図4）。10 µg QS-21 / CpGの組み合わせのIgG2a力価は、QS-21のみまたはCpGのみの11倍高かった（図5）。10 µg QS-21 / CpGの組み合わせのIgG3力価は、QS-21のみの85倍高く、CpGのみの95倍高かった（図6）。

【0049】

2回の免疫の後、10 µg QS-21 / CpGの組み合わせのIgG1力価は、QS-21のみの46倍高く、CpGのみの444倍高かった（図7）。10 µg QS-21 / CpGの組み合わせのIgG2a力価は、QS-21のみの476倍高く、CpGのみの127倍高かった（図5）。10 µg QS-21 / CpGの組み合わせのIgG3力

価は、Q S - 2 1 のみの 6 7 倍高く、C p G のみの 2 4 3 倍高かった (図 9) 。これらの力価の増強は、これが正の相乗効果であって、単にこれら二つのアジュバントを合した相加的アジュバント効果ではないことを示している。さらに、低用量の Q S - 2 1 (1 . 2 5 μ g) と 1 0 μ g C p G との組み合わせは、2 回の免疫の後に I g G 1 および I g G 3 力価をも生み出し、これらは 1 . 2 5 μ g Q S - 2 1 単独、1 0 μ g Q S - 2 1 単独、または 1 0 μ g C p G 単独により生み出される力価より高かった。

【 0 0 5 0 】

ここに本発明を詳細に記載してきたが、当業者にとっては、以下に開示する本発明の精神または範囲を逸脱することなく、多くの変更および修飾を施すことができるということが明らかであろう。

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、C T L 誘導によって証明される、Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチド / Q S - 2 1 配合物による、細胞性免疫反応の増強を示すグラフを示している。

【図 2】 図 2 は、C T L 誘導によって証明される、Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチド / Q S - 2 1 配合物による、細胞性免疫反応の増強を示すグラフを示している。

【図 3】 図 3 は、増強された抗体産生、特に T h 1 サイトカインにより影響を受ける I g G 2 a のような抗体サブクラスの産生増強の棒グラフを示している。

【図 4】 図 4 は、0 日目に最初の免疫を行った後、2 1 日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 1 力価の棒グラフを示している。

20

【図 5】 図 5 は、0 日目に最初の免疫を行った後、2 1 日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 2 a 力価の棒グラフを示している。

【図 6】 図 6 は、0 日目に最初の免疫を行った後、2 1 日目に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 3 力価の棒グラフを示している。

【図 7】 図 7 は、最初の免疫の 2 8 日後に行われた 2 回目の免疫の 1 4 日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 1 力価の棒グラフを示している。

30

【図 8】 図 8 は、最初の免疫の 2 8 日後に行われた 2 回目の免疫の 1 4 日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 2 a 力価の棒グラフを示している。

【図 9】 図 9 は、最初の免疫の 2 8 日後に行われた 2 回目の免疫の 1 4 日後に採取したマウス血清において、様々な剤型および / または配合の Q S - 2 1 および C p G オリゴヌクレオチドを用いた、肺炎球菌 1 4 型多糖類に対し特異的な I g G 3 力価の棒グラフを示している。

【図 1】

1/9

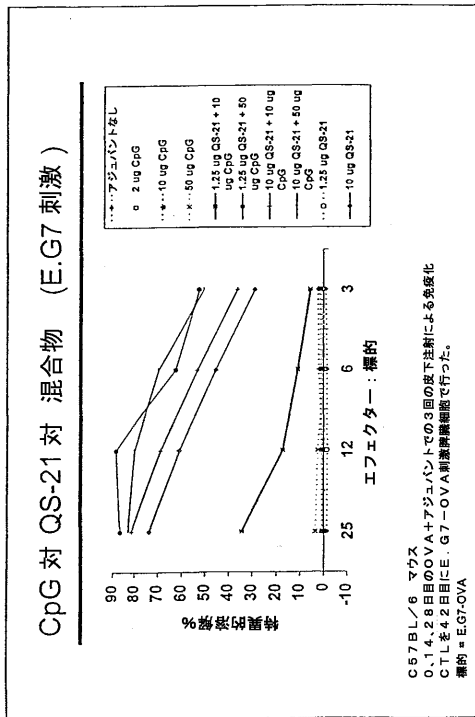


Figure 1: QS-21 およびCpG/QS-21により誘導されたCTL

【図 2】

2/9

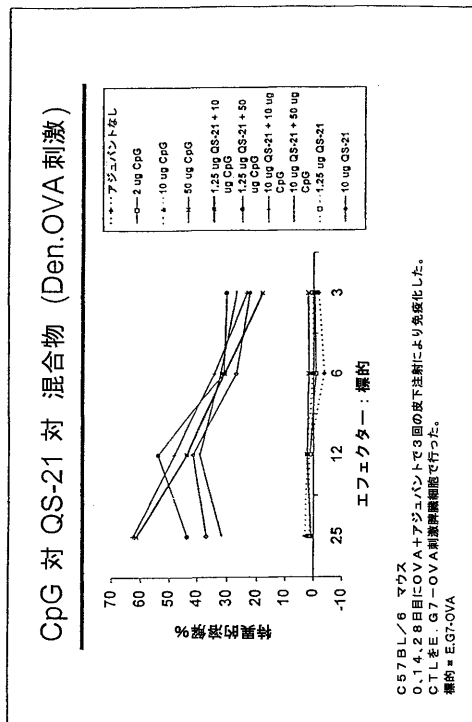


Figure 2: QS-21 およびCpG/QS-21により誘導されたCTL

【図 3】

3/9

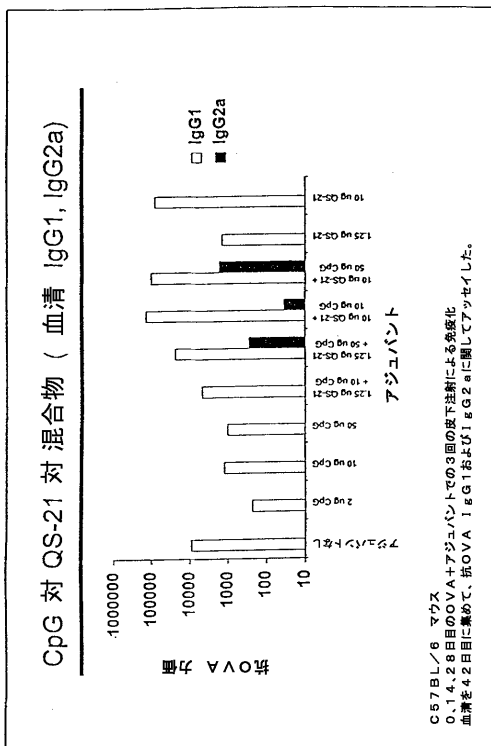
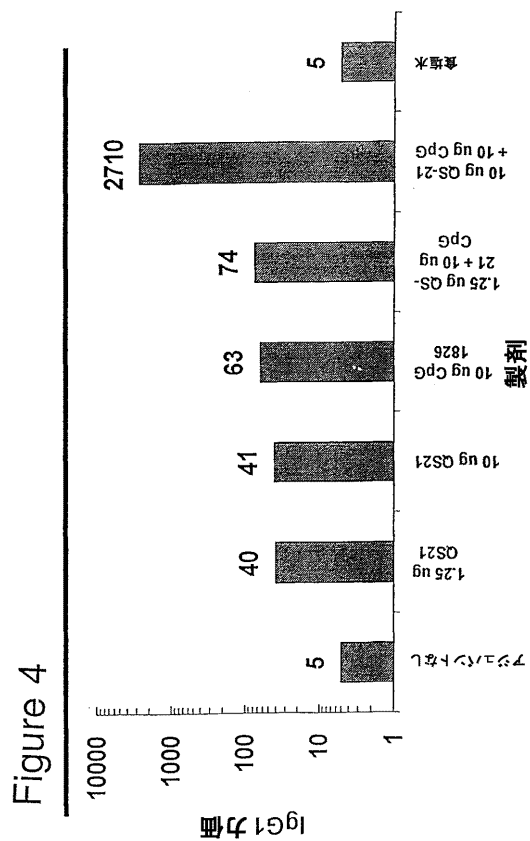


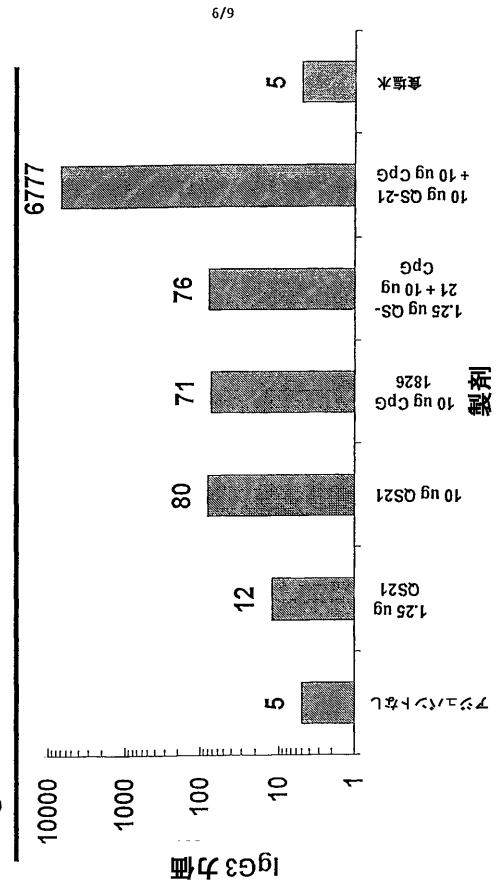
Figure 3: 抗原特異的血清IgG1およびIgG2a

【図 4】

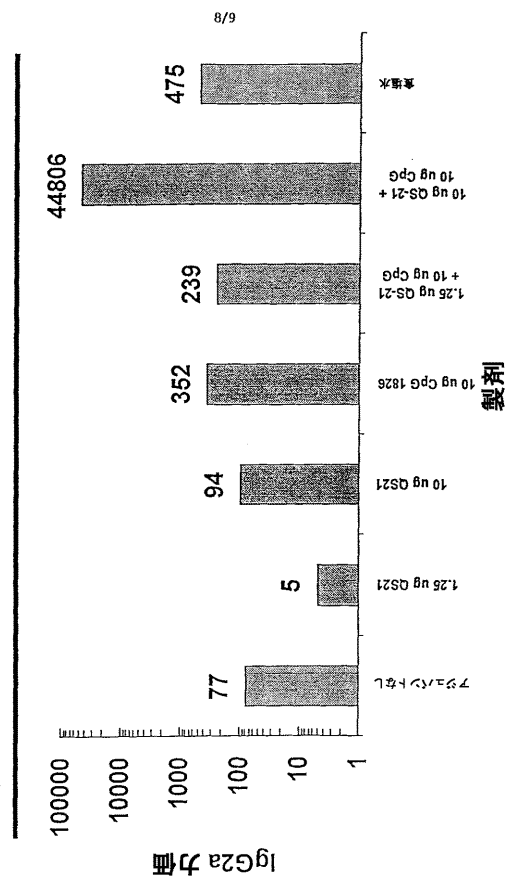
4/9



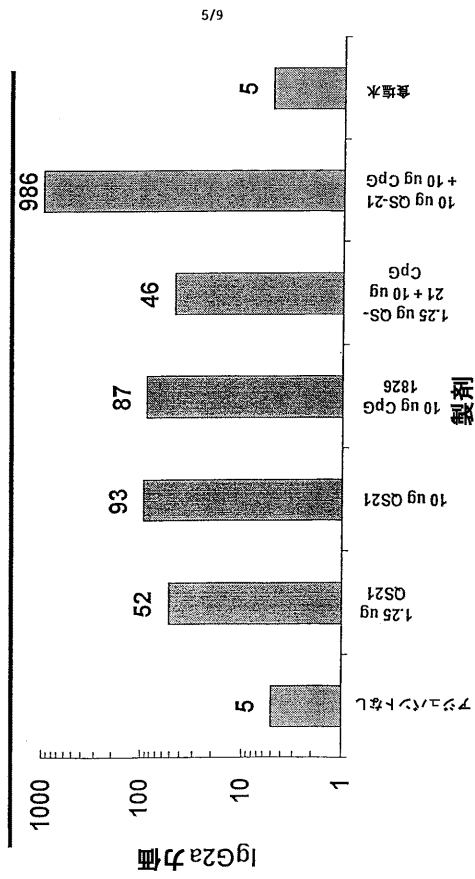
【図 9】



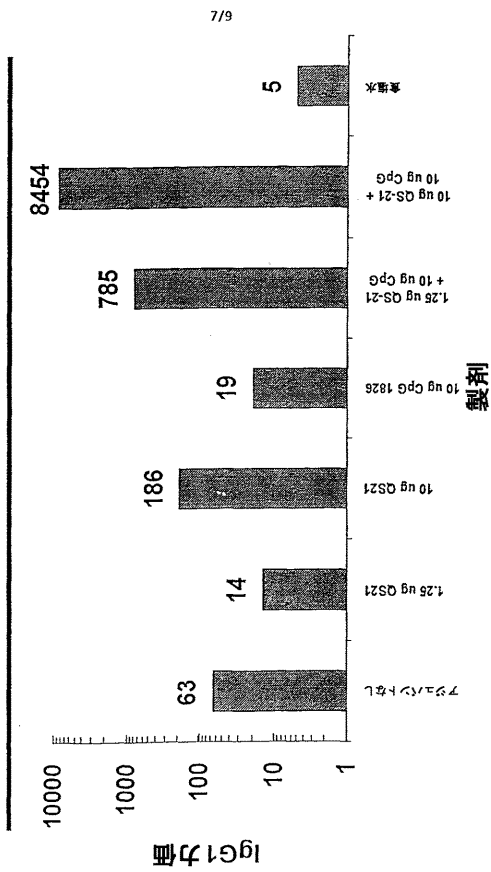
【図 8】



【図 5】

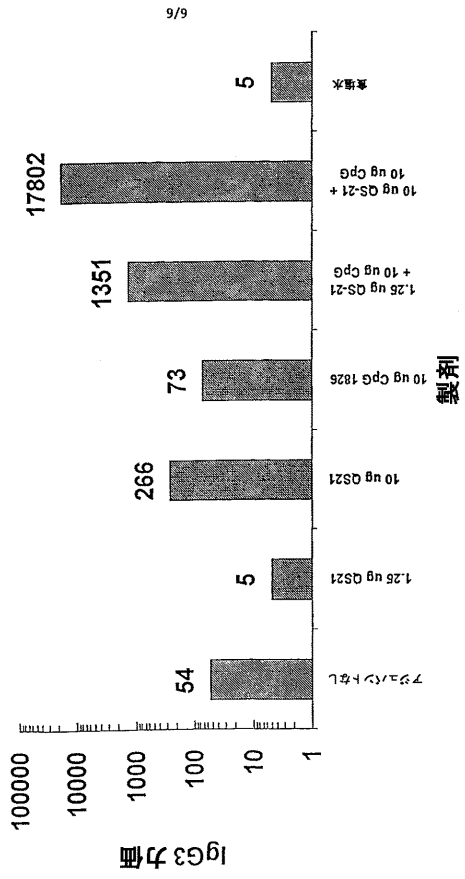


【図 7】



【図 9】

Figure 9



6/6

フロントページの続き

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆

(74)代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(72)発明者 シャーロット・エイ・ケンシル

アメリカ合衆国 01757 マサチューセッツ州ミルフォード、キャンプ・ストリート15番

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 国際公開第98/018810 (WO, A1)

特表平10-506265 (JP, A)

CHU, R.S., et al., CpG Oligodeoxynucleotides Acts as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity, Journal of Experimental Medicine, 1997年11月17日, Vol.186, No.10, p.1623-1631

DAVIS, H.L., et al., CpG DNA Is a Potent Enhancer of Specific Immunity in Mice Immunized with Recombinant Hepatitis B Surface Antigen, The Journal of Immunology, 1998年1月15日, Vol.160, No.2, p.870-876

WEINER, G.J., et al., Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997年9月30日, Vol.94, No.20, p.10833-10837

KLINMAN, D.M., Therapeutic Applications of CpG-Containing Oligodeoxynucleotides, ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, 1998年4月, Vol.8, No.2, p.181-184

KRIEG, A.M., et al., The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines, TRENDS IN MICROBIOLOGY, 1998年1月, Vol.6, No.1, p.23-27

SO, H-S., et al., Effect of a Novel Saponin Adjuvant Derived from Quillaja saponaria on the Immune Response to Recombinant Hepatitis B Surface Antigen, Molecules and Cells, 1997年4月30日, Vol.7, No.2, p.178-186

KENSIL, C.R., Saponins as Vaccine Adjuvants, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1996年, Vol.13, No.1&2, p.1-55

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/-39

C12N 15/00-09

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)