

(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2008-534467
(P2008-534467A)

(43) 公表日 平成20年8月28日(2008.8.28)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|------------------------------|---------------|-------------|
| A61K 39/145 (2006.01) | A 61 K 39/145 | 4 C 076 |
| A61K 47/22 (2006.01) | A 61 K 47/22 | 4 C 085 |
| A61K 47/34 (2006.01) | A 61 K 47/34 | |
| A61K 47/24 (2006.01) | A 61 K 47/24 | |
| A61P 31/16 (2006.01) | A 61 P 31/16 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 133 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2008-502346 (P2008-502346) | (71) 出願人 | 305060279 グラクソスミスクライン バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89 |
| (86) (22) 出願日 | 平成18年3月21日 (2006.3.21) | (74) 代理人 | 100091096 弁理士 平木 祐輔 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成19年11月19日 (2007.11.19) | (74) 代理人 | 100096183 弁理士 石井 貞次 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/EP2006/002838 | (74) 代理人 | 100118773 弁理士 藤田 節 |
| (87) 國際公開番号 | W02006/100111 | | |
| (87) 國際公開日 | 平成18年9月28日 (2006.9.28) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0506001.7 | | |
| (32) 優先日 | 平成17年3月23日 (2005.3.23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英國 (GB) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0506000.9 | | |
| (32) 優先日 | 平成17年3月23日 (2005.3.23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英國 (GB) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0505998.5 | | |
| (32) 優先日 | 平成17年3月23日 (2005.3.23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英國 (GB) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組成物

(57) 【要約】

本発明は、種々の疾患に対して免疫するためのインフルエンザワクチン製剤およびワクチン接種レジメンに関する。特に、本発明は、水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D-MPLを含むワクチン製剤、医薬におけるその使用、特に、種々の抗原に対する免疫応答増大させる際のその使用、ならびに調製方法に関するものであり、この水中油型エマルジョンは、ステロール、代謝可能なオイル、および乳化剤を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 抗原または抗原性組成物、
- (b) 水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (c) 3D MPL

を含み、前記水中油型エマルジョンは、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤を含む免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の0.5%~20%の量で存在する、
請求項1に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 3】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の1.0%~10%の量で存在する、
請求項1または請求項2に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の2.0%~6.0%の量で存在する、
請求項1~3のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

前記ステロールが -トコフェロールである、請求項1~4のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 6】

前記ステロールが、前記免疫原性組成物の全体積の1.0%~20%の量で存在する、請求項1~5のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

前記 -トコフェロールが、前記免疫原性組成物の全体積の1.0%~5.0%の量で存在する、
請求項6に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

前記乳化剤がTween80である、請求項1~7のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記乳化剤が、前記免疫原性組成物の0.01~5.0重量%(w/w)の量で存在する、請求項1~8のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 10】

前記乳化剤が、前記免疫原性組成物の0.1~2.0重量%(w/w)の量で存在する、請求項9に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

3D-MPLが、組成物1用例当たリ10~50 μg(w/v)の量で存在する、請求項1~10のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

3D-MPLが、組成物1用例当たリ25 μg(w/v)の量で存在する、請求項11に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

前記組成物1用例が、約0.5ml、0.5ml~1mlの間、または約1mlである、請求項11または請求項12に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

抗原もしくは前記抗原を含む病原体またはその変異体への曝露に伴う感染および/または疾患を予防するための、請求項1~14のいずれか1項に記載の免疫原性組成物の製造における、

- (a) 抗原または抗原性組成物、
- (b) 水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (c) 3D MPL

を含む組成物の使用。

40

50

【請求項 15】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗原または抗原性組成物、3D MPL、および水中油型エマルジョンアジュバントを、それを必要とする個体または集団に送達することを含むワクチン接種方法。

【請求項 16】

i)改善されたCD4 T細胞応答、ii)改善されたB細胞記憶応答、iii)改善された前記抗原に対する抗体応答のうちの少なくとも1つを誘発するための、請求項14または15に記載の使用または方法。

【請求項 17】

免疫低下したヒト個体または集団における、請求項14～16のいずれか1項に記載の使用または方法。 10

【請求項 18】

前記免疫原性組成物中の抗原が由来する病原体の変異体である病原体によって引き起こされた感染または疾患に対する保護のための、請求項14～17のいずれか1項に記載の使用または方法。

【請求項 19】

前記免疫原性組成物中の抗原の変異体である抗原を含む病原体によって引き起こされた感染または疾患に対する保護のための、請求項14～18のいずれか1項に記載の使用または方法。

【請求項 20】

感染した個体または集団の体温によって保護が評価される、請求項18または19に記載の使用または方法。 20

【請求項 21】

前記免疫原性組成物がCD4 T細胞エピトープを有する抗原を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 22】

前記免疫原性組成物が、B細胞エピトープを有する抗原を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 23】

抗原もしくは抗原性組成物またはその断片もしくは変異体、3D MPL、および水中油型エマルジョンアジュバントを事前にワクチン接種した個体のワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における前記抗原の使用。 30

【請求項 24】

前記ワクチン再接種のための抗原が、事前のワクチン接種に使用した抗原または抗原性組成物と共にCD4 T細胞エピトープを有している、請求項23に記載の使用。

【請求項 25】

前記ワクチン再接種のための抗原または抗原性組成物にアジュバントが添加されている、請求項23または24に記載の使用。

【請求項 26】

前記アジュバントが、請求項1～10のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンである、請求項25に記載の使用。 40

【請求項 27】

前記アジュバントが3D-MPLをさらに含む、請求項25または26に記載の使用。

【請求項 28】

免疫原性組成物を調製するための方法であって、本明細書で定義される水中油型エマルジョンを抗原または抗原性組成物および3D-MPLと組み合わせることを含む方法。

【請求項 29】

薬学的に許容される担体と組み合わせた、請求項1～14のいずれか1項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

医薬において使用するための、

(a)抗原、

(b)本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバント、および

(c)3D MPL

を含む組成物。

【請求項 3 1】

抗原または抗原性調製物が、インフルエンザウイルスおよびHPVからなる一覧から選択される、請求項1～30のいずれか1項に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 3 2】

前記インフルエンザ抗原が、スプリットインフルエンザウイルス、全インフルエンザウイルス、サブユニットインフルエンザウイルス、インフルエンザビロソーム、およびその抗原性調製物からなる一覧から選択される、請求項31に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 3 3】

前記HPV抗原が癌または陰部疣瘍と関連している、請求項31に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 3 4】

前記癌関連HPVがHPV16型および/またはHPV18型である、請求項33に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 3 5】

HPV16および/またはHPV18抗原と共に、発癌性HPV型由来の1種または複数の追加の抗原が使用され、前記追加の抗原が、HPV31、HPV45、HPV33、HPV58、およびHPV52のHPV型から選択される、請求項34に記載の組成物、使用、または方法。

【請求項 3 6】

前記抗原がウイルス様粒子の形態である、請求項34または35に記載の組成物、使用、または方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、様々な疾患に対して免疫するためのインフルエンザワクチン製剤およびワクチン接種レジメンに関する。特に、本発明は、水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D-MPLを含むワクチン製剤、医薬におけるその使用、特に、種々の抗原に対する免疫応答を増大させる際のその使用、ならびに調製方法に関するものであり、この水中油型エマルジョンは、ステロール、代謝可能なオイル、および乳化剤を含む。

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫原性が改善された新たな組成物またはワクチンが常に必要とされている。1つの戦略として、任意の所与の抗原に対して生じる免疫応答を試し、向上させるためにアジュバントが使用してきた。

【0 0 0 3】

例として、インフルエンザワクチンおよびヒトパピローマウイルス(human papilloma virus)(HPV)に対するワクチンがアジュバントを用いて開発されている。

【0 0 0 4】

インフルエンザウイルス(influenza virus)は、世界中に存在する最も偏在的なウイルスの1つであり、ヒトと家畜をどちらも侵す。インフルエンザは、相当な経済的負担、罹患率、さらには死亡率をもたらす。

【0 0 0 5】

インフルエンザウイルスは、直径約125nmの粒径を有するRNAエンベロープウイルスである。このウイルスは、脂質二重層構造および外部糖タンパク質を有するウイルスエンベロープで囲まれた内部ヌクレオカプシドまたは核タンパク質と会合したリボ核酸(RNA)のコ

10

20

30

40

50

アから基本的になる。ウイルスエンベロープの内層は、マトリックスタンパク質で主に構成されており、その外層は、宿主由来の脂質材料で大部分が構成されている。インフルエンザウイルスは、粒子の表面に10~12nmの長さのスパイクとして出現している2種の表面抗原、糖タンパク質ノイラミニダーゼ(NA)と赤血球凝集素(HA)とを含む。インフルエンザ亜型の抗原特異性を決定するのは、こうした表面タンパク質、特に赤血球凝集素である。

【0006】

こうした表面抗原は漸次、時には急速に一部変化し、これによりインフルエンザの抗原性変異がもたらされる。「ドリフト」とおよび「シフト」と呼ばれるこうした抗原変化は、予測不可能であり、最終的に新たなインフルエンザ株の出現をもたらし、またウイルスが免疫系を回避し、周知の流行をほとんど毎年引き起こすことができるようとするため、免疫学的な観点から劇的な影響を与える恐れがある。

10

【0007】

シーズン毎にインフルエンザワクチン中に組み込まれるインフルエンザウイルス株は、世界保健機構により国立の保健機関およびワクチン製造業者と共同して決定される。

【0008】

HAは、様々なインフルエンザ株の血清学的特異性を定義する上で最も重要な抗原である。この75~80kDのタンパク質は、数多くの抗原決定基を含有し、そのいくつかは、様々な株において配列変化を起こす領域内にあり(株特異的な決定基)、また他のは多くのHA分子に共通である領域内にあるものもある(決定基に共通)。

20

【0009】

インフルエンザウイルスは、ほとんど毎冬、流行を引き起こし、A型またはB型ウイルスの感染率は、6週間にわたって40%の高さである。インフルエンザ感染は、潜伏感染から軽度の上気道炎、重篤なウイルス性肺炎まで種々の疾患状態をもたらす。インフルエンザの典型的な流行は、入院率または死亡率の増大によって証明されるとおり、肺炎および下部呼吸器疾患の発生率の増大を引き起こす。疾患の重篤度は、宿主の年齢、その免疫状態、および感染部位によって主として判定される。

【0010】

65歳以上の高齢者は特に感染しやすく、先進国におけるすべてのインフルエンザ関連死の80~90%を占める。慢性基礎疾患有する個体もまた、そのような合併症を経験する可能性が非常に高い。年少乳児も重篤な疾患を患う恐れがある。したがって、こうした群は特に保護される必要がある。保健機関は、こうした「危険性がある」群に加えて、高齢者と接觸している健常成人にもワクチン接種することを勧めている。

30

【0011】

ワクチン接種は、毎年のインフルエンザの流行を制御する上で極めて重要な役割を果たす。現在利用可能なインフルエンザワクチンは、不活化インフルエンザワクチンまたは弱毒生インフルエンザワクチンのいずれかである。不活化インフルエンザワクチンは、抗原調製物の可能な3つの型:不活化全ウイルス、サブビリオン(精製ウイルス粒子が脂質エンベロープを溶解するための界面活性剤または他の試薬を用いて破壊されているもの、いわゆる「スプリット」ワクチン)、または精製されたHAおよびNA(サブユニットワクチン)で構成されている。こうした不活化ワクチンは、筋肉内に(i.m.)または鼻腔内に(i.n.)投与される。

40

【0012】

色々な種類のインフルエンザワクチンは通常3価のワクチンである。こうしたワクチンは通常、2種のインフルエンザA型ウイルス株および1種のインフルエンザB型株に由来する抗原を含有する。0.5mlの標準的な注射用量はほとんどの場合、各株由来の15μgの赤血球凝集素抗原成分を含有するが、これは一元放射免疫拡散法(SRD)によって測定される(J.M.

Woodら.:An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen:adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Woodら., International collaborative study of single radial diffusion and immunoele

50

ctrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330)。

【0013】

現在利用可能なインフルエンザワクチンは、すべての年齢群において安全であると考えられる(De Donatoら. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101)。しかし、現在のインフルエンザワクチンが2歳未満の小児に効き目がある証拠はほとんどない。さらに、確認された典型的なインフルエンザ疾病を予防するためのワクチン有効性の報告された割合は、高齢者について23~72%であり、これは、若年成人について報告された有効性の割合60~90%よりも有意に低い(Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc., 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527)。インフルエンザワクチンの有効性は、ウイルス株に対する血球凝集抑制(HI)抗体の血清力価と相関していることが示され、いくつかの試験により、インフルエンザ免疫の後、高齢者の方が若年成人の場合よりも低いHI力価を示すことが認められている(Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427-439)。

10

【0014】

したがって、免疫原性が改善された新たなワクチンがいまだ必要とされている。強力なアジュvantをワクチン抗原と配合することは、サブビリオン抗原に対する免疫応答を増強するための可能な手法である。

【0015】

アジュvant MF59を用いてアジュvant添加されたサブユニットインフルエンザワクチンが水中油型エマルジョンの形態で市販されており、アジュvant無添加のサブユニットワクチンで得られたものよりも高い抗体価を誘発できることが実証されている(De Donatoら. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101)。しかし、より最近の刊行物において、同一のワクチンは、アジュvant無添加のスプリットワクチンと比較して、その改善されたプロファイルを示さないことが実証されている(Puig-Barberaら., 2004, Vaccine 23, 283-289)。

20

【0016】

パピローマウイルスは、小さなDNA腫瘍ウイルスであり、このウイルスは高度に種特異的である。これまでのところ、100を超えるそれぞれ異なるヒトパピローマウイルス(HPV)遺伝子型が記載されている。HPVは通常、皮膚(例えばHPV-1およびHPV-2)または粘膜表面(例えばHPV-6およびHPV-11)のいずれかに特異的であり、通常、数カ月間または数年間存続する良性腫瘍(疣)を引き起こす。このような良性腫瘍は、当該個体にとって苦痛である恐れがあるが、若干の例外はあるものの生命にかかわることはほとんどない。

30

【0017】

一部のHPVは癌にも関連している。HPVとヒト癌の間での最も強力で明確な関連性は、HPV-16およびHPV-18と子宮頸癌の間に存在するものである。子宮頸癌は、発展途上国において最も一般的な悪性腫瘍であり、毎年世界中で約500,000例の新たな症例が生じている。ワクチンを使用してHPV-16一次感染、さらには確立されたHPV-16を含む癌に積極的に対処することは現在、技術的に実現可能である。HPV-16に対する予防的および治療的なワクチン接種の展望に関する総説については、Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 and Hageness M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564を参照されたい。

40

【0018】

小さな変異が起こるが、記載されたすべてのHPVゲノムは、少なくとも8つの初期遺伝子E1~E8および2つの後期遺伝子L1およびL2を有する。さらに、上流の調節領域は、HPVゲノムの大部分の転写事象を制御すると思われる調節配列を有する。

【0019】

HPV L1ベースのワクチンは、WO94/00152、WO94/20137、WO93/02184、およびWO94/05792で開示されている。このようなワクチンは、モノマー、カプソマー、またはウイルス様粒子としてL1抗原を含むことができる。VLPを調製するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、WO9913056およびUS6245568に記載されている、均一性の増大を提供するVLP分解再構築手法(VLP disassembly-reassembly approach)を含む。このような粒子はさら

50

に、L2タンパク質を含むことができる。L2ベースのワクチンは、例えばWO93/00436に記載されている。他のHPVワクチン手法は、E7などの初期タンパク質またはL2-E7などの融合タンパク質に基づく。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

インフルエンザワクチンまたはHPVワクチンなどの改良ワクチンがいまだ必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明の第1の態様において、

- (a)抗原、
- (b)水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (c)3D MPL

を含み、前記水中油型エマルジョンが、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤を含む免疫原性組成物が提供される。

【0022】

本発明はまた、感染および/もしくは疾患を予防するための免疫原性組成物の製造における、

- (a)抗原、
- (b)水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (c)3D MPL

を含み、前記水中油型エマルジョンは、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤を含む組成物の使用に関する。

【0023】

本発明はまた、抗原、本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバント、および3D-MPLを送達することを含むワクチン接種方法に関する。

【0024】

本発明はまた、免疫原性組成物を調製するための方法に関し、この方法は、本明細書で定義される水中油型エマルジョンを抗原および3D-MPLと組み合わせることを含む。

【0025】

本発明の他の態様および効果を、以下の、その好ましい実施形態の詳細な説明により詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明の原理は、水中油型エマルジョンおよび3D-MPLと組み合わせた、サブユニットまたはスプリットインフルエンザ抗原に関して、またはVLPの形態の種々の癌関連HPV抗原を用いて実証される。

【0027】

本発明の一態様において、本発明者らは、サブユニットもしくはスプリットインフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物を水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D-MPLと共に含むインフルエンザ製剤が、アジュバント無添加のサブユニットもしくはスプリットウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物を用いて得られた応答と比較して、ヒトにおける前記抗原または抗原性組成物に対するCD4 T細胞免疫応答および/またはB細胞記憶応答を改善することができることを見出した。

【0028】

したがって、前記組成物は、改良インフルエンザワクチンを提供する。

【0029】

特許請求される製剤を使用して、MHCクラスII分子によって提示されたインフルエンザエピトープを検出できる抗インフルエンザCD4-T細胞応答を誘発することができる。本出

10

20

30

40

50

願人は今回、相同およびドリフトインフルエンザ株に対する応答性を(ワクチン接種および感染に際して)増大させるためには、細胞仲介性免疫系を標的にすることが有効であることを見出した。

【0030】

本発明者らは、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物を本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D MPLと共に含むインフルエンザ製剤が、アジュバント無添加の組成物と比較して、ヒト対象への最初のワクチン接種後より高いB細胞記憶応答への少なくとも1つの傾向を誘発できることを見出した。

【0031】

本発明による、アジュバントが添加されたインフルエンザ組成物は、いくつかの利点を有する。すなわち、

1)改善された免疫原性:この組成物は、高齢者(50歳超、通常65歳超)における弱い免疫応答を若年成人において認められるレベル(抗体および/またはT細胞応答)にまで修復するのを可能にする、

2)改善された交差保護プロファイル:変異(ドリフト)インフルエンザ株に対する交差保護の増大、

3)この組成物は、類似の応答に使用される抗原用量の低減を可能にし、したがって緊急の場合に(例えば世界的流行)生産力の増大を保証する。

【0032】

本発明の別の態様において、本発明者らはまた、本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D MPLにより、水中油型エマルジョン成分を欠くアジュバントを用いて生成されたものと同等である、またはそれを超えることがある抗体産生およびB細胞記憶の両方に対する免疫原性効果が実証されることを見出した。

【0033】

こうした知見は、同一の抗原の他の型および他の抗原に適用することができる。

【0034】

抗原

本発明において使用することができる抗原には、

A群連鎖球菌(Group A Streptococcus)またはB群連鎖球菌(Group B Streptococcus)などに由来する連鎖球菌抗原が含まれるが、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に由来するものが最も好ましい。タンパク質抗原および/または糖抗原を使用することが最も好ましい。肺炎連鎖球菌糖抗原および/または少なくとも1つの肺炎連鎖球菌タンパク質抗原は、ニューモリシン、PspAまたはその膜貫通欠失変異体、PspCまたはその膜貫通欠失変異体、PsaAまたはその膜貫通欠失変異体、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、CbpAまたはその膜貫通欠失変異体、PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、SpsA、LytB、LytC、LytA、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130およびSp133、またはその免疫学的機能等価物からなる群から選択されることが最も好ましい。

【0035】

少なくとも1種(2、3、4、5、6、7、8、9、または10種)の肺炎連鎖球菌糖抗原および/または肺炎連鎖球菌タンパク質抗原も好ましく、これは、上記で挙げたタンパク質抗原からなる群から選択されることが好ましい。

【0036】

WO00/56359およびWO02/22167およびWO02/22168(参照により本明細書に組み込まれる)にある組成物が記載されている。

【0037】

この抗原は、莢膜糖抗原(担体タンパク質とコンジュゲートしていることが好ましい)を含むことができ、糖(多糖が最も好ましい)は、肺炎球菌の少なくとも4種の血清型に由来する。好ましくは、この4種の血清型は、6B、14、19F、および23Fを含む。より好ましくは、この組成物には少なくとも7種の血清型、例えば、血清型4、6B、9V、14、18C、19F、

10

20

30

40

50

および23Fに由来するものが含まれる。さらにより好ましくは、この組成物には少なくとも11種の血清型が含まれ、例えば、一実施形態における組成物は、血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F、および23Fに由来する莢膜糖(担体タンパク質とコンジュゲートしていることが好ましい)を含む。本発明の好ましい実施形態において、少なくとも13種の糖抗原(担体タンパク質とコンジュゲートしていることが好ましい)が含まれるが、さらなる糖抗原、例えば、23価のもの(血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F、33Fなど)も本発明によって企図される。

【0038】

高齢者のワクチン接種用(例えば、肺炎予防用)には、血清型8および12Fを(最も好ましくは、さらに15および22も)上記の11価の抗原性組成物に含めて15価組成物を形成することが有利であるが、小児または幼児用には(中耳炎がより懸念される)、血清型6Aおよび19Aを含めて13価組成物を形成することが有利である。

10

【0039】

上記糖は、その完全長の天然多糖の形態であることが有利であるが、必要であれば、タンパク質担体と結合させる場合、なお免疫原性を有する、サイズを縮めた多糖を使用してもよいことを理解されたい(例えば、EP497524およびEP497525を参照されたい)。

【0040】

高齢者(+55歳)集団における肺炎ならびに小児(18カ月以下)および幼児(通常18カ月~5歳)における中耳炎を予防/寛解するために、本明細書に記載の多価肺炎連鎖球菌糖を、上記で挙げたタンパク質からなる群から選択されることが好ましい肺炎連鎖球菌タンパク質と組み合わせることは、本発明の好ましい実施形態である。有利には、肺炎球菌タンパク質の組合せを以下に記載の通り利用することもできる。

20

【0041】

肺炎球菌タンパク質

肺炎連鎖球菌抗原は、ポリヒスチジントライアドファミリー(Pht)由来のタンパク質、Lytファミリー由来のタンパク質、コリン結合タンパク質、LPXTGモチーフ(ただし、Xは任意のアミノ酸である)を有するタンパク質、LXXCのII型シグナル配列モチーフ(ただし、Xは任意のアミノ酸である)を有するタンパク質、およびI型シグナル配列モチーフを有するタンパク質からなる群から選択されることが好ましい。こうした範疇(またはモチーフ)内の好ましい例は、以下のタンパク質(またはそのトランケートもしくは免疫学的機能等価物)である。

30

【0042】

Pht(ポリヒスチジントライアド)ファミリーは、タンパク質PhtA、PhtB、PhtD、およびPhtEを含む。このファミリーは、脂質化配列、プロリンリッチ領域によって隔てられた2種のドメイン、および金属またはヌクレオシドとの結合活性または酵素活性に関与している可能性があるいくつかのヒスチジントライアド、(3-5)コイルドコイルの領域、保存されたN末端、および異種C末端を特徴とする。このファミリーは、試験された肺炎球菌の全株に存在する。相同タンパク質が他の連鎖球菌およびナイセリア属(*Neisseria*)にも認められている。このファミリーの好ましいメンバーは、PhtA、PhtB、およびPhtDを含む。このメンバーは、PhtAまたはPhtDを含むことがより好ましい。しかし、用語PhtA、PhtB、PhtD、およびPhtEは、以下の引用において開示されている配列を有するタンパク質、ならびに引用されるタンパク質と少なくとも90%同一である配列相同性を有する自然に存在する(および人工の)その変異体を指すことが理解される。この相同性は、少なくとも95%同一であることが好ましく、97%同一であることが最も好ましい。

40

【0043】

Phtタンパク質に関しては、PhtAがW098/18930で開示されており、Sp36とも称される。上述の通り、PhtAは、ポリヒスチジントライアドファミリー由来のタンパク質であり、LXXCのII型シグナルモチーフを有する。

50

【0044】

PhtDは、W000/37105で開示されており、Sp036Dとも称される。上述の通り、PhtDは、ポリヒスチジントライアッドファミリー由来のタンパク質であり、II型LXXCシグナルモチーフを有する。

【0045】

PhtBは、W000/37105で開示されており、Sp036Bとも称される。PhtBファミリーの別のメンバーは、W000/17370で開示されているC3分解ポリペプチドである。このタンパク質もポリヒスチジントライアッドファミリーに由来し、II型LXXCシグナルモチーフを有する。好ましい免疫学的機能等価物は、W098/18930で開示されているタンパク質Sp42である。PhtBトランケート(約79kD)は、W099/15675で開示されており、PhtXファミリーのメンバーとも考えられる。

10

【0046】

PhtEは、W000/30299で開示されており、BVH-3とも称される。

【0047】

SpsAは、W098/39450で開示されているコリン結合タンパク質(Cbp)である。

【0048】

Lytファミリーは、細胞溶解に関連した膜結合タンパク質である。N末端ドメインは、コリン結合ドメインを含むが、Lytファミリーは、下記のコリン結合タンパク質ファミリー(Cbp)ファミリーに見られる特徴をすべて有しているとは限らず、したがって、本発明では、Lytファミリーは、Cbpファミリーと異なると考えられる。Cbpファミリーと対照的に、C末端ドメインは、Lytタンパク質ファミリーの触媒ドメインを含有する。このファミリーは、LytA、LytB、およびLytCを含む。Lytファミリーに関しては、LytAがRondaら、Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)で開示されている。LytBは、W098/18930で開示されており、Sp46とも称される。LytCもW098/18930で開示されており、Sp91とも称される。このファミリーの好ましいメンバーはLytCである。

20

【0049】

別の好ましい実施形態は、Lytファミリー(特にLytA)のトランケートであり、ここで、「Lyt」は上記で定義されており、「トランケート」は、コリン結合領域の50%以上を欠いているタンパク質を指す。このようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠いていることが好ましい。

30

【0050】

Sp125は、LPXTG(ただし、Xは任意のアミノ酸である)の細胞壁固定化モチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質の一例である。このモチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質のこのクラス内にあるどのタンパク質も本発明の状況の中で有用であることが認められており、したがって、本発明のさらなるタンパク質であると考えられる。Sp125はそれ自体、W098/18930で開示されており、ZmpB、すなわち亜鉛メタロプロテイナーゼとしても知られている。

30

【0051】

Sp101は、W098/06734で開示されている(これは参照番号y85993を有する)。これは、I型シグナル配列を特徴とする。

40

【0052】

Sp133は、W098/06734で開示されている(これは参照番号y85992を有する)。これも、I型シグナル配列を特徴とする。

【0053】

Sp128およびSp130は、W000/76540で開示されている。

【0054】

本発明において使用されるタンパク質は、群PhtD、PhtA、およびPhtE、またはこうしたタンパク質の2つまたは3つすべての組合せ(すなわち、PhtA+D、A+E、D+E、またはA+D+E)から選択されることが好ましい。

【0055】

含めることができるさらなる肺炎球菌タンパク質抗原は、ニューモリシン(PIyとも称さ

50

れる。化学的処理または突然変異によって解毒されることが好ましい。) [WO96/05859、WO90/06951、WO99/03884]、PsaAおよびその膜貫通欠失変異体(Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62)、PspAおよびその膜貫通欠失変異体(US5804193、WO92/14488、WO99/53940)、PspCおよびその膜貫通欠失変異体(WO97/09994、WO99/53940)、コリン結合タンパク質(Cbp)ファミリーのメンバー[例えば、CbpAおよびその膜貫通欠失変異体(WO97/41151、WO99/51266)]、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Infect. Immun. 1996 64:3544)、HSP70(WO96/40928)、PcpA(Sanchez-Beatoら. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14)、M様タンパク質(SB特許出願番号EP0837130)、およびアドヘシン18627(SB特許出願番号EP0834568)からなる群からの1種または複数である。本発明は、このようなタンパク質の免疫学的機能等価物またはトランケート(上記で定義した通り)も包含する。

10

【0056】

コリン結合タンパク質ファミリーに関しては、このファミリーのメンバーは当初、コリンアフィニティクロマトグラフィーによって精製することができる肺炎球菌タンパク質として同定された。コリン結合タンパク質はすべて、細胞壁タイコ酸および膜結合リボテイコ酸のホスホリルコリン部分に非共有結合している。構造的に、このタンパク質は、全ファミリーに共通していくつかの領域を有するが、このタンパク質の正確な性質(アミノ酸配列、長さなど)は異なり得る。通常、コリン結合タンパク質は、N末端領域(N)、保存された反復領域(R1および/またはR2)、プロリンリッチ領域(P)、およびこのタンパク質の約半分を占める複数の反復で構成されている保存されたコリン結合領域(C)を含む。本願明細書では、用語「コリン結合タンパク質ファミリー(Cbp)」は、WO97/41151で同定されているコリン結合タンパク質、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD、およびCbpGからなる群から選択される。CbpAはWO97/41151で開示されている。CbpDおよびCbpGはWO00/29434で開示されている。PspCは、WO97/09994で開示されている。PbcAはWO98/21337で開示されている。コリン結合タンパク質は、CbpA、PbcA、SpsA、およびPspCからなる群から選択されることが好ましい。

20

【0057】

Cbpは、利用されるさらなるタンパク質である場合、Cbpトランケートであってよく、ここで、「Cbp」は上記で定義されており、「トランケート」は、コリン結合領域(C)の50%以上を欠いているタンパク質を指す。このようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠いていることが好ましい。より好ましくは、このようなタンパク質トランケートは、(i)コリン結合領域および(ii)さらにはタンパク質のN末端半分の一部分を欠いているが、少なくとも1種の反復領域(R1またはR2)を保持する。さらにより好ましくは、このトランケートは、2種の反復領域(R1およびR2)を有する。このような好ましい実施形態の例は、WO99/51266またはWO99/51188で例示されている、NR1xR2、R1xR2、NR1xR2P、およびR1xR2Pであるが、類似のコリン結合領域を欠いている他のコリン結合タンパク質も本発明の範囲内で企図される。

30

【0058】

Cbpトランケート-Lytトランケートキメラタンパク質(または融合体)を本発明の組成物において使用することもできる。これは、CbpのNR1xR2(またはR1xR2またはNR1xR2PまたはR1xR2P)およびLytのC末端部分(Cterm、すなわちコリン結合ドメインを欠いている)(例えば、LytCCtermまたはSp91Cterm)を含むことが好ましい。Cbpは、CbpA、PbcA、SpsA、およびPspCからなる群から選択されることがより好ましい。Cbpは、CbpAであることがさらにより好ましい。LytはLytC(Sp91とも称される)であることが好ましい。

40

【0059】

コリン結合ドメイン(C)を欠いており、Lytとの融合タンパク質として発現されるPspAまたはPsaAトランケートを使用することもできる。LytはLytCであることが好ましい。

【0060】

肺炎球菌組成物において、本発明の様々な肺炎球菌タンパク質を組み合わせることが可能である。

【0061】

50

本発明のタンパク質の組合せは、LXXC(ただし、Xは、任意のアミノ酸、例えばポリヒスチジントライアドファミリー(Pht)である)のII型シグナル配列モチーフを有するタンパク質、コリン結合タンパク質(Cbp)、I型シグナル配列モチーフ(例えば、Sp101)を有するタンパク質、LPXTGモチーフ(ただし、Xは、任意のアミノ酸、例えばSp128、Sp130である)を有するタンパク質、毒素(例えば、PIy)などの2種以上(3種または4種)の様々な範疇から選択されることが好ましい。こうした範疇(またはモチーフ)内の好ましい例は、上述のタンパク質またはその免疫学的機能等価物である。毒素+Pht、毒素+Cbp、Pht+Cbp、および毒素+Pht+Cbpは、好ましい範疇の組合せである。

【0062】

好ましい有益な組合せには、それだけに限らないが、PhtD+NR1xR2、PhtD+NR1xR2-Sp91C termキメラまたは融合タンパク質、PhtD+PIy、PhtD+Sp128、PhtD+PsaA、PhtD+PspA、PhtA+NR1xR2、PhtA+NR1xR2-Sp91C termキメラまたは融合タンパク質、PhtA+PIy、PhtA+Sp128、PhtA+PsaA、PhtA+PspA、NR1xR2+LytC、NR1xR2+PspA、NR1xR2+PsaA、NR1xR2+Sp128、R1xR2+LytC、R1xR2+PspA、R1xR2+PsaA、R1xR2+Sp128、R1xR2+PhtD、R1xR2+PhtAが含まれる。NR1xR2(またはR1xR2)は、CbpAまたはPspC由来であることが好ましい。これはCbpA由来であることがより好ましい。

【0063】

肺炎球菌タンパク質の特に好ましい組合せは、PIy(またはそのトランケートもしくは免疫学的機能等価物)+PhtD(またはそのトランケートもしくは免疫学的機能等価物)を場合によってNR1xR2(またはR1xR2またはNR1xR2PまたはR1xR2P)と共に含む。NR1xR2(またはR1xR2またはNR1xR2PまたはR1xR2P)は、CbpAまたはPspC由来であることが好ましい。これはCbpA由来であることがより好ましい。

【0064】

抗原は、少なくとも4種の血清型、好ましくは少なくとも7種の血清型、より好ましくは少なくとも11種の血清型に由来する多糖抗原と、上記のタンパク質からなる群から選択されることが好ましい少なくとも1種、好ましくは2、3、または4種の肺炎連鎖球菌タンパク質とを含む肺炎球菌糖コンジュゲートであってもよい。このタンパク質のうちの1つは、PhtD(またはその免疫学的機能等価物)および/またはPIy(またはその免疫学的機能等価物)であることが好ましい。

【0065】

多糖によるワクチン接種手法に伴う問題は、多糖それ自体が免疫原として劣る事実である。これを克服するために、糖をタンパク質担体とコンジュゲートすることができ、これは、バイスタンダーであるT細胞の助けを提供する。したがって、本発明において利用される糖をこのようなタンパク質担体と結合させることが好ましい。糖免疫原の作製するのに現在一般に使用されているこのような担体の例には、ジフテリアおよび破傷風トキソイド(それぞれDT、DT CRM197、およびTT)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、髄膜炎菌(*N. meningitidis*)由来のOMPC、およびツベルクリンの精製タンパク誘導体(PPD)が含まれる。

【0066】

肺炎球菌糖ベースの免疫原性組成物(またはワクチン)用の好ましい担体は、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のタンパク質D(EP594610-B)またはその断片である。使用に適した断片には、Tヘルパーエピトープを包含する断片が含まれる。特に、タンパク質D断片は、タンパク質のN末端3分の1を含有することが好ましいと思われる。タンパク質D担体は、複数の肺炎球菌糖抗原とコンジュゲートされている組成物における担体として有用である。組み合わせた1種または複数の肺炎球菌糖は、有利には、タンパク質Dとコンジュゲートすることができる。

【0067】

肺炎球菌糖用の好ましいさらなる担体は、肺炎球菌タンパク質それ自体である(「本発明の肺炎球菌タンパク質」の節で既に定義した通りである)。

【0068】

10

20

30

40

50

この糖は、任意の知られている方法(例えば、Likhiteの米国特許第4,372,945号およびA rmorらの米国特許第4,474,757号による)により、担体タンパク質と結合させてもよい。CD APによるコンジュゲーションを実施することが好ましい(WO95/08348)。

【0069】

コンジュゲートのタンパク質:糖(重量:重量)比は、好ましくは0.3:1~1:1、より好ましくは0.6:1~0.8:1、最も好ましくは約0.7:1である。

【0070】

本発明の特に好ましい組成物は、1種または複数のコンジュゲートした肺炎球菌糖、および本発明の1種または複数の肺炎球菌タンパク質を含む。さらに、肺炎球菌糖および肺炎球菌タンパク質は、リン酸アルミニウムに液体の形態で吸着したバルク成分として安定に保存することができる。

10

【0071】

他の抗原は、好適には、HIV-1(例えば、gagまたはその断片、例えば、p24、tat、nef、gp120、もしくはgp160またはこれらの任意のものの断片)、ヒトヘルペスウイルス(human herpes virus)、例えば、gDもしくはその誘導体または前初期タンパク質、例えば、HSV1またはHSV2由来のICP27、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus)((特にヒト)(例えば、gBまたはその誘導体)、ロタウイルス(Rotavirus)(弱毒生ウイルスを含む)、エプスタインバーウイルス(Epstein Barr virus)(例えば、gp350またはその誘導体)、水痘带状疱疹ウイルス(Varicella Zoster Virus)(例えば、gp1、II、およびIE63)に由来するもの、または肝炎ウイルス(hepatitis virus)、例えば、B型肝炎ウイルス(例えばB型肝炎表面抗原またはその誘導体)、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルスに由来するもの、または他のウイルス病原体、例えば、パラミクソウイルス(paramyxovirus):呼吸器合胞体ウイルス(Respiratory Syncytial virus)(例えば、F、N、M、およびGタンパク質またはその誘導体)、パラインフルエンザウイルス(parainfluenza virus)、麻疹ウイルス(measles virus)、ムンプスウイルス(mumps virus)、ヒトパピローマウイルス(例えばHPV 6、11、16、18)、 flavivirus(例えば、黄熱ウイルス(Yellow Fever Virus)、デングウイルス(Dengue Virus)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(Tick-borne encephalitis virus)、日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis Virus))、またはインフルエンザウイルス(全生もしくは不活化ウイルス、卵またはMDCK細胞中で増殖したスプリットインフルエンザウイルス、または全インフルエンザビロソーム(R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920に記載の通り)、またはその精製もしくは組換えタンパク質、例えば、HA、NP、NAもしくはMタンパク質またはその組合せ)に由来するもの、あるいは細菌病原体、例えば、淋菌(N. gonorrhoea)および髄膜炎菌(例えば莢膜糖およびそのコンジュゲート、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PiIC、アドヘシン)を含めたナイセリア属種;化膿性連鎖球菌(S. pyogenes)(例えばMタンパク質またはその断片、C5Aタンパク質分解酵素、リポテイコ酸)、S.アガラクティエ(S. agalactiae)、ミュータンス連鎖球菌(S. mutans);軟性下疳菌(H. ducreyi);カタル球菌(Branhamella catarrhalis)としても知られているモラクセラ・カタラリス(Moraxella catarrhalis)(例えば、高分子量および低分子量アドヘシンならびにインベイシン)を含めたモラクセラ属種(Moraxella spp);百日咳菌(Bordetella pertussis)(例えば、ペルタクチン、百日咳毒素またはその誘導体、線維状赤血球凝集素、アデニル酸シクラーゼ、線毛)、パラ百日咳菌(B. parapertussis)、および気管支敗血症菌(B. bronchiseptica)を含めたボルデテラ属種(Bordetella spp);ヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)(例えばESAT6、抗原85A、85Bまたは85C)、ウシ型結核菌(M. bovis)、ライ菌(M. leprae)、トリ型結核菌(M. avium)、パラ結核菌(M. paratuberculosis)、スメグマ菌(M. smegmatis)を含めたマイコバクテリウム属種(Mycobacterium spp.);在郷軍人病菌(Legionella pneumophila)を含めたレジオネラ属種(Legionella spp);腸管毒性大腸菌(enterotoxic Escherichia coli)(例えば、定着因子、易熱性毒素またはその誘導体、耐熱性毒素またはその誘導体)、腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic E. coli)、腸管病原性大腸菌(enteropathogenic E. coli)(例えば志賀毒素様毒素またはその誘導体)を含めたエシェリヒア属種(Escherichia spp);コレラ菌(Vibrio cho

20

20

30

40

40

50

lera)を含めたビブリオ属種(*Vibrio* spp)(例えばコレラ毒素またはその誘導体);ソンネ赤痢菌(*Shigella sonnei*)、志賀赤痢菌(*S. dysenteriae*)、フレクスナー赤痢菌(*S. flexneri*)を含めたシゲラ属種(*Shigella* spp);エンテロコリチカ菌(*Yersinia enterocolitica*)(例えばYopタンパク質)、ペスト菌(*Y. pestis*)、仮性結核菌(*Y. pseudotuberculosis*)を含めたエルシニア属種(*Yersinia* spp);カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)(例えば、毒素、アドヘシン、およびインベイシン)およびC.コリ(*C. coli*)を含めたカンピロバクター属種(*Campylobacter* spp);チフス菌(*Salmonella typhi*)、パラチフス菌(*S. paratyphi*)、ブタコレラ菌(*S. choleraesuis*)、腸炎菌(*S. enteritidis*)を含めたサルモネラ属種(*Salmonella* spp);リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)を含めたリステリア属種(*Listeria* spp.);ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)を含めたヘリコバクター属種(*Helicobacter* spp)(例えば、ウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化毒素);緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を含めたシュードモナス属種(*Pseudomonas* spp);黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*)を含めたブドウ球菌属種(*Staphylococcus* spp.);大便連鎖球菌(*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*)を含めたエンテロコッカス属種(*Enterococcus* spp.);破傷風菌(*Clostridium tetani*)(例えば、破傷風毒素およびその誘導体)、ボツリヌス菌(*C. botulinum*)(例えば、ボツリヌストキシンおよびその誘導体)、*C. difficile*(*C. difficile*)(例えば、クロストリジウム毒素AまたはBおよびその誘導体)を含めたクロストリジウム属種(*Clostridium* spp.);炭疽菌(*Bacillus anthracis*)(例えば、ボツリヌストキシンおよびその誘導体)を含めたバシラス属(*Bacillus* spp.);ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)(例えば、ジフテリア毒素およびその誘導体)を含めたコリネバクテリウム属種(*Corynebacterium* spp.);ライム病菌(*Borrelia burgdorferi*)(例えば、OspA、OspC、DpbA、DpbB)、*B. garinii*(*B. garinii*)(例えば、OspA、OspC、DpbA、DpbB)、*B. afzelii*(*B. afzelii*)(例えば、OspA、OspC、DpbA、DpbB)、*B. andersonii*(*B. andersonii*)(例えば、OspA、OspC、DpbA、DpbB)、*B. hermsii*(*B. hermsii*)を含めたボレリア属種(*Borrelia* spp.);エーリキア・エクイ(*Ehrlichia* spp.);ヒト顆粒球エーリキア症の病原体を含めたエーリキア属種(*Ehrlichia* spp.);ロッキー山紅斑熱リケッチャ(*Rickettsia rickettsii*)を含めたリケッチャ属種(*Rickettsia* spp);トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)(例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、肺炎クラミジア(*C. pneumoniae*)(例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、オウム病クラミジア(*C. psittaci*)を含めたクラミジア属種(*Chlamydia* spp.);レプトスピラ・インテロガンス(*Leptospira interrogans*)を含めたレプトスピラ属種(*Leptospira* spp.);梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)(例えば、稀な外膜タンパク質)、*T. denticola*、*T. hyoile*、*T. hyoile*を含めたトレポネーマ属種(*Treponema* spp.)に由来するもの;あるいは寄生虫、例えば、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)を含めたプラスモディウム属種(*Plasmodium* spp.);トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)(例えば、SAG2、SAG3、Tg34)を含めたトキソプラズマ属種(*Toxoplasma* spp.);赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)を含めたエントアメーバ属種(*Entamoeba* spp.);バベシア・ミクロチ(*Babesia microti*)を含めたバベシア属種(*Babesia* spp.);クルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)を含めたトリパノソーマ属種(*Trypanosoma* spp.);ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)を含めたジアルジア属種(*Giardia* spp.);森林型熱帯リーシュマニア(*Leshmania major*)を含めたリーシュマニア属種(*Leshmania* spp.);ニューモシスティス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)を含めたニューモシスティス属種(*Pneumocystis* spp.);膣トリコモナス(*Trichomonas vaginalis*)を含めたトリコモナス属種(*Trichomonas* spp.);マンソン住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)を含めた住血吸虫属種(*Schistosoma* spp.)に由来するもの;あるいは酵母菌、例えば、カンジダアルビカンス(*Candida albicans*)を含めたカンジダ属種(*Candida* spp.);クリプトコッカス・ネオフォルマンス(*Cryptococcus neoformans*)を含めたクリプトコッカス属種(*Cryptococcus* spp.)に由来するものである。

【 0 0 7 2 】

ヒト型結核菌に特異的な他の好ましい抗原は、例えば、Tb Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb3

10

20

30

40

50

8-1、Erd14、DPV、MTI、MSL、mTCC2、およびhTCC1(WO99/51748)である。また、ヒト型結核菌のタンパク質には、ヒト型結核菌の少なくとも2種、好ましくは3種のポリペプチドが融合してより大きなタンパク質となっている融合タンパク質およびその変異体が含まれる。好ましい融合体には、Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、およびTbH9-DPV-MTIが含まれる(WO99/51748)。

【0073】

クラミジアの最も好ましい抗原には、例えば、高分子量タンパク質(HWMP)(WO99/17741)、ORF3(EP366412)、および推定膜タンパク質(Pmp)が含まれる。組成物の他のクラミジア抗原は、WO99/28475に記載の群から選択することができる。

10

【0074】

好ましい細菌組成物は、B型インフルエンザ菌(例えば、PRPおよびそのコンジュゲート)、分類不能型インフルエンザ菌を含めたヘモフィルス属種に由来する抗原、例えば、OMP26、高分子量アドヘシン、P5、P6、タンパク質Dおよびリポタンパク質D、ならびにフィンプリンおよびフィンプリン由来ペプチド(US5,843,464)またはその多コピー変異体もしくは融合タンパク質を含む。

【0075】

B型肝炎表面抗原の誘導体は、当技術分野で周知であり、これには、特に、欧州特許出願EP-A-414374、EP-A-0304578、およびEP198-474に記載されているこうしたPreS1、PreS2-S抗原が含まれる。好ましい一態様において、本発明のワクチン製剤は、特にCHO細胞内で発現されるHIV-1抗原gp120を含む。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、上記で定義されるgD2tを含む。

20

【0076】

本発明の好ましい実施形態において、組成物は、陰部疣瘍の原因と考えられるヒトパピローマウイルス(HPV)(HPV6またはHPV11など)、および子宮頸癌の原因と考えられるHPVウイルス(HPV16、HPV18など)に由来する抗原を含有する。

20

【0077】

陰部疣瘍予防または治療のための組成物の特に好ましい形態は、HPVタンパク質E1、E2、E5、E6、E7、L1、およびL2から選択される1種または複数の抗原を含む、L1粒子またはL1カプソマーおよび融合タンパク質を含む。

30

【0078】

融合タンパク質の最も好ましい形態は、WO96/26277で開示されているL2E7、およびGB9717953.5(PCT/EP98/05285)で開示されているタンパク質D(1/3)-E7である。

【0079】

HPV頸部感染または子宮頸癌予防または治療のための好ましい組成物は、HPV16またはHPV18抗原を含むことができる。例えば、L1もしくはL2抗原モノマー、またはウイルス様粒子(VLP)として一緒に提供されるL1もしくはL2抗原、またはVLPもしくはカプソマー構造として単独で提示されるL1単独のタンパク質である。このような抗原、ウイルス様粒子、およびカプソマーはそれ自体既知である。例えば、WO94/00152、WO94/20137、WO94/05792、およびWO93/02184を参照されたい。

40

【0080】

E7、E2、または好ましくはE5などの追加の初期タンパク質を単独で、または融合タンパク質として含めてもよく、例えば、この特に好ましい実施形態には、L1E7融合タンパク質を含むVLPが含まれる(WO96/11272)。

【0081】

特に好ましいHPV16抗原は、初期タンパク質E6またはE7をタンパク質D担体と融合した形態で含んで、HPV16由来のタンパク質D-E6もしくはE7融合体またはその組合せ;またはE6もしくはE7とL2との組合せを形成する(WO96/26277)。

【0082】

あるいは、HPV16またはHPV18初期タンパク質E6およびE7は、单一分子、好ましくはタン

50

パク質D-E6/E7融合体として提供することができる。このような組成物は、HPV18由来のE6およびE7タンパク質のいずれかまたは両方を、好ましくはタンパク質D-E6もしくはタンパク質D-E7融合タンパク質またはタンパク質D-E6/E7融合タンパク質の形態で場合によって含有していてもよい。

【0083】

本発明の組成物は、他のHPV株、好ましくは株HPV31または33由来の抗原をさらに含むことができる。

【0084】

本発明の組成物は、マラリアを引き起こす寄生虫に由来する抗原をさらに含む。例えば、熱帯熱マラリア原虫由来の好ましい抗原には、スプロゾイト周囲タンパク質(CSタンパク質)、RTS,S、MSP1、MSP3、LSA1、LSA3、AMA1、およびTRAPが含まれる。RTSは、B型肝炎表面抗原のpreS2部分の4アミノ酸を介して、B型肝炎ウイルスの表面(S)抗原に連結した、熱帯熱マラリア原虫のスプロゾイト周囲(CS)タンパク質のC末端部分をほぼすべて含むハイブリッドタンパク質である。その完全構造は、番号WO93/10152の下で公開された国際特許出願番号PCT/EP92/02591で開示されており、これは英国特許出願第9124390.7号の優先権を主張する。RTSは、酵母菌で発現される場合、リポタンパク質粒子として産生され、またHBV由来のS抗原と共に発現される場合、RTS,Sとして知られている混合粒子が生じる。TRAP抗原は、WO90/01496の下で公開された国際特許出願番号PCT/GB89/00895に記載されている。本発明の好ましい実施形態は、抗原性調製物がRTS,SおよびTRAP抗原の組合せを含むマラリアワクチンである。多価マラリアワクチンの成分となる候補である可能性が高い他のプラスモディウム抗原は、熱帯熱マラリア原虫MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、Sequestrin、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230、およびプラスモディウム属種におけるそのアナログである。本発明の一実施形態は、RTS,SもしくはCSタンパク質またはRTS,SのCS部分などのその断片を、例えば、MSP1、MSP3、AMA1、LSA1またはLSA3からなる群から選択することができる1種または複数のさらなるマラリア抗原と組み合わせて含む組成物である。

【0085】

この組成物は、抗腫瘍抗原を含有することもでき、免疫療法による癌治療に有用であり得る。例えば、この抗原は、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、腎癌、または黒色腫に対する抗原などの腫瘍拒絶抗原であってもよい。例示的な抗原には、MAGE1、MAGE3、およびMAGE4、またはWO99/40188で開示されているものなど他のMAGE抗原、PRAME、BAGE、Lage(NY Eos1としても知られている)、SAGE、およびHAGE(WO99/53061)またはGAGE(Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eyndeら., International Journal of Clinical & Laboratory Research (submitted 1997); Correaleら. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293)が含まれる。実際、こうした抗原は、黒色腫、肺癌、肉腫、および膀胱癌などの種々の腫瘍型において発現される。

【0086】

本発明において使用するためのMAGE抗原は、発現エンハンサーまたは免疫学的融合パートナーとの融合タンパク質として発現させてもよい。特に、Mageタンパク質は、B型インフルエンザ菌由来のタンパク質Dまたはその脂質化誘導体と融合してもよい。特に、この融合パートナーは、タンパク質Dの最初の3分の1を含むことができる。このような構築物はWO99/40188で開示されている。

【0087】

他の腫瘍特異的な抗原には、それだけには制限されないが、GM2、GM3などのKSA(GA733)腫瘍特異的ガングリオシド、または担体タンパク質とのそのコンジュゲートが含まれ、あるいは前記抗原は、多く癌の治療または免疫去勢において有用である10アミノ酸長の短ペプチドの全長ゴナドトロピンホルモン放出ホルモン(GnRH、WO95/20600)などの自己ペプチドホルモンであってよい。

【0088】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、前立腺特異抗原(PSA)、PAP、PSCA(PNAS 95(4) 1735 -1740 1998)、PSMA、またはプロスターゼ(Prostase)として知られている抗原などの前立腺抗原が利用される。

【0089】

プロスターゼは、保存されたセリンプロテアーゼ触媒トライアッドH-D-Sおよびアミノ末端プレプロペプチド配列を有する、254アミノ酸長の前立腺特異的セリンプロテアーゼ(トリプシン様)であり、潜在的な分泌機能を示す(P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. M oss, R. Gelinas, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression, In Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114-3119)。推定グリコシル化部位が記載されている。その予測構造は、他の既知のセリンプロテアーゼと極めて類似しており、成熟ポリペプチドが単一ドメインに折り畳まれることが示されている。この成熟タンパク質は、224アミノ酸長であり、1つのA2エピトープが自然にプロセシングされることが示されている。

10

【0090】

プロスターゼヌクレオチド配列および推定ポリペプチド配列およびホモログは、Ferguson,ら. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)、ならびに国際特許出願番号W098/12302(さらに、対応する付与特許US5,955,306)、W098/20117(さらに、対応する付与特許US5,840,871およびUS5,786,148)(前立腺特異的カリクレイン)、およびWO00/04149(P703P)で開示されている。

20

【0091】

本発明は、プロスターゼタンパク質ベースのプロスターゼタンパク質融合体ならびにその断片およびホモログ(「誘導体」)を含む組成物を提供する。このような誘導体は、前立腺腫瘍の治療に適した治療用ワクチン製剤における使用に適している。通常、この断片は、上記の参照特許および特許出願で開示されている通り、少なくとも20個、好ましくは50個、より好ましくは100個の連続するアミノ酸を含有する。

【0092】

さらなる好ましい前立腺抗原は、W098/37814の配列番号113であるP501Sとして知られている。免疫原性断片およびその部分は、上記の参照特許出願で開示されている通り、少なくとも20個、好ましくは50個、より好ましくは100個の連続するアミノ酸を含む。例えば、PS108(WO98/50567)を参照されたい。

30

【0093】

他の前立腺特異抗原は、W098/37418およびWO/004149により知られている。別の抗原はSTEAPである(PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)。

【0094】

本発明の状況において有用な他の腫瘍関連抗原には、Plu-1(J Biol. Chem 274 (22) 15 633-15645, 1999)、HASH-1、HasH-2、クリプト(Cripto)(Salomonら Bioessays 199, 21 6 1-70、米国特許第5654140号)、クリプチン(Criptin)(米国特許第5981215号)が含まれる。さらに、特に癌の治療に関連する抗原はまた、チロシナーゼおよびサバイビンを含む。

40

【0095】

Muc1などのムチン由来のペプチドについては、例えば、US5744,144、US5827,666、WO88 05054、US4,963,484を参照されたい。Muc1ペプチドの少なくとも1個の反復単位、好ましくは少なくとも2個のこのような反復を含み、SM3抗体(US6054438)によって認識されるMuc 1由来ペプチドが具体的に企図されている。他のムチン由来ペプチドにはMuc5由来のペプチドが含まれる。

【0096】

本発明の抗原は、her2/Neu、マンマグロビン(米国特許第5668267号)、またはWO/005216 5、WO99/33869、WO99/19479、WO98/45328で開示されているものなど、乳癌抗原であってもよい。Her2 neu抗原は、特に、米国特許第5,801,005号で開示されている。Her2 neuは、細胞外ドメイン全体(約1~645アミノ酸を含む)またはその断片、およびC末端の約580ア

50

ミノ酸である細胞内ドメイン全体またはその少なくとも1つの免疫原性部分を含むことが好ましい。特に、この細胞内部分は、リン酸化ドメインまたはその断片を含むべきである。このような構築物はWO00/44899で開示されている。特に好ましい構築物は、ECD PDとして知られており、もう一方はECD PDとして知られている(WO/00/44899参照)。本明細書で使用されるher2 neuは、ラット、マウス、またはヒトに由来し得る。

【0097】

この組成物は、腫瘍支持機序(例えば、血管形成、腫瘍浸潤)に関連する抗原、例えば、tie2、VEGFを含有していてもよい。

【0098】

本発明の組成物に、ボレリア属種に由来する抗原を使用してもよいことが予測される。10 例えば、抗原には、核酸、病原体由来の抗原または抗原性調製物、組換えにより產生されたタンパク質またはペプチド、およびキメラ融合タンパク質が含まれ得る。特に、この抗原はOspAである。OspAは、(Lipo-OspA)と称される、宿主細胞(大腸菌(E.Coli))によって脂質化された形態の完全成熟タンパク質、または脂質化されていない誘導体であってよい。このような脂質化されていない誘導体には、インフルエンザウイルスの非構造タンパク質(NS1)のN末端の最初の81アミノ酸および完全OspAタンパク質を有する脂質化されていないNS1-OspA融合タンパク質が含まれ、さらに、MDP-OspAは、N末端の追加の3アミノ酸を有するOspAの脂質化されていない形態である。

【0099】

本発明の組成物は、アレルギーを予防または治療するために使用することができる。20 このようなワクチンは、アレルゲン特異的抗原(例えば、Der p1)およびアレルゲン非特異的抗原(例えば、それだけには制限されないが、stanworthのデカペプチド(EP0477231B1)を含めた、ヒトIgEに由来するペプチド)を含むはずである。

【0100】

本発明の組成物は、アレルギー、癌、または感染症以外に、慢性障害を予防または治療するために使用することもできる。このような慢性障害は、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマーなどの疾患である。

【0101】

本発明の組成物は、特に、慢性状態、癌などの疾患の免疫療法による治療に適しているが、持続感染の治療にも適している。したがって、本発明の組成物は、特に、結核(TB)、30 AIDS、B型肝炎(HepB)ウイルス感染などの感染症の免疫療法に適している。

【0102】

また、AIDSの状況では、AIDSに感染しやすい、またはAIDSを患う個体を治療する方法が提供される。本発明のワクチンを個体に投与し、それにより後のHIV感染によって引き起こされるCD4+T細胞減少の量を低減し、またはHIVに既に感染した個体のCD4+T細胞減少を鈍化または停止させることを含む方法である。

【0103】

他の抗原には、上記のこうした肺炎球菌抗原以外に(またはそれに加えて)、細菌(好ましくは莢膜)糖が含まれる。多糖抗原は、好都合には、リン酸アルミニウムに吸着した液体バルクとして保存される。したがって、前記液体バルクを本発明のオイルエマルジョンと即座に混合することにより本発明のワクチン組成物を生成することが容易である。他の細菌糖は、髄膜炎菌血清型Aの莢膜糖(MenA)、髄膜炎菌血清型Cの莢膜糖(MenC)、髄膜炎菌血清型Yの莢膜糖(MenY)、髄膜炎菌血清型W-135の莢膜糖(MenW)、B群連鎖球菌I群の莢膜糖、B群連鎖球菌II群の莢膜糖、B群連鎖球菌III群の莢膜糖、B群連鎖球菌IV群の莢膜糖、B群連鎖球菌V群の莢膜糖、黄色ブドウ球菌5型の莢膜糖、黄色ブドウ球菌8型の莢膜糖、チフス菌由来のVi糖、髄膜炎菌LPS、モラクセラ・カタラリスLPS、およびインフルエンザ菌LPSからなる群から選択されることが好ましい。LPSとは、天然リポ多糖(またはリポオリゴ糖)もしくは脂質部分がいくつかの既知の任意の方法(例えば、WO97/18837またはWO98/33923を参照されたい)によって解毒されているリポ多糖、または前記LPSに由来するO-多糖を含む任意の分子のいずれかを意味する。髄膜炎菌LPSとは、12種の既知の免疫型(L1、L2 40 50

、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、またはL12)のうちの1種または複数を意味する。

【0104】

特に好ましい組合せは、1)コンジュゲートHib、コンジュゲートMenA、およびコンジュゲートMenC、2)コンジュゲートHib、コンジュゲートMenY、およびコンジュゲートMenC、3)コンジュゲートHibおよびコンジュゲートMenC、ならびに4)コンジュゲートMenA、コンジュゲートMenC、コンジュゲートMenY、およびコンジュゲートMenW-135を含む組成物である。上記各コンジュゲート中のPSの量は、ヒト用量0.5mL当たりそれぞれ5gまたは10gであつてよい。Hib、MenA、MenC、MenW-135、およびMenYは、TTコンジュゲートであることが好ましい。

10

【0105】

多糖によるワクチン接種手法に伴う問題は、多糖それ自体が免疫原として劣る事実である。これを克服するために、本発明の糖をタンパク質担体とコンジュゲートすることができる、これは、バイスタンダーであるT細胞の助けを提供する。したがって、本発明において利用される糖をこのようなタンパク質担体と結合させることが好ましい。糖免疫原を作製するのに現在一般に使用されているこのような担体の例には、ジフテリアおよび破傷風トキソイド(それぞれDT、DT CRM197、およびTT)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、インフルエンザ菌由来のタンパク質D(EP594610-B)、髄膜炎菌由来のOMPC、およびツベルクリンの精製タンパク誘導体(PPD)が含まれる。

20

【0106】

この糖は、任意の知られている方法(例えば、Likhiteの米国特許第4,372,945号およびArmorらの米国特許第4,474,757号による)により、担体タンパク質と結合させてもよい。CD APによるコンジュゲーションを実施することが好ましい(WO95/08348)。

20

【0107】

コンジュゲートのタンパク質:糖(重量:重量)比は、好ましくは0.3:1~1:1、より好ましくは0.6:1~0.8:1、最も好ましくは約0.7:1である。

【0108】

肺炎球菌および様々な病原体からの保護を提供する抗原の組合せは本発明に包含される。小児が受ける注射の数を低減するために、現在多くの小児科ワクチンが混合ワクチンとして提供されている。したがって、小児科ワクチン用に、他の病原体に由来する他の抗原を本発明の肺炎球菌ワクチンと共に配合してもよい。例えば、本発明のワクチンは、ジフテリアトキソイド(DT)、破傷風トキソイド(TT)、および百日咳成分[通常、解毒された百日咳トキソイド(PT)および線維状赤血球凝集素(FHA)を任意選択のペルタクチン(PRN)および/またはアグルチニン1+2と共に]を含む周知の「3価」混合ワクチン、例えば、DT、TT、PT、FHA、およびPRN抗原を含有する市販のワクチンINFANRIX-DTPa(商標)(SmithKlineBeecham Biologicals)と共に、または例えば、SmithKlineBeecham Biologicals s.a.からTrianrix(商標)として市販されている全細胞百日咳成分と共に配合する(または別々であるが同時に投与する)ことができる。この混合ワクチンは、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、ポリオウイルス抗原(例えば、不活化3価ポリオウイルス-IPV)、モラクセラ・カタラリスト外膜タンパク質、分類不能型インフルエンザ菌タンパク質、髄膜炎菌B型外膜タンパク質などの他の抗原を含むこともできる。

30

【0109】

混合ワクチン(特に、中耳炎の予防用)中に含めることができる好ましいモラクセラ・カタラリストタンパク質抗原の例は、OMP106[WO97/41731(Antex)およびWO96/34960(PMC)];OMP21;LbpAおよび/またはLbpB[WO98/55606(PMC)];TbpAおよび/またはTbpB[WO97/13785およびWO97/32980(PMC)];CopB[Helminen ME,ら. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010];UspA1および/またはUspA2[WO93/03761(テキサス大学)];OmpCD;HasR(PCT/EP99/03824);PiiQ(PCT/EP99/03823);OMP85(PCT/EP00/01468);lipo06(GB9917977.2);lipo10(GB9918208.1);lipo1(GB9918302.2);lipo18(GB9918038.2);P6(PCT/EP99/03038);D15(PCT/EP99/03822);OmpIA1(PCT/EP99/06781);Hly3(PCT/EP99/03257);およびOmpEである。混合ワクチン(特に、中耳炎)

40

50

炎の予防用)中に含めることができる分類不能型インフルエンザ菌抗原の例には、フィンプリンタンパク質[(US5766608-オハイオ州立研究財団(Ohio State Research Foundation)]およびそれに由来する融合ペプチド[例えば、LB1(f)ペプチド融合体;US5843464(OSU)またはWO99/64067];OMP26[WO97/01638(Cortecs)];P6[EP281673(ニューヨーク州立大学)];Tb pAおよび/またはTbpB;Hia;Hsf;Hin47;Hif;Hmw1;Hmw2;Hmw3;Hmw4;Hap;D15(WO94/12641);タンパク質D(EP594610);P2;およびP5(WO94/26304)が含まれる。

【0110】

企図される他の組合せは、例えば、インフルエンザ(弱毒化、スプリット、またはサブユニット)[例えば、表面糖タンパク質ノイラミニダーゼ(NA)および赤血球凝集素(HA)、例えば、Chaloupka I.ら, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127を参照されたい]、RSV(例えば、FおよびG抗原またはF/G融合体、例えば、Schmidt A. C.ら, J Virol, May 2001, p4594-4603を参照されたい)、PIV3(例えば、HNおよびFプロテイン、例えば、上記Schmidtら.を参照されたい)、水痘(例えば、弱毒化、糖タンパク質I~Vなど)、およびMMR(麻疹、流行性耳下腺炎、風疹)の任意(またはすべて)の成分由来のウイルス抗原と組み合わせた、本発明の肺炎球菌糖およびタンパク質である。

10

【0111】

中耳炎を包括的に治療または予防するための本発明によって企図される好ましい小児科混合ワクチンは、1種または複数の肺炎連鎖球菌糖抗原(タンパク質Dとコンジュゲートしていることが好ましい)、1種または複数の肺炎球菌タンパク質(上記のものが好ましい)、およびモラクセラ・カタラリスおよび/または分類不能型インフルエンザ菌由来の1種または複数の表面露出抗原を含む。タンパク質Dは、本来、B細胞によって媒介される分類不能型インフルエンザ菌(ntHi)からの保護を生じることが可能な免疫原であるので、有利には、肺炎球菌糖のタンパク質担体として使用することができる(上述の通り)。モラクセラ・カタラリスまたは分類不能型インフルエンザ菌抗原は、サブユニット型のワクチン中に含めることができ、または細菌から作製される外膜小胞(小胞)の表面上に存在する抗原として添加してもよい。

20

【0112】

好ましい抗原

上述の通り、一態様において、本発明は、感染および/または疾患を予防するための免疫原性組成物の製造における、

30

- (a)抗原、および
- (d)水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (e)3D MPL

を含む組成物の使用に関し、前記水中油型エマルジョンは、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤を含む。

【0113】

したがって、本発明の組成物は、この組成物によって予防または対応することができる感染および/または疾患に使用され、この組成物において、好適には抗原が疾患に関連した病原体(細菌またはウイルスなど)に由来または関連している。

40

【0114】

A型およびB型インフルエンザウイルス、HPV抗原、RSV AおよびB、SARS、連鎖球菌、VZV、ライノウイルス(rhinovirus)、パラインフルエンザウイルスに由来する抗原は、スプリットインフルエンザ、VZV gE、VZV IE63、および肺炎連鎖球菌由来のPhtDなど本発明において使用することが好ましい。しかし、任意の適切な抗原を使用してもよい。

【0115】

一実施形態において、本発明において使用される組成物は、インフルエンザサブユニット抗原をMF59(商標)アジュバントと共に含んでいない。

【0116】

本発明のすべての態様について、抗原は、CD4 T細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む、または好適には両方とも含むことが好ましい。

50

【0117】

インフルエンザウイルス株および抗原

本発明に従って使用するためのインフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物は、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物であってよい。代替の実施形態において、インフルエンザ調製物は、別の種類の不活化インフルエンザ抗原、例えば、不活化全ウイルスもしくは精製されたHAおよびNA(サブユニットワクチン)、またはインフルエンザビロソームを含有してもよい。さらに別の実施形態において、インフルエンザウイルスは、弱毒生インフルエンザ調製物であってよい。

【0118】

本発明に従って使用するためのスプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物は、好適には、ウイルス粒子が、脂質エンベロープを溶解するための界面活性剤または他の試薬を用いて破壊されている不活化ウイルス調製物である。スプリットウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物は、好適には、可溶化濃度の有機溶剤または界面活性剤を用いて感染性のまたは不活化された全インフルエンザウイルスを断片化し、続いて可溶化剤のすべてまたは大部分およびウイルス性脂質材料の一部または大部分を除去することによって調製される。そのスプリットウイルス抗原性調製物とは、スプリットウイルス成分の抗原特性の大部分を保持しながらスプリットウイルスと比較してある程度精製されていてよいスプリットウイルス調製物を意味する。例えば、卵において製造する場合、スプリットウイルスは卵夾雜タンパク質から除去することができ、または細胞培養において製造する場合、スプリットウイルスは宿主細胞夾雜物から除去することができる。スプリットウイルス抗原性調製物は、2種以上のウイルス株のスプリットウイルス抗原成分を含むことができる。スプリットウイルスを含有するワクチン(「インフルエンザスプリットワクチン」と呼ばれる)またはスプリットウイルス抗原性調製物は通常、残余のマトリックスタンパク質および核タンパク質、および時には脂質、ならびに膜エンベローピタンパク質を含有する。このようなスプリットウイルスワクチンは通常、ウイルス構造タンパク質の大部分または全種類を含有するが、それらは全ウイルスに存在するのと同じ割合であるとは限らない。

【0119】

別の実施形態において、インフルエンザウイルス調製物は、精製されたサブユニットインフルエンザの形態である。サブユニットインフルエンザワクチンは通常、2種の主要なエンベローピタンパク質、HAおよびNAを含有しており、サブユニットインフルエンザワクチンは特に若年のワクチン受容者において通常反応原性が少ないので、全ビリオンワクチンに勝る追加の利点を有し得る。サブユニットワクチンは、組換えにより、または破壊されたウイルス粒子からの精製により作製することができる。

【0120】

別の実施形態において、インフルエンザウイルス調製物は、ビロソームの形態である。ビロソームは、ビロソームのリン脂質二分子膜中に挿入された、標準的な高次構造(authentic conformation)の機能的ウイルスエンベロープ糖タンパク質HAおよびNAを保持する球状の単層小胞である。

【0121】

前記インフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物は、卵由来または組織培養由来であってよい。

【0122】

例えば、本発明によるインフルエンザウイルス抗原またはその抗原性調製物は、卵でインフルエンザウイルスを増殖し、収集された尿膜腔液を精製することによる従来の発育鶏卵法に由来するものであってよい。卵は、突然の通知に対しても数多く蓄積することができる。あるいは、上記ウイルス抗原またはその抗原性調製物は、組織培養を使用して、ウイルスを増殖させるか、または組換えインフルエンザウイルス表面抗原を発現させる任意の新たな作製方法に由来するものであってよい。ウイルスを増殖させるための適切な細胞基質には、例えば、MDCK、MDCKのクローン由来の細胞、またはMDCK様細胞などのイヌ腎細

10

20

30

40

50

胞、ベロ細胞を含めたAGMK細胞などのサル腎細胞、適切なブタ細胞系、またはワクチン用にインフルエンザウイルスを作製するのに適したあらゆる他の種類の哺乳動物細胞が含まれる。適切な細胞基質には、ヒト細胞、例えば、MRC-5細胞も含まれる。適切な細胞基質は細胞系に限られることなく、例えば、ニワトリ胚線維芽細胞などの一次細胞およびトリの細胞系も含まれる。

【0123】

インフルエンザウイルス抗原またはその抗原性調製物は、いくつかの商用の方法の任意のもの、例えば、参照により本明細書に組み込まれる特許第DD 300833号および第DD 211444号に記載されたスプリットインフルエンザ方法によって作製することもできる。従来より、スプリットインフルエンザは、リン酸トリ-n-ブチルまたはTween(商標)と組み合わせたジエチルエーテル(「Tween-エーテル」スプリット剤として知られている)などの溶剤/界面活性剤処理を使用して作製され、この方法は一部の製造施設でいまだ使用されている。現在使用されている他のスプリット剤には、界面活性剤、タンパク質分解酵素、または胆汁酸塩、例えば、参照により本明細書に組み込まれる特許第DD 155875号に記載のデオキシコール酸ナトリウムが含まれる。スプリット剤として使用することができる界面活性剤には、カチオン性界面活性剤、例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、他のイオン性界面活性剤、例えば、ラウリル硫酸塩、タウロデオキシコール酸塩、または非イオン界面活性剤、例えば、Triton X-100(例えば、Linaら, 2000, *Biologicals* 28, 95-103に記載の方法におけるもの)およびTriton N-101を含めた上記界面活性剤、または任意の2以上の界面活性剤の組合せが含まれる。

10

20

30

40

50

【0124】

スプリットワクチンの調製方法には、様々に組み合わされた、超遠心分離、限外濾過、ゾーン遠心分離、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換)ステップなど、いくつかの様々な濾過および/または他の分離ステップ、および場合によっては、例えば、加熱、ホルムアルデヒドもしくは-プロピオラクトン、またはUVによる、スプリット前または後に実施してもよい不活化ステップが含まれ得る。スプリット方法は、バッチ法、連続法、または半連続法として実施することができる。スプリット免疫原性組成物の好ましいスプリットおよび精製方法は、WO02/097072に記載されている。

【0125】

本発明による好ましいスプリットインフルエンザワクチン抗原調製物は、製造課程で残存したある剩余量のTween80および/またはTriton X-100を含むが、これらは、スプリット抗原の調製後に添加してもよいし、またはその濃度を調節してもよい。好ましくはTween80およびTriton X-100が両方とも存在する。ワクチン用量中のこのような非イオン性界面活性剤の終濃度の好ましい範囲は、

Tween80が0.01~1%、より好ましくは約0.1%(v/v)であり、

Triton X-100が0.001~0.1%(w/v)、より好ましくは0.005~0.02%(w/v)である。

【0126】

特定の実施形態において、Tween80の終濃度は、0.045%~0.09%w/vの範囲にある。別の具体的な実施形態において、抗原は、2倍濃縮混合物として提供され、この混合物は、0.045%~0.2%(w/v)の範囲にあるTween80濃度を有し、アジュバント添加物(または対照製剤中の緩衝液)との最後の配合時に2倍に希釈しなければならない。

【0127】

別の具体的な実施形態において、Triton X-100の終濃度は、0.005%~0.017%w/vの範囲にある。別の具体的な実施形態において、抗原は、2倍濃縮混合物として提供され、この混合物は、0.005%~0.034%(w/v)の範囲にあるTriton X-100濃度を有し、アジュバント添加物(または対照製剤中の緩衝液)との最後の配合時に2倍に希釈しなければならない。

【0128】

インフルエンザ調製物は、低レベルのチオメルサールの存在下で、または好ましくはチオメルサールの不在下で調製されることが好ましい。好ましくは、得られたインフルエンザ調製物は、有機水銀保存剤の不在下で安定であり、特に、この調製物は、剩余のチオメ

ルサールを含有していない。特に、インフルエンザウイルス調製物は、チオメルサールの不在下で、または低レベルのチオメルサールで(通常5 µg/ml以下)安定化する赤血球凝集素抗原を含む。具体的には、B型インフルエンザ株の安定化は、コハク酸 -トコフェロール(コハク酸ビタミンE、すなわちVESとも言う)などの -トコフェロールの誘導体によって実施される。このような調製物およびこれを調製するための方法はWO2/097072で開示されている。

【0129】

好みしい組成物は、適切なインフルエンザシーズンのWHO推奨株から調製された3種の不活化スプリットビリオン抗原を含有する。

【0130】

好みしくは、インフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物および水中油型エマルジョンアジュバントは、同一の容器内に含まれる。これは「1バイアルアプローチ」と称される。このバイアルは、事前に充填されるシリンジであることが好みしい。代替の実施形態において、インフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物および水中油型エマルジョンアジュバントは、別々の容器またはバイアル内に含まれ、対象への投与直前にまたは投与時に混合される。これは「2バイアルアプローチ」と称される。例として、ワクチンが0.7mlの合計用量の2成分ワクチンである場合、濃縮された抗原(例えば、濃縮された3価不活化スプリットビリオン抗原)は、1つのバイアル(335 µl)(抗原容器)内に提供され、事前に充填されたシリンジは、アジュバント(360 µl)を含有する(アジュバント容器)。注射時に、濃縮された3価不活化スプリットビリオン抗原を含有するバイアルの内容物は、アジュバントを含有するシリンジを使用してバイアルから吸い出され、続いてシリンジを穏やかに混合する。注射前に、使用済みの針は筋肉注射針と交換され、容量は530 µlに調整される。用時調製されるアジュバント添加インフルエンザワクチン候補の1回用量は、530 µlに相当する。

【0131】

本発明の好みしい組成物は、CD4 T細胞エピトープおよび場合によってはB細胞エピトープを有する抗原を含む。

【0132】

HPV抗原

本発明の他の態様において、組成物は、ヒトパピローマウイルス(HPV)、例えば、陰部疣の原因と考えられるウイルス(HPV6またはHPV11など)、または子宮頸癌の原因と考えられるHPVウイルス(HPV16、HPV18など)に由来する抗原を含有する。一態様において、予防用または治療用組成物は、HPV16またはHPV18抗原を含む。HPV16およびHPV18による感染は、癌の発症に関係している。

【0133】

好適にはVLPの形態のHPV16およびHPV18抗原の組合せなど、様々なHPV遺伝子型に由来する抗原の組合せを本発明において使用することができる。16および/または18と共に含めることができる追加のVLP型に由来する抗原には、HPV31、HPV45、HPV33、HPV58、およびHPV52などの他の既知の発癌性型に由来する抗原が含まれる。

【0134】

一態様において、HPV抗原は、L1またはL2抗原モノマーである。一態様において、本発明は、カプソマーまたはウイルス様粒子(VLP)として一緒に提供される、同一の遺伝子型に由来するHPV L1およびL2抗原の組合せに関する。一態様において、HPV抗原は、VLPまたはカプソマー構造体の形態のL1タンパク質(L2抗原を欠く)である。このような抗原、ウイルス様粒子、およびカプソマーはそれ自体既知である。例えば、WO94/00152、WO94/20137、WO94/05792、およびWO93/02184を参照されたい。

【0135】

一態様において、トランケートL1タンパク質は、例えば、WO96/11272で開示されている通り、本発明において使用することができる。L1のC末端切断、例えば、HPV16のC末端34アミノ酸の切断、または他のHPV型からの相当する切断を使用することが好みしい。

10

20

30

40

50

【0136】

本発明の一態様において、組成物は、HPV16およびHPV18由来のHPVウイルス様粒子またはカプソマーと、HPV31および/またはHPV45との組合せを含む。本発明の一態様において、組成物は、HPV16およびHPV18由来のHPVウイルス様粒子またはカプソマーと、HPV33および/またはHPV58との組合せを含む。本発明の一態様において、組成物は、HPV16およびHPV18由来のHPVウイルス様粒子またはカプソマーと、1種または複数の発癌性HPV型、例えば、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、およびHPV58のうちの1種、2種、3種、4種、またはすべて由来のVLPまたはカプソマーとの組合せを含む。

【0137】

したがって、一態様において、本発明は、HPV16、HPV18、HPV31、およびHPV45由来のウイルス様粒子を、3D MPLおよび本明細書に記載の水中油型エマルジョンを含むアジュバントと組み合わせて含む組成物に関する。

10

【0138】

本発明の一態様において、組成物は、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、およびHPV58 L1単独ウイルス様粒子またはカプソマーの混合物を含む。L1またはL2タンパク質は、融合タンパク質の形態で提供してもよい。

20

【0139】

陰部疣予防または治療のための組成物の特に適切な形態は、HPV6およびHPV11タンパク質、例えば、E6、E7、L1、およびL2から選択される1種または複数の抗原を含む、L1粒子またはカプソマーおよび融合タンパク質を含む。

【0140】

癌型由来のHPV抗原を陰部疣型由来の抗原と、例えば、HPV16および/またはHPV18をHPV6および/またはHPV11と組み合わせることができる。例えば、HPV16、HPV18、HPV6、およびHPV11を含む組成物が企図される。本発明の一態様において、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV45、HPV52、およびHPV58 L1単独ウイルス様粒子またはカプソマーの組合せを、HPV6および/またはHPV11ウイルス様粒子またはカプソマーと組み合わせて使用することができる。

20

【0141】

一態様において、E7、E2、またはE5などの初期タンパク質は、例えば、単独で、または組み合わせて含めることができ、または融合タンパク質であってよい。この実施形態には、L1E7融合タンパク質(WO96/11272)を含むVLPが含まれる。

30

【0142】

一態様において、この融合タンパク質は、WO96/26277で開示されているL2E7またはGB9717953.5(PCT/EP98/05285)で開示されているタンパク質D(1/3)-E7である。

【0143】

一態様において、HPV16抗原は、初期タンパク質E6またはE7をタンパク質D担体と融合した形態で含んで、HPV16由来のタンパク質D-E6もしくはE7融合体またはその組合せ;またはE6もしくはE7とL2との組合せを形成する(WO96/26277)。

【0144】

あるいは、HPV16またはHPV18初期タンパク質E6およびE7は、タンパク質D-E6/E7融合体などの单一分子として提供することができる。このような組成物は、HPV18由来のE6およびE7タンパク質のいずれかまたは両方を、例えば、タンパク質D-E6もしくはタンパク質D-E7融合タンパク質またはタンパク質D-E6/E7融合タンパク質の形態で場合によって含有していてよい。

40

【0145】

水中油型エマルジョンアジュバント成分

本発明のアジュバント組成物は、水中油型エマルジョンアジュバントを含有し、好ましくは、前記エマルジョンは、代謝可能なオイルを全体積の0.5%~20%の量で含み、油滴を有し、その油滴の少なくとも70強度%は直径1μm未満である。

【0146】

50

任意の水中油型組成物がヒトへの投与に適するには、エマルジョン系の油相が、代謝可能なオイルを含む必要がある。代謝可能なオイルという用語の意味は、当技術分野で周知である。代謝可能とは、「代謝によって変換されうる」と定義することができる(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 第25版(1974))。オイルは、受容者にとって毒性がなく、代謝によって変換されうる任意の植物油、魚油、動物油、または合成油であってよい。堅果、種子、および穀粒は、植物油の一般的供給源である。合成油は、本発明の一部分でもあり、これには市販のオイル、例えば、NEOBEE(登録商標)などが含まれる。特に適切な代謝可能なオイルはスクアレンである。スクアレン(2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエン)は、サメの肝油に大量、またオリーブ油、コムギ胚芽油、コメ糠油、および酵母に少量存在する不飽和油であり、本発明において使用するのが特に好ましいオイルである。スクアレンは、コレステロールの生合成における中間体であるという事実に基づき、代謝可能なオイルである(Merck Index, 第10版, entry no.8619)。

10

【0147】

水中油型エマルジョンそれ自体は、当技術分野で周知であり、アジュバント組成物として有用であることが示唆されている(EP 399843、WO 95/17210)。

【0148】

好適には、代謝可能なオイルは、免疫原性組成物の全体積の0.5%~20%の量(終濃度)、好ましくは全体積の1.0%~10%の量、好ましくは全体積の2.0%~6.0%の量で存在する。

20

【0149】

特定の実施形態において、代謝可能なオイルは、免疫原性組成物の全体積の約0.5%、1%、3.5%、または5%の最終量で存在する。別の具体的な実施形態において、代謝可能なオイルは、免疫原性組成物の全体積の0.5%、1%、3.57%、または5%の最終量で存在する。

【0150】

好ましくは、本発明の水中油型エマルジョン系は、サブミクロン範囲の小さな油滴サイズを有する。好適には、この液滴サイズは、直径120~750nm、より好ましくは120~600nmのサイズの範囲にある。最も好ましくは、水中油型エマルジョンは、少なくとも70強度%が直径500nm未満であり、より好ましくは少なくとも80強度%が直径300nm未満であり、より好ましくは少なくとも90強度%が直径120~200nmの範囲にある油滴を含有する。

30

【0151】

本発明による油滴サイズ、すなわち直径は、強度によって表される。油滴の直径を強度によって測定する方法はいくつかある。強度は、定寸装置の使用によって、好適にはMalvern Zetasizer 4000または好ましくはMalvern Zetasizer 3000HSなどの動的光散乱装置によって測定される。詳細な手順は実施例11.2で示す。第1の可能性は、動的光散乱(PCS-Photon correlation spectroscopy)により z 平均直径ZADを測定することである。この方法でさらに多分散インデックス(PDI)が得られ、ZADおよびPDIはどちらもキュムラントアルゴリズムで計算される。このような値には、粒子屈折率の知見を必要としない。第2の手法は、全粒径分布を他のアルゴリズム(ContinもしくはNNLS、または自動「Malvern」アルゴリズム(定寸装置に備わっているデフォルトアルゴリズム)のいずれか)で測定することにより油滴の直径を計算する手法である。ほとんどの場合、複合組成物の粒子屈折率は不明であるため、強度分布のみが、また必要に応じてこの分布から導き出される強度平均が、考慮される。

40

【0152】

水中油型エマルジョンはステロールを含む。ステロールは、当技術分野で周知であり、例えば、コレステロールが周知であり、例えば、Merck Index, 第11版, page 341で動物脂肪に存在する天然のステロールとして開示されている。他の適切なステロールには、 β -シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、 β -トコフェロール、およびエルゴカルシフェロールが含まれる。前記ステロールは、好適には、免疫原性組成物の全体積の0.01%~20%(w/v)の量、好ましくは0.1%~5%(w/v)の量で存在する。好ましくは、ステロールがコレステロールである場合、これは、免疫原性組成物の全体積の0.02%から0.2

50

% (w/v) の間の量、より好ましくはワクチン用量 0.5ml 中 0.02% (w/v) もしくはワクチン用量 0.5ml 中 0.07% (w/v)、またはワクチン用量 0.7ml 中 0.1% (w/v) の量で存在する。

【 0 1 5 3 】

好適には、ステロールは、-トコフェロール、またはコハク酸-トコフェロール(コハク酸ビタミンEとしても知られている)などのその誘導体である。好ましくは、-トコフェロールは、免疫原性組成物の全体積の 0.2% から 5.0% (v/v) の間の量、より好ましくはワクチン用量 0.5ml 中 2.5% (v/v) もしくはワクチン用量 0.5ml 中 0.5% (v/v)、またはワクチン用量 0.7ml 中 1.7 ~ 1.9% (v/v)、好ましくは 1.8% の量で存在する。明確にするために、v/v で示された濃度は、以下のコンバージョン係数を適用することにより w/v 濃度に変換することができる: 5% (v/v) の -トコフェロール濃度は、4.8% (w/v) の -トコフェロール濃度に相当する。

10

【 0 1 5 4 】

水中油型エマルジョンは乳化剤をさらに含む。乳化剤は、免疫原性組成物の 0.01 ~ 5.0 重量% (w/w) の量、好ましくは 0.1 ~ 2.0 重量% (w/w) の量で存在してよい。好ましい濃度は、全組成物の 0.5 ~ 1.5 重量% (w/w) である。

【 0 1 5 5 】

乳化剤は、好適には、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン(Tween80)であつてよい。特定の実施形態において、ワクチン用量 0.5ml は 1% (w/w) の Tween80 を含有し、ワクチン用量 0.7ml は 0.7% (w/w) の Tween80 含有する。別の具体的な実施形態において、Tween 80 の濃度は 0.2% (w/w) である。

20

【 0 1 5 6 】

水中油型エマルジョンアジュバントは、他のアジュバントまたは免疫賦活剤と共に利用してもよく、したがって、本発明の重要な実施形態は、スクアレンまたは他の代謝可能なオイル、-トコフェロール、および Tween80 を含む水中油型製剤である。水中油型エマルジョンは、span85 および/またはレシチンを含有することもできる。通常、水中油は、免疫原性組成物の全体積の 2 ~ 10% のスクアレン、2 ~ 10% の -トコフェロール、および 0.3 ~ 3% の Tween80 を含み、WO95/17210 に記載の手順によって作製することができる。好ましくは、スクアレン: -トコフェロール比は、1 に等しいかまたは 1 未満であり、それは、これがより安定なエマルジョンを提供するからである。Span85(トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン)もまた、例えば、1% のレベルで、存在してよい。

30

【 0 1 5 7 】

3D-MPL

組成物は、追加のアジュバントである 3-O-脱アシル化モノホスホリルリピド A (3D-MPL) を含む。3D-MPL は、リピド A の非毒性誘導体である TRL-4 リガンドアジュバントである。

【 0 1 5 8 】

3D-MPL は、Corixa corporation により商標 MPL (登録商標) の下で販売されており、文書全体にわたり MPL と称される。3D-MPL は、IFN- γ (Th1) 表現型を伴う CD4+T 細胞応答を主に促進する。3D-MPL は、GB 2220211A で開示されている方法によって作製することができる。化学的には、これは、3、4、5、または 6 個のアシル化鎖を有する 3-脱アシル化モノホスホリルリピド A の混合物である。本発明の組成物において、微粒子 3D-MPL を使用することができる好ましい。微粒子 3D-MPL は、0.22 μm フィルターを通して滅菌濾過できるような粒径を有する。このような調製物は、WO 94/21292 および実施例 11 に記載されている。

40

【 0 1 5 9 】

3D-MPL は、例えば、組成物 1 用量当たり 1 ~ 100 μg (w/v) の量、好ましくは組成物 1 用量当たり 10 ~ 50 μg (w/v) の量で使用することができる。3D-MPL の適切な量は、例えば、組成物 1 用量当たり 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 μg (w/v) のいずれかである。3D-MPL の量は、組成物 1 用量当たり 25 ~ 75 μg (w/v) の範囲にあることがより好ましい。通常、組成物 1 用量は、約 0.5ml ~ 約 1ml の範囲にある。典型的なワクチン 1 用量は、0.5ml、0.6ml、0.

50

7ml、0.8ml、0.9ml、または1mlである。好ましい実施形態において、ワクチン組成物1ml当たり50 µg、またはワクチン用量0.5ml当たり25 µgの終濃度の3D-MPLが含まれる。他の好ましい実施形態において、ワクチン組成物1ml当たり35.7 µgまたは71.4 µgの終濃度の3D-MPLが含まれる。具体的には、ワクチン用量0.5mlは、1用量当たり25 µgまたは50 µgの3D-MPLを含有する。

【0160】

MPLの用量は、好適には、ヒトにおける抗原に対する免疫応答を増強することができる。特に、適切なMPL量は、アジュバント無添加の組成物と比較して、または別のMPL量でアジュバント添加した組成物と比較して、その組成物の免疫学的潜在力を改善し、なおかつ反応原性(reactogenicity)プロファイルの観点からも許容可能な量である。

10

【0161】

3D MPLは、リピドAの非毒性誘導体であるTRL-4リガンドである。本発明は、3D-MPLの代わりに、リボ多糖(LPS)および誘導体、MDP(ムラミルジペプチド)、およびRSVのFプロテインを含めた他の適切なTLR-4リガンドの使用を企図する。リピドAの非毒性誘導体、特にモノホスホリルリピドAも企図される。

20

【0162】

リピドAの合成誘導体が知られており、TLR-4アゴニストとして一部記載されており、この合成誘導体は、本発明における使用に適しているはずであり、これには、それだけには限らないが、以下のものが含まれる。

【0163】

OM174

(2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ- -D-グルコピラノシリル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]- -D-グルコピラノシリルジハイドロジエンホスフェート)、(WO95/14026)

OM294

DP(3S、9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(ジハイドロジエンホスフェート)(WO99/64301およびWO00/0462)

OM197

MP-Ac DP(3S-,9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1-ジハイドロジエンホスフェート10-(6-アミノヘキサノエート)(WO01/46127)

30

【0164】

本発明の第1ワクチン接種に使用される免疫原性組成物の免疫原性特性

本発明の組成物は、アジュバント無添加の相当する組成物、すなわちいかなる外来アジュバントも含有しておらず(本明細書では「単味組成物(plain composition)」とも称される)またはアジュバント組成物の両方の成分の少なくとも一方(3D-MPLまたは水中油型エマルジョンアジュバント)が欠けている組成物で得られたCD4 T細胞免疫応答に比べ、少なくとも1種の成分抗原または抗原性組成物に対して、改善されたCD4 T細胞免疫応答を適切に引き起こす。

40

【0165】

「改善されたCD4 T細胞免疫応答」とは、アジュバント添加免疫原性組成物を投与した後に、アジュバント無添加またはアジュバント組成物の2成分の一方が欠けている同じ組成物の投与後に得られる応答よりも、高いCD4応答がヒト患者で得られることを意味する。例えば、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原調製物と、本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバントとを共に含む免疫原性組成物を投与することにより、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原調製物を含む免疫原性組成物の投与後に引き起こされる応答に比べ、より高いCD4 T細胞応答が、ヒト患者で得られる。そのような製剤は、MHCクラスII分子により提示されるインフルエンザエピトープの検出が可能な、抗インフルエンザCD4-T細胞応答が引き

50

起こされるように、有利に使用される。

【0166】

インフルエンザの場合、本発明のアジュバント添加スプリットインフルエンザ組成物によって引き起こされた前記免疫学的応答は、サブユニットインフルエンザワクチンや全インフルエンザウイルスワクチンなど、任意のその他の従来のアジュバント無添加インフルエンザワクチンによって引き起こされた免疫学的応答よりも高いことが好ましい。

【0167】

特に、限定するものではないが、前記「改善されたCD4 T細胞免疫応答」は、免疫学的に「プライミング(初回免疫)されていない」患者において、すなわち抗原に対して血清陰性の患者において適切にもたらされる。この血清陰性は、前記患者が、そのような抗原にこれまで遭遇しておらず(例えば、前記抗原を含有するウイルスまたはバクテリアに感染していない、いわゆる「ナイーブ」患者)、あるいは前記抗原に遭遇したときに応答できなかつた結果でありうる。

10

【0168】

改善されたCD4 T細胞免疫応答は、下記のサイトカインのいずれかを産生する細胞の数を測定することによって、評価することができる。

【0169】

- ・少なくとも2種の異なるサイトカイン(CD40L、IL-2、IFN 、TNF)を産生する細胞
- ・少なくともCD40Lおよび別のサイトカイン(IL-2、TNF 、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIL-2および別のサイトカイン(CD40L、TNF 、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIFN および別のサイトカイン(IL-2、TNF 、CD40L)を産生する細胞
- ・少なくともTNF および別のサイトカイン(IL-2、CD40L、IFN)を産生する細胞

20

【0170】

上記サイトカインのいずれかを産生する細胞が、アジュバント添加組成物の投与後にアジュバント無添加組成物の投与と比べてより多い量になる場合、改善されたCD4 T細胞免疫応答があることになる。典型的な場合、上に挙げた5つの条件のうち、少なくとも1つ、好ましくは2つが満たされる。具体的な実施形態において、4種のサイトカインすべてを産生する細胞は、アジュバント無添加群と比べた場合にアジュバント添加群における方が、より多い量で存在する。

30

【0171】

本発明のアジュバント添加組成物によって付与される、改善されたCD4 T細胞免疫応答は、理想的には1回の投与の後に、得ることができる。単一用量のアプローチは、急速に発展する発生状況において、極めて適切である。特定の状況では、特に高齢者集団について、または疾患(例えばインフルエンザ)に対して初めてワクチン接種された若年の小児(9歳未満)の場合については、その季節に関して同じ組成物の2つの用量を投与することが有益と考えられる。前記同じ組成物の2つ目の用量(依然として「第1ワクチン接種用組成物」と見なす)は、持続中の1次免疫応答中に投与することができ、適切に間隔があけられる。典型的な場合、組成物の第2の用量は、非応答性のまたは応答性が不十分な個体の免疫系をプライミングするのを助けるため、第1の用量の2~3週間後または約1ヶ月後に、例えば2週間、3週間、4週間、5週間、または6週間後に与えられる。

40

【0172】

したがって、本発明はまた、抗原に対する改善されたCD4 T細胞応答を誘発するための免疫原性組成物の製造における、

(a)抗原、および

(f)水中油型エマルジョンアジュバント、および

(g)3D MPL

を含み、前記水中油型エマルジョンが、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤を含む組成物の使用に関する。

【0173】

本発明はまた、抗原に対する改善されたCD4 T細胞応答を誘発する方法に関し、この方

50

法は、

- (a) 抗原、および
- (b) 本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバント、および
- (c) 3D-MPL

を含む組成物を送達するステップを含む。

【0174】

具体的な実施形態において、前記免疫原性組成物の投与により、アジュバント添加免疫原性組成物が投与された患者において、アジュバント無添加組成物で免疫されまたはアジュバント組成物の2成分のうち一方が欠けている組成物で免疫された個体で引き起こされる記憶B細胞応答の代わりに、またはそれに加えて、改善された記憶B細胞応答が引き起こされる。改善された記憶B細胞応答とは、*in vitro*分化の刺激によって測定される、抗原との遭遇によって抗体分泌形質細胞に分化することが可能な末梢血Bリンパ球の、増大した頻度を意味するものとする(実施例のセクション、例えばエリスポットB細胞記憶の方法を参照)。

10

【0175】

さらに別の具体的な実施形態において、アジュバント添加された、第1のワクチン接種用の組成物によるワクチン接種は、CD8応答に対して測定可能な影響を及ぼさない。

【0176】

前記改善されたCD4 T細胞免疫応答は、高齢者、典型的には少なくとも50、55、60、または65歳以上、あるいは危険性の高い病状を有する55歳よりも若い成人(「高リスク」成人)、または2歳より小さい子供など、免疫低下状態の対象から得られることが好ましい。

20

【0177】

本出願人は、驚くべきことに、代謝可能なオイル、ステロール、および乳化剤、および3D MPLを含む水中油型エマルジョンアジュバントが、免疫低下状態のヒト集団において、T細胞応答を促進させるのに有効であることを見出した。本出願人がインフルエンザに関して実証したように、本発明で記述された第1のワクチン接種のための免疫原性組成物の1回分用量の投与は、ヒト高齢者集団でのインフルエンザに対するワクチン再接種の後に、インフルエンザワクチンの保護の相関によって評価されるように、アジュバント無添加スプリットワクチンでワクチン接種を行った場合よりも、良好な血清保護を提供することが可能である。特許請求の範囲に記載されるアジュバント添加製剤は、アジュバント無添加製剤によって得られたものに比べ、インフルエンザウイルスに対する改善されたCD4 T細胞免疫応答を誘発することもできた。この知見は、インフルエンザ抗原曝露に対するワクチン接種または感染後の、増大する応答性に関連付けることができる。さらにこの知見は、交差応答性、すなわち変異体インフルエンザ株に対するより高い応答能力に関連付けることもできる。この改善された応答は、特に、高齢者集団(例えば50、55、60、65歳以上)、特に高リスク高齢者集団など、免疫低下状態のヒト集団に有益でありうる。これは、全体的な罹患率および死亡率を低下させることができ、肺炎およびその他のインフルエンザ様の病気の場合の緊急入院を防止することができる。これは、乳幼児集団(5歳未満、好ましくは2歳未満)にも有益でありうる。さらに、アジュバント無添加製剤で引き起こされた応答に比べ、時間的により持続する(例えば第1ワクチン接種の1年後に依然として存在する)CD4 T細胞応答を誘発することが可能になる。

30

【0178】

本発明者らは、特許請求の範囲に記載のアジュバント添加組成物が、アジュバント無添加組成物で得られた場合よりも多くの個体において、ワクチン内に存在する3種の株すべてに対する抗体を保護レベルで誘発するだけではなく、維持できることを実証することもできた(例えば表43参照)。

40

【0179】

したがって、さらに別の実施形態において、特許請求の範囲に記載の組成物は、インフルエンザ関連疾患に対する持続免疫応答を確実にすることが可能である。詳細には、持続とは、ワクチン接種から少なくとも3カ月後、好ましくは少なくとも6カ月後に規定された

50

基準を満たすことが可能な、HI抗体免疫応答を意味する。特に、特許請求の範囲に記載の組成物は、少なくとも3カ月後、少なくとも1種のインフルエンザ株に関して、好ましくはワクチン内に存在するすべての株に関して、個体の>70%、好適には個体の>80%、または好適には個体の>90%という保護レベルの抗体を引き起こすことができる。具体的な態様において、ワクチン組成物中に存在する少なくとも1種、好適には2種、またはすべての株に対して、>90%という保護レベルの抗体が、ワクチン接種後少なくとも6カ月で得られる。

【0180】

インフルエンザに関するこれらの知見は、HPV抗原に関して実証されているので、その他の疾患および抗原に適用可能である(実施例XIII参照)。

【0181】

したがって、本発明はまた、高リスクの成人や高齢者など、免疫低下状態のヒト個人または集団における、また高リスクの成人や高齢者集団など、ヒト免疫低下状態の個人または集団のワクチン接種のための免疫原性組成物の製造における本発明の組成物の使用に関する。

10

【0182】

本発明者らは、本明細書で定義される水中油型エマルジョンと共に抗原を使用することにより、変異体抗原に対する交差反応的応答をもたらすことができると決定した。

【0183】

好ましくは、プライミングしていない対象で得られた改善されたCD4 T細胞免疫応答などのCD4 T細胞免疫応答は、交差反応性CD4 Tヘルパー応答の誘導を伴う。特に、交差反応性CD4 T細胞の量が増加する。「交差反応性」CD4応答とは、CD4 T細胞ターゲッティングがインフルエンザ株間でエピトープを共有することを意味する。

20

【0184】

インフルエンザでは、例えば利用可能なインフルエンザワクチンは、通常、類似した抗原特性の赤血球凝集素を有するインフルエンザウイルスの感染株に対してのみ有効である。表面糖タンパク質、特に赤血球凝集素で(抗原性ドリフト変異体ウイルス株)、感染(循環)インフルエンザウイルスが小さな変化を経た場合(点変異や点変異の蓄積などであって、例えばアミノ酸の変化をもたらすもの)、ワクチンは依然としていくらかの保護をもたらすことができるが、新たに生成された変異体は、従来のインフルエンザ感染またはワクチン接種により引き起こされた免疫性を逃れる可能性があるので、限定された保護をもたらすことができるだけである。抗原性ドリフトは、大流行の挾間に生ずる例年の伝染病の原因となる(Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394)。交差反応性CD4 T細胞の誘発によって、本発明の組成物に追加の利点がもたらされ、すなわち交差保護、言い換えれば異種感染に対する保護、すなわち免疫原性組成物中に含有されるインフルエンザ株の変異体(例えばドリフト)である循環インフルエンザ株によって引き起こされる、感染に対する保護をもたらすことができる。これは、循環株を卵の中で増殖させるのが難しい場合、または組織培養物中で生成するのが難しい場合、ドリフト株の使用が、実用的な代替案となることから、有利でありうる。これは、対象が第1および第2のワクチン接種を数カ月または1年おいて受けており、なおかつ、第2の免疫で使用される免疫原性組成物中のインフルエンザ株が、第1ワクチン接種で使用された組成物中に使用されている株のドリフト変異体株である場合にも有利である。

30

【0185】

例えば実施例IIIに示される前臨床データは、本発明の組成物が、ヘテロタイプのインフルエンザ感染および体温の読み取りによって評価される疾患に対して、保護できることを示している。同じ結論が、ワクチン再接種調査で得られた臨床試験データにも言える。

40

【0186】

本発明の別の態様において、第1の組成物中の抗原が得られる病原体の変異体である病原体によって引き起こされた、感染または疾患に対する保護のための本発明の組成物の使用が提供される。また、本発明の組成物においてその変異体である抗原を含む病原体によって引き起こされた感染または疾患に対する保護のための本発明の組成物の問題点も提供

50

される。

【0187】

変異病原体および/または抗原は、好適には、第1の病原体または抗原と共に、共通のCD4 T細胞エピトープおよび/またはB細胞エピトープを有する抗原を有しており、これらの抗原は同一のものではない。

【0188】

交差反応性CD4 T細胞の検出(例えば、インフルエンザワクチンを用いたワクチン接種後)

古典的な3価インフルエンザワクチン投与の後(3週間)、ワクチン内に存在する抗原性株(H3N2:A/Panama/2007/99、H1N1:A/New Caledonia/20/99、B:B/Shangdong/7/97)と同種の抗原性株の調製物(全ウイルスまたはスプリット抗原)に応答する末梢血CD4 T細胞の頻度は、かなり増加する(実施例III参照)。ドリフト株として分類されたインフルエンザ株(H3N2:A/Sydney/5/97、H1N1:A/Beijing/262/95、B:B/Yamanashi/166/98)を用いて末梢血CD4 T細胞を再刺激した場合には同程度の頻度の増加が認められる。

【0189】

対照的に、末梢血CD4 T細胞が、この分野の専門家によってシフト株として分類されるインフルエンザ株(H2N2:A/Singapore/1/57、H9N2:A/Hongkong/1073/99)により再刺激を受けた場合、ワクチン接種後に観察可能な増加はない。

【0190】

同種(homologous)およびドリフトインフルエンザ株の両方を認識することができるCD4 T細胞を、本発明の文書では「交差反応性」と呼ぶ。

【0191】

異なるインフルエンザ株により共有されるCD4 T細胞エピトープが、ヒトで確認された(Gelder Cら. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelderら. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CMら. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506)。

【0192】

具体的な実施形態において、アジュバント添加組成物は、現在利用可能なワクチンが何の効き目も持たない赤血球凝集素において大きな変化(例えば、2つの異なる種の間での、遺伝子組換えなど)を経た(抗原シフト)循環株に対して、より良好な保護を提供するという追加の利益をもたらすことができる。

【0193】

その他のアジュバント

組成物は、好適にはTRL-4リガンドアジュバントや脂質の無毒性誘導体など、追加のアジュバントを含むことができる。適切なTLR-4リガンドは、リポ多糖(LPS)および誘導体、MDP(ムラミルジペプチド)、およびRSVのFプロテインである。

【0194】

リピドAの合成誘導体は知られており、いくつかはTLR-4アゴニストと記述され、限定するものではないが下記の誘導体が含まれる。

【0195】

OM174

(2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ- -D-グルコピラノシリル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ] - -D-グルコピラノシリルジハイドロジエンホスフェート)、(WO95/14026)

OM294

DP (3S,9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(ジハイドロジエンホスフェート)(WO99/64301およびWO00/0462)

OM197

MP-Ac DP (3S,9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1-ジハイドロジエンホスフェート10-(6-アミノヘキサノエート)(WO01/46127)

10

20

30

40

50

【0196】

その他の適切なTLR-4リガンドは、例えば、リポ多糖およびその誘導体、ムラミルジペプチド(MDP)、または呼吸器合胞体ウイルスのFプロテインである。

【0197】

本発明で使用される、別の適切な免疫刺激物質は、Quill Aおよびその誘導体である。Quill Aは、南アフリカの木であるキラジャサボナリアモリナ(*Quilaja Saponaria Molina*)から分離されたサポニン調製物であり、最初にDalsgaardらによって、1974年に("Saponin adjuvants", *Archiv. fur die gesamte Virusforschung*, Vol.44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)、アジュバント活性を有することが記述された。Quill Aの精製断片がHPLCにより分離されているが、これはQuill Aに関連した毒性を有することなくアジュバント活性を保持しており(EP 0362278)、例えばQS7およびQS21である(QA7およびQA21としても知られる)。QS-21は、キラジャサボナリアモリナの樹皮に由来する天然のサポニンであり、CD8+細胞傷害性T細胞(CTL)、Th1細胞、および支配的なIgG2a抗体応答を誘発するものであり、本発明の文脈においては好ましいサポニンである。

10

【0198】

特に好ましいQS21の特定の製剤が記述されており、これらの製剤はさらに、ステロールを含む(WO96/33739)。本発明の一部を形成するサポニンは、水中油型エマルジョンの形態をとることができ(WO95/17210)。

20

【0199】

ワクチン再接種

本発明の態様は、3D MPLおよび本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバントと共に、抗原またはその断片またはその変異体を事前にワクチン接種したヒトのワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における抗原の使用を提供する。

【0200】

典型的な場合、ワクチン再接種は、最初のワクチン接種から少なくとも6カ月後、好ましくは8から14カ月後、より好ましくは約10から12カ月後に行われる。

30

【0201】

好ましくは、抗原またはその断片もしくは変異体、3D MPL、および本明細書で定義される水中油型エマルジョンを事前にワクチン接種したヒトのワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における、

30

(1)抗原、および

(2)水中油型エマルジョンアジュバント

の使用が提供される。

【0202】

好ましくは、抗原またはその断片もしくは変異体、3D MPL、および本明細書で定義される水中油型エマルジョンを事前にワクチン接種したヒトのワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における、

40

(1)抗原、および

(2)水中油型エマルジョンアジュバント、および

(3)3D MPL

40

の使用が提供される。

【0203】

好ましい実施形態において、本発明は、抗原あるいはその断片または変異体を事前にワクチン接種したヒトのワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における、

40

(a)抗原、および

(b)水中油型エマルジョンアジュバント、および

(c)3D MPL

40

の使用を提供する。

【0204】

具体的な実施形態において、ワクチン再接種のための組成物は、好適には、共通のCD4

50

T細胞エピトープを、最初のワクチン接種で使用された組成物と共有する。この点で、最初にワクチン接種で使用された抗原の変異体が考えられる。

【0205】

ワクチン再接種のための免疫原性組成物(追加免疫組成物)は、同じタイプの抗原調製物、例えばサブユニット/スプリット/全不活化ウイルスを、最初のワクチン接種で使用された免疫原性組成物として含有することができる。あるいは、追加免疫組成物は、別のタイプの抗原調製物を含有することができる。例えば、インフルエンザの場合、最初のワクチン接種は、スプリット調製物によるものでもよく、追加免疫ワクチン接種は、不活化全ウイルスや精製HAおよびNA(サブユニットワクチン)などの別の不活化インフルエンザ抗原によるものでもよい。追加免疫組成物は、アジュバントが添加されていても添加されていてもよい。

10

【0206】

インフルエンザの場合、アジュバント無添加追加免疫組成物は、筋肉内から与えられたFluarix(商標)/ -Rix(登録商標)でもよい。この製剤は、適切なインフルエンザシーズンのWHO推奨株から調製された、3種の不活化スプリット抗原を含有する。

【0207】

変異体は、共通のCD4 T細胞エピトープ(一般に、T細胞受容体により認識され結合される抗原決定基と見なされる)を最初のワクチン接種で使用された抗原性組成物と共有するが、その抗原とは同一でない抗原でもよい。

20

【0208】

変異体は、共通のB細胞エピトープ(一般に、B細胞受容体により認識され結合される抗原決定基と見なされる)を最初のワクチン接種で使用された抗原性組成物と共有するが、その抗原とは同一でない抗原でもよい。

【0209】

T細胞およびB細胞エピトープは、当技術分野で周知の技法を使用して予測することができ、または本明細書に記述される技法を使用して免疫応答から推測することができる。

【0210】

前記水中油型エマルジョンアジュバントは、好ましくは、少なくとも1種の代謝可能なオイルを全体積の0.5%から20%の量で含み、その油滴の少なくとも70強度%が、1 μm未満の直径を有している。

30

【0211】

インフルエンザに関する具体的な実施形態において、ワクチン再接種のための免疫原性組成物(以下、本明細書では「免疫追加組成物」とも称される)は、最初のワクチン接種で使用されたスプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物と共にCD4 T細胞エピトープを共有する、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物を含有する。

【0212】

一般に、すべての抗原に関して、「共通のCD4 T細胞エピトープ」は、同じCD4細胞により認識されうる異なる抗原からのペプチド/配列/エピトープを意味するものとする(Gelde r Cら. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CMら. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CMら. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506に記載されているエピトープの例を参照されたい)。

40

【0213】

インフルエンザに関して、好ましい実施形態では、インフルエンザ株は、伝染病の大流行に関与している、または伝染病の大流行に関与する可能性を有する株でありうる。特にワクチンが2価や3価ワクチンなどの多価ワクチンであるとき、少なくとも1種の株は、伝染病の大流行に関与している、または伝染病の大流行に関与する可能性を有する。適切な株は、これだけに限らないが、H5N1、H9N2、H7N7、H2N2、およびH1N1である。

【0214】

典型的には追加免疫組成物は、この組成物を使用する場合は次のシーズン、例えば最初

50

の免疫原性組成物から約1年後に与えられる。免疫追加組成物は、その後毎年与えてもよい(3、4、5回目などのワクチン接種)。追加免疫組成物は、最初の組成物と同じでもよい。適切な場合、追加免疫組成物は、最初のワクチン接種で使用された株または抗原の変異体である、株またはそれから得られた抗原性調製物を含有する。

【0215】

ワクチン再接種で使用されるインフルエンザ抗原または抗原性組成物は、適切な場合には上述のように、アジュバントまたは水中油型エマルジョンを含むことが好ましい。アジュバントは、好ましくは、本明細書で既に述べたような水中油型エマルジョンアジュバントであってもよく、場合により3D-MPLのようなTRL-4リガンドやサポニンなどの追加のアジュバントを含有することができ、または、例えばミョウバンなどの別の適切なアジュバントでもよい。

10

【0216】

本発明のすべての抗原に関し、ワクチン再接種は、適切な場合、アジュバント無添加スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物で最初にワクチン接種した後に引き起こされた相当する応答に比べて、下記の事項、すなわち(i)インフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物に対する改善されたCD4応答、あるいは(ii)改善されたB細胞記憶応答、あるいは(iii)改善された液性応答のいずれか1つ、好ましくは2つ、またはすべてを引き起こす。好ましくは、本明細書で定義されるような、アジュバント添加スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物によるワクチン再接種後に引き起こされた免疫応答は、アジュバント無添加組成物によるワクチン再接種後に引き起こされた相当する応答よりも高い。アジュバント無添加の、好ましくはスプリットの、インフルエンザウイルスによるワクチン再接種後に引き起こされた免疫学的応答は、アジュバント無添加スプリットインフルエンザ組成物で第1ワクチン接種された集団での相当する応答よりも、アジュバント添加スプリットインフルエンザ組成物で第1ワクチン接種された集団において高いことが好ましい。

20

【0217】

本発明の別の態様において、前記第1の株の変異体であるウイルスまたは細菌株によって引き起こされた感染または疾患に対する保護のための免疫原性組成物の製造における、(a)第1のウイルスまたは細菌株に由来する抗原、および

30

(b)水中油型エマルジョンアジュバント

(c)3D MPL

の使用が提供される。

【0218】

例えばインフルエンザの場合、本発明のアジュバント添加組成物は、対照ワクチンによって与えられた保護と比較して、ドリフト株(次のインフルエンザシーズンからのインフルエンザ株)に対してより良好な保護を引き起こすことが可能である。

【0219】

インフルエンザウイルス株およびその抗原

スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物を含む組成物については、組成物は1価または多価、例えば2価または3価または4価であることが適当である。好ましくは、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物は、3種の異なるインフルエンザ株由来の抗原を有し、3価または4価である。

40

【0220】

場合によって少なくとも1つの株は世界的流行の発生に関与しているか、世界的流行の発生に関与する可能性を有する。

【0221】

背景として、大流行の狭間の期間に、それより前の流行からのインフルエンザウイルスと関係するインフルエンザウイルスが循環する。以前の感染による様々なレベルの免疫を有する人々の間で、ウイルスは広がる。そのような循環は、通常2~3年の期間にわたって

50

、一般集団の間で再び流行を引き起こすのに十分に変化した新しい株の選択を促進する。この過程は、「抗原ドリフト」と呼ばれる。「ドリフト変異体」はいかなる1年以内にでも異なるコミュニティ、地域、国または大陸で異なる影響を及ぼすことができるが、数年にわたると、それらの全体的な影響はしばしば類似する。言い換えると、インフルエンザの世界的流行は、ヒト集団が免疫を持っていない新しいインフルエンザウイルスが出現するときに起こる。入院率または死亡率の増加に見られるように、一般的なインフルエンザの流行は、肺炎および下部呼吸器疾患の発生率の増加を引き起こす。高齢者または根底にある慢性疾患を有する者はそのような合併症を最も起こしやすいが、幼い児童も重度の疾患を起こすことがある。

【0222】

10

新規インフルエンザウイルスが、予測できない間隔で、前のシーズンに蔓延した株と全く異なるサブタイプの重要な表面抗原、赤血球凝集素で出現する。この場合、生じる抗原は、以前ヒトで循環していた株の対応するタンパク質とは、20%から50%異なる可能性がある。この結果、ウイルスは「集団免疫」を逃れて世界的流行を確立することができる。この現象は、「抗原シフト」と呼ばれる。少なくとも過去においては、異なる種、例えばトリまたはブタのインフルエンザウイルスからのインフルエンザウイルスが種の障壁を超えたときに世界的流行が起こったと思われる。そのようなウイルスが人から人へ広がる能力を有するならば、それらは2、3ヶ月から1年以内に世界中に広がって、世界的流行を起こすことができる。例えば、1957年(アジア流行性感冒世界的流行)に、H2N2サブタイプのウイルスは、少なくともウイルスが最初に単離された1918年以降ヒト集団で循環していたH1N1ウイルスと入れ替わった。1957から1968年の間にH2 HAおよびN2 NAは抗原ドリフトを経、HAは1968年(ホンコンかぜ世界的流行)にはH3N2インフルエンザサブタイプの出現により置き換えられ、その後、N2 NAはH3 HAと共にドリフトし続けた(Nakajimaら., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395)。

20

【0223】

世界的流行の発生を引き起こす能力をそれに与えるインフルエンザウイルス株の特長は、以下の通りである。そのとき循環している株の赤血球凝集素と比較して新しい赤血球凝集素を含み、それはノイラミニダーゼサブタイプの変化を伴っても伴わなくてもよい。ヒト集団で水平伝染することができる。および、ヒトに病原性である。新しい赤血球凝集素は、H2のように、長期間、おそらく数十年間ヒト集団に顯れなかつたものである可能性がある。または、それは以前にヒト集団で循環していなかった赤血球凝集素、例えばトリで見られるH5、H9、H7またはH6である可能性がある。いずれにせよ集団の大多数、または少なくともその大部分、またはそのすべてでさえ、以前にその抗原に遭遇したことがなく、それに対して免疫学的にナイーブである。

30

【0224】

ある集団は、一般に、世界的流行の状況下でインフルエンザに感染するリスクが高い。高齢者、慢性病患者および小児は特に感受性であるが、多くの若く見かけ上健康な人々も危険にさらされる。H2インフルエンザについては、1968年以降生まれの部分集団のリスクが高い。これらの群をできるだけ早く、かつ簡単な方法で効果的に保護することが重要である。

40

【0225】

高リスクの人々の他の集団は、旅行者である。今日、以前にもましてより多くの人々が旅行をし、新しいウイルスのほとんどが出現する地域である中国および東南アジアは、近年人気がある旅行目的地となっている。旅行パターンのこの変化は、新しいウイルスが数ヶ月または数年ではなく、数週足らずで世界中に到達することを可能にする。

【0226】

したがってこれらの人々の集団のために、世界的流行の状況または潜在的世界的流行の状況でインフルエンザから保護するワクチン接種の必要が特にある。適当な株はH5N1、H9N2、H7N7、H2N2およびH1N1であるが、これらに限定されない。

【0227】

50

場合によって、組成物は3つ以上の結合価を、例えば2つの非世界的流行株、さらに1つの世界的流行株を含むことができる。あるいは、組成物は3つの世界的流行株を含むことができる。

【0228】

他の実施形態において、本発明は、第1のワクチン接種が、世界的流行の発生を起こす可能性のある少なくとも1つのインフルエンザ株を含むスプリットインフルエンザ組成物を用いて行われ、ワクチン再接種が世界的流行株または古典的な株の循環株を用いて行われる、ワクチン接種レジメンに関するものである。

【0229】

HAのCD4エピトープ

この抗原ドリフトは、主にウイルス表面タンパク質赤血球凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)のエピトープ領域に存在する。宿主免疫系の適応反応を避けるためにウイルスが用いる、異なるインフルエンザ株の間でのCD4およびB細胞エピトープの何らかの差が、インフルエンザワクチン接種で現在および将来、主要な役割を果たすことが知られている。

【0230】

異なるインフルエンザ株によって共有されるCD4 T細胞エピトープが、ヒトで同定された(例えば、Gelder Cら, 1998, *Int Immunol.* 10(2):211-22、Gelder CMら, 1996 *J Virol.* 70(7):4787-90およびGelder CMら, 1995 *J Virol.* 1995 69(12):7497-506)。

【0231】

具体的な実施形態において、ワクチン再接種は、第1ワクチン接種のために使われたスプリットインフルエンザウイルス抗原またはそのスプリットウイルス抗原性調製物と共にCD4 T細胞エピトープを共有するインフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物を含む追加免疫組成物を用いて行われる。

【0232】

したがって、本発明は、多回用量ワクチンの第1のワクチン接種成分の製造における、スプリットインフルエンザウイルスまたはそのスプリットウイルス抗原性調製物、本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバントおよび3D MPLを含む免疫原性組成物の使用に関し、多回用量ワクチンは、追加免疫用量として、第1ワクチン接種で与えられる用量中のスプリットインフルエンザウイルス抗原またはそのスプリットウイルス抗原性調製物と共にCD4 T細胞エピトープを共有するインフルエンザウイルスまたはその抗原性調製物をさらに含む。

【0233】

ワクチン接種

本発明の組成物は、皮内、粘膜、例えば鼻腔内、経口、筋肉内または皮下など、いかなる適当な送達経路でも投与することができる。他の送達経路は当技術分野において公知である。

【0234】

アジュバント添加インフルエンザ組成物のためには、筋肉内の送達経路が好ましい。

【0235】

皮内送達は、他の適当な経路である。皮内送達のためにいかなる適当なデバイスでも使用することができ、その例としては、短い針デバイス、例えばUS 4,886,499、US 5,190,521、US 5,328,483、US 5,527,288、US 4,270,537、US 5,015,235、US 5,141,496、US 5,417,662に記載されているものがある。皮内ワクチンは、皮膚への針の有効貫入長を制限するデバイス、例えば参照により本明細書に組み込まれているWO 99/34850およびEP 1092444に記載されているもの、およびその機能等価物によって投与することもできる。角質層を貫通して真皮に到達する噴流を起こさせる針を通してまたは液体ジェット式注射器を通して、液体ワクチンを真皮に送達するジェット式注射デバイスも適当である。ジェット式注射デバイスは、例えばUS 5,480,381、US 5,599,302、US 5,334,144、US 5,993,412、US 5,649,912、US 5,569,189、US 5,704,911、US 5,383,851、US 5,893,397、US 5,466,220

10

20

30

40

50

、US 5,339,163、US 5,312,335、US 5,503,627、US 5,064,413、US 5,520,639、US 4,596,556、US 4,790,824、US 4,941,880、US 4,940,460、WO 97/37705およびWO 97/13537に記載されている。粉状のワクチンを加速させて皮膚外層を通し真皮へ到達させるために圧縮ガスを使う、バリスティック粉体/粒子送達デバイスも適当である。さらに、従来の注射器を、皮内投与の古典的マントゥー方法で使うことができる。

【0236】

他の適当な投与経路は、皮下経路である。皮下送達のためにいかなる適当なデバイスでも、例えば古典的な針でも使うことができる。好ましくは、無針ジェット式注射器一式が使われ、その例は、WO 01/05453、WO 01/05452、WO 01/05451、WO 01/32243、WO 01/41840、WO 01/41839、WO 01/47585、WO 01/56637、WO 01/58512、WO 01/64269、WO 01/78810、WO 01/91835、WO 01/97884、WO 02/09796、WO 02/34317で公開されている。より好ましくは、前記デバイスは、液体ワクチン製剤が事前に充填される。

10

【0237】

あるいは、ワクチンは鼻腔内に投与される。一般的に、ワクチンは好ましくは肺に吸入されることなく、鼻咽頭の領域に局所投与される。それが全くまたは実質的に肺に入らないように、鼻咽頭の領域にワクチン製剤を送達する、鼻腔内送達デバイスを使うことが望ましい。

【0238】

本発明によるワクチンの鼻腔内投与のための好ましいデバイスは、噴霧デバイスである。市販の適当な鼻内噴霧デバイスとしては、Accuspray(商標)(Becton Dickinson)がある。ネブライザーは、肺に容易に吸入されて鼻粘膜に有效地に到達しない、非常に微細な噴霧を生成する。したがって、ネブライザーは好ましくない。

20

【0239】

鼻腔内の使用のための好ましい噴霧デバイスは、そのデバイスの性能が使用者によって加えられる圧力に依存しないデバイスである。これらのデバイスは、圧力閾デバイスとして知られている。閾値圧が加えられるときだけ、液体はノズルから放出される。これらのデバイスは、一定の液滴サイズを有する噴霧の達成をより簡単にする。本発明での使用に適当な圧力閾デバイスは当技術分野で公知であり、例えば、本明細書で参照により組み込まれているWO91/13281およびEP311 863 BおよびEP516 636に記載されている。そのようなデバイスはPfeiffer GmbHから市販され、Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999に記載されてもいる。

30

【0240】

好ましい鼻腔内デバイスは、1~200 μm、好ましくは10~120 μmの範囲の液滴(液体として水を使って測定)を生成する。10 μm以下では吸入のリスクがあるので、10 μm以下の液滴は多くても約5%であることが望ましい。120 μmより大きい液滴はそれより小さな液滴のようにには都合よく拡散しないので、120 μmを上回る液滴は多くても約5%であることが望ましい。

【0241】

二用量送達は、本発明によるワクチンで使用するための鼻腔内送達系の他の好ましい機構である。二用量デバイスは、単一のワクチンの用量の2つの下位用量(sub-dose)を含み、1下位用量が各鼻孔へ投与される。一般に、2つの下位用量は単一のチャンバーに存在し、デバイスの構造により一度に単一の下位用量の効率的送達が可能になる。代わりに、本発明によるワクチンを投与するために、一用量デバイスを使うことができる。

40

【0242】

代わりに、本発明では表皮または経皮のワクチン接種経路も企図される。

【0243】

本発明の具体的な態様において、第1の投与のためのアジュバント添加免疫原性組成物は筋肉内投与することができ、追加免疫組成物はアジュバント添加の有無にかかわらず異なる経路により、例えば皮内、皮下または鼻腔内に投与することができる。他の具体的な実施形態において、第1の投与のための組成物は1インフルエンザ株につき15 μgの標準HA

50

含量を含むことができ、追加免疫組成物は低用量、すなわち15 μg以下のHAを含むことができ、また、投与経路によってはより少ない量で与えることができる。

【0244】

ワクチン接種をする集団

標的集団は、好ましくはヒトの集団または個体である。

【0245】

ワクチン接種をする標的集団は、免疫低下したヒトであってもよい。免疫低下したヒトは、一般に健康な成人と比較して、抗原に、特にインフルエンザ抗原に上手く反応することができない。

【0246】

好ましくは、標的集団はインフルエンザからプライミングされていない集団であり、ナイーブである(例えば世界的流行株に対して)か、以前にインフルエンザ感染またはワクチン接種に応答することができなかった集団である。好ましくは、標的集団は、好適には、55歳以上の高齢者、保健機関労働者などのより若い高リスクの成人(すなわち18歳～54歳)、または心血管および肺の疾患もしくは糖尿病などの危険因子を有する若年成人である。他の標的集団は、年齢が6ヶ月以上のすべての子供、特に6～23ヶ月齢のインフルエンザ関連の入院率が比較的高い子供たちである。好ましくは、標的集団は、65歳超の高齢者である。

【0247】

ワクチン接種レジメン、投薬およびさらなる効力基準

各ワクチン用量中の糖(またはその複合体)抗原の量は、一般的なワクチン内でかなりの有害副作用を起こさずに免疫保護反応を誘導する量となるように選択される。そのような量は、どの特定の免疫原が使用されてそれがどのように提示されるかによって異なる。一般に、各用量は0.1～100 μg、好ましくは0.1～50 μg、好ましくは0.1～10 μgの糖を含むことが予想され、1～5 μgが最も好ましい範囲である。

【0248】

ワクチン中のタンパク質抗原の含量は一般的に1～100 μgの範囲であり、好ましくは5～50 μg、最も一般的には5～25 μgの範囲である。

【0249】

特定のワクチンのための成分の最適量は、対象における適当な免疫応答の観察を含む標準の研究によって確認することができる。最初のワクチン接種の後、対象は、適切な間隔をあけた1つまたはいくつかの追加免疫接種を受けることができる。

【0250】

ワクチン調製物は、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)で総説されている。リポソーム内への被包性は、Fullerton、米国特許第4,235,877号に記載されている。

【0251】

インフルエンザ抗原用量

インフルエンザについては、好適には本発明による免疫原性組成物はほとんどの場合標準的な0.5mlの注射可能な用量であり、一元放射免疫拡散法(SRD)によって測定されるように、その、または各インフルエンザ株由来の15 μgの赤血球凝集素抗原成分を含む(J.M. Woodら.:J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247、J. M. Woodら., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330)。好適には、ワクチン用量は0.5mlから1mlの間であり、特に0.5mlまたは0.7mlの標準的なワクチン用量である。元のバルク試料中のHA濃度に応じて、通常、用量はわずかに調節される。

【0252】

好適には、前記免疫原性組成物は、低用量のHA抗原を、例えば各インフルエンザ株につき1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14 μgのいずれかのHAを含む。HAの適当な低用量は、インフルエンザ株につき1～7.5 μgのHA、好適にはインフルエンザ株につき3.5～5 μg、例えば3.75 μgのHAであり、一般的にはインフルエンザ株につき約5 μgの

10

20

30

40

50

HAである。

【0253】

有利には、本発明によるワクチンの用量、特に低用量ワクチンは、一般に1用量につき約0.5、0.7または1mlである従来の注射式スプリットインフルエンザワクチンよりも、少ない体積で提供することができる。本発明による低体積用量は、1用量につき好ましくは500μl未満、より好ましくは300μl未満、最も好ましくは約200μl以下である。

【0254】

したがって、本発明の一態様による好ましい低体積ワクチン用量は、低体積の低抗原用量、例えば約200μlの量のうち約15μgもしくは約7.5μgのHAまたは約3.0μgのHA(株につき)を有する用量である。

【0255】

本発明のインフルエンザ医薬は、好ましくはワクチンの一定の国際基準を満たす。

【0256】

インフルエンザワクチンの有効性を測るために、基準は国際的に適用される。インフルエンザに対して有効なワクチンの欧洲連合公式基準を、下の表1で提示する。理論的には、欧洲連合要件を満たすために、ワクチンに含まれるすべてのインフルエンザ株について、インフルエンザワクチンは表の基準の1つだけを満たせばよい。本発明の組成物は、そのような基準の少なくとも1つを適切に満たす。

【0257】

しかし実際には、すべての株について、特に新しいワクチン、例えば異なる経路からの送達のための新しいワクチンについては、基準の少なくとも2つまたは3つすべてを満たす必要がある。ある条件下では、2つの基準で十分である。例えば、3つの基準のうちの2つがすべての株によって満たされ、第3の基準はすべてではないが一部の株(例えば3株中2株)によって満たされることが許容されることがある。要件は、成人の集団(18~60歳)および高齢者集団(>60歳)で異なる。

【表1】

表1

| | 18~60歳 | >60歳 |
|-------------|--------|------|
| セロコンバージョン率* | >40% | >30% |
| コンバージョン係数** | >2.5 | >2.0 |
| 保護率*** | >70% | >60% |

*セロコンバージョン率は、各ワクチン菌株についてのワクチン接種後の血清赤血球凝集素抑制(HI)力値が少なくとも4倍増大した被ワクチン接種者の百分率として定義される。

**コンバージョン係数は、各ワクチン菌株についてのワクチン接種後の血清HI幾何平均力値(GMT)の增加倍率として定義される。

***保護率は、(各ワクチン菌株についての)ワクチン接種後の血清HI力値が1:40に等しいまたはそれを超える被ワクチン接種者の百分率として定義され、保護を示すものとして通常認められている。

【0258】

他の態様において、本発明は、CD4+T細胞活性化を通して治癒または治療されることが知られている疾患のワクチンを設計する方法を提供し、この方法は

1)CD4+エピトープを含む抗原を選択すること、および

2)前記抗原を3D MPLと本明細書の上で定義された水中油型エマルジョンアジュvantと組み合わせることを含み、前記ワクチンは、前記哺乳動物へ投与すると前記哺乳動物の改善されたCD4 T細胞応答を誘発することができる。

【0259】

特許出願および許可された特許を含む、本明細書の中すべての参考文献の教示は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0260】

10

20

30

40

50

疑問の回避のため、本明細書の用語「含んでいる(comprising)」、「含む(comprise)」および「含む(comprises)」は、各事例において、場合により用語「からなっている(consisting of)」、「からなる(consist of)」および「からなる(consists of)」でそれぞれ代替可能であるものとする。

【実施例】

【0261】

以下の非限定的な実施例を参照することにより、本発明をさらに説明する。

【0262】

実施例Iは、マウス、フェレット、およびヒトの研究で使用される、免疫学的読み出し方法について記述する。

【0263】

実施例IIは、例示された研究で使用される、水中油型エマルジョンおよびアジュバント製剤の調製および特徴付けについて記述する。

【0264】

実施例IIIは、スプリットインフルエンザ抗原調製物およびAS03アジュバントを含有するワクチンによる、年齢が65歳超の高齢者集団での臨床試験について記述する。

【0265】

実施例IVは、スプリットインフルエンザ抗原調製物およびAS03アジュバントを含有するワクチンによる、年齢が65歳超の高齢者集団での第2の臨床試験、すなわちワクチン再接種試験について記述する。

【0266】

実施例Vは、フェレットにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価を示す(研究Iおよび研究II)。体温モニタリング、ウイルス排泄、およびCD4T細胞応答を測定した。

【0267】

実施例VIは、ナイーブC57Bl/6マウスおよびプライミングされたC57Bl/6マウスにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価を示す。

【0268】

実施例VIIは、異種株でプライミングされたC57Bl/6マウスにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のスプリットおよびサブユニットインフルエンザワクチンの前臨床評価を示す。

【0269】

実施例VIIIは、AS03アジュバントもしくはAS03+MPLアジュバントを含有しているか、いかなる外因性アジュバントも含有していないスプリットインフルエンザ抗原調製物含有ワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験について記載する。

【0270】

実施例IXは、フェレットにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価を示す(研究III)。温度モニタリング、ウイルス排泄、およびHI力値を測定した。

【0271】

実施例Xは、MPLを含む、もしくは含まないAS03アジュバントを含有するスプリットインフルエンザ抗原調製物含有ワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験、すなわち90日目および180日目における免疫原性持続性データを示す。

【0272】

実施例XIは、MPLを含むAS03アジュバントを含有するスプリットインフルエンザ抗原調製物含有ワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験を示す。

【0273】

実施例XIIは、2つの濃度のMPLをそれぞれ含むAS03アジュバントを含有するスプリットインフルエンザ抗原調製物含有ワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験を示す。

10

20

30

40

50

す。

【0274】

実施例XIIIは、マウスにおける、2種のアジュvant添加HPVワクチンの前臨床評価を示す。抗体応答およびB細胞記憶応答を測定した。

【0275】

実施例I

免疫学的読み出し方法

1.1. マウス方法

1.1.1. 赤血球凝集抑制試験

試験手順

10

3種のインフルエンザウイルス株に対する抗赤血球凝集素抗体力価を、赤血球凝集抑制試験(HI)を使用して測定した。HI試験の原理は、特定の抗インフルエンザ抗体が、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)によってニワトリ赤血球(RBC)の赤血球凝集を抑制することのできる能力に基づいている。熱不活化血清を、事前にカオリンおよびニワトリRBCにより処理して、非特異的抑制剤を除去した。前処理の後、2倍希釈した血清を、各インフルエンザ株を4つの赤血球凝集素単位と共にインキュベートした。次いでニワトリ赤血球を添加し、凝集の抑制を記録した。力価は、赤血球凝集が完全に抑制された血清の、最も高い希釈率の逆数で表した。血清の第1の希釈率が1:20であるとき、検出できないレベルを、10に等しい力価として記録した。

【0276】

20

統計的分析

統計的分析は、UNISTATを使用して、ワクチン接種後のHI力価に関して行った。分散分析のために適用されたプロトコルは、下記の通り簡単に記述することができる。

【0277】

・データのログ変換

・群分布の正規性を確認するための、各集団(群)に対するシャピロ-ウィルク(Shapiro-Wilk)試験

・種々の集団(群)同士の分散の不均質性を確認するための、コクラン(Cochran)試験

・群に対して行われた2元配置分散分析

・多数の比較のためのチューキー(Tukey)HSD

30

【0278】

1.1.2. 細胞内サイトカイン染色

この技法によって、サイトカイン産生に基づく抗原特異的Tリンパ球の定量が可能になり、エフェクターT細胞および/またはエフェクター-記憶T細胞がIFN- γ を産生し、かつ/または中央記憶T細胞がIL-2を産生する。PBMCを、免疫後7日で収集する。

【0279】

リンパ球を、分泌阻害剤(ブレフェルジン(Brefeldine))の存在下、in vitroで再刺激する。次いでこれらの細胞を、蛍光抗体(CD4、CD8、IFN- γ 、およびIL-2)を使用して、従来の免疫蛍光手順により処理する。結果を、CD4/CD8 T細胞内でのサイトカイン陽性細胞の頻度として表す。T細胞のサイトカインの細胞内染色は、2回目の免疫から7日後、PBMCに対して行った。血液をマウスから採取し、ヘパリン化培地RPMI+Addに溜めた。血液では、推奨されるプロトコル(遠心分離20分、2500rpmおよびR.T.で)に従って、RPMI+Addで希釈されたPBL懸濁液が、リンパ球-哺乳類勾配上に層状に形成された。界面にある単核細胞を除去し、RPMI+Add中で2回洗浄し、PBMC懸濁液を、RPMI 5%ウシ胎児血清中で 2×10^6 細胞/mlに調節した。

40

【0280】

PBMCのin vitro抗原刺激を、全FI(1 μ gHA/株)を用いて終濃度 1×10^7 細胞/ml(チューブFACS)で実施し、次いで抗CD28および抗CD49d(共に1 μ g/ml)を添加して2時間、37°Cでインキュベートした。

【0281】

50

抗原再刺激ステップの後、PBMCを、ブレフェルジン(1 μg/ml)の存在下、37℃で一晩インキュベートして、サイトカインの分泌を阻害する。

【0282】

IFN- γ /IL-2/CD4/CD8染色を、下記の通り行った。すなわち、懸濁液を洗浄し、2%Fc遮断試薬(1/50:2.4G2)を含有する50 μlのPBS 1% FCS中に再懸濁した。4℃で10分間インキュベートした後、抗CD4-PE(2/50)および抗CD8 perCp(3/50)の混合物50 μlを添加し、4℃で30分間インキュベートした。PBS 1% FCS中で洗浄した後、細胞を、サイトフィックス-サイトバーム(Cytotix-Cytoperm)(Kit BD)200 μl中に再懸濁し、4℃で20分間インキュベートすることによって透過化処理した。次いで細胞を、バームウォッシュ(Perm Wash)(Kit BD)で洗浄し、バームウォッシュ中で希釈された抗IFN- γ APC(1/50)+抗IL-2 FITC(1/50)の混合物50 μlと共に再懸濁した。インキュベーションを最短で2時間、最長で一晩4℃で行った後、細胞をバームウォッシュで洗浄し、PBS 1% FCS+1%パラホルムアルデヒド中に再懸濁した。サンプルの分析は、FACSにより行った。生細胞をゲーティングし(FCS/SSC)、獲得を、約20,000事象(リンパ球)または35,000事象、CD4+T細胞上で行った。IFN- γ +またはIL2+のパーセンテージを、CD4+およびCD8+のゲート集団に関して計算した。

10

【0283】

1.2. フェレット方法

1.2.1. 赤血球凝集素阻害試験(HI)

試験手順

3種のインフルエンザウイルス株に対する抗赤血球凝集素抗体力値を、赤血球凝集抑制試験(HI)を使用して測定した。HI試験の原理は、特定の抗インフルエンザ抗体が、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)によるニワトリ赤血球(RBC)の赤血球凝集を抑制することのできる能力に基づいている。まず、血清を25%ノイラミニダーゼ溶液(RDE)で処理し、熱不活化して、非特異的阻害剤を除去した。前処理の後、2倍希釈した血清を、各インフルエンザ株の4つの赤血球凝集単位と共にインキュベートした。次いでニワトリ赤血球を添加し、凝集の抑制を記録した。力値は、赤血球凝集を完全に阻害した血清の最も高い希釈率の逆数として表した。血清の第1の希釈が1:10であるとき、検出できないレベルを、5に等しい力値として記録した。

20

【0284】

統計的分析

30

統計的分析は、UNISTATを使用して、HI力値(41日目、チャレンジ前)に関して行った。分散分析に適用されたプロトコルは、下記の通り簡単に記述することができる。

【0285】

- ・データのログ変換
- ・群分布の正規性を確認するための、各集団(群)に関するシャピロ-ウィルク試験
- ・種々の集団(群)同士の分散の不均質性を確認するための、コクラン試験
- ・1元配置ANOVAの相互作用に関する試験
- ・多数の比較のためのチューキー試験

【0286】

1.2.2. 体温のモニタリング

40

個々の温度を、チャレンジ期間中に、トランスマッタを用いかつテレメトリー記録によってモニターした。すべての移植片について調べ、一新し、新たな較正をDSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 Tc Tilburg, The Netherlands)によってを行い、その後、腹腔内に配置した。これらの測定中、すべての動物を個々に単一のケージに収容した。

【0287】

チャレンジの4日前からチャレンジ後の7日目まで、15分毎に温度を記録した。

【0288】

1.2.3. 鼻洗浄

50

覚醒している動物の両方の鼻孔にPBSを5ml投与することによって、鼻洗浄を行った。接

種材料をペトリ(Petri)皿に収集し、ドライアイス上のサンプル容器内に配置した。

【0289】

鼻洗浄におけるウイルス滴定

すべての鼻サンプルを、まずSpin Xフィルター(Costar)に通して滅菌濾過することにより、あらゆる細菌汚染を除去した。鼻洗浄物質の連続10倍希釈物50 μ lを、培地(10ウェル/希釈)50 μ lが入っているマイクロタイタープレートに移した。次いでMDCK細胞100 μ l(2.4 \times 10⁵細胞/ml)を各ウェルに添加し、35℃で5~7日間インキュベートした。

【0290】

インキュベーションから5~7日後、培地を穏やかに取り出し、1/20 WST-1含有培地を100 μ l添加し、さらに18時間インキュベートした。

10

【0291】

生細胞によってWST-1が減少することにより生成された、黄色のホルマザン染料の強度は、ウイルス滴定アッセイの終わりにウェル内に存在する生細胞数に比例しており、適切波長(450nm)で各ウェルの吸光度を測定することによって定量される。カットオフは、非感染対照細胞のOD平均と定義される-0.3 OD(0.3 ODは、感染対照細胞のODの+/-3標準偏差に対応する)。正のスコアは、ODがカットオフ未満である場合と定義され、これとは対照的に負のスコアは、ODがカットオフよりも大きい場合と定義される。ウイルス排出力価は、「Reed and Muench」によって測定し、Log TCID50/mlとして表した。

【0292】

1.3. ヒトにおける免疫応答を評価するためのアッセイ

20

1.3.1. 赤血球凝集抑制アッセイ

免疫応答を、WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, USA(1991)に記載されている方法を使用してHI抗体を測定することにより決定した。

【0293】

抗体力価測定は、適切な抗原の4つの赤血球凝集抑制単位(4HIU)および0.5%トリ赤血球懸濁液を使用した、標準化されかつ全体が有効とされたマイクロメソッドにより、解凍した凍結血清サンプルに関して実施した。非特異的血清抑制剤は、熱処理および受容体破壊酵素によって除去した。

【0294】

得られた血清のHI抗体レベルを評価した。初期希釈1:10から開始して、最終希釈が1:20480になるまで、一連の希釈物(2倍)を調製した。滴定終点は、赤血球凝集の完全な抑制(100%)を示す最高希釈ステップと解釈した。すべてのアッセイは、2連で行った。

30

【0295】

1.3.2. ノイラミニダーゼ阻害アッセイ

このアッセイは、フェチュインでコーティングされたマイクロタイタープレートで行った。抗血清の連続2倍希釈物を調製し、標準量のインフルエンザA H3N2、H1N1、またはインフルエンザBウイルスと混合した。試験は、酵素作用によってフェチュインからノイラミン酸を放出するノイラミニダーゼの生物活性を基にした。末端ノイラミン酸の切断後、

-D-ガラクトース-N-アセチル-ガラクトサミンをアンマスキングした。ピーナツから得られた、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)で標識されたピーナツアグロチニンは、ガラクトース構造に特異的に結合するものであるが、このピーナツアグロチニンをウェルに添加した。結合したアグロチニンの量を、テトラメチルベンジジン(TMB)との基質反応で検出し、定量することができる。ウイルスノイラミニダーゼ活性を、依然として少なくとも50%阻害する最高抗体希釈率を、NI力価として示した。

40

【0296】

1.3.3. 中和抗体アッセイ

中和抗体測定を、解凍した凍結血清サンプルに関して実施した。血清に含有される抗体によるウイルス中和は、マイクロ中和アッセイで測定した。各血清について、3重に試験をした。標準量のウイルスを、血清の連続希釈物と混合し、抗体とウイルスとが結合する

50

ようにインキュベートした。次いで定義された量のMDCK細胞を含有する細胞懸濁液を、ウイルスと抗血清との混合物に添加し、33℃でインキュベートした。インキュベーション期間の後、ニワトリ赤血球の赤血球凝集によって、ウイルス複製を視覚化した。血清の50%中和力価を、Reed and Muenchの方法によって計算した。

【0297】

1.3.4. サイトカインフローサイトメトリー(CFC)によって細胞媒介性免疫を評価した

末梢血抗原特異的CD4およびCD8 T細胞は、これらに対応する抗原と共にインキュベートする場合にはIL-2、CD40L、TNF-α、およびIFNが生成されるように、in vitroで再刺激することができる。その結果、細胞内サイトカイン産生と同様に、細胞表現型の従来の免疫蛍光標識の後、フローサイトメトリーによって、抗原特異的CD4およびCD8 T細胞を数え上げることができる。本発明の研究では、インフルエンザワクチン抗原ならびに特定のインフルエンザタンパク質由来のペプチドを、インフルエンザ特異的T細胞を再刺激する抗原として使用した。結果は、CD4またはCD8 T細胞部分集団内のサイトカイン陽性CD4またはCD8の頻度として表した。

10

【0298】

1.3.5. 統計的方法

1.3.5.1. 主要エンドポイント

- ・ワクチン接種後7日間のフォローアップ期間(すなわち、ワクチン接種の日およびそれに続く6日間)中および全体の、求められた局所および全身の徴候および症状の、パーセンテージ、強度、およびワクチン接種との関係。
- ・ワクチン接種後21日間のフォローアップ期間(すなわち、ワクチン接種の日およびそれに続く20日間)中および全体の、求められない局所および全身の徴候および症状の、パーセンテージ、強度、およびワクチン接種との関係。
- ・全体的な研究の最中の、重篤な有害事象の発生。

20

【0299】

1.3.5.2. 副次的エンドポイント

液性免疫応答:

観察された変数:

- ・0日目および21日目:ワクチン中に提示される3種のインフルエンザウイルス株(抗H1N1、抗H3N2、および抗B抗体)のそれぞれに対して別々に試験がなされた、血清赤血球凝集抑制(HI)およびNI抗体力価。
- ・0日目および21日目:ワクチン中に提示される3種のインフルエンザウイルス株に対して別々に試験がなされた、中和抗体力価。

30

【0300】

得られた変数(95%信頼区間):

- ・ワクチン接種前後の95%信頼区間での、血清HI抗体の幾何平均力価(GMT)。
- ・21日目、95%CIでのセロコンバージョン率*
- ・21日目、95%CIでのコンバージョン係数**
- ・21日目、95%CIでの血清保護率***
- ・すべての時点での血清NI抗体GMT(95%信頼区間)。

40

* セロコンバージョン率は、各ワクチン株に関し、0日目に比べて21日目に血清HI力価が少なくとも4倍増加している被ワクチン接種体のパーセンテージと定義される。

** コンバージョン係数は、各ワクチン株に関する、0日目と比べた21日目の血清HI GMTの倍数増加と定義される。

*** 保護率は、通常は指示される保護として許容される、ワクチン接種後(各ワクチン株毎)の、血清HI力価=40での被ワクチン接種体のパーセンテージと定義される。

【0301】

細胞媒介性免疫(CMI)応答の場合

観察された変数

0日目および21日目:種々の試験における、 10^6 当たりのサイトカイン陽性CD4/CD8 T細胞

50

の頻度。

【0302】

各試験は、下記の事項に対するCD4/CD8 T細胞の応答を定量する：

- ・ペプチドインフルエンザ(pf)抗原(これら抗原の厳密な性質および起源を得ること/説明することが必要である)
- ・スプリットインフルエンザ(sf)抗原
- ・全インフルエンザ(wf)抗原。

【0303】

得られた変数：

- ・少なくとも2種のサイトカイン(CD40L、IL-2、IFN 、TNF)を産生する細胞
- ・少なくともCD40Lおよび別のサイトカイン(IL-2、TNF 、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIL-2および別のサイトカイン(CD40L、TNF 、IFN)を産生する細胞
- ・少なくともIFN および別のサイトカイン(IL-2、TNF 、CD40L)を産生する細胞
- ・少なくともTNF および別のサイトカイン(IL-2、CD40L、IFN)を産生する細胞

10

【0304】

1.3.5.3. 免疫原性の分析

免疫原性の分析は、ワクチン接種したコホートすべてを基にした。各治療群毎に、下記のパラメータ(95%信頼区間で)を計算した：

- ・0日目および21日目のHIおよびNI抗体力価の幾何平均力価(GMT)
- ・0日目および21日目の中和抗体力価の幾何平均力価(GMT)。
- ・21日目のコンバージョン係数。
- ・21日目のセロコンバージョン率(SC)は、0日目に比べて21日目の血清HI力価が少なくとも4倍増加しいる被ワクチン接種体のパーセンテージと定義される。
- ・21日目の保護率は、血清HI力価=1:40である被ワクチン接種体のパーセンテージと定義される。
- ・応答中に分泌されるCD4/CD8 Tリンパ球の頻度を、各ワクチン接種群毎に、各時点毎に(0日、21日目)、各抗原毎に(ペプチドインフルエンザ(pf)、スプリットインフルエンザ(sf)、および全インフルエンザ(wf))、まとめた(記述統計)。
- ・5つの異なる試験毎の、各ワクチン接種群および各抗原(pf、sf、およびwf)毎の、時点(後-前)応答間の個々の相違の記述的統計。
- ・ノンパラメトリック検定(クルスカル-ワリス検定)を使用して、3つの群の間での位置の相違を比較し、統計的p値を、5つの異なる試験毎に、各抗原に関して計算した。すべての有意検定は、両側検定であった。0.05以下のP値を、統計的に有意と見なした。

20

30

40

【0305】

実施例II

水中油型エマルジョンおよびアジュバント製剤の調製および特徴付け

他に特に指示しない限り、後続の実施例で使用される油/水エマルジョンは、2種の油(-トコフェロールおよびスクアレン)から作製された有機層と、乳化剤としてTween80を含有するPBSの水相とからなる。他に特に指示しない限り、後続の実施例で使用される水中油型エマルジョンアジュバント製剤は、下記の水中油型エマルジョン成分(所与の終濃度)、すなわちスクアレン2.5%(v/v)、-トコフェロール2.5%(v/v)、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン0.9%(v/v)(Tween80)を含むものが作製され、WO95/17210を参照されたい。後続の実施例ではAS03と呼ばれるこのエマルジョンは、2倍濃縮物として下記の通り調製した。

【0306】

11.1. エマルジョンSB62の調製

11.1.1. 実験室規模の調製

Tween80を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に溶解して、2%PBS溶液を得た。100mlの2倍濃縮物エマルジョンを得るために、DL-トコフェロール5gおよびスクアレン5mlを攪拌して完全に混合した。PBS/Tween溶液90mlを添加し、完全に混合した。次いで得られたエマ

50

ルジョンをシリングに通し、最終的に、M110Sミクロ流体マシンを使用してミクロ流動化する。得られた油滴は、約120~180nmのサイズ(PCSによって測定されたZ平均として表す)を有している。その他のアジュバント/抗原成分をエマルジョンに添加して、簡単に混合する。

【0307】

11.1.2. スケールアップした調製

SB62エマルジョンの調製は、疎水性成分(-トコフェロールおよびスクアレン)からなる油相と、水溶性成分(Tween80およびPBS(変性)、pH6.8)を含有する水相とを強く攪拌しながら混合することによって行う。攪拌しながら、油相(1/10全体積)を水相(9/10全体積)に移し、混合物を室温で15分間攪拌する。次いで得られた混合物を、ミクロ流動化器(15000 PSI-8サイクル)の相互作用チャンバ内で剪断力、衝撃力、および空洞力にかけることにより、サブミクロンの液滴(100から200nmの間の分布)が生成される。得られたpHは、6.8±0.1の間である。次いでSB62エマルジョンを、0.22 μm膜に通す濾過によって滅菌し、滅菌バルクエマルジョンを、2~8のCupac容器に冷蔵保存する。滅菌不活性ガス(窒素またはアルゴン)を、少なくとも15秒間、SB62エマルジョンの最終バルク容器の死空間に一気に流す。

【0308】

SB62エマルジョンの最終的な組成は、下記の通りである：

Tween80:1.8%(v/v) 19.4mg/ml; スクアレン:5%(v/v) 42.8mg/ml; -トコフェロール:5%(v/v) 47.5mg/ml; PBS-mod:NaCl 121mM、KCl 2.38mM、Na₂HPO₄ 7.14mM、KH₂PO₄ 1.3mM; pH6.8±0.1。

【0309】

11.2. 油滴サイズ動的光散乱の測定

11.2.1. 概要

油滴の直径のサイズを、下記の手順に従って、かつ下記の実験条件下で決定する。液滴サイズの測定は、強度測定として行われ、PCSにより測定されるZ平均として表される。

【0310】

11.2.2. サンプルの調製

サイズの測定を、水中油型エマルジョンアジュバントで行い:SB62はスケールアップ方法に従って調製し、AS03およびAS03+MPL(50 μg/ml)、最後の2つは使用直線に調製した。サンプルの組成物を、以下に示す(セクション2.2.4.参照)。サンプルを、PBS 7.4中で4000×~8000×に希釈した。

【0311】

対照として、PL-Nanocal粒度標準100nm(カタログ番号6011-1015)を10mM NaCl中に希釈した。

【0312】

11.2.3. Malvern Zetasizer 3000HSサイズ測定

すべてのサイズ測定は、共にMalvern Zetasizer 3000HSで行った。サンプルを、適切な希釈率(通常は、サンプル濃度に応じて4000×から20000×)で、かつ2つの光学モデルを用いて、すなわち

-実際の粒子屈折率が0であり、想像上の屈折率も0であるモデル、

-あるいは、実際の粒子屈折率が1.5であり、想像上の屈折率が0.01であるモデル(文献中に見出された値に従って適合された光学モデル)

を用いて、Malvern分析用のプラスチックのキュベットで測定した。

【0313】

技術的条件は、

-レーザ波長:532nm(Zeta3000HS)、

-レーザ出力:50mW(Zeta3000HS)、

-90°で検出された散乱光(Zeta3000HS)、

-温度:25°、

10

20

30

40

50

- 所要時間: ソフトによる自動測定、
- 数: 3つの連続した測定値、
- z平均直径: キュムラント解析による、
- サイズ分布: Continまたは自動方法による
という条件であった。

【0314】

自動Malvernアルゴリズムは、キュムラント、Contin、および非負最小2乗(NNLS)アルゴリズムの組合せを使用する。

【0315】

強度分布は、Mie理論のおかげで体積分布に変換することができる。

【0316】

11.2.4. 結果(表2参照)

キュムラント解析(Z平均直径):

【表2】

表2

| サンプル | 希釈率 | 記録 | 計数率 | ZAD | 多分散性 |
|------------------------|------|----|------|-----|------|
| SB62 | 5000 | 1 | 7987 | 153 | 0.06 |
| | | 2 | 7520 | 153 | 0.06 |
| | | 3 | 6586 | 152 | 0.07 |
| | | 平均 | 7364 | 153 | 0.06 |
| SB62(実施例IV) | 8000 | 1 | 8640 | 151 | 0.03 |
| | | 2 | 8656 | 151 | 0.00 |
| | | 3 | 8634 | 150 | 0.00 |
| | | 平均 | 8643 | 151 | 0.01 |
| SB62+MPL 25 μ g(*) | 8000 | 1 | 8720 | 154 | 0.03 |
| | | 2 | 8659 | 151 | 0.03 |
| | | 3 | 8710 | 152 | 0.02 |
| | | 平均 | 8697 | 152 | 0.02 |

(*)下記の通り調製した:注射用蒸留水、PBS 10 \times 濃縮物、SB62エマルジョン250 μ l、およびMPL 25 μ gを一緒に混合して、最終体積280 μ lにする。

【0317】

Z平均直径(ZAD)サイズは、サンプル中の各サイズの粒子によって散乱した光の量によって計った。この値は、サンプルの単峰性分析に関連しており、主に再現を目的に使用される。

【0318】

計数率(CR)は、散乱光の尺度であり、秒当たり何千個の光子に相当する。

【0319】

多分散性(Poly)インデックスは、分布の幅である。これは、分布の広さの無次元測定値である。

【0320】

Continおよび自動分析:

2種のその他のSB62の調製(2倍濃縮したAS03)を行い、下記のわずかな変更を行いつつ、上記にて説明した手順に従って評価した。

【0321】

最適な計数率の値が得られると決定された2つの希釈率で、サンプルを、Malvern分析用のプラスチックのキュベットで測定した:Zetasizer3000HSの場合に10000 \times および20000 \times 、上記実施例で使用したものと同じ光学モデル。

【0322】

結果を表3に示す。

10

20

30

40

【表3】

表3

| SB62 | 希釀率 | IR | | Contin での分析 (平均(単位:nm)) | | 自動での分析 (平均(単位:nm)) | |
|------|---------|-----|------|----------------------------|-----|-----------------------|-----|
| | | 実際 | 想像 | 強度 | 体積 | 強度 | 体積 |
| 1022 | 1/10000 | 0 | 0 | 149 | 167 | 150 | - |
| | | 1.5 | 0.01 | 158 | 139 | 155 | 143 |
| | 1/20000 | 0 | 0 | 159 | 200 | 155 | 196 |
| | | 1.5 | 0.01 | 161 | 141 | 147 | - |
| 1023 | 1/10000 | 0 | 0 | 158 | 198 | 155 | - |
| | | 1.5 | 0.01 | 161 | 140 | 150 | 144 |
| | 1/20000 | 0 | 0 | 154 | 185 | 151 | 182 |
| | | 1.5 | 0.01 | 160 | 133 | 154 | - |

「-」得られた値が一貫していない場合。

10

【0323】

これらの結果の概略的な表示を、製剤1023に関する図1に示す。図示されるように、大部分の粒子(例えば少なくとも80%)は、強度毎に300nm未満の直径を有する。

20

【0324】

11.2.5. 全体的な結論

SB62製剤は、Malvern Zetasizer 3000HSおよび2つの光学モデルを用いて、種々の希釀率で測定した。上記にて評価された製剤の粒度ZAD(すなわち、キュムラント解析による強度の平均)は、150~155nm程度であった。

20

【0325】

キュムラント解析を使用したとき、本発明者らは、希釀率がZADおよび多分散性に何の影響も及ぼさないことを見出した。

【0326】

11.3. MPLを含むAS03の調製

11.3.1. MPL懸濁液の調製

MPL(文書の最初から終わりまで通して使用されるように、3D-MPL、すなわち3-O-脱アシル化モノホスホリリピドAの略語である)液体バルクを、MPL(登録商標)凍結乾燥粉末から調製する。MPL液体バルクは、ワクチンまたはアジュバント製剤としてすぐに使用できる、原材料の安定な濃縮(1mg/ml程度)水性分散液である。調製プロセスの概略的な説明を、図2に示す。

30

【0327】

最大バッチサイズが12gの場合、MPL液体バルクの調製は、滅菌ガラス容器上で行う。MPLの分散液は、下記のステップからなる。

30

-MPL粉末を、注射用蒸留水に懸濁させる。

40

-加熱することによって(熱処理)、あらゆる大きな凝集体の、凝塊を行う。

40

-ミクロ流動化によって、粒度を100nmから200nmの間に縮小させる。

40

-調製物を、Sartocleanプレフィルターユニット、0.8/0.65 μmで事前に濾過する。

40

-調製物を室温で滅菌濾過する(Sartobran Pユニット、0.22m)。

【0328】

MPL粉末を、ミクロ流動化によって凍結乾燥し、その結果、安定なコロイド状水性分散液にする(MPL粒度は200nmより小さい)。MPL凍結乾燥粉末を、粗製の10mg/ml懸濁液を得るために、注射用蒸留水に分散させる。次いで懸濁液を、攪拌しながら熱処理にかける。室温に冷却後、粒度を低下させるために、ミクロ流動化を開始する。ミクロ流動化は、最小限の通過量(サイクル数:n_{min})に関して定められた圧力で、ミクロ流動化相互作用チャンバ内全体に分散液を連続的に循環させることにより、Microfluidics装置M110EHを使用して実施する。サイクル数を表すミクロ流動化の所要時間は、測定された流量および分散体積に基づいて計算する。所与の圧力の所与の装置では、得られた流量は、1つの相互作用

50

チャンバから別のチャンバに至るまで、また特定の相互作用チャンバのライフサイクルの最初から終わりに至るまで、様々に変わる可能性がある。本実施例では、使用される相互作用チャンバは、タイプF20Y Microfluidicsのものである。ミクロ流動化効率は、圧力-流量の組合せに関連しているので、処理時間は、1つのバッチと別のバッチとの間で異なる可能性がある。1サイクルに必要とされる時間は、流量を基に計算される。考えられる流量は、装置にMPLを導入する直前の、注射用蒸留水で測定された流量である。1サイクルを、MPLの全体積が装置内を1回通過するのに必要とされる時間(単位:分)と定義する。Nサイクルを得るのに必要な時間は、下記の通り計算する。

$n \times$ 処理されるMPLの量(ml) / 流量(ml/分)

【0329】

10

したがってサイクル数は、相応に適合される。実施されるサイクルの分数(n_{min})を、使用される好ましい装置および相互作用チャンバに関して記述する。実行されるサイクルの量全体は、 n_{min} サイクル後に行われる粒度測定の結果によって決定される。粒度限界(d_{lim})は、履歴データを基に定義される。測定は、光子相關分光法(PCS)技法によって実現され、 d_{lim} は、単一モード結果($Z_{平均}$)として表す。この限界より下では、ミクロ流動化を n_{min} サイクル後に停止することができる。この限界より上では、さらに最大50サイクルの間で、満足のいくサイズ縮小が得られるまでミクロ流動化を継続させる。

【0330】

20

ミクロ流動化の直後に濾過を行わない場合、濾過領域に移されるのを待ちながら、分散させたMPLを+2から+8で保存する。

【0331】

ミクロ流動化後、分散液を注射用蒸留水で希釈し、層流中で0.22 μ mフィルターに通して滅菌濾過する。最終的なMPL濃度は1mg/ml(0.80 ~ 1.20mg/ml)である。

【0332】

11.3.2. AS03+MPLアジュバントワクチンの調製:1バイアルアプローチ

AS03アジュバント製剤にMPLを添加し、終濃度を、ワクチン用量当たり10から50 μ gにした。

【0333】

30

PBS 10倍濃縮物(1倍濃縮の場合、pH7.4)、ならびにTween、Triton X-100、およびVES(コハク酸ビタミンE、すなわちコハク酸-トコフェロール)を含有するSB62混合物を、注射用蒸留水に添加する。これらの量は、目標とする終濃度がTween80では750 μ g/ml、Triton X-100では110 μ g/ml、VESでは100 μ g/mlに到達するような、インフルエンザ株に存在する界面活性剤を考慮に入れている。5分間の攪拌後、問題となっている各インフルエンザ株(例えば、古典的3価ワクチン中の株H1N1、H3N2、およびB)を15 μ g添加する。15分の攪拌後、SB62エマルジョン250 μ lを添加し、次いでMPLを25 μ gまたは50 μ g添加する。

【0334】

調製プロセスの概略図を、図3に示す。ヒト用量当たりの、MPLを含むAS03の最終粗製を表4に示す。

【表4】

表4

| 成分 | | 濃度 | ヒト用量当たり | |
|-------------|--|-----------------------------------|---|----------|
| 名称 | 成分 | | 量 | その他 |
| SB62 | スクアレン(溶液43mg/ml) トコフェロール(溶液 48mg/ml) Tween 80(溶液20mg/ml) | 781μl/ml | 250μl 10.68mg 11.86mg 4.85mg | |
| MPL** | (溶液1mg/ml) | 78μg/mlまたは156μg/ml | 25μgまたは 50μg | |
| PBS mod* | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ | 137mM 2.7mM 8.1mM 1.47mM | 2.56mg 0.064mg 0.368mg 0.064mg | |
| 注射用蒸 留水 | | | | Ad 320μl |
| pH | | | | 6.8±0.1 |

*PBS mod 10×濃縮物pH6.8=KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaCl、KCl-HCl

**MPLは、用量当たり25μgまたは50μg

10

20

30

40

【0335】

11.3.3. AS03+MPLアジュバントワクチンの調製:2バイアルアプローチ

同じ製剤は、2倍に濃縮した抗原または抗原性調製物を、AS03(SB62 250 μl)またはAS03+MPL(SB62 250 μl+MPL 25 μgまたは50 μg)アジュバントと混合することによって、2バイアルアプローチから調製することができる。この場合、調製は下記の通り進行する。AS25アジュバント添加インフルエンザワクチンの製造は、3つの主なステップからなる：

- 1)アジュバントを含まない3価の最終バルク(2×濃縮)の配合および抗原容器内への充填
- 2)AS03+MPLアジュバントの調製
- 3)AS03+MPLアジュバントスプリットウイルスワクチンの即時溶解。

【0336】

1)アジュバントを含まない3価の最終バルクの配合および抗原容器内への充填

3つの1価のバルクの体積は、配合前に1価のバルクそれぞれで測定されたHA含量と、目標体積1100mlとを基にしている。濃縮したリン酸緩衝生理食塩水と、Tween80、Triton X-100、およびコハク酸水素-トコフェリル(-tocopheryl hydrogen succinate)のプレミックスとを、注射用蒸留水で希釈する。次いで3つの濃縮モノバルク(A/New Caledonia、A/ニューヨーク、B/Jiangsu)を、得られたリン酸緩衝生理食塩水/Tween80-Triton X-100-コハク酸水素-トコフェリル溶液(pH7.4、NaCl 137mM、KCl 2.7mM、Na₂HPO₄ 8.1mM、KH₂PO₄ 1.47mM、Tween80 990 μg/ml、Triton X-100 150 μg/ml、およびコハク酸水素-トコフェリル130 μg/ml)中に連続的に希釈して、最終的に、3価の最終バルク1ml当たりA株(H1N1、H3N2)のHAが39.47 μg(15 μg HA/A株/380 μl 3価の最終バルク)、およびB株のHAが46 μg(17.5 μg HA/B株/380 μl 3価の最終バルク)の濃度になるようにする。1価のバルクのそれぞれを添加する合間に、混合物を室温で10~30分間攪拌する。最後の1価のバルクを添加して15~30分間攪拌した後、pHを検査し、HClまたはNaOHで7.2±0.2に調節する。

【0337】

抗原の3価の最終バルクを、無菌状態で3mlの滅菌I型(Ph. Eur.)ガラスバイアルに満たす。各バイアルは、470 μlの容積を有する(380 μl+90 μl 一杯にする)。

【0338】

2)AS03/MPLアジュバントバルクの調製およびアジュバント容器への充填

アジュバントAS03/MPLは、2成分、すなわちSB62エマルジョン(セクション2.1.2.の方法)およびMPL(セクション2.3.1.の方法)を混合することによって調製する。SB62バルクおよ

50

びMPL液体バルクを1mg/mlで含む、1倍濃縮PBS mod(10×濃縮PBS modを注射用蒸留水で希釈することによって調製された)。MPLの濃縮は、最終含量が、最終的なヒトワクチン用量当たり10から50μgの間になるように、好適には25μg程度になるように決定されることになる。混合物を、室温で5～30間攪拌し、pHを、NAOH(0.05または0.5M)/HCl(0.03Mまたは0.3M)で6.8±0.1に調節する。室温でさらに5～30分間攪拌した後、混合物を、0.22μmの膜に通して濾過することにより滅菌する。滅菌不活性ガス(窒素)のフラッシングを行って、最短で1分の間に充填容器内に不活性死空間を生成する。滅菌AS03+MPLアジュバントを、1.25ml滅菌I型(Ph.Eur.)ガラスシリンジに無菌状態で充填するまで、+2～8℃で保存する。各シリンジは、80μlを超える容積を有する(320μl+80μl一杯にして)。

【0339】

10

注射の時、アジュバントが入っている事前充填済みのシリンジの内容物は、濃縮された3価の不活性スプリットビリオン抗原が入っているバイアルに注入される。混合した後、その内容物をシリンジ内に引き出し、針を、筋肉内針と交換する。溶かして元に戻したAS25アジュバント添加インフルエンザ候補ワクチンの1回の用量は、0.7mLに相当する。

【0340】

11.4. 水中油型エマルジョン製剤中にインフルエンザ抗原および場合によってMPLを含む免疫原性組成物の調製

11.1のSB62エマルジョンに、等体積の2倍濃縮スプリットインフルエンザ抗原(Fluarix(商標))(株当たりHA 15μg)を添加し、混合した。これを、適切な場合には50μg/mlのMPLと一緒にして、最終的な製剤を得た。

20

【0341】

実施例 I I I

スプリットインフルエンザ抗原調製物およびAS03アジュバントを含有するワクチンを用いた65歳以上の高齢者集団における臨床試験(Explo-Flu-001)

アジュバントAS03を含有するGlaxoSmithKline Biologicalsインフルエンザ候補ワクチンの反応原性および免疫原性を評価するために、第1相オープン無作為試験を、2003年に65歳以上の高齢者集団で実施した。液性免疫応答(すなわち、抗赤血球凝集素、中和、および抗ノイラミニダーゼ抗体力値)および細胞媒介性免疫応答(CD4および/またはCD8T細胞応答)を、AS03アジュバントワクチンまたはWVワクチンの1回分用量を筋肉内投与してから21日後に測定した。Fluarix(商標)を参照として使用した。

30

【0342】

III.1. 試験の設計

3群の対象に、並行して下記のワクチンを筋肉内投与した。

- ・50名の対象の1群には、1回分用量の、溶解して元に戻したアジュバントSVインフルエンザワクチン(FluAS03)を投与した。
- ・50名の対象の1群には、1回分用量の、全ウイルスインフルエンザワクチン(FluWVV)を投与した。
- ・50名の対象の1群には、1回分用量のFluarix(商標)を下記の対照ワクチン接種スケジュールで投与した:0日目にインフルエンザワクチンを1回注射、血液サンプル採取、21日目に読み取り分析(HI抗体測定、NI抗体測定、中和抗体の測定、およびCMI分析)、試験終了。

40

【0343】

この試験で使用した標準的な3価のスプリットインフルエンザワクチン-Fluarix(商標)は、GlaxoSmithKline Biologistsによって2003年から開発され製造された市販のワクチンである。

【0344】

III.2. ワクチンの組成物および投与(表5)

III.2.1 ワクチンの調製

AS03アジュバント添加インフルエンザワクチン

AS03アジュバント添加インフルエンザワクチン候補は、I型ガラスバイアル(335μl)(抗原容器)内にある濃縮3価不活性スプリットビリオン抗原と、SB62エマルジョンが入ってい

50

る事前充填式シリンジ(335 μl)(アジュバント容器)からなる2成分ワクチンである。注射の時、抗原容器の内容物を、SN62エマルジョン事前充填式シリンジの助けを借りて除去し、その後、シリンジを穏やかに混合する。SB62エマルジョンとワクチン抗原との混合によって、AS03アジュバントが再構成される。注射の前に、使用済みの針を筋肉内針に代え、体積を500 μlに補正する。

【0345】

再構成されたAS03アジュバント添加インフルエンザワクチンの1回分用量は、0.5mlに相当し、登録されたFluarix(商標)/ -Rix(登録商標)ワクチンの場合と同様に各インフルエンザウイルス株のHAを15 μg含有し、スクアレンを10.68mg、DL- -トコフェロールを11.86mg、およびポリソルベート80(Tween80)を4.85mg含有する。

10

【0346】

調製

AS03アジュバント添加インフルエンザワクチンの製造は、3つの主なステップからなる。

【0347】

1)アジュバントを含まない3価の最終バルクの配合および抗原容器内への充填

3つの1価のバルクの体積は、配合前に1価のバルクそれぞれで測定されたHA含量と、目標体積800mlとを基にしている。濃縮したリン酸緩衝生理食塩水と、Tween80、Triton X-100、およびコハク酸水素 - トコフェリルのプレミックスとを、注射用蒸留水で希釈する。次いで3つの濃縮モノバルク(株A/New Caledonia、株A/Panama、および株B/Shangdong)を、得られたリン酸緩衝生理食塩水/Tween80-Triton X-100-コハク酸水素 - トコフェリル溶液(pH7.4、NaCl 137mM、KCl 2.7mM、Na₂HPO₄ 8.1mM、KH₂PO₄ 1.47mM、Tween80 1500 μg/ml、Triton X-100 220 μg/ml、およびコハク酸水素 - トコフェリル200 μg/ml)中に連続的に希釈して、最終的に、3価の最終バルク1ml当たりA株のHAが60 μg(15 μg HA/A株/250 μl 3価の最終バルク)、およびB株のHAが70 μg(17.5 μg HA/B株/250 μl 3価の最終バルク)の濃度になるようにする。1価のバルクのそれぞれを添加する合間に、混合物を室温で10分間攪拌する。最後の1価のバルクを添加して150分間攪拌した後、pHを検査し、HClまたはNaOHで7.2 ± 0.2に調節する。

20

【0348】

抗原の3価の最終バルクを、無菌状態で3mlの滅菌I型ガラスバイアルに満たす。各バイアルは、34%の体積超過を含む(全容積は335 μl)。

30

【0349】

2)SB62エマルジョン滅菌バルクの調製、およびアジュバント容器への充填

・水相:攪拌しながら、Tween80 902mlをPBS-mod緩衝液(HClで調節した後のpH=6.8)44105mlと混合する。

40

・油相:攪拌しながら、スクアレン2550mlを - トコフェロール2550mlに添加する。

・水相と油相の混合:攪拌しながら、油相5000ml(全体積の1/10)を水相45007ml(全体積の9/10)に移す。この混合物を、室温で15分間攪拌する。

・乳化:得られた混合物を、ミクロ流動器の相互作用チャンバ内で剪断力、衝撃力、および空洞力にかけて(15000PSI-8サイクル)、サブミクロンの液滴(100から200nmの間の分布)を生成する。得られたpHは、6.8 ± 0.1の間である。

・滅菌濾過:SB62エマルジョンを、0.22 μm膜に通す濾過によって滅菌し、滅菌バルクエマルジョンを、Cupac容器内で2から8℃に冷蔵保存する。滅菌不活性ガス(窒素またはアルゴン)を、少なくとも15秒間、SB62エマルジョンの最終バルク容器の死空間に一気に流す。

【0350】

与えられた成分の量のすべては、エマルジョンを50L調製するためのものであり、体積を単位として示される。実際に、量は、成分の密度を考慮して計量される。PBSの密度は、1に等しいと考えられる。

【0351】

SB62エマルジョンの最終組成は下記の通りである。

50

【表5】

表5

| | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|
| Tween 80: | 1.8%(v/v) | 19.4mg/ml |
| スクアレン: | 5%(v/v) | 42.8mg/ml |
| α-トコフェロール: | 5%(v/v) | 47.5mg/ml |
| PBS-mod: | | |
| NaCl | | 121mM |
| KCl | | 2.38mM |
| Na ₂ HPO ₄ | | 7.14mM |
| KH ₂ PO ₄ | | 1.3mM |
| pH | | 6.8±0.1 |

10

【0352】

次いで滅菌SB62バルクエマルジョンを、1.25mlの滅菌I型ガラスシリングに無菌状態で充填する。各シリングは、34%の体積超過を含む(全容積は335μl)。

【0353】

3) AS03アジュバントスプリットウイルスワクチンの即時溶解

注射の時、濃縮した3価の不活化スプリットビリオン抗原が入っているバイアルの内容物を、SB62エマルジョンが入っているシリングの助けを借りてバイアルから除去し、その後、シリングを穏やかに混合する。SB62エマルジョンとワクチン抗原との混合によって、AS03アジュバントが再構成される。

20

【0354】

III.2.2. ワクチンの組成(表6)および投与

【表6】

表6

| ワクチン | 配合 | 群 |
|------------------|--|----------|
| Fluarix (商標) | 3種のインフルエンザ株からのHA(合計HA=45μg) ・ A/New Caledonia/20/99(IVR-116):15μg ・ A/Panama/2007/99(RESVIR-17):15μg ・ B/shangdong/7/97:15μg チオメルサール含量:5μg 0.5mlの事前充填式シリング中 | Fluarix |
| WWV | 3種のインフルエンザ株からのHA(合計HA=45μg) ・ A/New Caledonia/20/99(IVR-116):15μg ・ A/Panama/2007/99(RESVIR-17):15μg ・ B/shangdong/7/97:15μg チオメルサール含量:5μg 0.5mlのバイアル中 | FluWWV |
| Fluarix+ AS03 | 3種のインフルエンザ株からのHA(合計HA=45μg) ・ A/New Caledonia/20/99(IVR-116):15μg ・ A/Panama/2007/99(RESVIR-17):15μg ・ B/shangdong/7/97:15μg チオメルサール含量:5μg 0.335mlのバイアル(2倍濃縮) +水中油型SB62エマルジョンが入っているシリング (0.335ml)中(スケールアップ調製) | Flu-AS03 |

30

40

【0355】

ワクチンを、利き腕ではない方の腕の三角筋部に、筋肉内投与した。ワクチン接種後に稀なアナフィラキシー反応が出た場合に適切な医療が容易に受けられる状態で、被ワクチ

50

ン接種者を少なくとも30分間綿密に観察した。

【0356】

III.3. 試験集団の結果

この試験では、合計148名の対象を登録し、49名の対象をFluAS03群に、49名の対象をFluarix群に、50名の対象をFluWVV群に登録した。ワクチン接種時の、ワクチン接種した全コホートの平均年齢は、71.8歳であり、標準偏差は6.0歳であった。3種のワクチン群全体にわたる対象の平均年齢および性別の分布は、類似していた。

【0357】

III.4. 安全性の結論

AS03でアジュバント添加されたインフルエンザワクチンの投与は、安全であり、試験集団において、すなわち65歳以上の高齢者において臨床上十分に耐えられるものである。

【0358】

III.5. 免疫原性の結果

免疫原性の分析を、ワクチン接種した全コホートについて行った。

【0359】

III.5.1. 液性免疫応答

AS03アジュバントワクチンにより誘発された液性免疫応答を評価するために、下記のパラメータ(95%信頼区間で)を各治療群毎に計算した。

- ・0日目および21日目のHIおよびNI抗体力価の幾何平均力価(GMT)
- ・0日目および21日目の中和抗体力価の幾何平均力価(GMT)。
- ・21日目のセロコンバージョン率(SC)は、0日目に比べて21日目の血清HI力価が少なくとも4倍増加しいる被ワクチン接種者のパーセンテージと定義される。
- ・21日目の変換計数は、各ワクチン株毎に、0日目と比べた21日目の血清HI GMTでの倍数増加と定義される。
- ・21日目の保護率は、血清HI力価=1:40である被ワクチン接種者のパーセンテージと定義される。

【0360】

III.5.1.1. 抗赤血球凝集素抗体応答

a) HI幾何平均力価(GMT)

95%CIでのHI抗体に関するGMTを、表7に示す(抗HI抗体に関するGMT)。すべてのワクチン株に関する抗体の、ワクチン接種前のGMTは、3つの群で同じ範囲内にあった。ワクチン接種後、抗赤血球凝集素抗体レベルが著しく増加した。ワクチン接種後は、FluAS03群およびFluarix群において、3種のワクチン株すべてに関するHI抗体のGMTが、より高くなる傾向があったが、Fluarix群とFluWVV群との間には、95%CIでいくらか重複があった。

10

20

30

【表7】

表7

| 抗体 | 群 | タイミング | N | GMT | | |
|-----------------|---------|----------|----|-------|-------|-------|
| | | | | 値 | 95%CI | |
| | | | | | LL | UL |
| A/New Caledonia | FluAS03 | Pre | 49 | 25.6 | 17.3 | 37.9 |
| | | PI(21日目) | 49 | 317.7 | 219.1 | 460.7 |
| | | Pre | 49 | 26.3 | 18.1 | 38.4 |
| | FluWVV | PI(21日目) | 49 | 358.5 | 244.2 | 526.4 |
| | | Pre | 50 | 19.7 | 13.6 | 28.6 |
| | | PI(21日目) | 50 | 138.2 | 90.3 | 211.7 |
| A/Panama | FluAS03 | Pre | 49 | 52.3 | 35.4 | 77.4 |
| | | PI(21日目) | 49 | 366.1 | 264.5 | 506.6 |
| | | Pre | 49 | 40.9 | 28.1 | 59.5 |
| | FluWVV | PI(21日目) | 49 | 296.0 | 205.4 | 426.6 |
| | | Pre | 50 | 25.8 | 18.0 | 37.1 |
| | | PI(21日目) | 50 | 165.6 | 116.0 | 236.5 |
| B/shangdong | FluAS03 | Pre | 49 | 27.5 | 19.0 | 39.8 |
| | | PI(21日目) | 49 | 317.7 | 226.9 | 444.9 |
| | | Pre | 49 | 26.0 | 17.2 | 39.2 |
| | FluWVV | PI(21日目) | 49 | 270.0 | 187.0 | 389.7 |
| | | Pre | 50 | 32.0 | 20.8 | 49.3 |
| | | PI(21日目) | 50 | 195.6 | 135.2 | 282.9 |

N=利用可能な結果を示す被験者の数

95%CI=95%信頼区間;LL=下限;UL=上限

MIN/MAX=最小/最大

PRE=0日目のワクチン接種前

PI(D21)=21日目のワクチン接種後

10

20

30

40

50

【0361】

b) 抗HI抗体力値のコンバージョン係数、血清保護率、およびセロコンバージョン率(ヒトにおける保護では相關する)

結果を表8に示す。

【0362】

コンバージョン係数は、0日目と比べた21日目の各ワクチン株毎の、血清HI GMTの倍数増加を表す。コンバージョン係数は、ウイルス株およびワクチンに応じて6.1から13.6まで変化する。このコンバージョン係数は、欧州当局(European Authorities)により要求されるGMTの2.0倍増加よりも大きく上回っている。

【0363】

血清保護率は、21日目に血清HI力値が40以上である対象の割合を表す。試験の冒頭で、すべての群の対象の半分(34.0%~69.4%の範囲)は、21日目にすべての株に対する抗体を保護レベルで有しており、3つの群の血清保護率は、種々のウイルス株に関して88.0%から100%に及んでいた。保護の観点から、これは、ワクチン接種後に88%を超える対象が40以上の血清HI力値を有しており、3種の株に対して保護されることが考えられる意味している。この率は、欧州当局によって60歳以上の高齢者集団で必要とされる60%という血清保護率を、大きく上回っている。

【0364】

セロコンバージョン率は、0日目に比べて21日目に、血清HI力値が少なくとも4倍の増加を示す、対象の割合を表す。3種の株に関する全体的な応答速度は、3つの群において本質的に等しかった。有効であると考えるために、かつ欧州連合によれば、ワクチンは、60歳

の集団において30%よりも高いセロコンバージョン率をもたらすべきである。この試験では、セロコンバージョン率が、3つの群において50%よりも高かった。

【表8】

表8

| | | | 血清保護率 | セロコンバージョン率 | コンバージョン係数 |
|-----------------|----------|----|-------------------|-----------------|----------------|
| EU規格(>60歳) | | | | >30% | >2.0 |
| 株 | 群 | N | %[95%CI] | %[95%CI] | GMR[95%CI] |
| A/New Caledonia | Flu AS03 | 49 | 98.0[89.1~99.9] | 69.4[54.6~81.7] | 12.4[7.3~21.0] |
| | Fluarix | 49 | 98.0[89.1~99.9] | 69.4[54.6~81.7] | 13.6[8.0~23.2] |
| | Flu WVV | 50 | 88.0[75.7~95.5] | 52.0[37.4~66.3] | 7.0[4.0~12.2] |
| A/Panama | Flu AS03 | 49 | 100.0[92.7~100.0] | 55.1[40.2~69.3] | 7.0[4.2~11.6] |
| | Fluarix | 49 | 91.8[80.4~97.7] | 65.3[50.4~78.3] | 7.2[4.7~11.3] |
| | Flu WVV | 50 | 90.0[78.2~96.7] | 56.0[41.3~70.0] | 6.4[3.9~10.4] |
| B/shangdong | Flu AS03 | 49 | 100.0[92.7~100.0] | 73.5[58.9~85.1] | 11.6[7.2~18.6] |
| | Fluarix | 49 | 95.9[86.0~99.5] | 69.4[54.6~81.7] | 10.4[6.5~16.5] |
| | Flu WVV | 50 | 90.0[78.2~96.7] | 50.0[35.5~64.5] | 6.1[3.6~10.3] |

N=被験者の総数

【0365】

終わりに:

・ワクチン接種後は、FluAS03群およびFluarix群において、3種のワクチン株すべてに関するHI抗体のGMTがより高くなる傾向があったが、Fluarix群とFluWVV群との間には、95%CIでいくらか重複があった。

【0366】

・コンバージョン係数は、ウイルス株およびワクチンに応じて6.1から13.6まで変化する。このコンバージョン係数は、欧州当局により要求されるGMTの2.0倍増加よりも大きく上回っている。

【0367】

・21日目に、3つの群の血清保護率は、種々のウイルス株に関して88.0%から100%に及んだ。この率は、欧州当局によって60歳以上の高齢者集団で必要とされる60%という血清保護率を、大きく上回っている。

【0368】

・この試験では、セロコンバージョン率が、3つの群に関して50%よりも大きかった。3種の株の全体的な応答速度は、3つの群において本質的に等しかった。

【0369】

III.5.1.2. 中和抗体力価

高齢者におけるインフルエンザワクチン接種に対する免疫応答をより良く特徴付けるため、中和抗原に対する血清抗体応答について評価した。結果を表9(抗中和抗体力価に対する血清保護率および幾何平均力価(GMT))および表10(ワクチン接種後、21日目の、抗中和に対するセロコンバージョン率(倍数増加=4))に示す。

【0370】

3種のインフルエンザ株に対する中和抗体の力価を、免疫前後の血清に関して測定した。下記のパラメータを測定した。

・ワクチン接種前後の、95%信頼区間(95%CI)での血清中和抗体の幾何平均力価(GMT)
・各ワクチン株毎に、0日目と比べて21日目に、HI力価の少なくとも4倍増加を示す被ワクチン接種者のパーセンテージと定義された、21日目の95%CIでのセロコンバージョン率

10

20

30

40

50

【0371】

【表9】

表9

| 抗体 | 群 | タイミング | N | >=18 1/DIL | | | | GMT | | | | |
|-----------------|---|---------|----|------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|----|----|
| | | | | n | % | 95%CI | | 値 | 95%CI | | LL | UL |
| | | | | | | LL | UL | | LL | UL | | |
| A/New Caledonia | 1 | PRE | 49 | 46 | 93.9 | 83.1 | 98.7 | 106.6 | 77.6 | 146.6 | 10 | |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 870.2 | 608.5 | 1244.3 | | |
| | 2 | PRE | 49 | 48 | 98.0 | 89.1 | 99.9 | 115.6 | 89.4 | 149.5 | 20 | |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 955.8 | 649.5 | 1406.5 | | |
| | 3 | PRE | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 | 87.7 | 63.6 | 120.8 | 30 | |
| | | PI(D21) | 50 | 50 | 100.0 | 92.9 | 100.0 | 375.4 | 271.2 | 519.6 | | |
| A/Panama | 1 | PRE | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 724.7 | 558.0 | 941.1 | 10 | |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 2012.8 | 1438.4 | 2816.5 | | |
| | 2 | PRE | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 727.8 | 556.1 | 952.6 | 20 | |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 1597.7 | 1128.8 | 2261.5 | | |
| | 3 | PRE | 50 | 50 | 100.0 | 92.9 | 100.0 | 512.0 | 409.3 | 640.6 | 30 | |
| | | PI(D21) | 50 | 50 | 100.0 | 92.9 | 100.0 | 977.8 | 738.2 | 1295.0 | | |
| B/shangdong | 1 | PRE | 49 | 29 | 59.2 | 44.2 | 73.0 | 25.6 | 18.8 | 35.0 | 10 | |
| | | PI(D21) | 49 | 48 | 98.0 | 89.1 | 99.9 | 222.5 | 148.1 | 334.2 | | |
| | 2 | PRE | 49 | 27 | 55.1 | 40.2 | 69.3 | 29.3 | 20.1 | 42.7 | 20 | |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100.0 | 92.7 | 100.0 | 190.4 | 127.6 | 284.3 | | |
| B/shangdong | 3 | PRE | 50 | 31 | 62.0 | 47.2 | 75.3 | 33.4 | 23.1 | 48.4 | 30 | |
| | | PI(D21) | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 | 117.8 | 82.6 | 168.0 | | |

1群:Fluワクチン混合アジュバント2×濃縮Fluワクチン

2群:FluワクチンFluワクチン

3群:FluワクチンFluWVVワクチン

N=利用可能な結果を示す被験者の数

n/%=指定範囲内の力値を示す被験者の数/パーセンテージ

95%CI=95%信頼区間;LL=下限;UL=上限

PRE=0日目のワクチン接種前

PI(D21)=21日目のワクチン接種後

【0372】

【表10】

表10

| 抗体 | 群 | N | 応答者 | | 95%CI LL | UL |
|-----------------|---|----|-----|------|-------------|------|
| | | | n | % | | |
| A/New Caledonia | 1 | 49 | 29 | 59.2 | 44.2 | 73.0 |
| | 2 | 49 | 30 | 61.2 | 46.2 | 74.8 |
| | 3 | 50 | 21 | 42.0 | 28.2 | 56.8 |
| A/Panama | 1 | 49 | 12 | 24.5 | 13.3 | 38.9 |
| | 2 | 49 | 9 | 18.4 | 8.8 | 32.0 |
| | 3 | 50 | 9 | 18.0 | 8.6 | 31.4 |
| B/shangdong | 1 | 49 | 29 | 59.2 | 44.2 | 73.0 |
| | 2 | 49 | 26 | 53.1 | 38.3 | 67.5 |
| | 3 | 50 | 19 | 38.0 | 24.7 | 52.8 |

1群:Flu ワクチン(DFLU58A16)混合アジュバント(D621024A8)2×濃縮 Flu ワクチン

2群:Flu ワクチン(18854B9)Flu ワクチン

3群:Flu ワクチン(DFLU59A2)Flu WVV ワクチン

N=ワクチン接種の前と後の両方で利用可能な結果を示す被験者の数

n=応答者の数

%=応答者の割合(n/N×100)

95%CI=正確な95%信頼区間;LL=下限、UL=上限

10

20

30

【0373】

主な知見は、下記の通りである。

【0374】

・21日目の3種のワクチンに関し、両方のA株で血清保護率100%が得られる。B株の場合、3つの群における血清保護率は、92%から100%に及んだ。

【0375】

・ワクチン接種後に、3つの群ではすべての株に関してGMTの著しい増加があった。しかしFluAS03群およびFluarix群では、FluWVVよりも、3種のワクチン株すべてに関するHI抗体のGMTがより高くなる傾向があったが、Fluarix群とFluWVV群との間には、95%CIでいかに重複があった。

【0376】

・セロコンバージョン率の場合、3種の株に関する全体的な応答速度は、3つの群で本質的に等しかった。

【0377】

すべての群において、その結果は、抗赤血球凝集素抗体に関して実施された分析から得られた結果と一致していた。

【0378】

III.5.1.3 ノイラミニダーゼ(NA)抗体力価

高齢者集団におけるインフルエンザワクチン接種に対する免疫応答を、より良く特徴付けるため、ノイラミニダーゼ抗原に対する血清抗体応答について評価した。HI抗体力価と同様に、下記のエンドポイントを測定した。

・GMT(log力価変換の平均の逆logを得る)

・各ワクチン株毎に、0日目に比べて21日目にHI力価が少なくとも4倍増加していることを示す、被ワクチン接種者のパーセンテージと定義されたセロコンバージョン率

40

【0379】

95%CIでのNI抗体に関するGMTおよびセロコンバージョン率を、表11(抗NA抗体GMT)および表12(ワクチン接種後のNAのセロコンバージョン率(21日目)(4倍増加))に示す。

【表11】

表11

| 抗体 | 群 | タイミング | N | GMT | 95%CI | |
|-----------------|---------|---------|----|-------|-------|-------|
| | | | | | LL | UL |
| A/New Caledonia | FluAS03 | PRE | 49 | 77.8 | 61.8 | 97.9 |
| | | PI(D21) | 48 | 270.0 | 212.9 | 342.3 |
| | Fluarix | PRE | 49 | 77.8 | 64.6 | 93.6 |
| | | PI(D21) | 49 | 249.1 | 190.0 | 326.5 |
| A/Panama | FluAS03 | PRE | 50 | 66.8 | 53.8 | 83.0 |
| | | PI(D21) | 50 | 159.2 | 122.8 | 206.4 |
| | Fluarix | PRE | 49 | 33.3 | 28.5 | 48.7 |
| | | PI(D21) | 48 | 156.8 | 124.8 | 196.9 |
| B/shangdong | FluAS03 | PRE | 49 | 34.2 | 25.6 | 45.8 |
| | | PI(D21) | 49 | 133.7 | 100.9 | 177.3 |
| | Fluarix | PRE | 50 | 24.6 | 18.7 | 32.4 |
| | | PI(D21) | 49 | 78.9 | 59.4 | 104.7 |
| | FluWVV | PRE | 49 | 46.7 | 36.5 | 59.9 |
| | | PI(D21) | 49 | 204.2 | 156.4 | 266.7 |
| | Fluarix | PRE | 49 | 46.1 | 35.3 | 60.1 |
| | | PI(D21) | 49 | 133.7 | 100.9 | 177.3 |
| | FluWVV | PRE | 50 | 48.6 | 36.4 | 64.7 |
| | | PI(D21) | 49 | 128.2 | 101.7 | 161.6 |
| | | | | | | |

FluAS03:AS03 アジュバント(D621024A8)と混合した Flu ワクチン(DFLU58A16)

Fluarix:Flu ワクチン(18854B9)

FluWVV:Flu WVV ワクチン(DFLU59A2)

PRE=ワクチン接種前、PI(D21)=ワクチン接種後 21 日目

95%CI、LL、および UL=95%信頼区間、下限、および上限

【0380】

【表12】

| 抗体 | 群 | N | 応答者 n | % | 95%CI | |
|-----------------|---------|----|----------|------|-------|------|
| | | | | | LL | UL |
| A/New Caledonia | FluAS03 | 48 | 25 | 52.1 | 37.2 | 66.7 |
| | Fluarix | 49 | 24 | 49.0 | 34.4 | 63.7 |
| | FluWVV | 49 | 18 | 36.7 | 23.4 | 51.7 |
| A/Panama | FluAS03 | 48 | 27 | 56.3 | 41.2 | 70.5 |
| | Fluarix | 49 | 23 | 46.9 | 32.5 | 61.7 |
| | FluWVV | 49 | 21 | 42.9 | 28.8 | 57.8 |
| B/shangdong | FluAS03 | 48 | 26 | 54.2 | 39.2 | 68.6 |
| | Fluarix | 49 | 23 | 46.9 | 32.5 | 61.7 |
| | FluWVV | 49 | 16 | 32.7 | 19.9 | 47.5 |

FluAS03:AS03 アジュバント(D621024A8)と混合した Flu ワクチン(DFLU58A16)、Fluarix:Flu ワクチン(18854B9)、FluWVV:Flu WVV ワクチン(DFLU59A2)

N=ワクチン接種の前と後の両方で利用可能な結果を示す被験者の数、n=応答者の数

% = 応答者の割合(n/N×100).

95%CI=正確な95%信頼区間;LL=下限、UL=上限

【0381】

主な知見は、下記の通りである。

【0382】

・より高い値のGMTおよびセロコンバーション率が、ノイラミニダーゼの場合よりも赤血球凝集素の場合に観察された。

10

20

30

40

50

【0383】

・すべてのワクチン株に関する抗体の、ワクチン接種前のGMTは、3つの群において同じ範囲内にあった。ワクチン接種後、抗ノイラミニダーゼ抗体レベルが著しく増加した。ワクチン接種後のHI抗体力値については、FluAS03群およびFluarix群における3種のワクチン株すべてに関してHI抗体のGMTがより高くなる傾向があったが、Fluarix群とFluWVV群との間には、95%CIにいくらか重複があった。

【0384】

・セロコンバージョン率に関し、3種の株に関する全体的な応答速度は、3つの群において、かつ3種の株に関して本質的に等しかった。

【0385】

本発明者らの結果は、インフルエンザに対してこの試験でワクチン接種を受けた健康な高齢者が、どのようなインフルエンザワクチンであっても、ノイラミニダーゼ抗原に対して良好な抗体応答を誘発することを示している。しかし、ノイラミニダーゼ抗原に対する応答は、赤血球凝集素抗原に対する応答よりも弱い。

10

【0386】

III.5.2. 細胞免疫応答

末梢血抗原特異的CD4およびCD8 T細胞は、これらに対応する抗原と共にインキュベートする場合、IL-2、CD40L、TNF-、およびIFN γ を生成するために、*in vitro*で再刺激を受けることができる。その結果、細胞内サイトカイン産生と同様に、細胞表現型の従来の免疫蛍光標識の後、フローサイトメトリーによって抗原特異的CD4およびCD8 T細胞を数え上げることができる。本発明の試験では、インフルエンザワクチン抗原ならびに特定のインフルエンザタンパク質由来のペプチドを、インフルエンザ特異的T細胞を再刺激する抗原として使用した。表13から18に、CD4およびCD8 T細胞の応答に関する結果を示す。

20

【表13】

表13 少なくとも2種の異なるサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4⁺T細胞の応答:CD40L/IL2/TNF- α /IFN- γ に関するPREおよびPOSTでの記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | 時点 | N | 平均 | SD | Min |
|--|------------------|---|------|----|---------|----------|---------|
| CD4 中の CD40L/IL2/IFN γ / TNF α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 0日目 | 44 | 33.50 | 139.026 | 1.00 |
| | | 1 | 21日目 | 45 | 58.40 | 132.664 | 1.00 |
| | | 2 | 0日目 | 42 | 92.10 | 368.790 | 1.00 |
| | | 2 | 21日目 | 44 | 88.36 | 272.528 | 1.00 |
| | | 3 | 0日目 | 45 | 80.13 | 284.316 | 1.00 |
| | | 3 | 21日目 | 47 | 91.40 | 382.967 | 1.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 0日目 | 47 | 1901.66 | 1596.203 | 102.00 |
| | | 1 | 21日目 | 48 | 6163.75 | 4265.900 | 773.00 |
| | | 2 | 0日目 | 45 | 2151.04 | 2622.594 | 265.00 |
| | | 2 | 21日目 | 49 | 4150.73 | 3712.469 | 328.00 |
| | | 3 | 0日目 | 48 | 1678.44 | 916.329 | 142.00 |
| | | 3 | 21日目 | 50 | 3374.60 | 1920.194 | 449.00 |
| | 全インフルエンザ | 1 | 0日目 | 48 | 3134.33 | 2568.369 | 507.00 |
| | | 1 | 21日目 | 47 | 9332.04 | 6875.403 | 1482.00 |
| | | 2 | 0日目 | 47 | 3050.85 | 2654.936 | 486.00 |
| | | 2 | 21日目 | 49 | 6760.31 | 6788.258 | 1852.00 |
| | | 3 | 0日目 | 48 | 2955.33 | 2019.233 | 473.00 |
| | | 3 | 21日目 | 50 | 5661.40 | 4530.321 | 635.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | 時点 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | クラスカル-ワリス検定 (P 値) |
|--|------------------|---|------|---------|---------|----------|----------|----------------------|
| CD4 中の CD40L/ IL2/ IFN γ /TNF α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 0日目 | 1.00 | 1.00 | 4.00 | 915.00 | 0.7631 |
| | | 1 | 21日目 | 1.00 | 1.00 | 56.00 | 733.00 | |
| | | 2 | 0日目 | 1.00 | 1.00 | 54.00 | 2393.00 | |
| | | 2 | 21日目 | 1.00 | 1.00 | 69.50 | 1740.00 | |
| | | 3 | 0日目 | 1.00 | 1.00 | 65.00 | 1908.00 | |
| | | 3 | 21日目 | 1.00 | 1.00 | 63.00 | 2615.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 0日目 | 957.00 | 1560.00 | 2408.00 | 9514.00 | 0.0002 |
| | | 1 | 21日目 | 3468.00 | 4908.00 | 7624.00 | 21324.00 | |
| | | 2 | 0日目 | 930.00 | 1381.00 | 2274.00 | 16289.00 | |
| | | 2 | 21日目 | 2247.00 | 3036.00 | 4744.00 | 21924.00 | |
| | | 3 | 0日目 | 1086.00 | 1502.00 | 2189.00 | 3899.00 | |
| | | 3 | 21日目 | 2312.00 | 3040.00 | 4437.00 | 10431.00 | |
| | 全インフルエンザ | 1 | 0日目 | 1730.00 | 2298.50 | 3876.00 | 15066.00 | 0.0040 |
| | | 1 | 21日目 | 4091.00 | 6523.00 | 14045.00 | 29251.00 | |
| | | 2 | 0日目 | 1190.00 | 2031.00 | 4161.00 | 11994.00 | |
| | | 2 | 21日目 | 3573.00 | 4621.00 | 7234.00 | 40173.00 | |
| | | 3 | 0日目 | 1421.50 | 2668.50 | 3411.50 | 10578.00 | |
| | | 3 | 21日目 | 2459.00 | 4315.00 | 7303.00 | 22053.00 | |

1群:FluAS03:AS03 アジュバントと混合したFluワクチンFluarix(商標)

2群:Fluarix:FluワクチンFluarix(商標)

3群:FluWVV:Flu WVVワクチン

SD=標準偏差;Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数;Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す被験者の数

P 値:21日目の3つの群の間で、位置の差を検定する(ウィルコクソン順位和検定)ための、クラスカル-ワリス検定(ノンパラメトリック法)

【0387】

10

20

30

40

【表14】

表14 少なくとも2種の異なるサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4 T細胞の応答:PREとPOSTとの差に関する記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | N | 平均 | SD | Min |
|--|------------------|---|----|---------|----------|----------|
| CD4 中の CD40L/IFN- γ / TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 9.57 | 159.363 | -860.00 |
| | | 2 | 42 | -40.98 | 386.998 | -2392.00 |
| | | 3 | 45 | -50.73 | 256.596 | -1664.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 47 | 4307.02 | 4468.828 | -8161.00 |
| | | 2 | 45 | 1982.93 | 3802.332 | -14318.0 |
| | | 3 | 48 | 1555.90 | 1596.216 | -526.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 47 | 6197.98 | 7220.765 | -11763.0 |
| | | 2 | 47 | 3791.34 | 5820.894 | -2128.00 |
| | | 3 | 48 | 2535.98 | 3966.345 | -4766.00 |
| CD8 中の CD40L/IFN- γ / TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 42 | -15.95 | 215.710 | -451.00 |
| | | 2 | 41 | 50.83 | 264.370 | -614.00 |
| | | 3 | 44 | -52.11 | 243.811 | -684.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 42 | 134.71 | 426.699 | -603.00 |
| | | 2 | 44 | -65.05 | 822.036 | -4938.00 |
| | | 3 | 45 | 2.49 | 330.700 | -1094.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 39 | 189.38 | 1394.153 | -2641.00 |
| | | 2 | 44 | -479.75 | 1790.094 | -9455.00 |
| | | 3 | 44 | -243.73 | 719.269 | -1892.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P 値 |
|--|------------------|---|----------|---------|----------|----------|---------|
| CD4 中の CD40L/IF N- γ /TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 0.00 | 0.00 | 37.50 | 430.00 | 0.0765 |
| | | 2 | -15.00 | 0.00 | 26.00 | 514.00 | |
| | | 3 | -37.00 | 0.00 | 0.00 | 212.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 1888.00 | 3396.00 | 6634.00 | 19555.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 699.00 | 1490.00 | 2573.00 | 15169.00 | |
| | | 3 | 466.00 | 1183.50 | 2186.50 | 7851.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 2170.00 | 4009.00 | 11681.00 | 25570.00 | 0.0003 |
| | | 2 | 1246.00 | 2382.00 | 3992.00 | 33801.00 | |
| | | 3 | 503.00 | 1382.50 | 3300.50 | 19337.00 | |
| CD8 中の CD40L/IF N- γ /TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | -106.00 | 0.00 | 81.00 | 655.00 | 0.0932 |
| | | 2 | -58.00 | 13.00 | 202.00 | 703.00 | |
| | | 3 | -160.50 | 0.00 | 53.00 | 567.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | -122.00 | 35.50 | 221.00 | 1387.00 | 0.2121 |
| | | 2 | -64.50 | 0.00 | 160.50 | 1252.00 | |
| | | 3 | -99.00 | 0.00 | 76.00 | 1060.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | -420.00 | 49.00 | 591.00 | 5045.00 | 0.0851 |
| | | 2 | -1016.00 | -263.50 | 180.00 | 3743.00 | |
| | | 3 | -651.00 | -86.50 | 180.00 | 1011.00 | |

【表15】

表15 少なくともCD40Lおよび別のサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4 T細胞の応答:PREとPOSTとの間での差に関する記述的統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | N | 平均 | SD | Min |
|--------------|------------------|---|----|---------|----------|----------|
| CD4 中の CD40L | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 10.09 | 153.007 | -815.00 |
| | | 2 | 42 | -29.40 | 316.983 | -1921.00 |
| | | 3 | 45 | -43.73 | 251.146 | -1629.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 46 | 4266.20 | 4470.807 | -8093.00 |
| | | 2 | 45 | 2026.42 | 3511.508 | -11482.0 |
| | | 3 | 47 | 1512.34 | 1576.133 | -494.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 47 | 6071.96 | 7118.132 | -11691.0 |
| | | 2 | 47 | 3764.64 | 5740.762 | -2114.00 |
| | | 3 | 48 | 2544.27 | 3959.879 | -4390.00 |
| CD8 中の CD40L | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | -19.41 | 81.675 | -370.00 |
| | | 2 | 41 | -3.98 | 100.998 | -399.00 |
| | | 3 | 45 | -5.56 | 64.666 | -181.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 43 | 39.53 | 190.122 | -438.00 |
| | | 2 | 44 | 27.61 | 91.173 | -155.00 |
| | | 3 | 45 | 30.18 | 191.326 | -291.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 41 | -91.24 | 617.077 | -1779.00 |
| | | 2 | 44 | -115.91 | 588.424 | -2583.00 |
| | | 3 | 45 | -150.89 | 367.300 | -1239.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P 値 |
|-----------------|------------------|---|---------|---------|----------|----------|---------|
| CD4 中の CD40L | ペプチド インフルエンザ | 1 | 0.00 | 0.00 | 36.50 | 428.00 | 0.1233 |
| | | 2 | -8.00 | 0.00 | 27.00 | 494.00 | |
| | | 3 | -35.00 | 0.00 | 3.00 | 230.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 1799.00 | 3156.50 | 6647.00 | 19480.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 783.00 | 1485.00 | 2546.00 | 15021.00 | |
| | | 3 | 469.00 | 1107.00 | 2035.00 | 7687.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 2109.00 | 4048.00 | 11472.00 | 25448.00 | 0.0004 |
| | | 2 | 1212.00 | 2509.00 | 3957.00 | 33428.00 | |
| | | 3 | 523.00 | 1392.00 | 3261.50 | 19478.00 | |
| CD8 中の CD40L | ペプチド インフルエンザ | 1 | -2.00 | 0.00 | 0.50 | 100.00 | 0.9721 |
| | | 2 | -28.00 | 0.00 | 24.00 | 231.00 | |
| | | 3 | -13.00 | 0.00 | 3.00 | 176.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | -35.00 | 0.00 | 140.00 | 608.00 | 0.6175 |
| | | 2 | -18.50 | 0.00 | 77.50 | 326.00 | |
| | | 3 | -9.00 | 0.00 | 28.00 | 1188.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | -142.00 | -8.00 | 175.00 | 2087.00 | 0.3178 |
| | | 2 | -195.50 | -34.50 | 150.00 | 1258.00 | |
| | | 3 | -270.00 | -103.00 | 88.00 | 588.00 | |

【表16】

表16 少なくともIFN γ および別のサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4 T細胞の応答:PREとPOSTの間の差に関する記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | N | N欠測 | 平均 | SD | Min |
|--------------------|------------------|---|----|-----|---------|----------|----------|
| CD4 中のIFN γ | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 5 | 7.50 | 64.539 | -171.00 |
| | | 2 | 42 | 7 | -30.67 | 277.984 | -1766.00 |
| | | 3 | 45 | 5 | -27.91 | 103.403 | -639.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 46 | 3 | 2712.87 | 2905.629 | -4394.00 |
| | | 2 | 45 | 4 | 1148.56 | 2526.536 | -10586.0 |
| | | 3 | 47 | 3 | 871.00 | 1016.251 | -764.00 |
| | 全インフルエンザ | 1 | 47 | 2 | 4240.09 | 4811.891 | -8272.00 |
| | | 2 | 47 | 2 | 2445.38 | 4030.694 | -3018.00 |
| | | 3 | 48 | 2 | 1535.48 | 2456.915 | -3670.00 |
| CD8 中のIFN γ | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 5 | 7.75 | 146.412 | -226.00 |
| | | 2 | 41 | 8 | 10.68 | 176.026 | -420.00 |
| | | 3 | 44 | 6 | -49.80 | 217.214 | -699.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 43 | 6 | 138.58 | 365.565 | -470.00 |
| | | 2 | 44 | 5 | -112.82 | 793.746 | -4919.00 |
| | | 3 | 44 | 6 | 29.91 | 238.157 | -708.00 |
| | 全インフルエンザ | 1 | 41 | 8 | 6.66 | 1642.577 | -5610.00 |
| | | 2 | 44 | 5 | -471.55 | 1792.348 | -9586.00 |
| | | 3 | 44 | 6 | -189.05 | 685.291 | -1879.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P 値 |
|--------------------|------------------|---|---------|---------|---------|----------|---------|
| CD4 中のIFN γ | ペプチド インフルエンザ | 1 | -9.50 | 0.00 | 7.50 | 265.00 | 0.1541 |
| | | 2 | -5.00 | 0.00 | 24.00 | 222.00 | |
| | | 3 | -20.00 | 0.00 | 0.00 | 51.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 1273.00 | 1644.00 | 4057.00 | 13296.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 405.00 | 931.00 | 1757.00 | 9426.00 | |
| | | 3 | 283.00 | 624.00 | 1114.00 | 5031.00 | |
| | 全インフルエンザ | 1 | 1610.00 | 2693.00 | 7437.00 | 17489.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 723.00 | 1487.00 | 2983.00 | 21594.00 | |
| | | 3 | 232.50 | 810.00 | 2218.50 | 11319.00 | |
| CD8 中のIFN γ | ペプチド インフルエンザ | 1 | -52.50 | 0.00 | 40.00 | 615.00 | 0.3322 |
| | | 2 | -1.00 | 0.00 | 72.00 | 610.00 | |
| | | 3 | -172.00 | 0.00 | 90.50 | 424.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | -46.00 | 42.00 | 294.00 | 1549.00 | 0.1257 |
| | | 2 | -62.00 | 0.00 | 74.00 | 1028.00 | |
| | | 3 | -59.50 | 26.50 | 123.00 | 643.00 | |
| | 全インフルエンザ | 1 | -385.00 | 131.00 | 450.00 | 5068.00 | 0.1179 |
| | | 2 | -955.50 | -221.00 | 177.00 | 3492.00 | |
| | | 3 | -476.50 | -36.50 | 198.00 | 1299.00 | |

【表17】

表17 少なくともIL2および別のサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4 T細胞の応答:PREとPOSTの間での差に関する記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | N | 平均 | SD | Min |
|------------|------------------|---|----|---------|----------|----------|
| CD4 中の IL2 | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 2.82 | 118.164 | -595.00 |
| | | 2 | 42 | 0.90 | 84.255 | -167.00 |
| | | 3 | 45 | -28.62 | 191.709 | -1222.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 46 | 3456.15 | 3853.960 | -7009.00 |
| | | 2 | 45 | 1738.29 | 2406.045 | -451.00 |
| | | 3 | 47 | 1210.02 | 1361.705 | -634.00 |
| | 全インフルエンザ | 1 | 47 | 4839.02 | 5978.277 | -9178.00 |
| | | 2 | 47 | 2891.00 | 4493.387 | -1370.00 |
| | | 3 | 48 | 2042.50 | 3123.912 | -3179.00 |
| CD8 中の IL2 | ペプチド インフルエンザ | 1 | 42 | -30.60 | 219.777 | -630.00 |
| | | 2 | 41 | 38.85 | 210.715 | -674.00 |
| | | 3 | 45 | -44.80 | 197.026 | -526.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 41 | 54.85 | 250.817 | -336.00 |
| | | 2 | 44 | -2.36 | 423.957 | -2272.00 |
| | | 3 | 45 | -26.07 | 244.870 | -1004.00 |
| | 全インフルエンザ | 1 | 39 | 56.21 | 406.262 | -704.00 |
| | | 2 | 44 | -151.02 | 822.384 | -4304.00 |
| | | 3 | 45 | -63.56 | 359.699 | -1036.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P 値 |
|---------------|------------------|---|---------|---------|---------|----------|---------|
| CD4 中の IL2 | ペプチド インフルエンザ | 1 | -1.50 | 0.00 | 31.50 | 324.00 | 0.0806 |
| | | 2 | -34.00 | 0.00 | 2.00 | 362.00 | |
| | | 3 | -19.00 | 0.00 | 0.00 | 253.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 1309.00 | 2598.50 | 5926.00 | 16988.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 453.00 | 1113.00 | 2049.00 | 12273.00 | |
| | | 3 | 331.00 | 806.00 | 1596.00 | 6474.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 1516.00 | 3341.00 | 8955.00 | 21032.00 | 0.0006 |
| | | 2 | 995.00 | 1942.00 | 3007.00 | 26358.00 | |
| | | 3 | 371.50 | 1083.50 | 2624.50 | 14057.00 | |
| CD8 中の IL2 | ペプチド インフルエンザ | 1 | -111.00 | 0.00 | 103.00 | 412.00 | 0.1684 |
| | | 2 | -41.00 | 0.00 | 138.00 | 542.00 | |
| | | 3 | -150.00 | -34.00 | 71.00 | 447.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | -76.00 | 26.00 | 133.00 | 803.00 | 0.2311 |
| | | 2 | -78.50 | 0.00 | 121.50 | 1064.00 | |
| | | 3 | -93.00 | -1.00 | 30.00 | 705.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | -167.00 | 63.00 | 261.00 | 1302.00 | 0.4586 |
| | | 2 | -444.50 | -4.00 | 199.00 | 1398.00 | |
| | | 3 | -198.00 | 9.00 | 131.00 | 838.00 | |

【表18】

表18 少なくともTNF α および別のサイトカインを産生する細胞内で発現された、抗原特異的CD4 T細胞の応答:PREとPOSTの間での差に関する記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 分泌 | 抗原 | 群 | N | 平均 | SD | Min |
|----------------------|------------------|---|----|---------|----------|----------|
| CD4 中の TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 44 | 9.48 | 92.992 | -466.00 |
| | | 2 | 42 | -47.71 | 367.624 | -2333.00 |
| | | 3 | 45 | -37.38 | 179.147 | -1169.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 46 | 2343.11 | 2596.177 | -4450.00 |
| | | 2 | 45 | 703.87 | 2973.241 | -14260.0 |
| | | 3 | 47 | 732.00 | 740.001 | -611.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 47 | 3103.74 | 4248.997 | -5146.00 |
| | | 2 | 47 | 1658.38 | 3639.959 | -1393.00 |
| | | 3 | 48 | 1010.15 | 1689.394 | -1482.00 |
| CD8 中の TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | 42 | 11.71 | 201.031 | -453.00 |
| | | 2 | 41 | 37.46 | 245.241 | -612.00 |
| | | 3 | 44 | -42.95 | 210.185 | -645.00 |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 41 | 138.54 | 362.601 | -329.00 |
| | | 2 | 44 | -70.27 | 790.309 | -4741.00 |
| | | 3 | 44 | -39.75 | 348.803 | -1044.00 |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 39 | 279.59 | 1048.352 | -1184.00 |
| | | 2 | 44 | -280.70 | 1562.095 | -9070.00 |
| | | 3 | 44 | -71.57 | 492.135 | -1574.00 |

| 分泌 | 抗原 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P 値 |
|-------------------------|------------------|---|---------|---------|---------|----------|---------|
| CD4 中の TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | -1.50 | 0.00 | 39.00 | 239.00 | 0.1836 |
| | | 2 | -4.00 | 0.00 | 12.00 | 277.00 | |
| | | 3 | -26.00 | 0.00 | 5.00 | 53.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | 862.00 | 1466.50 | 3931.00 | 9267.00 | <0.0001 |
| | | 2 | 251.00 | 698.00 | 1229.00 | 12275.00 | |
| | | 3 | 191.00 | 540.00 | 1010.00 | 3288.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | 868.00 | 1607.00 | 5266.00 | 17199.00 | 0.0008 |
| | | 2 | 367.00 | 871.00 | 1584.00 | 23540.00 | |
| | | 3 | 175.00 | 592.00 | 1385.50 | 8760.00 | |
| CD8 中の TNF- α | ペプチド インフルエンザ | 1 | -80.00 | 0.50 | 70.00 | 772.00 | 0.2759 |
| | | 2 | -81.00 | 0.00 | 155.00 | 791.00 | |
| | | 3 | -179.00 | 0.00 | 39.50 | 566.00 | |
| | スプリット インフルエンザ | 1 | -23.00 | 60.00 | 178.00 | 1468.00 | 0.0790 |
| | | 2 | -107.00 | 0.00 | 158.00 | 1286.00 | |
| | | 3 | -185.00 | 0.00 | 78.50 | 1021.00 | |
| | 全インフルエン ザ | 1 | -250.00 | 108.00 | 399.00 | 4601.00 | 0.1482 |
| | | 2 | -392.00 | -56.50 | 205.00 | 3258.00 | |
| | | 3 | -233.50 | -54.00 | 160.00 | 1543.00 | |

結果を、CD4またはCD8 T細胞部分集団内のサイトカイン陽性CD4またはCD8 T細胞の頻度としても表し、図4および図5に示した。

【0393】

同様の分析では、交差反応性CD4 T細胞応答を、ドリフト株 (A/H1N1/Beijing/262/95 (H1N1d)、A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d)、B/Yamanashi/166/98 (Bd)) またはシフト株 (A/Singapore/1/57 (H2N2)、A/Hongkong/1073/99 (H9N2)) から得たインフルエンザ抗原を使用して評価した。サイトカイン陽性CD4 T細胞の頻度として表された結果を、図6に示す。

【0394】

主な知見は、下記の通りである。

【0395】

・Fluarixまたは全ウイルスによるワクチン接種は、CD4 T細胞応答をわずかに高める。Flu AS03によるワクチン接種は強力なCD4 T細胞応答を引き起こし(図4)、これは統計的に有意なものである。スプリット抗原または全ウイルスによる *in vitro* 刺激の後に、同じ結論が下され、これはすべてのサイトカインについて調査されている(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、およびCD40L)。

10

【0396】

・ほとんどの個体は全インフルエンザ(flu)に対してCD8 T細胞応答を示すが、ワクチン接種は、試験がなされた群がどれであっても、CD8 T細胞応答に対して測定可能な影響を及ぼさない(すなわち、Pre=Post)(図5)。

20

【0397】

Fluarixのみによるワクチン接種は、低レベルの交差反応性CD4 T細胞応答を誘発する(図6)。FluAS03によるワクチン接種は、ドリフトインフルエンザ株に対して強力なCD4 T細胞応答を引き起こし、これは統計的に有意なものである(図6)。シフト株に対しては、わずかな応答が検出された。

20

【0398】

III.5.3. B細胞エリスポット記憶

III.5.3.1 目的

AS03アジュバント添加インフルエンザワクチンによって誘発されたCMI応答を、より良く特徴付けるために、インフルエンザワクチン株または抗ヒト免疫グロブリンを使用して *in vitro* で形質細胞へと分化するよう誘発されたB細胞エリスポット記憶応答を、抗インフルエンザまたはIgG分泌血漿を数え上げるために評価した。結果を、表19および表20に示し、かつ図7に示す。

30

【0399】

B細胞記憶エリスポット技法を使用して、インフルエンザ特異的記憶B細胞に対するワクチン接種の影響を評価するために、1回分用量のFluAS03ワクチンが接種された22名の最初の対象の部分集合と、1回分用量のFluarixワクチンが接種された21名の最初対象の部分集合を選択した。下記のエンドポイントを測定した。

30

・0日目および21日目:インフルエンザ特異的記憶B細胞を、すべての対象においてB細胞エリスポットにより測定した。結果は、抗体形成細胞100万個(10^6)当たりのインフルエンザ特異的抗体形成細胞の頻度として表した。

40

・ワクチン接種の後(21日目)と前(0日)の差も、抗体形成細胞100万個(10^6)当たりのインフルエンザ特異的抗体形成細胞の頻度として表した。

【0400】

III.5.3.2. 統計的方法

0日目および21日目の各ワクチン接種群毎の記述統計を、抗体形成細胞100万個(10^6)当たりのインフルエンザ特異的抗体形成細胞の頻度として表した。抗体形成細胞100万個(10^6)当たりのインフルエンザ特異的抗体形成細胞の頻度としての、21日目と0日目の間(Post-Pre)の個々の差の記述統計。

【0401】

ウィルコクソン検定を使用して、2つの群の間での差の位置を比較し、統計的p値を3種

50

の株(A/New Caledonia、A/Panama、およびB/Shangdong)のそれぞれについて計算した。

【0402】

III.5.3.3. 結果

Fluarix群に比べ、インフルエンザアジュバントAS03ワクチンが有利になる傾向がある。A/New Caledonia株では、Fluarixに比べてFluAS03が有利である統計的有意差(p 値=0.021)がある。A/Panama株とB/Shangdong株では、2つの群の間に統計的な差が観察されなかつた。

【表19】

表19 B細胞記憶:10⁶個のIgG産生プラズマ細胞内での抗原プラズマの頻度の、pre(0日目)およびpost(21日目)に関する記述統計と、post(21日目)の推測統計(被験者の部分集合)

| 株 | 群 | 時点 | N | 平均 | SD | Min |
|-----------------|---|------|----|----------|-----------|---------|
| A/New Caledonia | 1 | 0日目 | 22 | 9751.58 | 6630.335 | 0.00 |
| | 1 | 21日目 | 22 | 22001.65 | 11308.261 | 3981.90 |
| | 2 | 0日目 | 21 | 9193.61 | 4339.421 | 1300.81 |
| | 2 | 21日目 | 21 | 12263.08 | 7285.698 | 789.47 |
| A/Panama | 1 | 0日目 | 22 | 4329.17 | 2923.497 | 0.00 |
| | 1 | 21日目 | 22 | 18066.69 | 14604.842 | 714.29 |
| | 2 | 0日目 | 21 | 4860.41 | 3392.373 | 0.00 |
| | 2 | 21日目 | 21 | 13872.95 | 12052.163 | 0.00 |
| B/Shandong | 1 | 0日目 | 22 | 3722.80 | 2347.315 | 0.00 |
| | 1 | 21日目 | 22 | 15949.60 | 12385.965 | 0.00 |
| | 2 | 0日目 | 21 | 3030.39 | 2206.589 | 640.57 |
| | 2 | 21日目 | 21 | 9714.03 | 5656.805 | 0.00 |

| 株 | 群 | 時点 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P値 (wilcoxon 検定) |
|-----------------|---|------|----------|----------|----------|----------|----------------------|
| A/New Caledonia | 1 | 0日目 | 4117.65 | 9606.46 | 13430.66 | 25570.78 | 0.0056 |
| | 1 | 21日目 | 11052.63 | 20450.55 | 30234.74 | 40526.32 | |
| | 2 | 0日目 | 6363.64 | 9686.41 | 11698.11 | 19164.84 | |
| | 2 | 21日目 | 7741.05 | 9545.45 | 17069.60 | 32000.00 | |
| A/Panama | 1 | 0日目 | 2275.45 | 4003.02 | 5764.55 | 10842.49 | 0.1814 |
| | 1 | 21日目 | 9347.37 | 13176.41 | 21471.39 | 54789.92 | |
| | 2 | 0日目 | 2222.22 | 4545.45 | 7495.74 | 11698.11 | |
| | 2 | 21日目 | 6231.88 | 10147.06 | 20540.54 | 52188.84 | |
| B/Shandong | 1 | 0日目 | 2058.82 | 2956.78 | 5972.22 | 7832.17 | 0.1483 |
| | 1 | 21日目 | 6860.47 | 12796.90 | 22947.37 | 48947.37 | |
| | 2 | 0日目 | 1290.32 | 2113.82 | 4770.02 | 7783.25 | |
| | 2 | 21日目 | 6590.91 | 9009.01 | 12774.87 | 21201.72 | |

1群:FluワクチンFluarix(商標)+AS03水中油型エマルジョンアジュバント

2群:FluワクチンFluarix(商標)

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す被験者の数

P値:21日目の、2つの群の間の位置の差を検定するための(wilcoxon 検定)、
wilcoxon 検定(ノンパラメトリック法)

【0403】

10

20

30

【表20】

表20

B細胞記憶:10⁶個のIgG産生プラズマ細胞内での抗原特異的プラズマの頻度のPOST(21日目)とPRE(0日目)の間の差に関する記述および推測統計(被験者の部分集合)

| 株 | 群 | N | 平均 | SD | Min |
|-----------------|---|----|----------|-----------|----------|
| A/New Caledonia | 1 | 22 | 12250.07 | 12875.755 | -4365.08 |
| | 2 | 21 | 3069.46 | 7309.731 | -10043.4 |
| A/Panama | 1 | 22 | 13737.52 | 13677.942 | -188.29 |
| | 2 | 21 | 9012.54 | 11489.012 | -1551.05 |
| B/shandong | 1 | 22 | 12226.81 | 12243.895 | -2222.22 |
| | 2 | 21 | 6683.64 | 6240.312 | -2113.82 |

10

| 株 | 群 | Q1 | 中央値 | Q3 | Max | P値 (ウィルコクソン検定) |
|-----------------|---|----------|----------|----------|----------|-------------------|
| A/New Caledonia | 1 | 2418.07 | 6776.65 | 26036.01 | 35059.98 | 0.0210 |
| | 2 | -1762.54 | 1694.51 | 6850.19 | 18579.97 | |
| A/Panama | 1 | 4551.30 | 11039.04 | 16614.85 | 49881.94 | 0.1449 |
| | 2 | 1522.85 | 6480.96 | 9214.67 | 47812.47 | |
| B/shandong | 1 | 1788.75 | 9322.70 | 18907.05 | 42134.18 | 0.1895 |
| | 2 | 2117.44 | 5384.41 | 9897.27 | 19801.28 | |

20

1群:Flu ワクチン Fluarix(商標)+AS03 水中油型エマルジョンアジュバント

2群:Flu ワクチン Fluarix(商標)

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す被験者の数

30

P値:21日目で、2つの群の間の位置の差を検定するための(ウィルコクソン順位和検定)、
ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法)

【0404】

III.6. 全体的な結論

III.6.1. 反応原性および安全性の結果

インフルエンザ免疫は、肺炎およびこれに関連する死の危険性を著しく低下させるが、高齢者のワクチン接種は、インフルエンザ疾患に対して23~72%しか予防しない。強力なアジュバントを有するワクチン抗原の製剤が、サブユニット抗原に対する免疫応答を高めるのに魅力あるアプローチである。この研究は、(1)水中油型エマルジョン、すなわちAS03でアジュバント添加されたインフルエンザワクチンの、健康な高齢者における安全性および反応原性と、(2)抗体および細胞媒介性免疫応答を評価するように設計された。反応原性のデータは、AS03がアジュバント添加されたインフルエンザワクチンが、他の2種のワクチンよりも多くの局所および全身症状を誘発することを示している。しかし、求められない有害事象に関しては、これら3種のワクチンの間で差が観察されなかった。これらの結果から、候補ワクチンの反応原性および安全性のプロファイルが満足のいくものであり、臨床上許容されると結論付けることができる。

40

【0405】

III.6.2. 免疫原性の結果

免疫応答に関し、3種のワクチンは、スプリットビリオンインフルエンザワクチンの毎年の登録に関する欧州当局の要件("Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Vaccines against Influenza" 2007/45/EC)に準拠する。

50

ts for influenza Vaccines" for the immunological assessment of the annual strain changes-CPMP/BWP/214/96)を上回っていた。この研究で試験がなされた3種のインフルエンザワクチンは、健康な高齢者において免疫原性であり、インフルエンザ赤血球凝集素および中和抗原に対して良好な抗体応答を示した(表21)。

【表21】

表21

| 変数 | 抗体応答に関するEU規格 | 結果 |
|------------|--------------|------|
| コンバージョン係数 | >2.0 | >6.1 |
| セロコンバージョン率 | >30% | >50% |
| 保護率 | >60% | >88% |

10

【0406】

細胞媒介性免疫(CMI)応答に関し、AS03でアジュバント添加されたインフルエンザワクチンは、他の2種のワクチン(Fluarixおよび全インフルエンザウイルスワクチン)よりも著しく強力なCD4応答を引き起こした(ドリフト株を含む)。しかしワクチン接種は、CD8応答に対して測定可能な影響を及ぼさない。

【0407】

B細胞記憶応答に関しては、アジュバント無添加ワクチンに比べてインフルエンザアジュバントワクチンが有利である傾向がある。

20

【0408】

実施例IV

スプリットインフルエンザ抗原調製物およびAS03アジュバントを含有するワクチンを用いた、65歳以上の高齢者集団での臨床試験-Explo-Flu-002

65歳以上でありかつExplo-Flu-001臨床試験の候補ワクチンが2003年に事前にワクチン接種された高齢者集団において、アジュバントAS03を含有するGlaxoSmithKline Biologicalsインフルエンザ候補ワクチンの反応原性および免疫原性を評価するために、第I/II相オーブン対照試験を実施した。免疫原性および安全性の評価では、Fluarix(商標)(ベルギーでは-rix(商標)としても知られている)を参照として使用した。

30

【0409】

IV.1. 目的

液性免疫応答(すなわち、抗赤血球凝集素抗体力値)、および細胞媒介性免疫応答(CD4および/またはCD8 T細胞)、およびB記憶細胞応答を、1回分量のAS03アジュバントワクチンを筋肉内投与してから21日目に測定した。Fluarix(商標)を参照として使用した。

【0410】

目的は、下記の通りであった。

1)Fluarix(18名の対象)に対してAS03アジュバントFlu(40名の対象)では、インフルエンザ抗原をワクチン接種した個人のCD4および/またはCD8媒介性免疫に関して、その最強の免疫刺激活性が確認されるか否かを決定すること。

2)2004年に事前にワクチン接種されたときの免疫応答(したがって、2003年の最初のワクチン接種から1年後の応答)に対するAS03アジュバントの影響を、長期的分析を使用して調査すること。

40

【0411】

IV.2. 研究設計、ワクチン組成、およびエンドポイント

・2003年のExplo-Flu-001臨床試験中に、1回分用量のAS03アジュバント添加インフルエンザワクチンが事前に投与された、65歳を超える40名の対象(FluAS03)。

・2003年のExplo-Flu-001臨床試験中に、1回分用量のFluarix(商標)が事前に投与された、65歳を超える約20名の対象の1つの対照群

【0412】

IV.2.1. ワクチン組成

50

ワクチン組成は、ワクチンに含まれるインフルエンザ株以外(2004年のワクチン)、Explo-Flu-001の研究で使用されたものと類似している。株は、下記の通りである。

- ・A/New Caledonia/20/99(IVR-116)(H1N1)=A/New Caledonia/(H1N1)-様の株
- ・A/Wyoming/3/2003(X-147)(H3N2)=A/Fujian(H3N2)-様の株
- ・B/Jiangsu/10/2003=B/Shanghai-様の株

【0413】

IV.2.2. 免疫原性(HI)エンドポイント

- ・GMT(log力値変換の平均のlogをとる)
- ・コンバージョン係数(0日目と比べた21日目の、HI GMTにおける倍数増加)
- ・セロコンバージョン率(各ワクチン株毎に、0日目と比べた21日目の、HI力値の少なくとも4倍増加を示す被ワクチン接種者のパーセンテージ)
- ・保護率(21日目で、血清HIが1:40以上である、被ワクチン接種者のパーセンテージ)

【0414】

IV.2.3. CMI-エンドポイント

観察した変数:

0日目および21日目:4種の異なるサイトカインへの、 10^6 個当たりのサイトカイン陽性CD4/CD8細胞の頻度。各試験は、

- ・3種の下記の抗原のプール
- ・New Caledonia抗原
- ・Wyoming抗原
- ・Jiangsu抗原

に対するCD4/CD8 T細胞の応答を定量する。

【0415】

導き出された変数:

抗原特異的CD4およびCD8 T細胞応答は、下記の5つの異なる試験(サイトカイン)で生じた。

1. 少なくとも2種の異なるサイトカイン(CD40L、IL-2、IFN 、TNF)を産生する細胞
2. 少なくともCD40Lおよび別のサイトカイン(IL-2、TNF 、IFN)を産生する細胞
3. 少なくともIL-2および別のサイトカイン(CD40L、TNF 、IFN)を産生する細胞
4. 少なくともIFN および別のサイトカイン(IL-2、TNF 、CD40L)を産生する細胞
5. 少なくともTNF および別のサイトカイン(IL-2、CD40L、INF)を産生する細胞

【0416】

IV.2.4. CMI分析

最初のCMI分析は、全ワクチンコホート(FluAS03群についてはN=40の対象、Fluarix群についてはN=18の対象)を基にした。

【0417】

長期分析は、Explo-Flu-001(スプリットタンパク質)およびExplo-Flu-002(プールFlu抗原)の動的コホートの研究を基にした。

【0418】

(a)応答して分泌されるCD4/CD8 Tリンパ球の頻度は、各抗原毎、各サイトカイン毎、各ワクチン群毎、および各時点毎に(ワクチン接種の前後)、記述統計によってまとめた。

【0419】

(b)時点(Post-Pre)間の応答の個々の相違における記述統計は、各抗原毎、各サイトカイン毎、および各ワクチン群毎に表にした。

【0420】

(c)ワクチン接種の後および(post-pre)での時点では、ノンパラメトリックウィルコクソン検定を使用して、2つのワクチン群の間での位置の差を比較し、下記の事項について、4種の異なるサイトカインに関する統計的p値を計算した。

10

20

30

40

50

-New Caledonia、Wyoming、Jiangsu、およびこれら3種の株のプールに対するCD4 T細胞応答。

-New Caledonia、Wyoming、Jiangsu、およびこれら3種の株のプールに対するCD8 T細胞応答。

【0421】

(d) ノンパラメトリック検定(ウィルコクソン検定)も、下記の目的で使用した。

【0422】

-各ワクチン群において、Explo-Flu-001とExplo-Flu-002との間での特定のCD4の頻度に関し、Pre(0日)での免疫応答の動態を調査するため。

-Explo-Flu-001とExplo-Flu-002の研究のそれぞれにおいて、2つのワクチン群の間の特定のCD4の頻度に関し、Pre(0日)での免疫応答の動態を調査するため。 10

-各ワクチン群において、Explo-Flu-001とExplo-Flu-002との間での特定のCD4の頻度の差(Post-Pre)に関し、免疫応答の動態を調査するため。

-Explo-Flu-001とExplo-Flu-002の研究のそれぞれにおいて、2つのワクチン群の間の特定のCD4の頻度の差(Post-Pre)に関し、免疫応答の動態を調査するため。

【0423】

すべての有意検定を、2回追跡した。0.05以下のP値は、統計的に有意と見なした。

【0424】

IV.3. 結果

結果は、CD4またはCD8 T細胞部分集団内の、サイトカイン陽性CD4またはCD8 T細胞の頻度として表した。 20

【0425】

IV.3.1. 抗原特異的CD4 Tリンパ球

応答して分泌される抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度を、各抗原毎に、各サイトカイン毎に、各ワクチン群毎に、各時点毎に(ワクチン接種の前後)、記述統計によってまとめた。

【0426】

5種の異なるサイトカインそれぞれでの各抗原毎、および各ワクチン群毎との、CD4 Tリンパ球応答における時点間(Post-Pre)での個人差の記述統計を、表22に示す。

【表22】

表22 抗原特異的CD4 Tリンパ球応答に関する、ワクチン接種後(21日目)とワクチン接種前(0日目)との差に関する記述統計(全ワクチン接種コホート)

| 抗原 | サイト カイン | ワクチン 群 | N | 平均 | SD | Min | Q1 | 中央値 | Q3 | Max |
|--------------------|--------------|-----------|----|---------|----------|----------|--------|---------|---------|---------|
| B/Flu | オール ダブル | Fluarix | 18 | 1268.67 | 1051.744 | 197.00 | 724.00 | 863.00 | 1561.00 | 4676.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 1781.31 | 1484.860 | -2379.00 | 929.50 | 1664.50 | 2821.00 | 4669.00 |
| | CD40L | Fluarix | 18 | 1260.11 | 1054.487 | 243.00 | 721.00 | 849.00 | 1602.00 | 4743.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 1711.56 | 1433.113 | -2359.00 | 838.00 | 1576.00 | 2759.50 | 4575.00 |
| | IFN γ | Fluarix | 18 | 762.94 | 813.884 | -12.00 | 294.00 | 496.00 | 1061.00 | 3564.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 1179.92 | 881.255 | -817.00 | 692.50 | 1180.50 | 1865.50 | 2831.00 |
| A/New Caledonia | オール ダブル | Fluarix | 18 | 1019.06 | 917.905 | -258.00 | 544.00 | 702.00 | 1174.00 | 3850.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 1423.33 | 1359.471 | -2702.00 | 651.00 | 1260.00 | 2200.50 | 4342.00 |
| | TNF α | Fluarix | 18 | 803.39 | 915.838 | 32.00 | 231.00 | 533.00 | 936.00 | 3892.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 1078.28 | 1029.122 | -1816.00 | 446.00 | 983.00 | 1836.00 | 3310.00 |
| | CD40L | Fluarix | 18 | 481.44 | 381.534 | -241.00 | 282.00 | 448.50 | 598.00 | 1412.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 812.78 | 749.192 | -828.00 | 215.50 | 911.50 | 1274.50 | 3206.00 |
| A/Wyoming | IFN γ | Fluarix | 18 | 316.28 | 279.662 | -165.00 | 175.00 | 259.00 | 387.00 | 1111.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 438.22 | 420.770 | -685.00 | 125.00 | 393.00 | 733.50 | 1557.00 |
| | IL2 | Fluarix | 18 | 326.06 | 290.792 | -294.00 | 193.00 | 330.00 | 488.00 | 834.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 634.72 | 616.478 | -557.00 | 179.50 | 678.50 | 952.00 | 2602.00 |
| | TNF α | Fluarix | 18 | 316.44 | 372.492 | -140.00 | 50.00 | 278.00 | 542.00 | 1449.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 449.17 | 591.796 | -916.00 | 100.50 | 343.50 | 848.00 | 2452.00 |
| B/Jiangsu | オール ダブル | Fluarix | 18 | 609.56 | 559.396 | -176.00 | 257.00 | 510.50 | 957.00 | 1998.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 766.61 | 579.191 | -568.00 | 316.00 | 864.50 | 1221.00 | 1662.00 |
| | CD40L | Fluarix | 18 | 616.33 | 550.853 | -176.00 | 274.00 | 488.00 | 939.00 | 2017.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 728.61 | 570.316 | -670.00 | 260.00 | 789.50 | 1216.00 | 1675.00 |
| | IFN γ | Fluarix | 18 | 407.06 | 424.758 | -311.00 | 129.00 | 370.50 | 723.00 | 1372.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 526.72 | 443.938 | -770.00 | 219.00 | 556.50 | 776.00 | 1342.00 |
| | IL2 | Fluarix | 18 | 495.83 | 503.805 | -187.00 | 88.00 | 540.50 | 801.00 | 1841.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 572.89 | 533.728 | -789.00 | 220.00 | 602.00 | 882.50 | 1512.00 |
| | TNF α | Fluarix | 18 | 424.56 | 485.591 | -260.00 | 110.00 | 359.50 | 461.00 | 1718.00 |
| | | Flu AS03 | 36 | 550.58 | 538.461 | -765.00 | 269.50 | 543.50 | 905.50 | 1678.00 |

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す、試験がなされた被験者の数

【0427】

ワクチン誘発性CD4 T細胞は、前年にFluarix/AS03がワクチン接種された個体に比べてFluarixがワクチン接種された個体の間で、CD4 T細胞応答のワクチン接種前レベルに観察可能な差があることから、少なくとも1年間生存できることが示されている。結果を図8にも示すが、ワクチン再接種前後のスプリットFlu抗原に対するCD4 T細胞応答が示されている。D0は、最初の年のワクチン接種から12カ月後に相当し、したがって生存することが示されている。

【0428】

10

20

30

40

50

ワクチン接種後のウィルコクソン検定により、2つの群の間の抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、ほぼすべてのp値が0.05未満であり、F1uAS03群の方が統計的に有意であると見なされた(表23参照)。

【表23】

表23 推測統計:抗原特異的 CD4 T リンパ球応答に関し、21日目に2つのワクチン群の間でウィルコクソン順位和検定から得たp値(全ワクチン接種コホート)

| サイトカイン | P値 | | | |
|--------------|--------|---------------|---------|---------|
| | プール | New Caledonia | Wyoming | Jiangsu |
| オールダブル | 0.0014 | 0.0023 | 0.0286 | 0.0133 |
| CD40L | 0.0016 | 0.0014 | 0.0427 | 0.0155 |
| INF γ | 0.0006 | 0.0366 | 0.0400 | 0.0041 |
| IL2 | 0.0037 | 0.0024 | 0.0584 | 0.0162 |
| TNF α | 0.0031 | 0.0103 | 0.0918 | 0.0114 |

P値:21日目に2つの群の間の位置の差を検定するための(ウィルコクソン順位和検定)ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法)。

【0429】

ウィルコクソン検定により、2つの群の間の抗原特異的CD4 Tリンパ球応答の頻度の個体差(Post-Pre)の違いを比較すると、0.05未満でありかつ統計的に有意と見なされるp値が、下記の抗原-サイトカインの組み合わせて生じた:プールf1u-オールダブル、プールf1u-IFN、およびJiangsu-IFN、F1uAS03群が有利である(表24)。

【表24】

表24 推測統計:抗原特異的 CD4 T リンパ球応答についてのワクチン接種後(21日目)とワクチン接種前(0日目)との差に関し、異なる群の間でウィルコクソン順位和検定によって計算されたp値(全ワクチン接種コホート)

| サイトカイン | P値 | | | |
|--------------|--------|---------------|---------|---------|
| | プール | New Caledonia | Wyoming | Jiangsu |
| オールダブル | 0.0435 | 0.1124 | 0.2189 | 0.3085 |
| CD40L | 0.0638 | 0.0781 | 0.2831 | 0.2872 |
| INF γ | 0.0290 | 0.3589 | 0.2553 | 0.0435 |
| IL2 | 0.1024 | 0.0563 | 0.3986 | 0.0435 |
| TNF α | 0.0693 | 0.4090 | 0.1232 | 0.3129 |

P値:2つの群の間での位置の差を検定するための(ウィルコクソン順位和検定)ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法)。

【0430】

IV.3.2. 抗原特異的CD8 Tリンパ球

CD4 T細胞応答に関して述べた手順と同様に、応答して分泌される抗原特異的CD8 Tリンパ球の頻度を、各抗原毎に、各サイトカイン毎に、各ワクチン群毎に、各時点毎に(ワクチン接種前後)、記述統計によってまとめた。

【0431】

ワクチン接種後に、ウィルコクソン検定によって、2つの群の間での抗原特異的CD8 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、すべてのp値は0.05よりも高く、統計的に有意とは見なされなかった。ウィルコクソン検定によって、2つの群の間での抗原特異的CD8 Tリンパ球応答の頻度の個体差(Post-Pre)の違いを比較すると、すべてのp値は0.05よりも高く、統計的に有意とは見なされなかった。

【0432】

IV.3.3. 動的分析:ワクチン接種前の免疫応答(2003年の最初のワクチン接種から1年後)

ワクチン接種後に応答して分泌される抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度を、各サイトカ

10

20

30

40

50

イン毎、および各ワクチン群毎に、これら2つの調査のそれぞれについて表25に、またこれら2つの調査のそれぞれと各ワクチン群毎に表27に、記述統計によってまとめた。推測統計を、表26および表28に示す。

【表25】

表25 特異的CD4 Tリンパ球応答ワクチン接種に関する、ワクチン接種前(0日目)についての記述統計(動的)

| サイト カイン | 群 | 調査 | N | 平均 | SD | Min | Q1 | 中央値 | Q3 | Max |
|--------------|-------------|--------------|--------------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|
| オール ダブル | Flu AS03 | EXPLO 001 | 36 | 2000.86 | 1783.474 | 102.00 | 911.50 | 1461.50 | 2791.00 | 9514.00 |
| | | EXPLO 002 | 36 | 2028.28 | 1427.000 | 55.00 | 1190.50 | 1647.50 | 2575.00 | 7214.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 2152.87 | 2162.463 | 747.00 | 930.00 | 1354.00 | 2101.00 | 7868.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1587.07 | 2123.841 | 192.00 | 468.00 | 735.00 | 1578.00 | 8536.00 |
| | CD40L | Flu AS03 | EXPLO 001 | 35 | 1946.66 | 1771.102 | 120.00 | 837.00 | 1340.00 | 2819.00 |
| | | EXPLO 002 | 35 | 1992.20 | 1440.721 | 77.00 | 1125.00 | 1590.00 | 2587.00 | 7286.00 |
| | | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 2094.93 | 2076.632 | 745.00 | 902.00 | 1340.00 | 2077.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1561.73 | 2097.201 | 34.00 | 475.00 | 672.00 | 1579.00 | 8428.00 |
| INF γ | Flu AS03 | EXPLO 001 | 35 | 1068.63 | 1030.745 | 91.00 | 448.00 | 790.00 | 1503.00 | 5425.00 |
| | | EXPLO 002 | 35 | 1259.23 | 890.590 | 312.00 | 725.00 | 984.00 | 1354.00 | 4146.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 1248.07 | 1452.459 | 320.00 | 388.00 | 778.00 | 1227.00 | 5431.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 974.80 | 1394.044 | 52.00 | 252.00 | 337.00 | 1057.00 | 5576.00 |
| IL2 | Flu AS03 | EXPLO 001 | 35 | 1690.20 | 1524.689 | 37.00 | 688.00 | 1211.00 | 2416.00 | 8235.00 |
| | | EXPLO 002 | 35 | 1883.60 | 1361.337 | 14.00 | 1068.00 | 1413.00 | 2370.00 | 6891.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 1888.40 | 2085.857 | 568.00 | 715.00 | 1136.00 | 1770.00 | 7403.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1493.93 | 2037.139 | 58.00 | 444.00 | 755.00 | 1485.00 | 8193.00 |
| TNF α | Flu AS03 | EXPLO 001 | 35 | 1174.74 | 1119.633 | 55.00 | 466.00 | 795.00 | 1720.00 | 5415.00 |
| | | EXPLO 002 | 35 | 1545.40 | 1159.490 | 135.00 | 831.00 | 1203.00 | 1857.00 | 5354.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 1444.20 | 1946.211 | 201.00 | 520.00 | 688.00 | 1254.00 | 7213.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1304.73 | 1759.716 | 144.00 | 316.00 | 824.00 | 1171.00 | 7056.00 |

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す、試験がなされた被験者の数

各ワクチン群毎のウィルコクソン検定によって、2つの調査の間での抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、0.05未満でありかつ統計的に有意と見なされるp値が(Ex plo-Flu-002が好ましい)、FluAS03群のみで、TNF サイトカインに関して生じた(表26参照)。

【表26】

表26 推測統計:抗原特異的CD4 Tリンパ球応答に関する、0日目の異なる調査の間での、
ウィルコクソン順位和検定から得られたp値(動的)

| サイトカイン | 群 | P値 |
|--------------|---------|--------|
| オールダブル | FluAS03 | 0.5209 |
| | Fluarix | 0.0712 |
| CD40L | FluAS03 | 0.4957 |
| | Fluarix | 0.0744 |
| INF γ | FluAS03 | 0.0896 |
| | Fluarix | 0.1103 |
| IL2 | FluAS03 | 0.1903 |
| | Fluarix | 0.1647 |
| TNF α | FluAS03 | 0.0427 |
| | Fluarix | 0.5476 |

P値:21日目の、2つの群の間での位置の差を検定するための(ウィルコクソン順位和検定)、
、ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法)。

【0 4 3 4】

10

20

【表27】

表27 特異的CD4 Tリンパ球応答ワクチン接種に関する、ワクチン接種前(0日目)の記述統計(動的)

| サイト カイン | 調査 | 群 | N | 平均 | SD | Min | Q1 | 中央値 | Q3 | Max |
|--------------|--------------|-------------|----|---------|----------|--------|---------|---------|---------|---------|
| オール ダブル | EXPLO 001 | Flu AS03 | 36 | 2000.86 | 1783.474 | 102.00 | 911.50 | 1461.50 | 2791.00 | 9514.00 |
| | | Fluarix | 15 | 2152.87 | 2162.463 | 747.00 | 930.00 | 1354.00 | 2101.00 | 7868.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 36 | 2028.28 | 1427.000 | 55.00 | 1190.50 | 1647.50 | 2575.00 | 7214.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1587.07 | 2123.841 | 192.00 | 468.00 | 735.00 | 1578.00 | 8536.00 |
| CD40L | EXPLO 001 | Flu AS03 | 35 | 1946.66 | 1771.102 | 120.00 | 837.00 | 1340.00 | 2819.00 | 9462.00 |
| | | Fluarix | 15 | 2094.93 | 2076.632 | 745.00 | 902.00 | 1340.00 | 2077.00 | 7385.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 35 | 1992.20 | 1440.721 | 77.00 | 1125.00 | 1590.00 | 2587.00 | 7286.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1561.73 | 2097.201 | 34.00 | 475.00 | 672.00 | 1579.00 | 8428.00 |
| INF γ | EXPLO 001 | Flu AS03 | 35 | 1068.63 | 1030.745 | 91.00 | 448.00 | 790.00 | 1503.00 | 5425.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1248.07 | 1452.459 | 320.00 | 388.00 | 778.00 | 1227.00 | 5431.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 35 | 1259.23 | 890.590 | 312.00 | 725.00 | 984.00 | 1354.00 | 4146.00 |
| | | Fluarix | 15 | 974.80 | 1394.044 | 52.00 | 252.00 | 337.00 | 1057.00 | 5576.00 |
| IL2 | EXPLO 001 | Flu AS03 | 35 | 1690.20 | 1524.689 | 37.00 | 688.00 | 1211.00 | 2416.00 | 8235.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1888.40 | 2085.857 | 568.00 | 715.00 | 1136.00 | 1770.00 | 7403.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 35 | 1883.60 | 1361.337 | 14.00 | 1068.00 | 1413.00 | 2370.00 | 6891.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1493.93 | 2037.139 | 58.00 | 444.00 | 755.00 | 1485.00 | 8193.00 |
| TNF α | EXPLO 001 | Flu AS03 | 35 | 1174.74 | 1119.633 | 55.00 | 466.00 | 795.00 | 1720.00 | 5415.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1444.20 | 1946.211 | 201.00 | 520.00 | 688.00 | 1254.00 | 7213.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 35 | 1545.40 | 1159.490 | 135.00 | 831.00 | 1203.00 | 1857.00 | 5354.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1304.73 | 1759.716 | 144.00 | 316.00 | 824.00 | 1171.00 | 7056.00 |

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す、試験がなされた被験者の数

【0435】

各調査毎のウィルコクソン検定によって、2つのワクチン群の間での抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、Explo-Flu-002に関するすべてのp値は0.05未満であり、統計的に有意と見なされた(FluAS03が好ましい)(表28参照)。

10

20

30

40

【表28】

表28 推測統計:抗原特異的 CD4 T リンパ球応答に関する、21日目での異なる群の間の
ウィルコクソン順位和検定から得られた p 値(動的)

| サイトカイン | 調査 | p 値 |
|--------------|---------------|--------|
| オールダブル | Explo Flu 001 | 0.9423 |
| | Explo Flu 002 | 0.0300 |
| CD40L | Explo Flu 001 | 0.8989 |
| | Explo Flu 002 | 0.0361 |
| INF γ | Explo Flu 001 | 0.8738 |
| | Explo Flu 002 | 0.0121 |
| IL2 | Explo Flu 001 | 0.9747 |
| | Explo Flu 002 | 0.0216 |
| TNF α | Explo Flu 001 | 0.9916 |
| | Explo Flu 002 | 0.0514 |

P値:21日目の2つの群の間での、位置の差を検定する(ウィルコクソン順位和検定)ための
、ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法)。

【0436】

IV.3.4. 動的分析:ワクチン接種後からワクチン接種前を差し引いたときの免疫応答

(post-pre)時点で応答して分泌される抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度を、各サイトカイン毎、および各ワクチン群毎に、それぞれの調査に関しては表29に、また各調査毎および各ワクチン群毎に表31に、記述統計によってまとめた。推測統計を、表30および表32に示す。

【表29】

表29 特異的CD4 Tリンパ球応答ワクチン接種に関する、ワクチン接種後(21日目)とワクチン接種前(0日目)との差についての記述統計(動的)

| サイト カイン | 群 | 調査 | N | 平均 | SD | Min | Q1 | 中央値 | Q3 | Max |
|--------------|-------------|--------------|----|---------|----------|----------|---------|---------|---------|----------|
| オール ダブル | Flu AS03 | EXPLO 001 | 34 | 4837.56 | 4476.129 | -609.00 | 1888.00 | 3483.50 | 8148.00 | 19555.00 |
| | | EXPLO 002 | 34 | 1737.79 | 1450.177 | -2379.00 | 936.00 | 1664.50 | 2743.00 | 4669.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 3103.53 | 3726.645 | 436.00 | 800.00 | 2283.00 | 3226.00 | 15169.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1369.00 | 1127.784 | 197.00 | 725.00 | 869.00 | 1808.00 | 4676.00 |
| CD40L | Flu AS03 | EXPLO 001 | 33 | 4819.06 | 4489.788 | -718.00 | 1799.00 | 3479.00 | 8288.00 | 19480.00 |
| | | EXPLO 002 | 33 | 1694.73 | 1431.082 | -2359.00 | 921.00 | 1659.00 | 2662.00 | 4575.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 3090.00 | 3684.759 | 477.00 | 822.00 | 2189.00 | 3208.00 | 15021.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1360.93 | 1131.051 | 243.00 | 725.00 | 860.00 | 1687.00 | 4743.00 |
| IFNy | Flu AS03 | EXPLO 001 | 33 | 3127.09 | 2974.067 | -453.00 | 1325.00 | 1721.00 | 5162.00 | 13296.00 |
| | | EXPLO 002 | 33 | 1167.85 | 893.363 | -817.00 | 633.00 | 1207.00 | 1803.00 | 2831.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 1660.13 | 1834.023 | -84.00 | 480.00 | 1386.00 | 2284.00 | 7120.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 851.87 | 859.585 | 148.00 | 294.00 | 501.00 | 1222.00 | 3564.00 |
| IL2 | Flu AS03 | EXPLO 001 | 33 | 3950.18 | 3878.538 | -358.00 | 1309.00 | 2780.00 | 6635.00 | 16988.00 |
| | | EXPLO 002 | 33 | 1404.67 | 1355.665 | -2702.00 | 719.00 | 1341.00 | 2109.00 | 4342.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 2413.87 | 3027.392 | 263.00 | 674.00 | 1672.00 | 2425.00 | 12273.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 1117.80 | 975.934 | -258.00 | 575.00 | 714.00 | 1618.00 | 3850.00 |
| TNF α | Flu AS03 | EXPLO 001 | 33 | 2627.36 | 2574.458 | -825.00 | 862.00 | 1475.00 | 4764.00 | 9267.00 |
| | | EXPLO 002 | 33 | 1072.36 | 1044.140 | -1816.00 | 447.00 | 1000.00 | 1752.00 | 3310.00 |
| | Fluarix | EXPLO 001 | 15 | 1460.53 | 3115.174 | -1586.00 | 251.00 | 813.00 | 1314.00 | 12275.00 |
| | | EXPLO 002 | 15 | 904.67 | 974.958 | 32.00 | 338.00 | 752.00 | 965.00 | 3892.00 |

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す、試験がなされた被験者の数

10

20

30

【0437】

各ワクチン群毎のウィルコクソン検定によって、2つの調査の間での抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、FluAS03群に関するすべてのp値が0.05未満であり、統計的に有意であると見なされた(Explo-Flu-001が好ましい)(表30参照)。

【表30】

表30 ワクチン接種後(21日目)とワクチン接種前(0日目)との差についての推測統計:抗原特異的 CD4 T リンパ球応答に関する 21日目の差の調査の間での、ウィルコクソン順位和検定から得られたp値(動的)

| サイトカイン | 群 | p値 |
|--------------|---------|--------|
| オールダブル | FluAS03 | 0.0005 |
| | Fluarix | 0.1300 |
| CD40L | FluAS03 | 0.0007 |
| | Fluarix | 0.0890 |
| INF γ | FluAS03 | 0.0012 |
| | Fluarix | 0.1103 |
| IL2 | FluAS03 | 0.0025 |
| | Fluarix | 0.1409 |
| TNF α | FluAS03 | 0.0327 |
| | Fluarix | 0.6936 |

P値:21日目の2つの群の間での、位置の差を検定する(ウィルコクソン順位和検定)ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法).

【0438】

【表31】

表31 特異的CD4 Tリンパ球応答ワクチン接種に関する、ワクチン接種後(21日目)とワクチン接種前(0日目)との差についての記述統計(動的)

| サイト カイン | 調査 | 群 | N | 平均 | SD | Min | Q1 | 中央値 | Q3 | Max |
|--------------|--------------|-------------|----|---------|----------|----------|---------|---------|---------|----------|
| オール ダブル | EXPLO 001 | Flu AS03 | 34 | 4837.56 | 4476.129 | -609.00 | 1888.00 | 3483.50 | 8148.00 | 19555.00 |
| | | Fluarix | 15 | 3103.53 | 3726.645 | 436.00 | 800.00 | 2283.00 | 3226.00 | 15169.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 34 | 1737.79 | 1450.177 | -2379.00 | 936.00 | 1664.50 | 2743.00 | 4669.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1369.00 | 1127.784 | 197.00 | 725.00 | 869.00 | 1808.00 | 4676.00 |
| CD40L | EXPLO 001 | Flu AS03 | 33 | 4819.06 | 4489.788 | -718.00 | 1799.00 | 3479.00 | 8288.00 | 19480.00 |
| | | Fluarix | 15 | 3090.00 | 3684.759 | 477.00 | 822.00 | 2189.00 | 3208.00 | 15021.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 33 | 1694.73 | 1431.082 | -2359.00 | 921.00 | 1659.00 | 2662.00 | 4575.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1360.93 | 1131.051 | 243.00 | 725.00 | 860.00 | 1687.00 | 4743.00 |
| IFNy | EXPLO 001 | Flu AS03 | 33 | 3127.09 | 2974.067 | -453.00 | 1325.00 | 1721.00 | 5162.00 | 13296.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1660.13 | 1834.023 | -84.00 | 480.00 | 1386.00 | 2284.00 | 7120.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 33 | 1167.85 | 893.363 | -817.00 | 633.00 | 1207.00 | 1803.00 | 2831.00 |
| | | Fluarix | 15 | 851.87 | 859.585 | 148.00 | 294.00 | 501.00 | 1222.00 | 3564.00 |
| IL2 | EXPLO 001 | Flu AS03 | 33 | 3950.18 | 3878.538 | -358.00 | 1309.00 | 2780.00 | 6635.00 | 16988.00 |
| | | Fluarix | 15 | 2413.87 | 3027.392 | 263.00 | 674.00 | 1672.00 | 2425.00 | 12273.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 33 | 1404.67 | 1355.665 | -2702.00 | 719.00 | 1341.00 | 2109.00 | 4342.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1117.80 | 975.934 | -258.00 | 575.00 | 714.00 | 1618.00 | 3850.00 |
| TFN α | EXPLO 001 | Flu AS03 | 33 | 2627.36 | 2574.458 | -825.00 | 862.00 | 1475.00 | 4764.00 | 9267.00 |
| | | Fluarix | 15 | 1460.53 | 3115.174 | -1586.00 | 251.00 | 813.00 | 1314.00 | 12275.00 |
| | EXPLO 002 | Flu AS03 | 33 | 1072.36 | 1044.140 | -1816.00 | 447.00 | 1000.00 | 1752.00 | 3310.00 |
| | | Fluarix | 15 | 904.67 | 974.958 | 32.00 | 338.00 | 752.00 | 965.00 | 3892.00 |

SD=標準偏差

Min、Max=最小、最大

Q1=第1四分位数

Q3=第3四分位数

N=利用可能な結果を示す、試験がなされた被験者の数

【0439】

各調査毎のウィルコクソン検定によって、2つのワクチン群の間での抗原特異的CD4 Tリンパ球の頻度の差を比較すると、p値は、Explo-Flu-001でのみ0.05未満であり、統計的に有意であると見なされた(FluAS03が好ましい)(表32参照)。

10

20

30

【表32】

表32 推測統計:抗原特異的 CD4 Tリンパ球応答に関し、21日目の異なる群の間のウィルコクソン順位和検定から得られたp値(動的)

| サイトカイン | 調査 | p値 |
|--------------|---------------|--------|
| オールダブル | Explo Flu 001 | 0.0827 |
| | Explo Flu 002 | 0.0992 |
| CD40L | Explo Flu 001 | 0.0931 |
| | Explo Flu 002 | 0.1391 |
| INF γ | Explo Flu 001 | 0.0543 |
| | Explo Flu 002 | 0.1068 |
| IL2 | Explo Flu 001 | 0.0847 |
| | Explo Flu 002 | 0.2254 |
| TNF α | Explo Flu 001 | 0.0375 |
| | Explo Flu 002 | 0.2009 |

P値:21日目での2つの群の間の位置の差を検定する(ウィルコクソン順位和検定)ウィルコクソン検定(ノンパラメトリック法).

【0440】

IV.4. HI力値

結果を、図9と表33から36に示す。

【表33】

表33: 幾何平均力値(GMT)、および抗HI力値の血清陽性率(ワクチン接種された被験者について計算されたGMT)

| 抗体 | 群 | タイミング | N | S+ | % | 95%CI | | GMT | 95%CI | |
|---------------|------------|---------|-----|----|------|-------|------|-------|-------|-------|
| | | | | | | L.L. | U.L. | | L.L. | U.L. |
| New Caledonia | Fluarix | PRE | 18 | 17 | 94.4 | 72.6 | 99.9 | 63.5 | 38.1 | 105.9 |
| | | PI(D21) | 18 | 18 | 100 | 81.5 | 100 | 131.9 | 77.1 | 225.6 |
| | FluAS03 | PRE | 40 | 39 | 97.5 | 86.8 | 99.9 | 70.3 | 50.5 | 97.7 |
| A/Fujian | Fluarix | PI(D21) | 40 | 40 | 100 | 91.3 | 100 | 218.6 | 158.2 | 302.0 |
| | | PRE | 18 | 18 | 100 | 81.5 | 100 | 95.0 | 51.0 | 176.9 |
| | FluAS03 | PI(D21) | 18 | 18 | 100 | 81.5 | 100 | 498.3 | 272.1 | 912.7 |
| | | PRE | 40 | 40 | 100 | 91.3 | 100 | 94.3 | 71.4 | 124.6 |
| | B/Shanghai | PI(D21) | 40 | 40 | 100 | 91.3 | 100 | 735.1 | 564.4 | 957.5 |
| B/Shanghai | Fluarix | PRE | 18 | 16 | 88.9 | 65.3 | 98.6 | 23.3 | 15.2 | 35.8 |
| | | PI(D21) | 18 | 17 | 94.4 | 72.6 | 99.9 | 139.8 | 64.0 | 305.0 |
| | | FluAS03 | PRE | 40 | 38 | 95.0 | 83.1 | 99.4 | 58.6 | 43.9 |
| | | PI(D21) | 40 | 40 | 100 | 91.3 | 100 | 364.4 | 269.7 | 492.4 |

PRE=ワクチン接種前

PI(D21)=ワクチン接種後21日目

95%CI、LL、およびUL=95%信頼区間、下限、および上限

S+=血清陽性の被験者の数

【0441】

【表34】

表34: 抗HI力値のコンバージョン係数(全てワクチン接種された被験者)

| 群 | A/N-Caledonia | | | A/Fujian | | | B/Shanghai | | |
|---------|---------------|----------------|-----------|----------|----------------|------------|------------|----------------|------------|
| | N | GMR [95%CI] | | N | GMR [95%CI] | | N | GMR [95%CI] | |
| Fluarix | 18 | 2.1 | [1.4;3.2] | 18 | 5.2 | [3.0;9.3] | 18 | 6.0 | [3.5;10.2] |
| FluAS03 | 40 | 3.1 | [2.4;4.0] | 40 | 7.8 | [5.6;10.9] | 40 | 6.2 | [4.7;8.2] |

N=被験者の総数

GMR=幾何平均比(21日目/0日日の力値比の平均logの逆log)

95%CI=95%信頼区間

【0442】

10

20

30

40

【表35】

表35: 抗HI力値の血清保護率(全てワクチン接種された被験者)

| 抗体 | 群 | タイミング | N | >=40 | | | |
|-----------------|---------|---------|----|------|------|-------|------|
| | | | | n | % | 95%CI | |
| A/New Caledonia | Fluarix | PRE | 18 | 14 | 77.8 | 52.4 | 93.6 |
| | | PI(D21) | 18 | 16 | 88.9 | 65.3 | 98.6 |
| A/Fujian | FluAS03 | PRE | 40 | 32 | 80 | 64.4 | 90.9 |
| | | PI(D21) | 40 | 39 | 97.5 | 86.8 | 99.9 |
| B/Shanghai | Fluarix | PRE | 18 | 14 | 77.8 | 52.4 | 93.6 |
| | | PI(D21) | 18 | 18 | 100 | 81.5 | 100 |
| | FluAS03 | PRE | 40 | 36 | 90 | 76.3 | 97.2 |
| | | PI(D21) | 40 | 40 | 100 | 91.2 | 100 |
| | Fluarix | PRE | 18 | 6 | 33.3 | 13.3 | 59.0 |
| | | PI(D21) | 18 | 14 | 77.8 | 52.4 | 93.6 |
| | FluAS03 | PRE | 40 | 34 | 85 | 70.2 | 94.3 |
| | | PI(D21) | 40 | 40 | 100 | 91.2 | 100 |

PRE=ワクチン接種前

PI(D21)=ワクチン接種後21日目

N=利用可能な結果を示す被験者の数

n=指定範囲内の力値を有する被験者の数

% = 指定範囲内の力値を有する被験者のパーセンテージ

【0443】

【表36】

表36: ワクチン接種後21日目のセロコンバージョン率(倍数増加=4)(全てワクチン接種された被験者)

| 抗体 | ワクチン群 | N | n | 応答者 | | |
|-----------------|---------|----|----|------|-------|------|
| | | | | % | 95%CI | LL |
| A/New Caledonia | Fluarix | 18 | 3 | 16.7 | 3.6 | 41.5 |
| | FluAS03 | 40 | 19 | 47.5 | 31.5 | 63.9 |
| A/Fujian | Fluarix | 18 | 13 | 72.2 | 46.5 | 90.3 |
| | FluAS03 | 40 | 34 | 85.0 | 70.2 | 94.3 |
| B/Shanghai | Fluarix | 18 | 12 | 66.7 | 41.0 | 86.7 |
| | FluAS03 | 40 | 31 | 77.5 | 61.5 | 89.2 |

N=ワクチン接種の前と後の両方で利用可能な結果を示す被験者の数

n=応答者の数

% = 応答者の割合(n/N×100)

95%CI=正確な95%信頼区間; LL=下限、 UL=上限

【0444】

IV.5. 全体的な結論

この臨床研究から、アジュバントワクチンFlu-AS03は、インフルエンザ特異的CD4 T細胞の頻度に関して、また最初のFlu-AS03ワクチン接種(Explo Flu 001での最初のワクチン接種)により誘発される免疫応答が、ワクチン再接種調査のD0(Explo Flu 002、すなわち±1年後)まで持続することに關しても、相当するアジュバント無添加ワクチンFluarixより優れていることが確認される。さらに、この応答は、新しいワクチン中に存在するドリフトインフルエンザ株を認識すること、および2004年インフルエンザワクチンの株を認識することが可能である。

【0445】

最初の年のワクチン接種とは対照的に、ワクチン再接種を行うことにより、アジュバントFluarix(商標)が事前にワクチン接種された個人は、アジュバント無添加Fluarix(商標)

10

20

30

40

50

でワクチン接種された個人に比べて高いHI力価応答性を示した。H1N1およびH3N2株に対するHI力価が1.5~2倍増加し、B株に対するHI力価には実証された統計的増加があるという、観察可能な傾向が存在する。

【0446】

実施例V

フェレットにおけるアジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価

第1の研究-新規製剤AS03およびAS03+MPLの有効性

V.1. 原理および目的

フェレットモデルのインフルエンザ感染症は、感染に対する感受性および臨床反応の両方に関して、ヒトインフルエンザを緻密に模倣している。

【0447】

フェレットは、事前にウイルス株を適応させないでも、インフルエンザA型ウイルスおよびB型ウイルスの両方への感染に対して強い感受性を有する。したがって、フェレットは、投与されたインフルエンザワクチンによって与えられる保護の研究のための優れたモデル系を提供する。

【0448】

この研究は、同種株でチャレンジされたフェレットの病徵(体温)および鼻汁中のウイルス排泄を低減する、アジュバント添加または無添加の様々な3価スプリットワクチンの効力を調査した。

【0449】

この実験の目的は、単味(アジュバント無添加)ワクチンと比較した、アジュバント添加インフルエンザワクチンの効力を明らかにすることであった。

【0450】

エンドポイントは以下の通りであった。

- 1) 第1エンドポイント: 同種チャレンジ後における鼻洗浄液中のウイルス排泄の低減。
- 2) 第2エンドポイント: プライミングおよびチャレンジ周辺におけるIHAによる体液性応答の分析および体温のモニタリング。

【0451】

V.2. 実験計画

V.2.1. 治療/群(表37)

週齢14~20週間の雌フェレット(*Mustela putorius furo*)(6フェレット/群)をMISAY Consultancy(Hampshire, UK)から入手した。0日目に、フェレットを異なる亜型株であるH1N1 A/Stockholm/24/90でプライミングした(4 Log TCID₅₀/ml)。21日目に、H1N1A/New Caledonia/20/99、H3N2A/Panama/2007/99、およびB/Shangdong/7/97の組合せの完全なヒト用量(500 μgワクチン用量、15 μgHA/株)をフェレットに筋肉内注射した。次に、41日目に、鼻腔内経路によって同型株であるH3N2/Panama/2007/99をフェレットにチャレンジした(4.51 Log TCID₅₀/ml)。

10

20

30

【表37】

表37

| 群 | 抗原+用量 | 処方+用量 | コメント (スケジュール/ 経路/チャレン ジ) | 他の処置 |
|---|----------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 3価 単味 | 完全HD:15μg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90)0日目 |
| 2 | 3価 AS03 | 完全HD:15μg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90)0日目 |
| 3 | 3価 AS03+MPL | 完全HD:15μg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90)0日目 |
| 4 | PBS | | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90)0日目 |

【0452】

V.2.2. ワクチン製剤の調製

製剤1:3価単味(アジュバント無添加)製剤(500μl)

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750μgのTween80、110μgのTriton X100、および100μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1およびH3N2各株15μg、ならびにB株17.5μgを順番に添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4で保存する。

【0453】

製剤2:AS03でアジュバント添加した3価スプリットインフルエンザ(500μl)

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750μgのTween80、110μgのTriton X100、および100μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1およびH3N2各株15μg、ならびにB株17.5μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250μlのSB62エマルジョン(実施例II.1で教示されている通りに調製する)を添加する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4で保存する。

【0454】

製剤3:AS03+MPLでアジュバント添加した3価スプリットインフルエンザ

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)、ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750μgのTween80、110μgのTriton X100、および100μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1およびH3N2各株15μg、ならびにB株17.5μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250μlのSB62エマルジョン(実施例II.1で教示されている通りに調製する)を添加する。この混合物を再度15分間搅拌し、その直後に、実施例II.3.1で詳述した通りに調製した懸濁液から得られた25μgのMPLを添加する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4で保存する。

【0455】

注意:各製剤において、等張となるように10倍濃縮PBSを添加し、これは最終容積では、1倍濃縮となる。H₂O容積は、目的の容積に達するように計算する。

【0456】

V.2.3. 読み取り(表38)

【表38】

表38

| 読み取り | 時点 | 試料タイプ | I/P | 分析方法 |
|----------|--|--------------------|-----|------|
| ウイルス排出 | プライミング後の-1日目から +7日目 チャレンジ後の-1日目から+5日目 | 鼻洗浄 | In | 力価測定 |
| 体温モニタリング | プライミング後のD-1日目から +3日目 チャレンジ後の-2日目から+3日目 | 腹腔内の インプラン ト | In | 遠隔測定 |
| IHA | プライミング前、後、ワクチン接種後、チャレンジ後 | 血清 | In | IHA |

In=個体/Po=プール

10

【0457】

V.3. 結果

結果の模式図を図10および図11に示す。

20

【0458】

V.3.1. 体温モニタリング

個体の体温を、送信機を用い、遠隔測定記録によってモニターした(1.2.2で詳述した手順に従った)。腹腔内腔に設置する前に、すべてのインプラントを検査して、新装し、DSIによって新たな較正を行った。これらの測定中、すべての動物を単一ケージに個別に収容した。

【0459】

体温は、チャレンジの3日前からチャレンジの5日後まで、15分間毎にモニターし、正午までの平均を計算した。ベースラインからベースラインまでの体温の結果を図10A(-1から+3日までの結果を示す)および10B(-2から+3日までの結果を示す)に示す。

30

【0460】

チャレンジ後、3価スプリット単味もしくはPBSで免疫処置された後でのみ、体温のピークが観測された。AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットで免疫処置された後にはピークが観測されなかった。

【0461】

V.3.2. ウイルス排泄(図11)

1群当たり6匹の動物について、鼻洗浄液のウイルス力価測定を行った。

【0462】

鼻洗浄は、覚醒している動物の両方の鼻孔に5mlのPBSを投与することによって行った。接種物をペトリ皿に収集し、-80 (ドライアイス)の試料容器中に置いた。

40

【0463】

すべての鼻腔試料は、いかなる細菌汚染も除去するために、最初に、Spin Xフィルター(Costar)に通して無菌濾過した。鼻洗浄液の連続10倍の希釈物50 μlを、50 μlの培地を含有するマイクロタイタープレート中に移した(10ウェル/希釈)。その後、100 μlのMDCK細胞(2.4×10^5 細胞/ml)を各ウェルに添加し、対照細胞が細胞集密に達するまで、例えば5~7日間、35 °Cでインキュベートした。6~7日間のインキュベーションの後、培養培地を穏やかに除去し、培地を含有する100 μlの1/20 WST-1を添加して、さらに18時間インキュベートする。

【0464】

生存細胞によるWST-1の還元の際に產生される黄色のホルマザン色素の強度は、ウイルス力価測定アッセイの終わりに、ウェル中に存在する生存細胞数に比例しており、適切な

50

波長(450ナノメートル)で各ウェルの吸収を測定することによって定量化される。カットオフは、未感染の対照細胞の平均ODと定義され、0.3 OD(0.3 ODは未感染の対照細胞のODの+/- 3 StDevに対応している)である。正のスコアはODが<カットオフであるときと定義され、その反対に、負のスコアは、ODが>カットオフであるときと定義される。ウイルス排泄力価は、「ReedおよびMuench」によって測定し、 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ で表した。

【0465】

AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットでチャレンジされた後には、3価スプリット単味またはPBSと比較して、より少ないウイルス排泄が観測された。保護効果は、AS03を用いた場合に、AS03+MPLと比較してわずかに良かった(チャレンジ後の2日目を参照)。1群当たりの動物数が少なかったため、統計的有意性を決定することはできなかった。

10

【0466】

V.3.3. 実験の結論

3株すべてに関して、3価スプリット単味と比較して、より高い体液性応答(HI力価)がAS03またはAS03+MPLでアジュバント添加した3価スプリットで観測された(3株のうちの2株、すなわちH3N2およびB株では少なくとも2倍)。

【0467】

AS03製剤およびAS03+MPL製剤は、フェレットにおける保護効果に関して利益の追加(低減したウイルス排泄および体温)を示した(図10および11)。

20

【0468】

AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットで免疫処置された後には、チャレンジ後、体液性応答のブーストが観測されなかった。

【0469】

第2の研究-フェレットにおける異型チャレンジ研究:試験された新規製剤の効力の実証

V.4. 原理および目的

この研究は、アジュバント添加または無添加の様々な3価スプリットワクチンの効力を、それらが病徵(体温)を低減させる能力、および異種チャレンジ後における免疫処置されたフェレットの鼻汁中のウイルス排泄へのそれらの影響によって調査した。

【0470】

V.5. 実験計画

30

週齢14~20週間の雌フェレット(*Mustela putorius furo*)(6フェレット/群)をMISAY Consultancy(Hampshire、UK)から入手した。以下の4つの群を試験した。

*Fluarix

*3価スプリットAS03

*3価スプリットAS03+MPL

*PBS

【0471】

0日目に、フェレットを異なる亜型株であるH1N1A/Stockholm/24/90でプライミングした(4 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)。21日目に、H1N1A/New Caledonia/20/99、H3N2A/Panama/2007/99、およびB/Shangdong/7/97の組合せの完全なヒト用量(500 μg ワクチン用量、15 μg HA/株)をフェレットに筋肉内に注射した(17.5 μg HA)。次に、43日目に、鼻腔内経路によって異なる亜型株であるH3N2 A/Wyoming/3/2003をフェレットにチャレンジした(4.51 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)。

40

【0472】

V.6. 結果

結果の模式図を図12および図13に示す。

【0473】

V.6.1. 体温モニタリング

個体の体温を、送信機を用い、遠隔測定記録によってモニターした。腹腔内腔に設置する前に、すべてのインプラントを検査して、新装し、DSIによって新たな較正を行った。

50

これらの測定中、すべての動物を单一ケージに個別に収容した。

【0474】

結果(図12)は以下のことを示している。

- プライミングの周辺において、群相互の大きな変動が観測された。ベースラインは、プライミングの後より、プライミングの前の方が高いようであった。

- 体温の変動が大きかったのにもかかわらず、チャレンジ後におけるピークは、PBS(6/6匹のフェレット)、3価スプリット単味(5/6匹のフェレット)、およびAS03でアジュバント添加された3価スプリット(2/6匹のフェレット)で免疫処置されたフェレットにおいてのみ観測された。AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットでは、免疫処置後にピークは観察されなかった(0/6匹のフェレット)。

- 発熱予防に関しては、AS03は、異種株に対してAS03+MPLより効力が弱いようであった。発明者らは、アジュバント相互の相違が、チャレンジ前の抗体レベルにおける、レベルの相違によるものであるという可能性について結論付けることができない。

【0475】

V.6.2. ウイルス排泄(図13)

鼻洗浄は、覚醒している動物の両方の鼻孔に5mlのPBSを投与することによって行った。接種物をペトリ皿に収集し、-80 (ドライアイス)の試料容器中に置いた。

【0476】

すべての鼻腔試料は、いかなる細菌汚染も除去するために、最初に、Spin Xフィルター(Costar)に通して無菌濾過した。鼻洗浄液の連続10倍の希釈物50 μlを、50 μlの培地を含有するマイクロタイタープレート中に移した(10ウェル/希釈)。その後、100 μlのMDCK細胞(2.4×10^5 細胞/ml)を各ウェルに添加し、対照細胞が細胞集密に達するまで、例えば5~7日間、35 °Cでインキュベートした。6~7日間のインキュベーションの後、培養培地を穏やかに除去し、培地を含有する100 μlの1/20 WST-1を添加して、さらに18時間インキュベートする。

【0477】

生存細胞によるWST-1の還元の際に產生される黄色のホルマザン色素の強度は、ウイルス力価測定アッセイの終わりに、ウェル中に存在する生存細胞数に比例しており、適切な波長(450ナノメートル)で各ウェルの吸収を測定することによって定量化される。カットオフは、未感染の対照細胞の平均ODと定義され、0.3 OD(0.3 ODは未感染の対照細胞のODの+/-3StDevに対応している)である。正のスコアはODが<カットオフであるときと定義され、その反対に、負のスコアは、ODが>カットオフであるときと定義される。ウイルス排泄力価は、「ReedおよびMuench」によって測定し、 $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ で表した。

【0478】

プライミング後のウイルス排泄

12匹のフェレットで、プライミング前の1日目からプライミング後の7日目までウイルス排泄を測定した。結果はプールで表した。

【0479】

すべてのフェレットで、プライミング後の7日目にウイルスのクリアランスが観測された。

【0480】

チャレンジ後のウイルス排泄

6フェレット/群で、チャレンジ前の1日目からチャレンジ後の7日目までウイルス排泄を測定した。

【0481】

チャレンジの2日後に、AS03およびAS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットで免疫処置されたフェレットで、3価スプリット単味およびPBSで免疫処置されたフェレットと比較して、統計的に有意に低いウイルス力価が観測された(単味ワクチンと比較した相違は、アジュバント添加群AS03/AS03+MPLでそれぞれ1.25/1.22 logおよび1.67/1.64 log)。

10

20

30

40

50

【0482】

50日目には、鼻腔洗浄液中にウイルスは検出されなかった。

【0483】

V.6.3. 血球凝集抑制試験(HI力価)(図14AおよびB)

プライミングの1日前、プライミングの21日後、免疫処置の22日後、およびチャレンジの14日後に血清試料を収集した。

【0484】

H3N2インフルエンザウイルス(ワクチン株およびチャレンジ株)に対する抗赤血球凝集素抗体力価を、血球凝集抑制試験(HI)を用いて測定した。HI試験の原理は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)によるニワトリ赤血球(RBC)の赤血球凝集反応を抑制する、特異的抗インフルエンザ抗体の能力に基づいている。血清は、最初に、25%のノイラミニダーゼ溶液(RDE)で処理し、非特異的な抑制因子を除去するために熱不活化させた。前処置の後、血清の2倍希釈物を4赤血球凝集反応単位の各インフルエンザ株と共にインキュベートした。その後、ニワトリ赤血球を添加し、凝集の抑制をスコアリングした。力価は、赤血球凝集反応を完全に抑制した最も高い血清希釈率の逆数として表した。最初の血清希釈率は1:10であったので、検出不可能なレベルは、5に等しい力価としてスコアリングした。

10

【0485】

結果

結果を図14Aおよび14Bに示す。H3N2 A/Panamaで免疫処置した後では、フェレットをアジュバント無添加(単味)の3価スプリットワクチン(Fluarix(商標))で免疫処置した後で観測される体液性応答と比較して、より高い体液性応答(HI力価)が、AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加した3価スプリットワクチンで免疫処置されたフェレットで観測された。

20

【0486】

AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加されたH3N2 A/Panamaで免疫処置されたフェレットで、同様なHI力価が観測された。

【0487】

異種株であるA/Wyoming H3N2に対する交差反応性HI力価は、AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加されたワクチンを含有するA/Panama H3N2株で免疫処置した後で観測されたのみであった(3価スプリット単味で免疫処置された後では観測されなかった)。

30

【0488】

異種株A/Panama H3N2で免疫処置され、かつA/Wyoming H3N2でチャレンジされたフェレットでは、A/Wyoming特異的なHI力価のブーストが観測された。予測通り、そして同種チャレンジとは反対に、AS03およびAS03+MPLでアジュバント添加されたA/Panama H3N2で免疫処置されたフェレットにおいて、異種チャレンジはA/Panama特異的なHI力価の増大をもたらした。

【0489】

V.6.4. この実験の結論

予測通り、同種チャレンジの後の状況(ブーストなし)と比較して、異種チャレンジの後では、抗H3N2 HI力価のブーストが観測された。

40

【0490】

しかし、同様な保護(ウイルス排泄)が、異種チャレンジおよび同種チャレンジの後で観測された。

【0491】

実施例V IプライミングされたC57Bl/6マウスにおけるアジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価VI.1. 実験計画および目的

Explo-Flu-001臨床実験(実施例III参照)では、Fluarix単味(アジュバント無添加)と比

50

較して、3価FluスプリットAS03に対する、有意な、より高いCD4T細胞応答が観測された。これらの2つの群の間では、CD8T細胞応答の相違も体液性応答の相違も両方とも観測されなかった。

【0492】

目的は、ヒトで観測されるものに類似したCMI応答をマウスで誘導する読み取りを選択することであった。詳細には、目的は、スプリットAS03またはスプリットAS03+MPLを用いることによって、スプリット単味と比較して、より高いCMI応答をマウスで示すことであった。

【0493】

VI.1.1. 治療/群

10

週齢6~8週間の雌C57Bl/6マウス(15マウス/群)をオランダ国、Harlan Horstから入手した。試験された群は以下の通りであった。

-3価スプリット単味

-3価スプリットAS03

-3価スプリットAS03+MPL

-PBS

【0494】

0日目に異なる亜型株(5 μgのHA不活化全H1N1A/Johnannesburg/82/96、H3N2 A/Sydney/5/97、B/Harbin/7/94)でマウスをプライミングした。28日目に、単味またはアジュバント添加のHA3価スプリット(A/New Caledonia/20/99、A/Panama/2007/99、B/Shangdong/7/97) 20 1.5 μgをマウスに筋肉内注射した(下記の群を参照)。

【0495】

VI.1.2. ワクチン製剤の調製

各製剤において、等張となるように10倍濃縮PBSを添加し、これは最終容積では、1倍濃縮となる。H₂O容積は、目的の容積に達するように計算する。

【0496】

3価スプリット単味(アジュバント無添加)

製剤1(500 μl当たり) :10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750 μgのTween80、110 μgのTriton X100、および100 μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。 30

【0497】

水中油型エマルジョンアジュバントAS03でアジュバント添加された3価スプリット

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750 μgのTween80、110 μgのTriton X100、および100 μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62エマルジョン(実施例II.1で教示されている通りに調製する)を添加する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。 40

【0498】

AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリット

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり750 μgのTween80、110 μgのTriton X100、および100 μgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62エマルジョン(実施例II.1で教示されている通りに調製する)を添加する。この混合 50

物を、再度15分間攪拌し、その直後に25 μgのMPLを添加する。上記製剤を15分間室温で攪拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0499】

VI.1.3. 読み取り

CMI分析(ICS:CD4/CD8、IL-2/IFNg染色)

プライミングされたマウスから、免疫処置7日後にPBMCを採取した。それらはプール/群において試験した。

【0500】

VI.2. 結果

プライミングされたC57Bl/6マウスと、再刺激抗原として不活化全ウイルス1 μg/mlとを用いることによって、より高い頻度のCD4およびCD8+ T細胞、ならびにより低いバックグラウンドを示した条件を決定した。結果を図15(CD4T細胞応答)および図16(CD8T細胞応答)に示す。

【0501】

これらの条件を用いて、以下の応答を誘導することが可能であった。

- ヒトで観測した際に、スプリット単味と比較して、より強い、スプリットAS03に対するCD4T細胞応答。
- スプリット単味と比較して、より強い、スプリットAS03+MPLに対するCD4T細胞応答。
- ヒトで観測した際に、スプリット単味とスプリットAS03との間で類似したCD8T細胞応答。
- スプリットAS03またはスプリット単味と比較して、より強い傾向にある、AS03+MPLに対するCD8T細胞応答。

【0502】

実施例VII

異種株でプライミングされたC57Bl/6マウスにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のスプリットおよびサブユニットインフルエンザワクチンの前臨床評価

VII.1. 実験計画および目的

Explo-Flu-001臨床実験(実施例III参照)では、Fluarix単味(アジュバント無添加)と比較して、3価FluスプリットAS03に対する、有意な、より高いCD4T細胞応答が観測された。これらの2つの群の間では、CD8T細胞応答の相違も体液性応答の相違も両方とも観測されなかった。

【0503】

ヒトで観測されるものと類似した免疫プロファイルを再現する動物モデルを、異種株でプライミングされたC57Bl/6マウスを用いることによって開発した。ICS(細胞内サイトカイン染色)には、不活化全ウイルスを用いて再刺激を行う。

【0504】

目的は、GlaxoSmithKlineの市販スプリットワクチン(Fluarix(商標))によって誘導されるCMI応答を、サブユニットワクチン(Chiron製ワクチン(Fluad)(商標))と比較すること、およびAS03もしくはAS03+MPLまたは別の水中油型エマルジョンアジュバント(OW)でアジュバント添加されたこれらのワクチンによって得られるCMI応答と比較することであった。

【0505】

VII.1.1. 治療/群

週齢6~8週間の雌C57Bl/6マウス(24マウス/群)をオランダ国、Harlan Horstから入手した。0日目に、異型株(5 μgのホルムアルデヒド不活化全H1N1A/Johnannesburg/82/96、H3N2 A/Sydney/5/97、B/Harbin/7/94)を用いて、鼻腔内でマウスをプライミングした。29日目に、単味またはアジュバント添加の3価スプリット(A/New Caledonia/20/99、A/Wyoming/3/2003、B/Jiangsu/10/2003)1,5 μgHAをマウスに筋肉内注射した(下記表39中の群を参照)。

10

20

30

40

【表39】

表39

| 群 | 抗原/処方 | 他の処置 |
|----|---|-------------|
| 1 | 3価スプリット*/単味(アジュバント無添加) =Fluarix(商標) | 異種プライミング0日目 |
| 2 | 3価スプリット*/OW | 異種プライミング0日目 |
| 3 | 3価スプリット*/AS03 | 異種プライミング0日目 |
| 4 | 3価スプリット*/AS03+MPL(2.5μg/用量) | 異種プライミング0日目 |
| 5 | グリップガード(=Fluad(商標))=水中油型 エマルジョン中サブユニット | 異種プライミング0日目 |
| 6 | Agrippal(商標)(サブユニット)/AS03 | 異種プライミング0日目 |
| 7 | Agrippal(商標)(サブユニット)/AS03+MPL (2.5μg/用量) | 異種プライミング0日目 |
| 8 | Agrippal(商標)(サブユニット)/OW** | 異種プライミング0日目 |
| 9 | Agrippal(商標)(サブユニット) | 異種プライミング0日目 |
| 10 | PBS | 異種プライミング0日目 |

*Fluarix(商標)

**OWは下記セクションの説明の通りに調製した。

10

【0506】

20

VII.1.2. ワクチン製剤の調製

OWの調製

OWと呼ばれる水中油型エマルジョンは、Chiron BehringのFluad(FluAd)ワクチンに含有されている説明書に公開されているレシピに従って調製する。

【0507】

30

注射用水、36.67mgのクエン酸、および627.4mgのクエン酸ナトリウム・2H₂Oを混合し、容積を200mlに調整する。この緩衝剤94.47mlに、470mgのTween80を混合する。この混合物を「溶液A」と呼ぶ。油性混合物は、磁気攪拌しながら、3.9gのスクワレンを470mgのSpan 85と混合することによって調製する。その後、溶液Aを上記油性混合物に添加し、それによって得られる最終容積は100mlである。この混合物を、その後まず最初に18Gx1 1/2の注射針に通し、次に、油滴のサイズを低減させるために2つの試料にして、M110Sマイクロフリューダイザー(Microfluidics製)に入れる。それについて、約150nmの粒径が得られたときに、2つの試料をプールし、0.2 μmフィルターで濾過する。T0におけるプール試料では、z平均143nm、多分散度0.10が得られ、4で4ヶ月間貯蔵した後には、145nm、多分散度0.06が得られた。このサイズは、以下の技術的条件下でZetasizer 3000HS(Malvern製)を用いることによって得られる。

- レーザ波長:532nm (Zeta3000HS)、
- レーザパワー:50 mW(Zeta3000HS)、
- 散乱光は90°で検出(Zeta3000HS)、
- 温度:25°、
- 時間:ソフトによる自動測定、
- 数:3回の連続測定、
- z-平均直径:キュムラント分析による。

40

【0508】

第1群用の製剤(1ml当たり)

終濃度375 μg/ml Tween80、55 μg/ml Triton X100、および50 μg/ml VESとなるように、10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)、ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。5分間の攪拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間攪拌する。上記製剤を15分間攪拌し、直接投与しない場合には4で保存する。

50

【0509】

第2群用の製剤(1ml当たり)

終濃度375 μg/ml Tween80、55 μg/ml Triton X100、および50 μg/ml VESとなるように、10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)、ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 μlのOWエマルジョンを添加する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0510】

第3群用の製剤:1ml当たり

終濃度375 μg/ml Tween80、55 μg/ml Triton X100、および50 μg/ml VESとなるように、10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)、ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62エマルジョンを添加する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0511】

第4群用の製剤:1ml当たり

終濃度375 μg/ml Tween80、55 μg/ml Triton X100、および50 μg/ml VESとなるように、10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)、ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用水に添加する。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 μgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62エマルジョンを添加する。この混合物を、再度15分間搅拌し、その後に25 μgのMPLを添加する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0512】

第5群用の製剤:1ml当たり

等容積のPBSとFluad(商標)/グリップガード(商標)(市販ワクチン)ワクチンとを混合する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0513】

第6群用の製剤:1ml当たり

pH7.4に調整した250 μlのPBSを、500 μl用量のAgrippal(商標)(市販ワクチン)に添加する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62を添加する(大規模生産用に詳述された方法に従って調製する)。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0514】

第7群用の製剤:1ml当たり

pH7.4に調整したPBS(最終容積1mlとなるように)を、500 μl用量のAgrippal(商標)(市販ワクチン)に添加する。15分間の搅拌の後に、250 μlのSB62を添加する(大規模生産用に詳述された方法に従って調製する)。その後、25 μgのMPLを添加する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0515】

第8群用の製剤:1ml当たり

pH7.4に調整した250 μlのPBSを、500 μl用量のAgrippalに添加する。15分間の搅拌の後に、第2群用に調製された250 μlのOWを添加し、上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0516】

第9群用の製剤:1ml当たり

pH7.4に調整したPBSとAgrippalとを等容積混合する。上記製剤を15分間搅拌し、直接投与しない場合には4℃で保存する。

【0517】

10

20

30

40

50

VII.1.3. 読み出し(表40)

CMI(ICS):免疫処置の7日後。

IHA/中和アッセイ:免疫処置の21日後。

【表40】

表40

| 読み取り | 時点 | 試料タイプ | I/P | 分析方法 |
|----------------------------------|---------------|-------|-----|--------|
| ICS(CD4,CD8,IL-2,IFN- γ) | 35日目 | PBL | Po | FACS分析 |
| 体液性応答 | 14日目、 44日目 | 血清 | In | IHA、中和 |

In=個体/Po=プール

10

【0518】

CMI分析(ICS:CD4/CD8; IL-2/IFN- γ 染色)

免疫処置の7日後に、24マウス/群からPBMCを採取し、プール/群において試験した。

【0519】

VII.2. 結果VII.2.1. 体液性免疫

1群当たり24匹の動物から得た血清において、上記3株のワクチン株に対する赤血球凝集抑制活性が、鼻腔内異種プライミング後の14日目、および免疫処置後の16日目に検出された。

20

【0520】

上記3株およびすべての群について、免疫処置後にHI力値のブーストが観測された。

【0521】

- 同一アジュバントおよび上記3株について、サブユニットワクチンおよびスプリットワクチンによって、類似したHI力値が誘導された。

【0522】

- 上記3株では、Agrippal OWとの比較において、類似したHI力値がFluadに対して観測された。

30

【0523】

- H1N1株およびB株では、FluarixとAgrippalとの間に相違は観測されなかった。

【0524】

- 上記3株では、Fluワクチン(スプリットまたはサブユニット)がMPLを含むか、もしくは含まないAS03でアジュバント添加された際に、単味のFluワクチンと比較して、統計的に有意な、より高いHI力値が観測された。

【0525】

- OWでアジュバント添加されたFluワクチン(スプリットもしくはサブユニット)に対するHI力値は、Fluワクチン単味と比較して、A/Wyoming株のみで、統計的に有意であり、より高かった。

40

【0526】

VII.2.2. 細胞性免疫応答(免疫処置後の7日目におけるICS)CD4T細胞応答-図17上部

1群当たり24匹のマウスから得られたPBMCを、免疫処置の7日後に採取して、1プール/群で試験した。再刺激抗原として、不活化3価全ウイルス(1 μ g/ml)を用いた。結果を図17上部に示す。

【0527】

IL-2、IFN- γ または両サイトカインを発現するFlu全ウイルス特異CD4+T細胞(図17上部)に関して(図17上部)、

1.GSKアジュバントは、以前に観測されたのと同じ傾向を示した(実施例VI)。すなわち、AS03+MPLは、AS03より優れており、そして後者は、単味ワクチンで得られた結果より優れ

50

ていた。この傾向は、スプリットワクチンまたはサブユニットワクチンの両方で観察された。

【0528】

2.いかなる処方であっても(単味、AS03、またはAS03+MPL)、スプリットワクチンはサブユニットワクチンより高いCD4+T細胞応答を誘導した。

【0529】

3.Fluad(サブユニット+水中油型エマルジョンOW-調製セクションを参照のこと)は、Flurix単味に類似した頻度を誘導する。

【0530】

4.3価スプリット/AS03製剤または3価スプリット/AS03+MPL製剤は、サブユニット/水中油型エマルジョンOW製剤より強いCD4+T細胞応答を誘導した。

【0531】

CD8T細胞応答-図17下部

免疫処置の7日後に、1群当たり24匹のマウスから得たPBMCを採取し、1プール/群で試験した。再刺激抗原として、不活化3価全ウイルス(1 μg/ml)を用いた。

【0532】

IL-2もしくはIFN- γ 、またはこれらのサイトカインの両方を発現するFlu全ウイルス特異的CD8+ T細胞に関して(図17下部)、

・PBS陰性対照群で観測された高バックグラウンドにより、この実験のカットオフは比較的高かった。

・しかし、3価スプリット/AS03+MPLで免疫処置されたマウスでは、他のワクチン製剤と比較して、より強い特異的CD8T細胞応答が観測された。

【0533】

VII.3. 結果および結論の概要

以下の結果を得た。

【0534】

1)免疫処置の7日後にICSによって得られたFlu特異的CD4+T細胞は、以下のことを示した。

【0535】

1.Fluadでは、Flurixと比較して、類似した応答が得られた。

【0536】

2.スプリットインフルエンザワクチン(ヒトで観測)およびサブユニット(Agrippal)ワクチン(ヒトでは評価されていない)の両方に関して、アジュバント添加製剤は、アジュバント無添加ワクチンと比較してより高い免疫応答を誘導した。MPL(群4および9)を補足された水中油型エマルジョンアジュバントAS03は、水中油型エマルジョンアジュバントAS03(群3および8)より強い応答を与えた。

【0537】

3.スプリット/AS03+MPLに対するCD4応答は、スプリット/AS03と比較して、より高い傾向にある(図17)。

【0538】

4.スプリットワクチンによって誘導された応答は、サブユニットワクチンで得られた応答より優れていた(群1~4と群5~9とを比較)。

【0539】

5.スプリットワクチンは、MPLを含むAS03でアジュバント添加されたものも、MPLを含まないAS03でアジュバント添加されたものも(群3および4)、Fluad(群5)またはAgrippal+OW(群7)いずれかのサブユニットワクチンでより強いCD4+T細胞応答を示した。

【0540】

2)免疫処置の7日後にICSによって得られたFlu特異的CD8+T細胞は、スプリット/AS03+MPLの使用によるCD8+ T細胞応答は、スプリット/AS03またはスプリット単味と比較して、

10

20

30

40

50

より高い傾向にあった。

【0541】

3)同ーアジュバントおよび上記3株では、サブユニットワクチンおよびスプリットワクチンによって、類似したHI力値が誘導された。上記3株では、Fluワクチン(サブユニットまたはスプリット)がAS03もしくはAS03+MPLでアジュバント添加された際に、Fluワクチン単味と比較して、統計的に有意な、より高い力値が観測された(A/Wyoming株では、FluワクチンOW>Fluワクチン単味)。

【0542】

実施例VIII

スプリットインフルエンザ抗原調製物、およびMPLを含むAS03アジュバントまたはMPLを含まないAS03アジュバントを含有するワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験

10

VIII.1. 研究計画

筋肉内投与されたAS03アジュバントまたはAS03+MPLアジュバントを含有のGlaxoSmithKline Biologicals製インフルエンザ候補ワクチンの反応原性および免疫原性をFluarix(商標)ワクチン(ベルギーでは -Rix(商標)として知られている)と比較して評価するための、65歳超(65歳)の高齢者集団における、第1相オープン無作為対照試験。

【0543】

以下の3つの平行群を評価した。

- ・再構成、かつAS03アジュバント添加のSVインフルエンザワクチン1用量の投与を受ける50名の対象からなる1群(Flu AS03)
- ・再構成、かつFlu AS03+MPLアジュバント添加のSVインフルエンザワクチン1用量の投与を受ける50名の対象からなる1群(Flu AS03+MPL)
- ・Fluarix(商標)1用量の投与を受ける50名の対象からなる1対照群(Fluarix)

20

【0544】

VIII.2. ワクチン組成物および投与

上記3種のワクチンに使用された株は、2004-2005北半球四半期用にWHOによって推奨されたもの、すなわち、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/New California/3/2003(H3N2)、およびB/Jiangsu/10/2003であった。比較器として用いられた市販ワクチンであるFluarix(商標)/ -Rix(商標)と同様に、アジュバント添加ワクチン(AS03またはAS03+MPL)は、1用量当たりそれぞれ15 μg赤血球凝集素(HA)のインフルエンザウイルス株を含有している。

30

【0545】

上記アジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンは、I型ガラスバイアル中に用意した濃縮3価不活化スプリットビリオン抗原と、アジュバント(AS03またはAS03+MPL)を含有する前充填のI型ガラス注射器とからなる2成分ワクチンである。それらは実施例IIで詳述されている通りに調製した。上記アジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンの製剤に使用される3種の不活化スプリットビリオン抗原(1価原体)は、市販のFluarix(商標)/ -Rixの製剤に使用される活性成分と正確に同じものである。

【0546】

AS03アジュバント添加ワクチン

AS03アジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンは、I型ガラスバイアル(抗原容器)中に用意された濃縮3価不活化スプリットビリオン抗原(335 μl)と、SB62エマルジョン(335 μl)を含有する前充填のI型ガラス注射器(アジュバント容器)とからなる2成分ワクチンである。AS03候補ワクチンの記述および組成物は、実施例IIIに説明されている。

40

【0547】

AS03+MPLアジュバント添加ワクチン

簡潔には、AS03+MPLアジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンは、I型ガラスバイアル(抗原容器)中に用意された濃縮3価不活化スプリットビリオン抗原(335 μl)と、AS03+MPLアジュバント(360 μl)を含有する前充填のI型ガラス注射器(アジュバント容器)とからなる2成分ワクチンである。注射時に、AS03+MPLアジュバントを含有する注射器を用いることによって、バイアルから抗原容器の中身を取り出し、その後その注射器を穏やかに

50

混合させる。注射の前に、使用済みの注射針を筋肉内用の注射針によって置換し、容積を530 μlに修正する。1用量の再構成、かつAS03+MPLアジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンは、530 μlに相当する。AS03+MPLアジュバント添加ワクチンの再構成の際に各インフルエンザ株について15 μg HAを得るために、不活化スプリットビリオン抗原は、Fluarix(商標)(すなわち30 μg HA/ml)と比較して、抗原容器内で2倍濃縮されている(すなわち60 μg HA/ml)。

【0548】

再構成、かつアジュバント添加のインフルエンザワクチン1用量の組成は、インフルエンザ株を除いて、表45(実施例XIを参照)に報告されているものと同一である。両ワクチンとも筋肉内投与した。

10

【0549】

VIII.3. CMIの目的、エンドポイント、および結果

CMIの目的は、AS03またはAS03+MPLでアジュバント添加された製剤と、いかなるアジュバントも添加されていない組成物との間で、いずれの免疫原性組成物が、インフルエンザ抗原をワクチン接種された個体のCD4介在性およびCD8介在性免疫について、最も強い免疫賦活性を有するかを決定することであった。

【0550】

VIII.3.1. CMIのエンドポイントおよび結果

観測された変数

0および21日目における、5種の異なったサイトカインへの、10⁶当たりのサイトカイン陽性CD4/CD8細胞の頻度。各試験は、以下の抗原に対するCD4/CD8 T細胞の応答を定量化する。

20

-下記3種の抗原のプール

-New Caledonia抗原

-Wyoming抗原

-Jiangsu抗原。

【0551】

派生変数

以下の5つの異なった試験で発現された抗原特異的なCD4およびCD8-T細胞応答。

【0552】

(a)少なくとも2種の異なったサイトカイン(CD40L、IL-2、IFN 、TNF)を産生する細胞

30

(b)少なくともCD40Lおよびもう1種のサイトカイン(IL-2、TNF 、IFN)を産生する細胞

(c)少なくともIL-2およびもう1種のサイトカイン(CD40L、TNF 、IFN)を産生する細胞

(d)少なくともIFN およびもう1種のサイトカイン(IL-2、TNF 、CD40L)を産生する細胞

(e)少なくともTNF およびもう1種のサイトカイン(IL-2、CD40L、IFN)を産生する細胞

【0553】

CMI応答の分析

CMI分析は、総ワクチン接種コホートに基づいて行った。

【0554】

(a)各治療群において、応答して分泌しているCD4/CD8 Tリンパ球の頻度を、各ワクチン接種群、各時点(0日目、21日目)、ならびに各抗原、すなわちNew Caledonia、Wyoming、Jiangsu、および上記異なった3株のプールについて測定した。

40

【0555】

(b)5種の異なったサイトカインそれぞれにおける各ワクチン接種群および各抗原の時点(POST-PRE)応答の間にある個人差の記述統計。

【0556】

(c)5種の異なったサイトカインに関する、

-New Caledonia、Wyoming、Jiangsu、および上記3株のプールに対するCD4 T細胞応答

-New Caledonia、Wyoming、Jiangsu、および上記3株のプールに対するCD8 T細胞応答の上記3群の比較。

50

【0557】

(d) ノンパラメトリック検定(クラスカル-ワオリス検定)を用いて、上記3群の間にある部位の相違を比較し、5種の異なったサイトカインそれぞれにおける各抗原について統計的なp値を計算した。

【0558】

(e) ウィルコクソン検定を用いて、Flu AS03+MPL対Fluarix、Flu AS03+MPL対Flu AS03、およびFlu AS03対Fluarixの間で、それぞれ2群における一対一比較を検定した。

【0559】

(f) すべての有意性検定は、両側検定であった。0.05以下のP値を、統計的に有意であるとした。

10

【0560】

VIII.3.2. CMIの結果

結果は、CD4 T細胞またはCD8 T細胞亜集団内におけるサイトカイン陽性のCD4 T細胞またはCD8 T細胞の頻度として表した。

【0561】

抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度

(a) 実施例IIIで行った測定と同様に、各時点(0日目、21日目)、各抗原、および各ワクチン接種群(プール、New Caledonia、Wyoming、およびJiangsu)について、応答して分泌している抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度を測定した。

20

【0562】

(b) クラスカル-ワオリス検定によって、上記3群の間にある抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度の相違を比較したところ、すべてのp値が0.05未満であり、統計的に有意であるとされた。

【0563】

(c) ウィルコクソン検定によって、Flu AS03+MPL群とFluarix群との間の抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度の相違を比較したところすべてのp値が0.05未満であり、統計的に有意であるとされた。

【0564】

(d) ウィルコクソン検定によって、Flu AS03群とFluarix群との間の抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度の相違を比較したところ、すべてのp値が0.05未満であり、統計的に有意であるとされた。

30

【0565】

(e) ウィルコクソン検定によって、Flu AS03群とFlu AS03+MPL群との間の抗原特異的なCD4 Tリンパ球の頻度の相違を比較したところ、すべてのp値が0.05超であり、統計的に有意でないとされた。

【0566】

CD4 Tリンパ球における時点(POST-PRE)間の個人差

(a) 実施例IIIで行ったのと同様に、CD4 Tリンパ球応答における時点(POST-PRE)間の個人差を、各ワクチン接種群、各抗原、および5種の異なったサイトカインについて計算した。

40

【0567】

(b) クラスカル-ワオリス検定によって、上記3群の間にある、抗原特異的なCD4-Tリンパ球応答におけるPOST-PREの個人差を比較したところ、すべてのp値が0.001未満であり、統計的に高度に有意であるとされた。

【0568】

(c) ウィルコクソン検定を用いて、Flu AS03+MPLとFluarixとの間にある、抗原特異的なCD4-Tリンパ球応答におけるPOST-PREの個人差を比較したところ、すべてのp値が0.05未満であり、統計的に有意であるとされた。

【0569】

(d) ウィルコクソン検定を用いて、Flu AS03とFluarixとの間にある、抗原特異的なCD4-T

50

リンパ球応答におけるPOST-PREの個人差を比較したところ、すべてのp値が0.001未満であり、統計的に高度に有意であるとされた。

【0570】

(e) ウィルコクソン検定を用いて、Flu AS03+MPLとFlu AS03との間にある、抗原特異的なCD4-Tリンパ球応答におけるPOST-PREの個人差を比較したところ、すべてのp値が0.05超であり、統計的に有意でないとされた。

【0571】

VIII.4. B細胞記憶応答の目的、エンドポイント、および結果

この研究の目的は、AS03+MPLアジュバントまたはAS03アジュバントを含有するFlu候補ワクチンを用いた1回の筋肉内ワクチン接種の際に、高齢者集団における、Flu抗原に特異的な記憶B細胞の頻度が、Fluarixと比較として、有意に誘導されるかどうか調査することであった。記憶B細胞の頻度は、B細胞エリススポットアッセイによって評価した。

10

【0572】

VIII.4.1. B細胞記憶応答のエンドポイント

エンドポイントは以下の通りである。

(a) 0、21日目における、すべての対象のB細胞エリススポットによって、100万(10^6)のIgG産生プラズマ細胞のうちの特異的抗原プラズマ細胞の頻度として測定される、in vitro培養記憶B細胞内で生成された細胞。

20

(b) ワクチン接種後(21日目)と、ワクチン接種前(0日目)との間にある相違も、100万(10^6)の抗体産生細胞当たりのインフルエンザ特異的抗体産生細胞の頻度として表す。

【0573】

VIII.4.2. B細胞記憶応答の結果

100万(10^6)の抗体産生細胞当たりのインフルエンザ特異的抗体産生細胞の頻度を測定した。結果は、ウィルコクソン検定による、Flu AS03+MPL群とFluarix群との間のFlu抗原特異的な記憶B細胞の頻度が、B/Jiangsu株では有意に($p<0.05$)高かったが、他の2株では有意でなかった(New Caledonia株およびWyoming株)ことを示した。

30

【0574】

Flu抗原特異的な記憶B細胞における、時点(post-pre)間の個人差も測定した。結果は、クラスカル-ワオリス検定による、Flu AS03+MPL群とFluarix群との間にある、Flu抗原特異的な記憶B細胞の頻度における時点(post-pre)間の個人差が、B/Jiangsu株では有意に($p<0.05$)高かったが、他の2株では有意でなかった(New Caledonia株およびWyoming株)ことを示した。

30

【0575】

結果を図18に示す。

【0576】

実施例IX

フェレットにおける、アジュバント添加およびアジュバント無添加のインフルエンザワクチンの前臨床評価(研究III)

IX.1. 原理および目的

この研究では、アジュバント無添加(Fluarix(商標))またはAS03+MPLでアジュバント添加された市販のGSKインフルエンザ3価スプリットワクチンを、以下に示す他の2種の市販サブユニットワクチンと比較した。

40

-Fluad(商標)、Chiron製のアジュバント添加サブユニットワクチン(アジュバントはChiron製MF59アジュバントである)。

-Agrippal(商標)、アジュバント無添加のChiron製市販のサブユニットワクチン。これは、本研究ではAS03アジュバントでアジュバント添加した。

【0577】

この実験の目的は、異種株でチャレンジされたフェレットの鼻汁における病徵(体温およびウイルス排泄)を低減させるこれらのワクチンの能力を評価することであった。

【0578】

50

エンドポイントは以下の通りであった。

- 1) 第1エンドポイント: 異種チャレンジ後における鼻洗浄物中のウイルス排泄の低減。
- 2) 第2エンドポイント: プライミングおよび異種チャレンジ周辺における、IHAによる体液性応答の分析および体温のモニタリング。

【0579】

IX.2. 実験計画

IX.2.1. 治療/群

週齢14~20週間の雌フェレット(*Mustela putorius furo*)をMISAY Consultancy(英国ハンプシャー(Hampshire))から入手した。0日目に、フェレットを異なる亜型株であるH1N1A/Stockholm/24/90で鼻腔内にプライミングした(4 Log TCID₅₀/ml)。21日目に、H1N1 A/Ne w Caledonia/20/99、H3N2 A/Wyoming/3/2003、およびB/Jiangsu/10/2003の組合せを完全なヒト用量(1mlワクチン用量、15 µg HA/株)でフェレットに筋肉内注射した。次に、42日目に、鼻腔内経路によって異型株であるH3N2A/Panama/2007/99をフェレットにチャレンジした(4.51 Log TCID₅₀/ml)。群(6匹のフェレット/群)を表41に示す。行われた読み取りを表42に詳述する。

【表41】

表41

| 群 | 抗原+用量 | 配合+用量 | コメント (実験:スケジュール /経路/チャレンジ) | 他の処置 |
|---|-----------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| 1 | 3価単味 (Fluarix(商標)) | 完全HD:15µg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90) 0日目 |
| 2 | 3価 AS03+MPL | 完全HD:15µg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90) 0日目 |
| 3 | Fluad(商標) | 完全HD:15µg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90) 0日目 |
| 4 | Agrippal(商標) AS03 | 完全HD:15µg HA/株 | IM;21日目 | プライミングH1N1 (A/Stockholm/24/90) 0日目 |

【0580】

IX.2.2. ワクチン製剤の調製

スプリット3価単味(アジュバント無添加):1mlの製剤

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用蒸留水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち、1ml当たり375 µgのTween80、55 µgのTriton X100、および50 µgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1およびH3N2各株15 µg、ならびにB株17.5 µgを添加し、その際、各添加の間に10分間搅拌する。上記製剤を15分間室温で搅拌し、直接投与しない場合には4で保存する。

【0581】

AS03+MPLでアジュバント添加されたスプリット3価:1mlの製剤

10倍濃縮されたPBS(1倍濃縮のときにpH7.4)ならびにTween80、Triton X100、およびVESを含有する混合物(量には株に存在する界面活性剤を考慮に入れる)を注射用蒸留水に添加する。得られる界面活性剤の量は以下の通り、すなわち:1ml当たり375 µgのTween80、55 µgのTriton X100、および50 µgのVESである。5分間の搅拌の後に、H1N1、H3N2、およびBの各株15 µgを添加し、その際各添加の間に10分間搅拌する。15分間の搅拌の後に、250 µlのSB62エマルジョン(実施例II.1で教示されている通りに調製する)を添加する。この混

10

20

30

40

50

合物を、再度15分間攪拌し、その直後に25 μ gのMPLを添加する。上記製剤を15分間室温で攪拌し、直接投与しない場合には4^oCで保存する。

【0582】

Fluad(商標)製剤:1mlの製剤

PBS緩衝剤pH7.4中にFluad(商標)ワクチンの2倍希釀を調製する。

【0583】

Agrippal(商標)AS03製剤:1mlの製剤

1用量のAgrippal(商標)に、250 μ lのPBS緩衝液pH7.4を添加する。攪拌の後、250 μ lのS B62エマルジョン(実施例11.1で教示されている通りに調製する)を添加する。この混合物を室温で攪拌する。

10

【0584】

IX.2.2. 読み取り

【表42】

表42

| 読み取り | 時点 | 試料タイプ | I/Po | 分析方法 |
|----------|--|------------|------|------|
| ウイルス排出 | プライミング後の-3日目から+7日目 チャレンジの+1日目から+5日目 | 鼻洗浄 | In | 力価測定 |
| 体温モニタリング | プライミング後の-3日目から+4日目 チャレンジの-2日目から+4日目 | 腹腔内のインプラント | In | 遠隔測定 |
| IHA | プライミング前、後、ワクチン接種後、チャレンジ後 | 血清 | In | IHA |

20

In=個体/Po=プール

【0585】

IX.3. 結果(図19から22)

30

IX.3.1. 体温モニタリング

個体の体温を、送信機を用い、遠隔測定記録によってモニターした。腹腔内腔に設置する前に、すべてのインプラントを検査して、新装し、DSIによって新たな較正を行った。これらの測定中、すべての動物を单一ケージに個別に収容した。体温は、チャレンジの2日前からチャレンジの4日後まで、15分間毎にモニターし、正午までの平均体温を計算した。結果を図19に示す。

【0586】

結果

アジュバント無添加(単味)の3価スプリット(Fluarix(商標))またはサブユニットワクチンFluad(商標)(これはMF59水中油型エマルジョンを含有する)を用いてフェレットの免疫処置を行った後では、チャレンジ後に体温のピークが観察された。フェレットを、AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットワクチンで免疫処置した後でも、あるいはAS03でアジュバント添加されたサブユニットAgrippal(商標)で免疫処置した後でも、ピークは観察されなかった。結論として、チャレンジ後における体温上昇の予防における、AS03含有ワクチンの付加価値が、試験されたスプリットワクチンおよびサブユニットワクチンの両方で示された。これは、MF59含有ワクチンが、フェレットにおけるチャレンジ後の体温上昇を予防できなかったことと対照的である。

40

【0587】

IX.3.2. ウイルス排泄

1群当たり6匹の動物について、鼻洗浄液のウイルス力価測定を行った。鼻洗浄は、覚醒

50

している動物の両方の鼻孔に5mlのPBSを投与することによって行った。接種物をペトリ皿に収集し、ドライアイス(-80℃)上の試料容器中に置いた。

【0588】

すべての鼻腔試料は、いかなる細菌汚染も除去するために、最初に、Spin Xフィルター(Costar)に通して無菌濾過した。鼻洗浄液の連続10倍の希釈物50μlを、50μlの培地を含有するマイクロタイタープレート中に移した(10ウェル/希釈)。その後、100μlのMDCK細胞(2.4×10^5 細胞/ml)を各ウェルに添加し、35℃で5~7日間インキュベートした。5~7日間のインキュベーションの後、培養培地を穏やかに除去し、培地を含有する100μlの1/20WST-1を添加して、さらに18時間インキュベートする。

【0589】

生存細胞によるWST-1の還元の際に產生される黄色のホルマザン色素の強度は、ウイルス力価測定アッセイの終わりに、ウェル中に存在する生存細胞数に比例しており、適切な波長(450ナノメートル)で各ウェルの吸収を測定することによって定量化される。カットオフは、未感染の対照細胞の平均ODと定義され、0.3 OD(0.3 ODは未感染の対照細胞のOD +/- 3 StDevに対応している)である。正のスコアはODが<カットオフであるときと定義され、その反対に、負のスコアは、ODが>カットオフであるときと定義される。ウイルス排泄力価は、「ReedおよびMuench」によって測定し、 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ で表した。

10

【0590】

結果

結果を図20に示す。アジュバント無添加(単味)の3価スプリットワクチン(Fluarix(商標))、またはFluad(商標)サブユニットワクチンで、フェレットを免疫処置した後における、減少が極めて少なかったウイルス排泄と比較して、AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットワクチン、またはAS03でアジュバント添加されたAgrippal(商標)サブユニットワクチンでチャレンジされた後には、より少ないウイルス排泄が観測された。

20

【0591】

体温上昇に関して論じたことと同様に、MF59含有ワクチンとの比較における、AS03含有ワクチンの付加価値が観測された。

【0592】

IX.3.3. HI力価

H3N2インフルエンザウイルス株に対する抗赤血球凝集素抗体力価を、血球凝集抑制試験(HI)を用いて測定した。HI試験の原理は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)によるニワトリ赤血球(RBC)の赤血球凝集反応を抑制する特異的抗インフルエンザ抗体の能力に基づいている。血清は、最初に、25%のノイラミニダーゼ溶液(RDE)で処理し、非特異的な抑制因子を除去するために熱不活化させた。前処置の後、血清の2倍希釈物を4赤血球凝集反応単位の各インフルエンザ株と共にインキュベートした。その後、ニワトリ赤血球を添加し、凝集の抑制をスコアリングした。力価は、赤血球凝集反応を完全に抑制した最も高い血清希釈率の逆数として表した。最初の血清希釈率は1:10であったので、検出不可能なレベルは、5に等しい力価としてスコアリングした。

30

【0593】

結果

H3N2 A/Wyomingで免疫処置した後では、フェレットをアジュバント無添加(単味)の3価スプリットワクチン(Fluarix(商標))またはFluad(商標)サブユニットワクチンで免疫処置した後で観測される体液性応答と比較して、より高い体液性応答(HI力価)が、AS03+MPLでアジュバント添加した3価スプリットワクチンまたはAS03でアジュバント添加されたAgrippal(商標)サブユニットワクチンで免疫処置されたフェレットで観測された(図21)。

40

【0594】

H3N2 A/Wyomingで免疫処置した後では、3価スプリット単味またはFluadで免疫処置されたフェレットと比較して、より高い体液性応答(HI力価)が、AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットまたはAS03でアジュバント添加されたAgrippal(商標)で免疫処置されたフェレットで、チャレンジ株として使用されたドリフト株H3N2 A/Panamaに対して観

50

測された(図22)。

【0595】

本発明者らのアジュバント(AS03またはAS03+MPL)で観測された、異種株に対するこの交差反応は、AS03+MPLでアジュバント添加された3価スプリットワクチンまたはAS03でアジュバント添加されたAgrippal(商標)サブユニットワクチンで免疫処置され、その後この異種株でチャレンジされたフェレットで観測された保護と相關している。AS03含有ワクチンによって誘導された、異種株に対するこの交差反応は、MF59アジュバント添加ワクチン(Fluad(商標))では誘導されなかった。

【0596】

実施例X

スプリットインフルエンザ抗原調製物、およびMPLを含むAS03アジュバントまたはMPLを含まないAS03アジュバントを含有するワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験:90および180日目の免疫原性持続データ

X.1. 研究計画

筋肉内投与されたAS03アジュバントまたはAS03+MPLアジュバント含有のGlaxoSmithKline Biologicals製インフルエンザ候補ワクチンの反応原性および免疫原性をFluarix(商標)ワクチン(ベルギーでは-Rix(商標)として知られている)と比較して評価するための、65歳超(65歳)の高齢者集団における、第1相オープン無作為対照試験。この研究は、実施例VIIIで報告されたことに従う。

【0597】

以下の3つの平行群の評価を行った。

- ・再構成、かつAS03アジュバント添加のSVインフルエンザワクチン1用量の投与を受ける50名の対象からなる1群(Flu AS03)
- ・再構成、かつAS03+MPLアジュバント添加のSVインフルエンザワクチン1用量の投与を受ける50名の対象からなる1群(Flu AS03+MPL)
- ・Fluarix(商標)1用量の投与を受ける50名の対象からなる1対照群(Fluarix)

【0598】

X.2. 免疫原性の結果

X.2.1. 体液性免疫応答のエンドポイントおよび結果

AS03およびAS03+MPLアジュバント添加ワクチンによって誘導された体液性免疫応答およびその持続性を評価するために、各治療群について、以下のパラメータを計算した。

【0599】

0、21、90、および180日目における、ワクチン中に提示された3株のインフルエンザウイルス株それぞれに対して別々に試験された血清赤血球凝集抑制(HI)抗体力値(抗H1N1、抗H3N2、および抗B抗体)。

【0600】

- ・0、21、90、および180日目における、95%CIを有する血清HI抗体GMT
- ・21、90、および180日目における95%CIを有するセロコンバージョン率
- ・21日目における95%CIを有するコンバージョン係数
- ・0、21、90、および180日目における95%CIを有する血清保護率。

【0601】

結果

95%CIを有するHI抗体GMTを図23に示す。3株のワクチン株すべての抗体のワクチン接種前GMTは、それら3群の中では同じ範囲内にあった。ワクチン接種後の抗赤血球凝集抗体レベルは有意に増大した。しかし、上記3株のワクチン株の抗体のワクチン接種後GMTはすべてのワクチンで同じ範囲内のままであった。21日目に、A/New CaledoniaおよびB/Jiangsuでは、Fluarixと比較して、2種のアジュバント添加ワクチンの方が好ましいというかすかな傾向が見出され、これら2種のアジュバント添加ワクチンの間では、A/Wyoming株およびB/Jiangsu株に関しては、FLU AS03で、より高いGMTが観測された。

【0602】

10

20

30

40

50

同じ傾向が90日目に観察された。180日目には、上記3株のワクチン株の抗体のGMTが、上記3種のワクチンで同じ範囲内にあった。

【0603】

すべてのインフルエンザワクチンが、60歳以上の対象におけるインフルエンザ不活化ワクチン年間登録のための欧州当局の規定[「Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes」(CPMP/BWP/214/96)]を満たしていた。

【0604】

ワクチン接種の3カ月(90日間)後および6カ月(180日間)後には、血清保護率は、どの検査群を考慮しても、依然として、欧州当局によって規定されている最低率である60%より高かった。90日目には、セロコンバージョン率は、依然として、A/New Caledonia用のFlu arixを除いて、上記3つのワクチン群のすべてのワクチン株で、欧州当局によって規定されている最低率である30%を達成していた。180日目には、A/Wyoming株およびB/Jiangsu株に関しては上記3種のワクチンで、依然としてそれが達成されていたが、A/New Caledonia株に関しては達成されていなかった(表43および表44)。

【表43】

表43 1:40に等しいかそれを超える血清赤血球凝集抑制力値を有するワクチン受容者の割合としての血清保護率(免疫原性に関するATPコホート)

| 抗体 | 群 | タイミング | ≥1:40 | | 95%CI | | |
|-----------------|--------------|----------|-------|----|-------|------|-------|
| | | | N | n | % | LL | UL |
| A/New Caledonia | Flu AS03+MPL | PRE | 50 | 28 | 56.0 | 41.3 | 70.0 |
| | | PI(D21) | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 |
| | | PI(D90) | 50 | 43 | 86.0 | 73.3 | 94.2 |
| | | PI(D180) | 50 | 39 | 78.0 | 64.0 | 88.5 |
| | Fluarix | PRE | 50 | 26 | 52.0 | 37.4 | 66.3 |
| | | PI(D21) | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 |
| | | PI(D90) | 50 | 38 | 76.0 | 61.8 | 86.9 |
| | | PI(D180) | 50 | 34 | 68.0 | 53.3 | 80.5 |
| | FluAS03 | PRE | 49 | 28 | 57.1 | 42.2 | 71.2 |
| | | PI(D21) | 49 | 48 | 98.0 | 89.1 | 99.9 |
| | | PI(D90) | 49 | 45 | 91.8 | 80.4 | 97.7 |
| | | PI(D180) | 49 | 38 | 77.6 | 63.4 | 88.2 |
| A/Wyoming | Flu AS03+MPL | PRE | 50 | 33 | 66.0 | 51.2 | 78.8 |
| | | PI(D21) | 50 | 47 | 94.0 | 83.5 | 98.7 |
| | | PI(D90) | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 |
| | | PI(D180) | 50 | 45 | 90.0 | 78.2 | 96.7 |
| | Fluarix | PRE | 50 | 32 | 64.0 | 49.2 | 77.1 |
| | | PI(D21) | 50 | 50 | 100 | 92.9 | 100.0 |
| | | PI(D90) | 50 | 49 | 98.0 | 89.4 | 99.9 |
| | | PI(D180) | 50 | 50 | 100 | 92.9 | 100.0 |
| | FluAS03 | PRE | 49 | 34 | 69.4 | 54.6 | 81.7 |
| | | PI(D21) | 49 | 48 | 98.0 | 89.1 | 99.9 |
| | | PI(D90) | 49 | 46 | 93.9 | 83.1 | 98.7 |
| | | PI(D180) | 49 | 47 | 95.9 | 86.0 | 99.5 |
| B/Jiangsu | Flu AS03+MPL | PRE | 50 | 19 | 38.0 | 24.7 | 52.8 |
| | | PI(D21) | 50 | 50 | 100 | 92.9 | 100.0 |
| | | PI(D90) | 50 | 47 | 94.0 | 83.5 | 98.7 |
| | | PI(D180) | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 |
| | Fluarix | PRE | 50 | 17 | 34.0 | 21.2 | 48.8 |
| | | PI(D21) | 50 | 48 | 96.0 | 86.3 | 99.5 |
| | | PI(D90) | 50 | 47 | 94.0 | 83.5 | 98.7 |
| | | PI(D180) | 50 | 47 | 94.0 | 83.5 | 98.7 |
| | FluAS03 | PRE | 49 | 25 | 51.0 | 36.3 | 65.6 |
| | | PI(D21) | 49 | 49 | 100 | 92.7 | 100.0 |
| | | PI(D90) | 49 | 47 | 95.9 | 86.0 | 99.5 |
| | | PI(D180) | 49 | 46 | 93.9 | 83.1 | 98.7 |

N=利用可能な結果を有する対象の数

n/%=所定範囲内に力値を有する対象の数/パーセント

PRE=ワクチン接種前の力値

PI(D21)=21日目におけるワクチン接種後血液採取

PI(D90)=90日目におけるワクチン接種後血液採取

PI(D180)=180日目におけるワクチン接種後血液採取

【表44】

表44 ワクチン接種後の各時点での血清 HI 効価が 0 日目と比較して少なくとも 4 倍増大しているワクチン受容者の割合として定義された、赤血球凝集抑制(HI)抗体効価のセロコンバージョン率(免疫原性に関する ATP コホート)

| ワクチン株 | タイミング | 群 | N | 4 倍 | | | |
|-----------------|--------|--------------|----|-----|------|-------|------|
| | | | | n | % | 95%CI | |
| | | | | | | LL | UL |
| A/NEW CALEDONIA | 21 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 30 | 60.0 | 45.2 | 73.6 |
| | | Fluarix | 50 | 25 | 50.0 | 35.5 | 64.5 |
| | | Flu AS03 | 49 | 31 | 63.3 | 48.3 | 76.6 |
| | 90 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 19 | 38.0 | 24.7 | 52.8 |
| | | Fluarix | 50 | 14 | 28.0 | 16.2 | 42.5 |
| | | Flu AS03 | 49 | 17 | 34.7 | 21.7 | 49.6 |
| | 180 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 12 | 24.0 | 13.1 | 38.2 |
| | | Fluarix | 50 | 11 | 22.0 | 11.5 | 36.0 |
| | | Flu AS03 | 49 | 10 | 20.4 | 10.2 | 34.3 |
| A/WYOMING | 21 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 46 | 92.0 | 80.8 | 97.8 |
| | | Fluarix | 50 | 38 | 76.0 | 61.8 | 86.9 |
| | | Flu AS03 | 49 | 40 | 81.6 | 68.0 | 91.2 |
| | 90 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 33 | 66.0 | 51.2 | 78.8 |
| | | Fluarix | 50 | 33 | 66.0 | 51.2 | 78.8 |
| | | Flu AS03 | 49 | 31 | 63.3 | 48.3 | 76.6 |
| | 180 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 27 | 54.0 | 39.3 | 68.2 |
| | | Fluarix | 50 | 23 | 46.0 | 31.8 | 60.7 |
| | | Flu AS03 | 49 | 26 | 53.1 | 38.3 | 67.5 |
| B/JIANGSU | 21 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 44 | 88.0 | 75.7 | 95.5 |
| | | Fluarix | 50 | 38 | 76.0 | 61.8 | 86.9 |
| | | Flu AS03 | 49 | 43 | 87.8 | 75.2 | 95.4 |
| | 90 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 37 | 74.0 | 59.7 | 85.4 |
| | | Fluarix | 50 | 36 | 72.0 | 57.5 | 83.8 |
| | | Flu AS03 | 49 | 37 | 75.5 | 61.1 | 86.7 |
| | 180 日目 | Flu AS03+MPL | 50 | 32 | 64.0 | 49.2 | 77.1 |
| | | Fluarix | 50 | 29 | 58.0 | 43.2 | 71.8 |
| | | Flu AS03 | 49 | 31 | 63.3 | 48.3 | 76.6 |

N=ワクチン接種前の結果とワクチン接種後の結果との両方が利用可能である対象の数

n/%=少なくとも 4 倍の増大を有する対象の数/パーセント

95%CI=正確な 95% 信頼区間; LL=下限、 UL=上限

【0606】

X.2.2. CMI 応答のエンドポイントおよび結果

アジュバント添加ワクチンによって誘導された細胞性免疫応答およびその持続性を評価するために、各治療群について、以下のパラメータを計算した。

【0607】

各時点(0、21、90、および180日目)における、異なった試験での 10^6 当たりのサイトカイン陽性CD4/CD8細胞の頻度(0および21日目には、New Caledonia、Wyoming、およびJiangsu抗原、ならびにプールを別々に考慮し、90および180日目には、New Caledonia、Wyoming、Jiangsu、およびNew York抗原、ならびにプールを別々に考慮した)。

【0608】

- ・オールダブル: 少なくとも2つの異なったサイトカインを産生する細胞(CD40L、IFN- γ 、IL-2、TNF- α)。
- ・CD40L: 少なくともCD40Lおよびもう1種のサイトカイン(IFN- γ 、IL-2、TNF- α)を産生する細胞。
- ・IFN- γ : 少なくともIFN- γ およびもう1種のサイトカイン(CD40L、IL-2、TNF- α)を産生

10

20

30

40

50

する細胞。

- ・IL-2:少なくともIL-2およびもう1種のサイトカイン(CD40L、IFN- γ 、TNF- β)を産生する細胞。
- ・TNF- β :少なくともTNF- β およびもう1種のサイトカイン(CD40L、IFN- γ 、IL-2)を産生する細胞。

【0609】

結果

主要な知見は以下の通りであった(図24)。

【0610】

(a)ワクチン接種の21日後に、サイトカイン陽性CD4 T細胞(IL-2、CD40L、TNF- β 、およびIFN- γ)の頻度は、2つのアジュバント添加ワクチン群で、Fluarix群と比較して有意に高かった。しかし、それら2つのアジュバント間には有意な相違が検出されなかった。

【0611】

(b)アジュバント添加ワクチンとFluarixとの間におけるすべての統計的相違は、180日目における以下の例外を除いて、最大90日目および180日目まで維持されていた。

・オールダブル、CD40L、IFN- γ 、およびIL2(Wyoming株のみ)に関して、ならびにオールダブル、CD40L、およびTNF- β (New York株のみ)に関しては、FluAS03/MPLとFluarixとの間に統計的に有意な相違が見出されなかった。

・IL2(Jiangsu株のみ)に関しては、FluAS03とFluarixとの間で統計的に有意な相違が見出されなかった。

【0612】

(c)上記2種のアジュバント添加ワクチン間における統計的に有意な相違の欠如は、最大90日目および180日目まで確認された。

【0613】

(d)調査したすべてのサイトカイン(IL-2、CD40L、TNF- β 、およびIFN- γ)に関して、CD4 Tリンパ球応答における、ワクチン接種前とワクチン接種後(21日目)との間の相違は、上記2種のアジュバント添加ワクチンで、Fluarix(商標)と比較して有意に大きかった。しかし、両アジュバント間では有意な相違が検出されなかった。

【0614】

(e)ワクチン接種は、いかなる治療群でも、測定可能な変化をCD8応答に与えなかった。

【0615】

実施例X I

スプリットインフルエンザ抗原調製物、およびMPLを含むAS03アジュバントを含有するワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験

XI.1. 研究計画および目的

AS03+MPLアジュバントを含有するGlaxoSmithKline Biologicals製インフルエンザ候補ワクチンの反応原性および免疫原性を評価するために、2004年に同じ候補ワクチンで事前にワクチン接種されている65歳超(>65歳)の高齢者集団における第I/II相オープン対照試験を行った。免疫原性および安全評価には、参照としてFluarix(商標)(ベルギーではrix(商標)として知られている)ワクチンを用いた。

【0616】

以下の2つの平行群を評価した。

- ・以前の臨床試験中に再構成されたアジュバント添加のインフルエンザワクチン1用量の投与を事前に受けた約50名の対象からなる1群
- ・以前の臨床試験中にFluarix(商標)1用量の投与を事前に受けた約50名の対象からなる1対照群(Fluarix)

【0617】

この研究の目的の1つは、初回投与の約1年後に投与されたアジュバント添加インフルエンザワクチンFlu AS03+MPLでのワクチン再接種の体液性免疫応答(抗赤血球凝集素および抗MPL力値)を評価することであった。比較を目的として、以前の試験で既にFluarix(商標)

10

20

30

40

50

)の投与を受けた対象は、1用量の市販ワクチンの投与を受け、この試験の対照群を形成した。

【0618】

XI.2. ワクチン組成物および投与

上記3種のワクチンに使用された株は、2005-2006北半球四半期用にWHOによって推奨されたもの、すなわち、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/New California/7/2004(H3N2)、およびB/Jiangsu/10/2003であった。比較器として用いられた市販ワクチンであるFluarix (商標)/ -Rix(商標)と同様に、AS03+MPLアジュバント添加ワクチン(本明細書では以下「アジュバント添加ワクチン」と短縮)は、1用量当たりそれぞれ15 μg赤血球凝集素(HA)のインフルエンザウイルス株を含有している。

10

【0619】

上記アジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンは、I型ガラスバイアル中に用意した濃縮3価不活化スプリットビリオン抗原と、AS03+MPLアジュバントを含有する前充填のI型ガラス注射器とからなる2成分ワクチンである。それは、実施例11に詳述されている方法に従って調製した。

【0620】

注射時に、濃縮3価不活化スプリットビリオン抗原を含有しているバイアル中に、アジュバントを含有する前充填された注射器の内容物を注入する。混合の後、内容物を注射器中に戻し、注射針を筋肉内用の注射針によって置換する。再構成アジュバント添加インフルエンザ候補ワクチンの1用量は、0.7mlに相当する。アジュバント添加インフルエンザ候補ワクチンは無保存剤ワクチンである。

20

【0621】

1用量の再構成アジュバント添加インフルエンザワクチンの組成を表45に示す。両ワクチンとも筋肉内投与した。

【表45】

表45 再構成ワクチンアジュバント添加(AS03+MPL)インフルエンザ候補ワクチンの組成

| 成分 | 量/用量 |
|---------------------------------|----------|
| <u>不活化スプリットビリオン</u> | |
| - A/New Caledonia/20/99(H1N1) | 15μg HA |
| - A/New California/7/2004(H3N2) | 15μg HA |
| - B/Jiangsu/10/2003 | 15μg HA |
| <u>アジュバント</u> | |
| <u>SB62エマルジョン</u> | |
| - (スクアレン) | 10. 68mg |
| - (DL- α -トコフェロール) | 11. 86mg |
| - (ポリソルベート80-Tween 80) | 4. 85mg |
| MPL | 25μg |

30

【0622】

XI.3. 免疫原性結果

XI.3.1. 抗HA体液性免疫応答のエンドポイントおよび結果

観測された変数

0および21日目における、ワクチン中に提示された3株のインフルエンザウイルス株それぞれに対して別々に試験された血清赤血球凝集抑制(HI)抗体力価(抗H1N1、抗H3N2、および抗B抗体)。

40

【0623】

派生変数(95%の信頼区間を有する)

(f)ワクチン接種前およびワクチン接種後における、95%の信頼区間(95%CI)を有する、血清HI抗体の幾何平均力価(GMT)

(g)21日目における、95%CIを有するセロコンバージョン率*

50

(h)21日目における95%CIを有するセロコンバージョン係数^{**}

(i)21日目における95%CIを有する血清保護率^{***}

【0624】

*セロコンバージョン率は、各ワクチン株について、<1:10のワクチン接種前HI力価および1:40のワクチン接種後力価、あるいは1:10のワクチン接種前力価およびワクチン接種後力価における最小4倍の増大を有する被ワクチン接種者のパーセントと定義される。

【0625】

**セロコンバージョン係数は、各ワクチン株について、21日目の血清HI GMTにおける、0日目と比較した増大の倍率と定義される。

【0626】

***保護率は、保護を示すと通常認められている40の血清HI力価をワクチン接種後に有する被ワクチン接種者のパーセント(各ワクチン株について)と定義される。

【0627】

結果

予測通り、両群中の大多数の対象は、上記3株に関してワクチン接種前に既に血清陽性であった。3株のワクチン株すべてのワクチン接種前GMTは、上記2群中で同じ範囲内にあった。Flu AS03+MPL群では、95%CIは重なっていたが、3株のワクチン株すべてに関して、ワクチン接種後に、Fluarix群と比較して、より高いGMTを有する傾向があった(図25)。

【0628】

上記2種のインフルエンザワクチンは、60歳以上の対象におけるインフルエンザ不活化ワクチン年間登録のための欧州当局の規定[「Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes」(CPMP/BWP/214/96)]を満たしていた(表46)。

【表46】

表46 21日目における血清保護率、セロコンバージョン率、およびコンバージョン係数(免疫原性に関するATPコホート)

| 株 | 群 | N | 血清保護率(HI力価≥40)% | セロコンバージョン率(≥4倍増)[95%CI]% | セロコンバージョン係数[95%CI]% |
|-----------------------|--------------|----|-------------------|--------------------------|---------------------|
| EU基準(>60歳) | | | >60% | >30% | >2.0 |
| A/New Caledonia(H1N1) | Flu+MPL-AS03 | 38 | 89.5[75.20~97.06] | 31.6[17.5~48.7] | 3.1[2.2~4.4] |
| | Fluarix | 45 | 82.2[67.95~92.00] | 31.1[18.2~46.6] | 2.5[1.8~3.5] |
| A/New York(H3N2) | Flu+MPL-AS03 | 38 | 92.1[78.62~98.34] | 78.9[62.7~90.4] | 8.8[6.1~12.5] |
| | Fluarix | 45 | 95.6[84.85~99.46] | 68.9[53.4~81.8] | 6.0[4.4~8.3] |
| B/Jiangsu(B) | Flu+MPL-AS03 | 38 | 100[90.75~100] | 57.9[40.8~73.7] | 5.1[3.7~7.0] |
| | Fluarix | 45 | 100[92.13~100] | 37.8[23.8~53.5] | 3.1[2.4~4.0] |

N=対象の総数;%=21日目に所定範囲内の力価を有する対象のパーセント;CI=信頼区間

【0629】

実施例XII

2つの異なる濃度のAS03およびMPLでアジュバント添加されたスプリットインフルエンザ抗原調製物含有ワクチンを用いた、65歳超の高齢者集団での臨床試験

XII.1. 研究計画および目的

高齢者集団(65歳以上)に投与された、様々なアジュバントを含有しているGlaxoSmithKline Biologicals製インフルエンザ候補ワクチンが、成人(18~40歳)に投与されたFluarix(商標)(ベルギーでは-Rix(商標)として知られている)と比較して、細胞性免疫応答に関して劣っていないことを実証するためのオープン無作為第I/II相試験。

【0630】

以下の4つの平行群を割り当てた。

(a)Fluarix(商標)1用量の投与を受ける75名の成人(18~40歳)からなる1対照群(Fluarix群)

(b)3:3:2で3群にランダム化された200名の高齢対象(65歳以上)

10

20

30

40

50

-AS03+MPLでアジュバント添加されたインフルエンザワクチンの投与を受ける75名の対象からなる1群(濃度1~25 μg)

-AS03+MPLでアジュバント添加されたインフルエンザワクチンの投与を受ける75名の対象からなる1群(濃度2~50 μg)

-Fluarix(商標)の1用量の投与を受ける50名の対象からなる参照Flu群

【0631】

一次目的

一次目的は、成人(18~40歳)に投与されたFluarix(商標)と比較して、高齢対象(65歳以上)に投与されたインフルエンザアジュバント添加ワクチンが、ワクチン接種後21日間に、少なくとも2つの異なったサイトカイン(CD40L、IL-2、TNF-、IFN-)を産生するインフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球の頻度に関して劣っていないことを実証することである。
10

【0632】

二次目的

二次目的は以下の通りである。

(a)高齢対象(65歳以上)における上記ワクチンの筋内投与後21日間ににおける、アジュバント添加の候補インフルエンザワクチンを用いたワクチン接種の安全性および反応原性を評価すること。Fluarix(商標)を参照として用いる。

(b)アジュバント添加のインフルエンザ候補ワクチンでワクチン接種した21、90、および180日後における、体液性免疫応答(抗赤血球凝集素力価)を評価することFluarix(商標)を参考として用いる。
20

【0633】

三次目的

三次目的は、アジュバント添加インフルエンザワクチンでワクチン接種した21、90、および180日後における、細胞性免疫応答(IFN-、IL-2、CD40L、およびTNF-の産生、ならびに記憶B細胞応答)を評価することである。Fluarix(商標)を参照として用いる。

【0634】

XII.2. ワクチンの組成および投与

AS03+MPL(1用量当たり25 μg)システムでアジュバント添加されたインフルエンザワクチンは、実施例VIに示した研究でも使用されている。AS03+MPL(1用量当たり50 μg)システムでアジュバント添加されたインフルエンザワクチンは、MPLの濃度が倍にされていることを除けば、同一組成のものである。工程は、AS03+MPLでアジュバント添加されたインフルエンザワクチンに関して実施例VIIIで記載したものと同じであり、MPLの濃度が倍であるということのみが相違している。
30

【0635】

対照:IM投与による完全用量のFluarix(商標)。

計画における1対象当たり4回の来院:0、21、90、および180日目。各来院時に、免疫原性を評価するためにの血液試料を収集する。

ワクチン接種計画:0日目にインフルエンザワクチンを単回注射

【0636】

XII.3. 免疫原性の結果

XII.3.1. CMIのエンドポイントおよび結果

一次エンドポイントの評価

21日目における、試験された10⁶当たりの、少なくとも2種の異なったサイトカイン(IL-2、IFN-、TNF-、およびCD40L)を産生するインフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球の頻度に関する、全対象のCMI応答。
40

【0637】

CMI応答の評価には、以下の通りにインフルエンザ特異的CD4の頻度を分析する。

アジュバント添加ワクチンでワクチン接種された群とFlu(若年)でワクチン接種された群との間における、インフルエンザ特異的CD4の頻度に関するGM比を、対数変換された力
50

価に関する共分散分析モデルを用いて得る。この共分散分析モデルは、固定効果としてワクチン群、そしてリグレッサーとしてワクチン接種前の対数変換力価を含んでいる。GM比およびそれらの98.75%CIは、モデルで対比される対応群の指數関数変換として得られる。調整GMの98.75%CIは、上記共分散分析モデルの群最小2乗平均の98.75%CIの指數関数変換によって得られる。

【0638】

結果-推測分析(表47)

「プール抗原II」でin vitro再刺激した後、21日目における、少なくとも2種のサイトカイン(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、およびCD40L)を産生するインフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球の調整GM比およびGM比(それらの98.75%CIを有する)を表47に示す。各アジュバント添加インフルエンザワクチンについて、GM比の両側98.75%CIの上限は、臨床上の限界である2.0よりはるかに小さい。これは、高齢対象に投与されたアジュバント添加のインフルエンザワクチンは両方とも、インフルエンザ特異的CD4のワクチン接種後頻度に関して、18～40歳の成人に投与されたFluarix(商標)ワクチンと比較して劣っていないことを示す。

【表47】

表47 少なくとも2種類のサイトカインを産生するインフルエンザ特異的CD4の調整GM比、21日目(免疫原性に関するATPコホート)

| | | 調整 GM 比 (Flu YNG/AS03+MPL(濃度 1)) | | | | |
|---------|----------------|-------------------------------------|--------|------|------|------|
| Flu(若年) | AS03+MPL(濃度 1) | 98.8%CI | | | | |
| N | 調整 GM | N | 調整 GM | 値 | LL | UL |
| 70 | 1995.3 | 72 | 2430.0 | 0.82 | 0.65 | 1.04 |

| | | 調整 GM 比 (Flu YNG/AS03+MPL(濃度 2)) | | | | |
|---------|----------------|-------------------------------------|--------|------|------|------|
| Flu(若年) | AS03+MPL(濃度 2) | 98.8%CI | | | | |
| N | 調整 GM | N | 調整 GM | 値 | LL | UL |
| 70 | 1979.4 | 72 | 2603.8 | 0.76 | 0.59 | 0.98 |

調整GM=ベースライン力価に対して調整された抗体の幾何平均;N=ワクチン接種前の結果とワクチン接種後の結果との両方が利用可能である対象の数;98.8%CI=調整GM比の98.8%信頼区間(共分散分析モデル:ベースラインに対して調整);LL=下限,UL=上限

【0639】

結果-記述分析(図26)

主要な知見は以下の通りであった。

【0640】

- ワクチン接種前、CMI応答は高齢者のものより若年成人のものの方が強い。

【0641】

- ワクチン接種後、

-若年成人(18～40歳)のCMI応答にはインフルエンザワクチンの追加免疫効果があった。

-アジュバント添加のインフルエンザワクチンの投与を受けた高齢者のCMI応答は、若年成人のCMI応答に匹敵する。

【0642】

・本発明者らがFluarix(18～40歳)とFlu/AS03+MPL(濃度1)とを比較した際には、調査したすべてのサイトカイン(IL-2、CD40L、TNF- α 、およびIFN- γ)のCD4 Tリンパ球応答における、ワクチン接種前とワクチン接種後との間の相違は、IFN- γ を除いてすべての試験で、アジュバント添加ワクチンを用いた場合、Fluarix(商標)(18～40歳)と比較して、有意に高かった。

【0643】

10

20

30

40

50

in vitro刺激は、ワクチンに含まれているA/H1N1/New-Caledoniaではなく、(i) B/Jian gsu、(ii) A/H3N2/New-York、および(iii) A/H3N2/WyomingのFlu株を用いて行われたことに留意するべきである。しかし、対象の部分集合から得られた、A/H1N1/New Caledoniaワクチン株を含む予備データは、それらの結果が類似したものであろうことを示している。

【0644】

結果-三次エンドポイントの評価(表48)

三次エンドポイントを評価するために、0、21、90、および180日目に、インフルエンザ特異的なCD4/CD8 Tリンパ球および記憶B細胞の頻度を測定した。

【0645】

0および21日目における各ワクチン接種群、各抗原に関して、インフルエンザ特異的なサイトカイン陽性CD4/CD8 Tリンパ球の頻度の概略を示した(記述統計)。

【0646】

ノンパラメトリック検定(ウィルコクソン検定)を用いて、上記2群(インフルエンザアジュバント添加ワクチン対Fluarix(商標))の間にある部位の相違を比較し、異なった試験それぞれにおける各抗原の統計的p値を計算した。

【0647】

21日目/0日目(ワクチン接種後/前)の応答の間にある個人差の記述統計を、各ワクチン接種群および異なった試験それぞれにおける各抗原に関して計算する。

【0648】

ノンパラメトリック検定(ウィルコクソン検定)を用いて、ワクチン接種後/前の個人差を比較し、異なった試験それぞれにおける各抗原の統計的p値を計算するであろう。

【0649】

インフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球の頻度の相違を比較するのに用いられたウィルコクソン検定から得られたp値を表48に示す。

【表48】

表48 推測統計:各時点におけるCD4T細胞のクラスカル-ワリス検定からのp-値(免疫原性に関するATPコホート)

| | p 値 | | | | | | | |
|--------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | 群1およびFlu (高齢) | | 群2およびFlu (高齢) | | 群1およびFlu (若年) | | 群2およびFlu (若年) | |
| | 0日目 | 21日目 | 0日目 | 21日目 | 0日目 | 21日目 | 0日目 | 21日目 |
| オールダブル | 0.4380 | 0.0003 | 0.4380 | 0.0003 | 0.0000 | 0.9014 | 0.0005 | 0.4889 |
| CD4OL | 0.3194 | 0.0002 | 0.3194 | 0.0002 | 0.0000 | 0.9841 | 0.0003 | 0.5412 |
| IFNy | 0.5450 | 0.0004 | 0.5450 | 0.0004 | 0.0000 | 0.5397 | 0.0001 | 0.7895 |
| IL2 | 0.3701 | 0.0008 | 0.3701 | 0.0008 | 0.0003 | 0.8557 | 0.0022 | 0.4766 |
| TFN α | 0.3716 | 0.0004 | 0.3716 | 0.0004 | 0.0000 | 0.8730 | 0.0013 | 0.2114 |

群1:AS03+MPL(濃度1)をアジュバント添加されたインフルエンザワクチン

群2:AS03+MPL(濃度2)をアジュバント添加されたインフルエンザワクチン

【0650】

主要な結論は以下の通りである。

【0651】

(a)インフルエンザ特異的CD4のワクチン接種前GM頻度は、高齢対象のすべての群で類似していたが、18から40歳の間の成の方が優れていた。

【0652】

(b)インフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球のワクチン接種後(21日目)の頻度は、アジュバント添加ワクチンでワクチン接種された高齢対象、およびFluarix(商標)でワクチン接種された18から40歳の間の成で類似していた。

【0653】

(c)高齢対象では、インフルエンザ特異的CD4 Tリンパ球のワクチン接種後(21日目)頻度は

10

20

30

40

50

、Fluarix(商標)でワクチン接種したものより、アジュバント添加ワクチンでワクチン接種した後の方が有意に高かった。

【0654】

(d)インフルエンザ特異的CD8 T細胞のワクチン接種前およびワクチン接種後のGM頻度は、本質的にはすべての群で類似していた。

【0655】

結果-体液性免疫応答のエンドポイントの評価

観測された変数

0、21、90、および180日目における、ワクチン中に提示された3株のインフルエンザウイルス株それぞれに対して別々に試験された血清赤血球凝集抑制(HI)抗体力価(抗H1N1、抗H3N2、および抗B抗体)。

10

【0656】

全ワクチン抗原に対するHI抗体のカットオフ値は、分析前に検査室によって定義された(そして、1:10に等しい)。血清陰性対象は、抗体力価がカットオフ値未満の対象である。血清陽性の対象は、抗体力価がカットオフ値以上である対象である。アッセイのカットオフ未満である抗体力価には、カットオフの半分の任意値を与える。

【0657】

HI抗体力価に基づいて、以下のパラメータを計算する。

【0658】

(j)対数変換力価の平均真数をとることによって計算される、0および21日目におけるHI抗体の幾何平均力価(GMT)。

20

【0659】

(k)0日目と比較した、21日目の血清HI GMTの増大の倍率と定義される、21日目のセロコンバージョン係数(SF)。

【0660】

(l)<1:10のワクチン接種前HI力価および1:40のワクチン接種後力価、あるいは1:10のワクチン接種前力価およびワクチン接種後力価における最小4倍の増大を有する被ワクチン接種者のパーセントと定義される、21日目のセロコンバージョン率(SC)。

30

【0661】

(m)血清HI力価が1:40である被ワクチン接種者のパーセントとして定義される、21日目の血清保護率(SPR)。

【0662】

GMの95%CIは、各群の中で別々に得る。最初に、対数変換力価は通常、未知の分散で分配されると仮定して、対数変換力価の平均の95%CIを得る。次に、対数変換力価平均の95%CIの指数関数変換によりGMの95%CIを得る。

【0663】

特定の抗体測定の欠失している血清学結果は、置換しない。したがって、所与の時点における血清学結果のない対象は、その時点のアッセイの分析には寄与しない。

【0664】

体液性免疫応答の結果(図27および表49)

40

3株のワクチン株すべてに対するHI抗体のワクチン接種GMTは、4つの治療群で同じ範囲内にあった。上記2種のアジュバントは、同じ集団における標準的Fluarixと比較して、ワクチン接種後に、高齢における体液性応答を増強する明確な影響を有した。

【0665】

GMTは、

- ・H1N1については、AS03+MPL(濃度2)で有意に高い。
- ・H3N2およびBについては、両方のアジュバントで有意に高い。

【0666】

ワクチン接種の21日後に、Fluarix(18~40歳)の対象は、New Caledonia株およびB/Jangsu株で、より高いHI応答を有した。

50

【0667】

表49に示す通り、上記アジュバント添加インフルエンザワクチンは、60歳以上の対象におけるスプリットビリオンインフルエンザワクチン年間登録のための欧州当局の規定[「Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes」(CPMP/BWP/214/96)]を上回るものであった。

【0668】

ワクチン接種後に、HI抗体の血清保護率に関して、Fluarix(65歳)群と以下のものとの間に統計的な相違があった。

- ・A/New Caledonia株でのFlu AS03+MPL(濃度2)

10

【0669】

各ワクチン株について、上記2種のインフルエンザアジュバント添加ワクチン群の血清保護率は、Fluarix(18~40歳)群と比較して、同じ範囲内にある。

【0670】

HI抗体のセロコンバージョン率に関して、Fluarix(65歳)群と以下のものとの間に統計的な相違があった。

- ・A/New Caledonia株でのFlu AS03+MPL(濃度2)
- ・B/Jiangsu株でのFlu AS03+MPL(濃度1)

【0671】

各ワクチン株について、上記2種のインフルエンザアジュバント添加ワクチン群のセロコンバージョン率は、New Caledonia株のものを除いて、Fluarix(18~40歳)群と比較して、同じ範囲内にある。

20

【表49】

表 49 21 日目における血清保護率、セロコンバージョン率、およびコンバージョン係数(免疫原性に関する ATP コホート)

| 株 | 群 | N | 血清保護率(HI 力値 ≥ 40)% | セロコンバージョン率(≥4 倍増)[95%CI]% | コンバージョン係数[95%CI]% |
|-----------------------|--------------------|----|--------------------|---------------------------|-------------------|
| EU 基準(>60 歳) | | | >60% | >30% | >2.0 |
| EU 基準(<60 歳) | | | >70% | >40% | >2.5 |
| A/New Caledonia(H1N1) | Flu(若年) | 75 | 100[95.20~100] | 77.3[66.2~86.2] | 35.1[21.9~56.4] |
| | Flu(高齢) | 49 | 71.4[56.74~83.42] | 30.6[18.3~45.4] | 3.7[2.4~5.7] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 1) | 75 | 90.5[81.48~96.11] | 55.4[43.4~67.0] | 6.4[4.5~9.0] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 2) | 75 | 98.7[92.79~99.97] | 74.7[63.3~84.0] | 9.2[6.4~13.3] |
| A/New York(H3N2) | Flu(若年) | 75 | 93.3[85.12~97.80] | 76.0[64.7~85.1] | 9.2[7.1~11.8] |
| | Flu(高齢) | 49 | 81.6[67.98~91.24] | 69.4[54.6~81.7] | 8.2[5.7~11.8] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 1) | 75 | 94.6[86.73~98.51] | 90.5[81.5~96.1] | 19.2[14.6~25.3] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 2) | 75 | 93.3[85.12~97.80] | 82.7[72.2~90.4] | 15.0[11.2~20.2] |
| B/Jiangsu(B) | Flu(若年) | 75 | 100[95.20~100] | 80.0[69.2~88.4] | 13.9[10.1~19.1] |
| | Flu(高齢) | 49 | 93.9[83.13~98.72] | 81.3[70.7~89.4] | 4.3[3.0~6.1] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 1) | 75 | 95.9[88.61~99.16] | 73.0[61.4~82.6] | 8.5[6.5~11.2] |
| | Flu AS03+MPL(濃度 2) | 75 | 98.7[92.79~99.97] | 66.7[54.8~77.1] | 7.6[5.6~10.2] |

N=対象の総数;%=21日目に所定範囲内の力値を有する対象のパーセント;CI=信頼区間

30

【0672】

XII.3.2. 免疫原性の結論

(a)インフルエンザ特異的CD4のワクチン接種前の頻度は、高齢成人では、18から40歳の間の成人と比較して、有意に劣っていた。Fluarix(商標)でワクチン接種した後、ワクチン接種後(21日目)の頻度は、高齢成人では、より若いものと比較して劣ったままであった。反対に、高齢対象にアジュバント添加ワクチンを接種した後では、18から40歳の間の成人におけるFluarix(商標)でのワクチン接種と比較して、インフルエンザ特異的CD4のワクチン接種後の頻度に関して劣っていないことが実証された。

40

【0673】

(b)HI抗体応答に関する体液性免疫応答に関しては、すべてのインフルエンザワクチンが、インフルエンザ不活化ワクチン年間登録のための欧州当局の規定[「Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes」(CPMP/BWP/214/96)]を満たしていた。高齢成人では、アジュバント添加ワクチンは、インフルエンザ赤血球凝集素に対して、少なくとも、Fluarix(商標)より強い傾向のある体液性免疫応答を媒介した。高齢対象において

50

アジュバント添加ワクチンによって媒介された各ワクチン株に対する体液性免疫応答における、Fluarix(商標)と比較して有意な相違の概略を表50に示す。アジュバント添加ワクチンを接種された高齢対象は、A/New York株に対して、21日目に、Fluarix(商標)をワクチン接種された18から40歳の間の成人と比較して、より高いワクチン接種後GMTおよびセロコンバージョン係数を有する傾向を示した。

【表 50】

表 50 年齢の対象の体液性免疫応答におけるアジュバント添加ワクチンと Fluarix との間の有意差

| | ワクチン接種後 の GMT | セロコンバー ジョン係数 | 血清保護率 | セロコンバー ジョン率 |
|------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Flu AS03+MPL (濃度 1) | A/New York B/Jiangsu | A/New York | - | B/Jiangsu |
| Flu AS03+MPL (濃度 2) | A/New York B/Jiangsu A/New Caledonia | A/New Caledonia | A/New Caledonia | A/New Caledonia |

【 0 6 7 4 】

XII.4. 反応原性の結果

XII.4.1. 有害事象(AE)に関する記録

7日間の追跡期間中(ワクチン接種日およびそれに続く6日間)に生じた検査症候(solicited symptom)(表51を参照)を記録した。21日間の追跡期間中(ワクチン接種の日およびそれに続く20+3日間)に生じた非検査症候(unolicited symptom)も記録した。以下のAEの強度は、表52の記載に従って評価した。

【表 51】

表 51 引き起こされた局所/全身性有害事象

| 引き起こされた局所有害事象 | 引き起こされた全身性有害事象 |
|---------------|----------------|
| 注射部位の疼痛 | 疲労 |
| 注射部位の発赤 | 発熱 |
| 注射部位の膨潤 | 頭痛 |
| 血腫 | 筋肉痛 |
| | 震え |
| | 注射された腕の関節痛 |
| | 他の部位の関節痛 |

注意 体温は夕刻に記録した。一日の他の時間に追加の体温測定が行われた場合、高い方の体温を記録した。

【 0 6 7 5 】

10

20

30

【表52】

表52 成体において引き起こされた症候の強度スケール

| 有害事象 | 強度グレード | パラメーター |
|--------------------|--------|-------------------|
| 注射部位の疼痛 | 0 | 不在 |
| | 1 | 接触時 |
| | 2 | 手足を動かした際 |
| | 3 | 通常の活動を阻害する |
| 注射部位の発赤 | | 最大の表面直径を mm で記録する |
| 注射部位の膨潤 | | 最大の表面直径を mm で記録する |
| 注射部位の血腫 | | 最大の表面直径を mm で記録する |
| 発熱* | | 体温を°C/F で記録 |
| 頭痛 | 0 | 不在 |
| | 1 | 容易にがまんできる |
| | 2 | 通常の活動を阻害する |
| | 3 | 通常の活動を不可能にする |
| 疲労 | 0 | 不在 |
| | 1 | 容易にがまんできる |
| | 2 | 通常の活動を阻害する |
| | 3 | 通常の活動を不可能にする |
| 注射部位および他の部位における関節痛 | 0 | 不在 |
| | 1 | 容易にがまんできる |
| | 2 | 通常の活動を阻害する |
| | 3 | 通常の活動を不可能にする |
| 筋肉痛 | 0 | 不在 |
| | 1 | 容易にがまんできる |
| | 2 | 通常の活動を阻害する |
| | 3 | 通常の活動を不可能にする |
| 震え | 0 | 不在 |
| | 1 | 容易にがまんできる |
| | 2 | 通常の活動を阻害する |
| | 3 | 通常の活動を不可能にする |

*発熱は、 $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ (99.5°F)の腋下体温として定義する。

【0676】

局所的注射部位の発赤/膨潤の最大強度は以下の通りにスコアリングする。
0は0mm、1は0~20mm、2は20~50mm、3は>50mmである。

【0677】

発熱の最大の強度は以下の通りにスコアリングする。
1は $>37.5 \sim 38.0$ 、2は $>38.0 \sim 39.0$ 、3は >39.0 である。

【0678】

治験責任医師は、試験中に報告されたSAEを含めた他のすべてのAE、すなわち非検査症候に関する強度の診断を行う。診断は、治験責任医師の臨床上の判断に基づく。記録された各AEの強度は、以下の範疇の1つに割り当てられる。

1(軽度)=対象によって容易に許容されるAE、最小限の不快感を引き起こし、日々の活動を妨害しない。

2(中程度)=日々の正常な活動を妨害するのに十分に不快なAE。

3(重度)=日々の正常な活動を阻止するAE(成人/青年においては、そのようなAEは、例えば仕事/学校への出席を阻止するであろうし、また、矯正療法の投与を必要とするであろう)。

10

20

30

40

50

【 0 6 7 9 】

XII.4.2. 有害事象(AE)の記録

高齢対象でアジュバント添加ワクチンに伴って観察された、局所性および全身性両方の症候に関する反応原性は、同じ集団ではFluarix(商標)に伴うものより高いことが見出された。しかし、それは、成人集団で見られるレベルと同程度であることが示された。発生率および症候の強度は、アジュバント添加ワクチンを接種された後では、高齢対象でFluarix(商標)に伴って見られた反応原性と比較して増大していた(図28)。すべての症例において、症候は速やかに解消された。

【 0 6 8 0 】

最も高濃度のMPLでアジュバント添加されたワクチンの投与を受けた群では、グレード3の症候が、MPLが低濃度であるアジュバント添加ワクチンの投与を受けた群と比較して、より高い傾向を示した。しかし、すべての症例において、症候は速やかに解消された。

【 0 6 8 1 】

実施例XII.1

マウスにおける、AS03+MPLでアジュバント添加されたHPVワクチンを用いた前臨床試験

XII.1. 緒言

ウイルス様粒子の形態にある4種の異なった抗原、すなわちHPV16L1、HPV18L1、HPV31L1、およびHPV45L1をそれぞれ2.5 μgを含有しているアジュバント添加混合物をBALB/Cマウスに注射した。各L1タンパク質は、C末端欠如型であり、HPV16の場合、34アミノ酸(または同等な領域における他の配列)が除去されている。

20

【 0 6 8 2 】

HPVタンパク質は、例えばW003/077942に記載されている通り、バキュロウイルス発現系で発現させ、精製した。

【 0 6 8 3 】

この4価のVLPの組合せを、2種の異なったアジュバントのうち1種と組み合わせた。

【 0 6 8 4 】

試験されたアジュバントは以下の通りであった。

1水酸化アルミニウムと3D-MPLとの混合物(AS04と呼ばれる)。

2本質的には実施例IIと同じく調製された、AS03+3D-MPLの混合物。

30

【 0 6 8 5 】

AS04アジュバントは、HPV16およびHPV18 L1のみのウイルス様粒子を含むワクチンで使用し、The Lancet, vol 364, issue 947, 13 November 2004, 1757-1765に記載の通り、第II相臨床試験で試験した。したがって、それはAS03+3D-MPLとの比較の良い基礎を提供する。このアジュバントは、例えばW001/17751およびW000/23105に記載の通りに調製することができる。

【 0 6 8 6 】

上記ワクチンの各成分について、抗体力価の分析を行った。加えて、総IgG分子集団内における、HPV16およびHPV18に特異的なB記憶細胞の分析を行った。

【 0 6 8 7 】

XII.2. 材料および方法

XII.2.1. 動物モデル

AS04(AI(OH)₃ 50 μg+MPL 5 μg)、またはエマルジョン50 μl+MPL 5 μgを含有する、本質的には実施例IIと同じに調製されたAS03+3D-MPL混合物と共に処方された、2.5 μgのHPV-16/18/31/45 L1で、2群のBALB/cマウス(n=10)を、1本の脚の筋肉内に免疫処置した(0および28日目)。

40

【 0 6 8 8 】

XII.2.2. 抗HPV-16/18/31/45 L1血清学:Ig

HPV-16 L1(ロットE16L1P093)、HPV-18 L1(ロットE18L1P079)、HPV-31 L1(ロットEA31L1 P329)、およびHPV-45 L1(ロットEA45L1P328)をコーティング抗原として用いたELISAによって、抗HPV-16/18/31/45 L1抗体の定量を行った。HPV-16/18/31/45 L1および抗体溶液は

50

、ウェル当たり $50\mu\text{l}$ で使用し、飽和溶液のみはウェル当たり $100\mu\text{l}$ で使用した。HPV-16/18/31/45 L1は、PBS中に終濃度 $0.5\mu\text{g/ml}$ に希釈し、96ウェルマイクロタイープレートのウェルに終夜、4℃で吸着させた(Maxisorb免疫プレート、デンマーク国Nunc)。コーティング溶液を除去した後で、1%ウシ血清アルブミンを含有しているPBS(飽和緩衝液)と共に、1時間、37℃でプレートをインキュベートした。飽和溶液を除去した後で、コーティングされたプレートに、希釈緩衝液(飽和緩衝液+0.1% Tween20)中へのマウス血清の2倍希釈液を添加し、1時間30分、37℃でインキュベートした。PBS 0.1% Tween20で4回、プレートを洗浄し、飽和緩衝剤中に希釈されたビオチン結合抗マウスIg 1/1000(Dako)を各ウェルに添加し、37℃で1時間30分インキュベートした。洗浄ステップの後に、飽和緩衝剤中に1/3000に希釈されたアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体(英国、Dako)を、さらに37℃で30分間添加した。プレートを上記の通り4回洗浄し、o-フェニレンジアミン(米国ミズーリ州、Sigma)0.04%、 H_2O_2 0.03%を含む0.1% Tween20、0.05Mクエン酸緩衝液pH4.5の溶液と共に室温で20分間インキュベートした。2Nの H_2SO_4 を添加して反応を停止させ、プレートを490/630nmで測定した。

10

【0689】

ELISA力価計算

光学密度(OD)は、コンピューターに連結されたマイクロプレートリーダーを用いて測定した。データは、SoftMaxProソフトウェアを用いて取り込んだ。各試料を力価測定するために、各プレートには標準物質が含まれている。4パラメータ対数記録機能を用いて、検量線を計算する。検量線の内挿によって、試験試料の各希釈率で、抗体濃度を計算した。

20

【0690】

抗体力価は、検量線の動作範囲(20~80% OD)内にある全希釈率からの値を平均することによって得た。ELISA力価は、EU/mlで表す。

【0691】

XIII.2.3. B記憶細胞エリススポット

第2の免疫処置の33日~75日後にマウスを屠殺し、リンホプレップ(lymphoprep)勾配によって脾細胞を分離した。その後、添加物(ビルビン酸ナトリウム1mM、MEM非必須アミノ酸、Pen/Strep、グルタミン、およびrhIL-2(eBioscience)、および $3\mu\text{g/ml}$ CpG(ホスホチオエート化CpG ODN-7909-5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'-配列番号1)を含有しているRPMI 1640培地(Gibco)中にPBMを再懸濁した。他のCpG配列も、このB記憶評価法での使用に適している。細胞は、最終密度 10^6 細胞/ml、平底6ウェル当たり5mlで5日間培養した。エタノールを用いた活性化ステップの後で、ニトロセルロースプレート(Multiscreen-IP; Millipore)を、 $10\mu\text{g/ml}$ のHPV-16/18 L1またはPBSで1/200に希釈されたヤギ抗マウスIg(GAM; Sigma)でコーティングした。完全培地と用いた飽和ステップの後で、 $100\mu\text{l}$ の 2.10^6 細胞/mlを、HPV-16/18 L1コーティングされたプレートに添加し、 $100\mu\text{l}$ の 10^6 および 5.10^5 細胞/mlをGAMプレートに添加した。37℃、2時間のインキュベーション時間の後、プレートは、4℃で終夜保存した。PBS 0.1% Tween20でプレートを4回洗浄し、PBS 1% BSA 5% FCS(希釈緩衝液)中に1/200に希釈された抗マウスIg Biotをプレートに分注し、37℃で2時間インキュベートする。洗浄ステップの後に、希釈緩衝液中に1/550に希釈されたエクストラビデイン(Extravidin)HRP(Sigma)を37℃でさらに1時間添加した。プレートを上記の通りに洗浄し、AECの溶液(Sigma)と共に室温で10分間インキュベートした。水道水の下でプレートを穏やかにゆすぐことによって、反応を停止させた。乾燥させた後、自動化エリススポット画像解析システム(Zeiss KS400)でプレートを測定した。

30

【0692】

HPV-16/18 L1特異的なB記憶細胞の割合は、総IgGスポットと比較したHPV-16/18 L1陽性スポットの比率に対応する。

40

【0693】

XIII.3. 血清学的結果(表53-55)

【表53】

表53

| | IIの後14日目における抗VLP力値(EU/ml) | | | |
|------------------------|---------------------------|--------|--------|-------|
| | HPV16 | HPV18 | HPV31* | HPV45 |
| VLPs 2.5μg/AS04 | 528441 | 512290 | 28671 | 42224 |
| VLPs 2.5μg/AS03+3D MPL | 824773 | 460800 | 77232 | 65716 |

【0694】

【表54】

表54

10

| | IIの後75日目における抗VLP力値(EU/ml) | | | |
|------------------------|---------------------------|--------|-------|--------|
| | HPV16 | HPV18 | HPV31 | HPV45* |
| VLPs 2.5μg/AS04 | 230425 | 241983 | 15846 | 9812 |
| VLPs 2.5μg/AS03+3D MPL | 415657 | 292199 | 29054 | 32230 |

*群間の統計的相違

【0695】

【表55】

表55-B 細胞記憶

20

| | IIの後33日目における、全IgG記憶B細胞中のHPV特異的記憶B細胞の頻度 | |
|------------------------|--|-------|
| | HPV16 | HPV18 |
| VLPs 2.5μg/AS04 | 0.4% | 0.2% |
| VLPs 2.5μg/AS03+3D MPL | 0.7% | 0.4% |
| | IIの後75日目における、全IgG記憶B細胞中のHPV特異的記憶B細胞の頻度 | |
| | HPV16 | HPV18 |
| VLPs 2.5μg/AS04 | 2.0% | 0.6% |
| VLPs 2.5μg/AS03+3D MPL | 3.8% | 0.5% |

30

【0696】

XIII.4. 結論

AS03+3D-MPLのアジュバントを試験した動物モデル系は、抗体産生およびB細胞記憶の両方に關して、評価されるHPV型に依存して、AS04で生み出されるものに相当するか、あるいは時にはそれより大きい免疫原性の結果を示す。

【図面の簡単な説明】

【0697】

【図1-1】PCSによって測定された、SB62水中油型エマルジョンの油滴粒度分布を示す図である。図1Aは、Malvern Zetasizer 3000HSによる、SB62ロット1023サイズ測定値を示す:A=希釈率1/10000(Rec22からRec24)(Cont inでの分析、適合された光学モデル1.5/0.01); B=希釈率1/20000(Rec28からRec30)(Cont inでの分析、適合された光学モデル1.5/0.01)。図1Bは、強度による記録22(上部)および記録23(下部)の概略図を示す。

40

【図1-2】図1-1の続きである。

【図1-3】図1-2の続きである。

【図1-4】図1-3の続きである。

【図2】MPLバルクの調製を示す概略図である。

【図3】AS03+MPLアジュバントの調製を示す概略図である。

【図4】Explo Flu-001臨床試験におけるスプリットインフルエンザ抗原に対するCD4 T細胞応答(Q1=第1四分位数、Q3=第3四分位数)を示す図である。

【図5】Explo Flu-001臨床試験におけるスプリットインフルエンザ抗原に対するCD8 T細

50

胞応答(Q1=第1四分位数、Q3=第3四分位数)を示す図である。

【図6】Explo Flu-001臨床試験におけるFluarix+AS03でワクチン接種した後の、スプリットインフルエンザウイルス抗原に対する交差反応性CD4 T細胞応答を示す図である。

【図7】Explo Flu-001臨床試験におけるワクチン接種後のB細胞記憶応答を示す図である。

【図8】Explo Flu-002臨床試験におけるワクチン再接種後のスプリットインフルエンザ抗原に対するCD4 T細胞応答を示す図である。

【図9】Explo Flu-002臨床試験におけるワクチン再接種後の抗HI力値を示す図である。

【図10】フェレット研究Iにおける体温モニタリング(プライミングおよびチャレンジ)を示す図である。図10Aはプライミングであり、図10Bはチャレンジである。

10

【図11】フェレット研究Iにおけるウイルス排泄を示す図である。

【図12】フェレット研究IIにおける体温モニタリング(プライミングおよびチャレンジ)を示す図である。図12Aはプライミングであり、図12Bはチャレンジである。

【図13】フェレット研究IIにおけるウイルス排泄を示す図である。

【図14A】フェレット研究IIにおけるH3N2 A/Panama(ワクチン株)に対するHI力値を示す図である。

【図14B】フェレット研究IIにおけるH3N2 A/Wyoming(チャレンジ株)に対するHI力値を示す図である。

【図15】マウス研究における不活化全ウイルスを再刺激抗原として用いた際のプライミングされたC57Bl/6マウスにおけるCD4T細胞の頻度(免疫処置後の7日目)を示す図である。

20

【図16】マウス研究における不活化全ウイルスを再刺激抗原として用いた際のプライミングされたC57Bl/6マウスにおけるCD8T細胞の頻度(免疫処置後の7日目)を示す図である。

【図17】マウス研究における不活化全ウイルスを再刺激抗原として用いた際の、異種株でプライミングされたC57Bl/6マウスにおけるCD4(上部)およびCD8(下部)T細胞の頻度(免疫処置後の7日目)を示す図である。

【図18】ヒト臨床試験におけるFluarix、Fluarix+AS03、Fluarix+AS03+MPLで高齢者をワクチン接種した後のB細胞記憶応答(前と後とでの相違)を示す図である。

【図19】フェレット研究IIIにおけるチャレンジ前後の体温モニタリングを示す図である。

30

【図20】フェレット研究IIIにおけるチャレンジ前後のウイルス排泄を示す図である。

【図21】フェレット研究IIIにおけるH3N2A/Woming(ワクチン株)に対するHI力値を示す図である。

【図22】フェレット研究IIIにおけるH3N2A/Panama(チャレンジ株)に対するHI力値を示す図である。

【図23】ヒト臨床試験におけるワクチン接種後21、90、および180日目のHI力値(GMT)(持続性)を示す図である。

【図24】ヒト臨床試験におけるCD4応答-全て二重試験-ワクチン接種後の21、90、および180日目のプール抗原(持続性)を示す図である。

【図25】ヒト臨床試験において、Fluarixとの比較における、AS03+MPLを用いたワクチン再接種臨床試験でのHI力値を示す図である。

40

【図26】ヒト臨床試験におけるCD4応答のCMI-全て二重試験-0および21日目のプール抗原を示す図である。

【図27】2つの濃度のAS03+MPLを用いたヒト臨床試験における0および21日目のHI力値を示す図である。

【図28】2つの濃度のAS03+MPLを用いたヒト臨床試験における反応原性を示す図である。

。

【図 1 - 1】

1A
希釈率A

Rec22

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 27.9 | 0.0 | 0.0 |
| 32.2 | 0.0 | 0.0 |
| 37.3 | 0.0 | 0.0 |
| 43.1 | 0.0 | 0.0 |
| 49.8 | 0.0 | 0.0 |
| 57.6 | 0.0 | 0.0 |
| 66.6 | 0.0 | 0.0 |
| 77.0 | 1.0 | 1.1 |
| 89.1 | 4.0 | 10.3 |
| 103.0 | 8.4 | 14.7 |
| 119.1 | 13.3 | 16.6 |
| 137.3 | 17.3 | 18.8 |
| 159.3 | 18.8 | 19.4 |
| 184.2 | 17.1 | 10.2 |
| 212.9 | 12.3 | 7.0 |
| 224.7 | 6.2 | 4.0 |
| 284.7 | 1.5 | 1.7 |
| 329.2 | 0.0 | 0.4 |
| 380.6 | 0.0 | 0.0 |
| 441.1 | 0.0 | 0.0 |
| 508.9 | 0.0 | 0.0 |
| 588.5 | 0.0 | 0.0 |
| 680.4 | 0.0 | 0.0 |
| 786.8 | 0.0 | 0.0 |

| 強度によるピーク分析 | | | |
|------------|-------|-------|-------|
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 160.0 | 122.3 |
| 体積によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 141.3 | 116.6 |
| 数によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 109.8 | 62.5 |

Rec23

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 23.0 | 0.0 | 0.0 |
| 27.0 | 0.0 | 0.0 |
| 31.7 | 0.0 | 0.0 |
| 37.3 | 0.0 | 0.0 |
| 43.0 | 0.0 | 0.0 |
| 51.5 | 0.0 | 0.0 |
| 60.6 | 0.0 | 1.2 |
| 71.2 | 1.1 | 5.3 |
| 82.7 | 2.8 | 9.9 |
| 98.4 | 8.0 | 19.0 |
| 115.6 | 13.0 | 16.4 |
| 135.9 | 17.2 | 15.4 |
| 156.9 | 16.2 | 15.9 |
| 187.7 | 17.7 | 9.9 |
| 220.7 | 12.8 | 6.9 |
| 269.8 | 6.2 | 4.1 |
| 309.8 | 1.2 | 1.8 |
| 356.3 | 0.0 | 0.4 |
| 421.1 | 0.0 | 0.0 |
| 485.1 | 0.0 | 0.0 |
| 581.8 | 0.0 | 0.0 |
| 683.8 | 0.0 | 0.0 |
| 803.7 | 0.0 | 0.0 |
| 944.6 | 0.0 | 0.0 |

| 強度によるピーク分析 | | | |
|------------|-------|-------|-------|
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 161.7 | 135.3 |
| 体積によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 139.8 | 128.6 |
| 数によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 102.0 | 59.8 |

【図 1 - 3】

Rec29

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 28.1 | 0.0 | 0.0 |
| 32.5 | 0.0 | 0.0 |
| 37.0 | 0.0 | 0.0 |
| 43.4 | 0.0 | 0.0 |
| 50.2 | 0.0 | 0.0 |
| 58.1 | 0.0 | 0.3 |
| 67.1 | 0.2 | 2.1 |
| 77.6 | 1.6 | 5.5 |
| 89.7 | 4.2 | 10.6 |
| 100.7 | 5.3 | 14.2 |
| 119.9 | 12.8 | 16.5 |
| 138.6 | 16.6 | 14.9 |
| 150.2 | 18.3 | 12.8 |
| 153.0 | 17.0 | 10.0 |
| 214.1 | 12.6 | 7.0 |
| 247.6 | 6.7 | 4.3 |
| 250.5 | 2.5 | 2.0 |
| 330.6 | 0.0 | 0.0 |
| 382.5 | 0.0 | 0.0 |
| 442.2 | 0.0 | 0.0 |
| 511.0 | 0.0 | 0.0 |
| 591.0 | 0.0 | 0.0 |
| 683.2 | 0.0 | 0.0 |
| 789.8 | 0.0 | 0.0 |

| 強度によるピーク分析 | | | |
|------------|-------|-------|-------|
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 161.7 | 127.0 |
| 体積によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 141.4 | 124.5 |
| 数によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 105.8 | 62.6 |

Rec30

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 29.1 | 0.0 | 0.0 |
| 33.5 | 0.0 | 0.0 |
| 38.6 | 0.0 | 0.0 |
| 44.4 | 0.0 | 0.0 |
| 51.2 | 0.0 | 0.0 |
| 58.9 | 0.0 | 0.8 |
| 67.9 | 0.2 | 2.1 |
| 78.2 | 1.5 | 6.0 |
| 90.1 | 4.3 | 10.7 |
| 107.7 | 6.3 | 14.2 |
| 119.5 | 12.8 | 14.6 |
| 137.6 | 16.6 | 14.9 |
| 158.5 | 18.1 | 12.8 |
| 182.6 | 16.9 | 10.0 |
| 211.8 | 12.5 | 7.0 |
| 242.3 | 6.8 | 4.2 |
| 279.1 | 2.0 | 1.9 |
| 321.5 | 0.0 | 0.4 |
| 370.5 | 0.0 | 0.0 |
| 428.5 | 0.0 | 0.0 |
| 491.3 | 0.0 | 0.0 |
| 565.9 | 0.0 | 0.0 |
| 651.8 | 0.0 | 0.0 |
| 750.8 | 0.0 | 0.0 |

| 強度によるピーク分析 | | | |
|------------|-------|-------|-------|
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 159.8 | 123.3 |
| 体積によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 139.6 | 119.8 |
| 数によるピーク分析 | | | |
| ピーク | 面積 | 平均 | 幅 |
| 1 | 100.0 | 106.0 | 62.1 |

【図 1 - 2】

Rec24

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 20.2 | 0.0 | 0.0 |
| 24.0 | 0.0 | 0.0 |
| 28.6 | 0.0 | 0.0 |
| 34.0 | 0.0 | 0.0 |
| 40.4 | 0.0 | 0.0 |
| 48.0 | 0.0 | 0.0 |
| 57.1 | 0.0 | 0.5 |
| 67.9 | 2.4 | 6.5 |
| 80.7 | 2.9 | 9.5 |
| 95.9 | 7.6 | 15.4 |
| 114.0 | 13.7 | 18.1 |
| 136.8 | 19.2 | 17.2 |
| 161.2 | 21.3 | 14.4 |
| 191.7 | 18.9 | 10.6 |
| 227.9 | 12.0 | 6.7 |
| 271.0 | 5.9 | 3.2 |
| 322.2 | 0.0 | 0.0 |
| 383.1 | 0.0 | 0.0 |
| 455.6 | 0.0 | 0.0 |
| 541.2 | 0.0 | 0.0 |
| 643.9 | 0.0 | 0.0 |
| 766.5 | 0.0 | 0.0 |
| 910.2 | 0.0 | 0.0 |
| 1082.2 | 0.0 | 0.0 |

1A
希釈率B

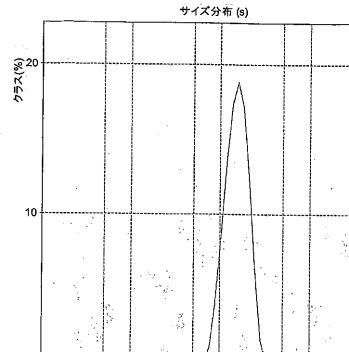
Rec28

| サイズ(nm) | 強度 | 体積 |
|---------|------|------|
| 22.2 | 0.0 | 4.4 |
| 26.2 | 0.2 | 9.7 |
| 30.9 | 0.1 | 7.1 |
| 34.4 | 0.0 | 4.5 |
| 42.9 | 0.0 | 0.0 |
| 50.6 | 0.0 | 0.0 |
| 59.6 | 0.0 | 0.0 |
| 70.2 | 0.0 | 0.0 |
| 82.7 | 1.8 | 5.1 |
| 97.6 | 6.2 | 10.4 |
| 114.9 | 5.1 | 14.3 |
| 135.5 | 20.1 | 15.5 |
| 159.7 | 23.5 | 13.4 |
| 188.2 | 20.9 | 9.9 |
| 221.8 | 20.0 | 5.0 |
| 261.4 | 2.1 | 2.0 |
| 308.1 | 0.0 | 0.3 |
| 363.2 | 0.0 | 0.0 |
| 428.1 | 0.0 | 0.0 |
| 504.5 | 0.0 | 0.0 |
| 594.6 | 0.0 | 0.0 |
| 709.9 | 0.0 | 0.0 |
| 826.1 | 0.0 | 0.0 |
| 973.6 | 0.0 | 0.0 |

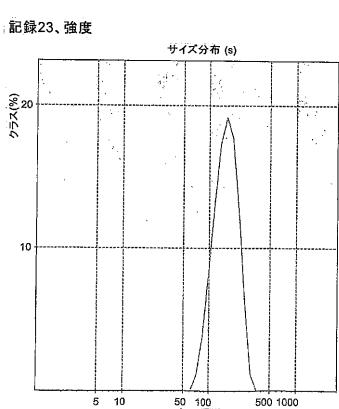
【図 1 - 3】

1B

記録22、強度



記録23、強度



【図2】

MPL[®] 粉末

懸濁液 (10mg/mL)



熱処理



冷却



ミクロ流動化



2mg/mLに希釈



0.65μmでの予備濾過



0.2μmでの濾過



1mg/mLに希釈



+2/+8°Cで保存

【図3】

注射用水
+
PBS mod 10 Xcc pH 6.8 (10×希釈のとき)-Ad
→ PBS mod 1×濃縮(cc)+
SB62パルク-Ad → 781μg/ml+
1mg/mlでのMPL液体パルク - Ad → 78μg/ml
↓ 磁気搅拌-時間(分):5-30 -
温度(°C):室温NaOH 0.05Mまたは0.5M/HCl 0.03Mまたは
0.3MでpH6.8±0.1に調節する↓ 磁気搅拌-時間(分):5-30 -
温度(°C):室温

酢酸セルロース膜(Sartobranタイプ)での濾過0.22μm

↓ サンプリング

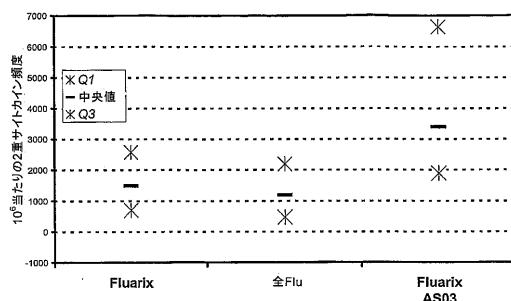
最低1分間、充填された容器内に不活性隙生成されるよう、
不活性ガスのフラッピング(窒素)を行う

↓ 無菌試験用にサンプリングする

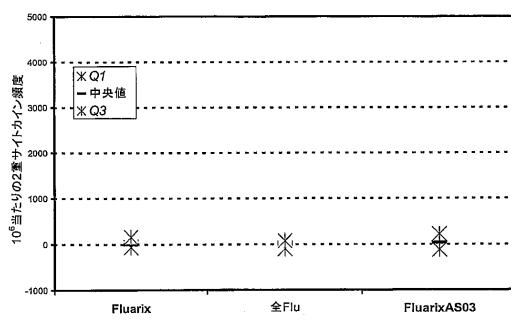
充填まで、+2~8°Cの間で保存する

注記:ワクチンパルクは、配合プロセスの全体にわたって
攪拌状態で維持される

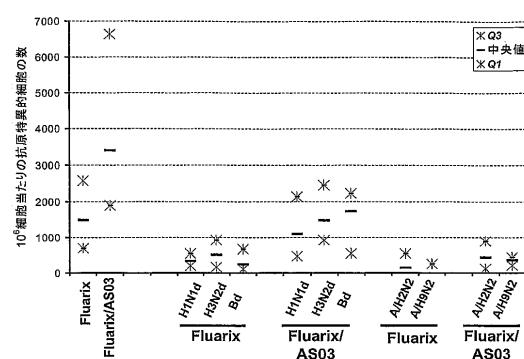
【図4】



【図5】

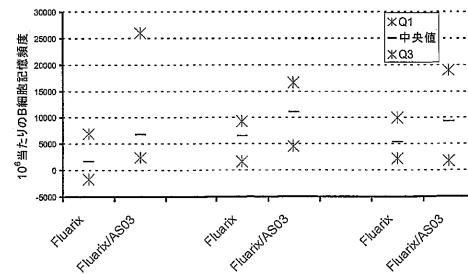


【図6】

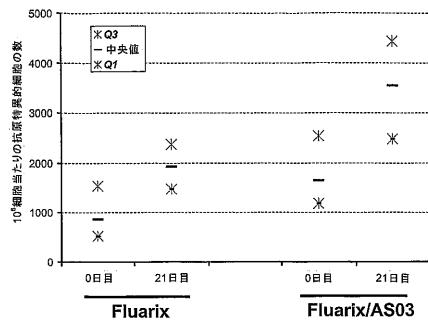


【図7】

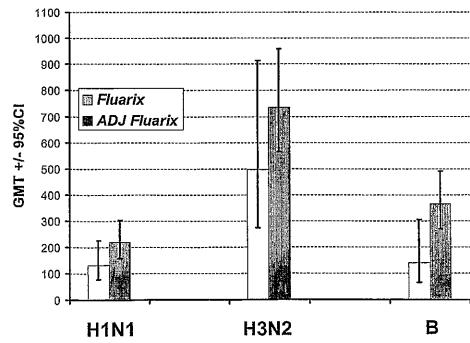
ワクチン接種(Post-Pre)に対するB細胞記憶応答



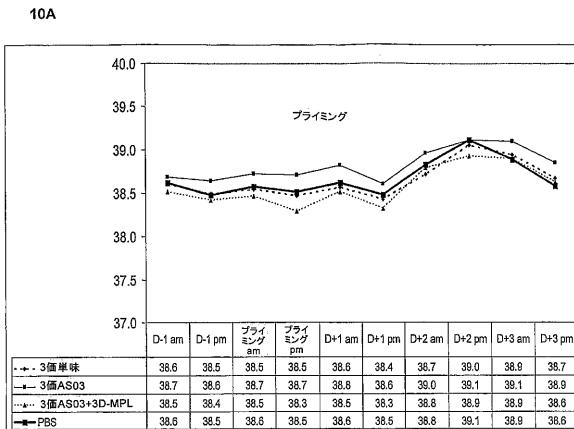
【図8】



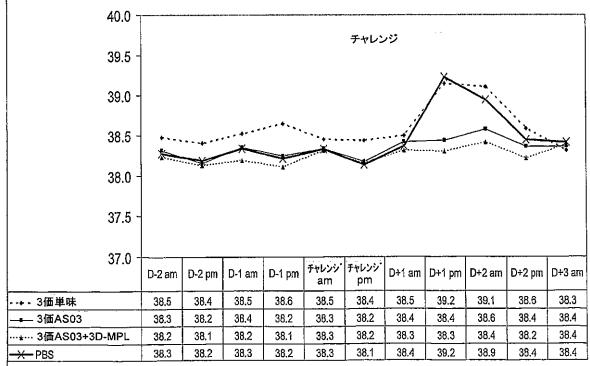
【図9】



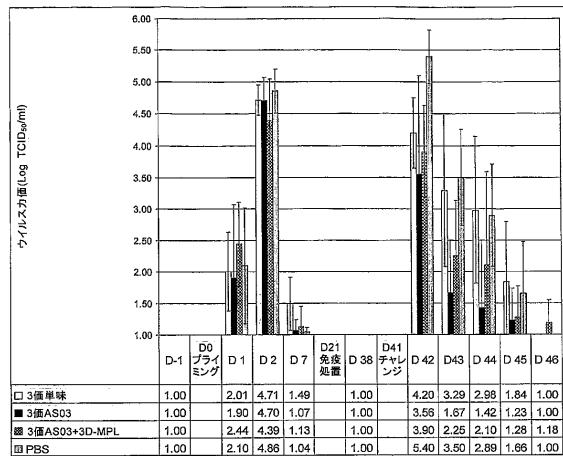
【図10】



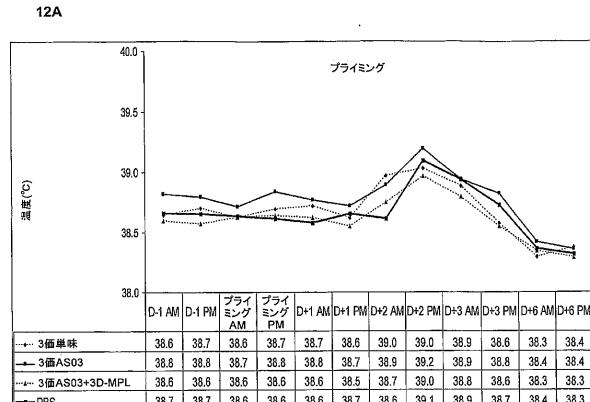
10B



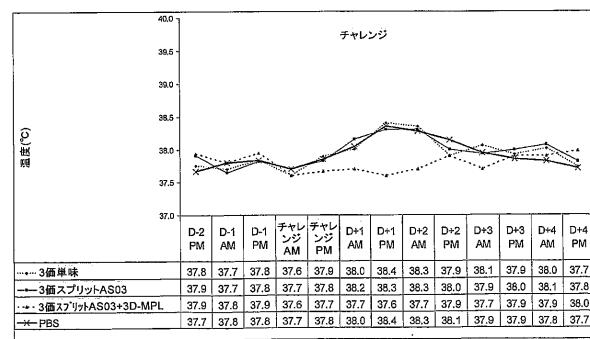
【図11】



【図12】

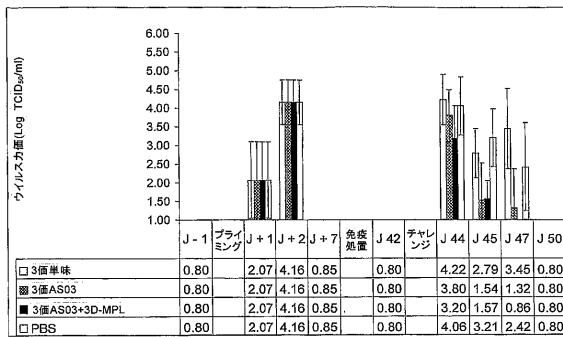


12A

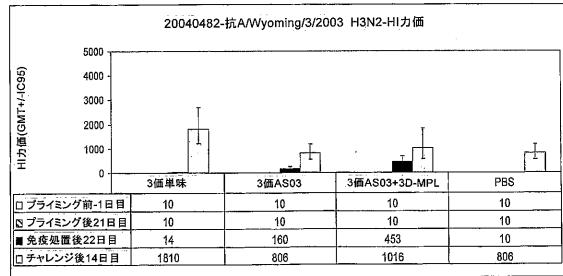


12B

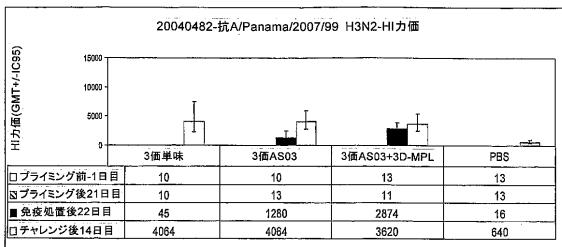
【図13】



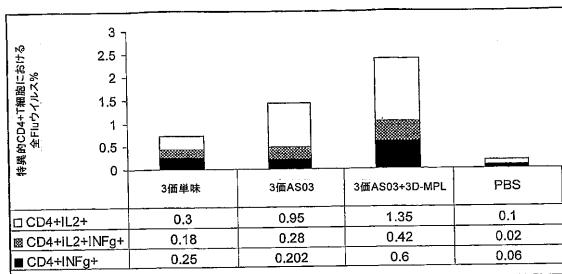
【図14A】



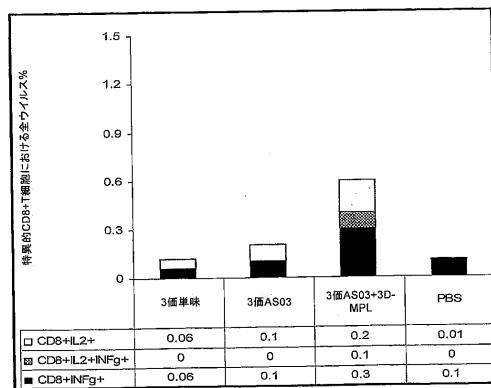
【図14B】



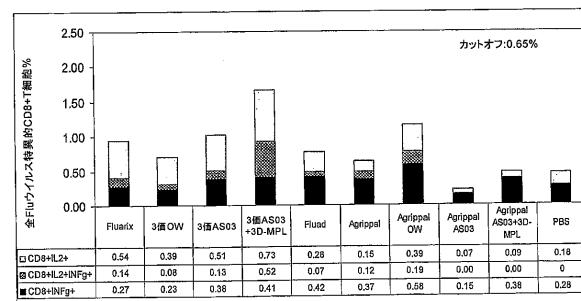
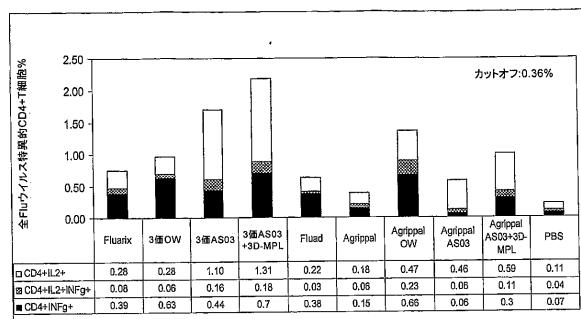
【図15】



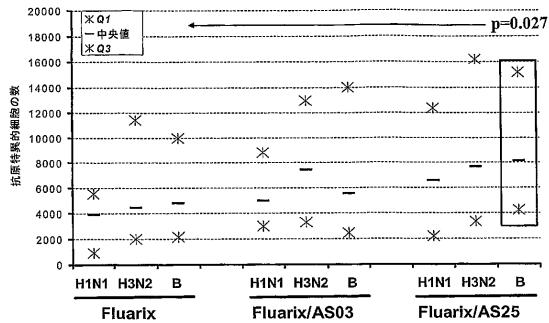
【図16】



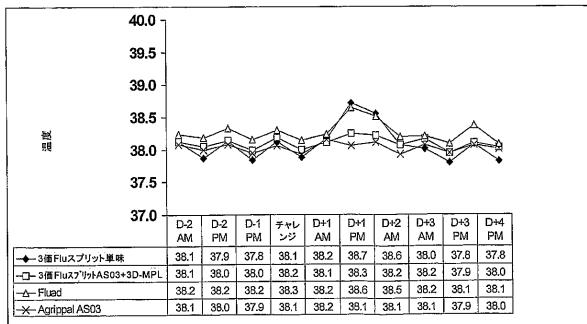
【図17】



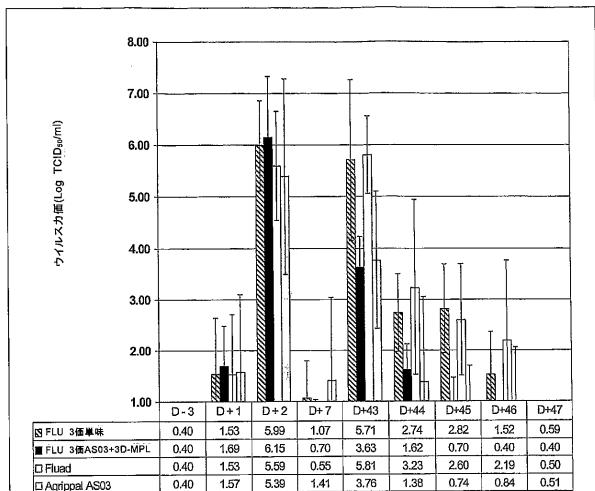
【図18】



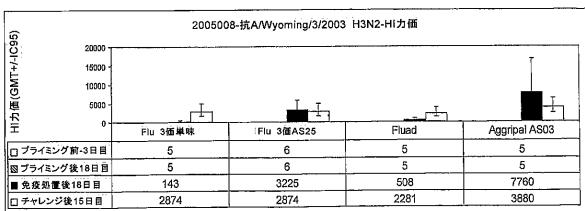
【図19】



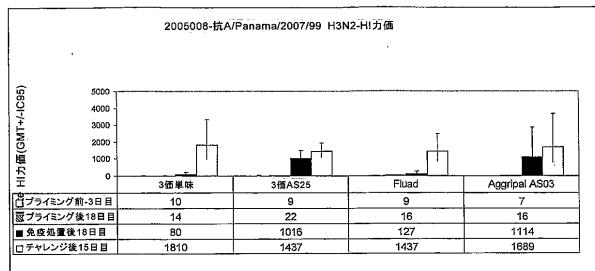
【図20】



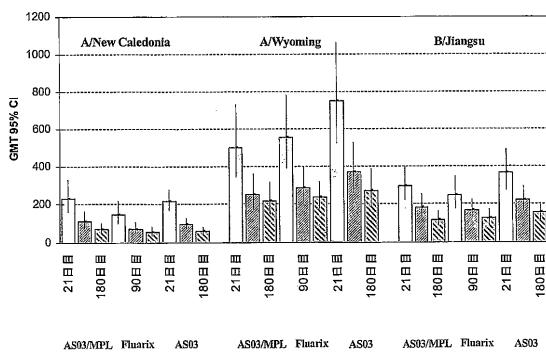
【図21】



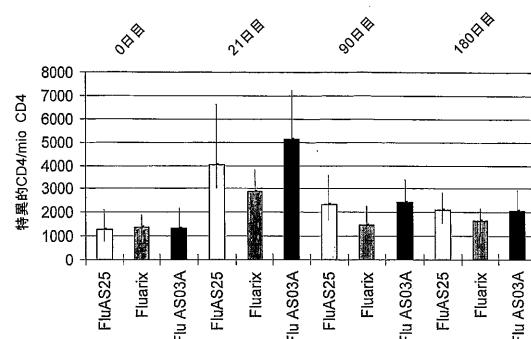
【図22】



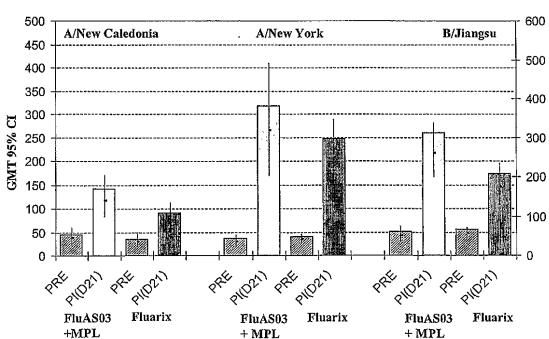
【図23】



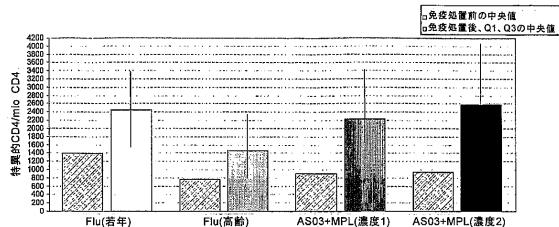
【図24】



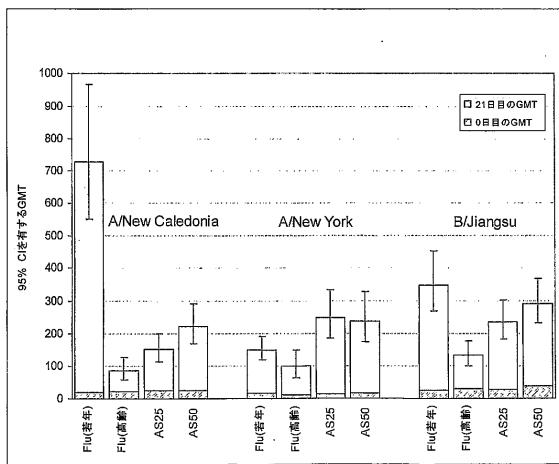
【図25】



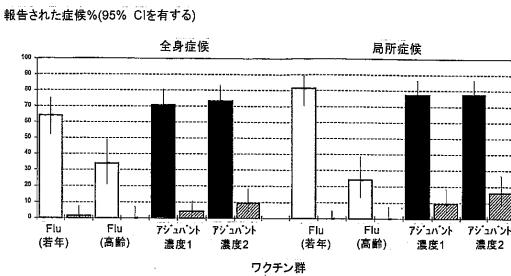
【図26】



【図27】



【図28】



ワクチン群

【配列表】

2008534467000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年12月10日(2007.12.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 抗原又は抗原性組成物、
- (b) 水中油型エマルジョンアジュバント、及び
- (c) 組成物1用量当たり $25\text{ }\mu\text{g}(\text{w/v})$ の3D MPL

を含む免疫原性組成物であって、前記水中油型エマルジョンは代謝可能なオイル、ステロール又は α -トコフェロール及びモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン(Tween 80TM)である乳化剤を含む、前記免疫原性組成物。

【請求項2】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の0.5%~20%の量で存在する、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の1.0%~10%の量で存在する、請求項1又は2に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】

前記代謝可能なオイルが、前記免疫原性組成物の全体積の2.0%~6.0%の量で存在する

、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

前記ステロール又は - トコフェロールが、前記免疫原性組成物の全体積の 1.0%～20% の量で存在する、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

前記 - トコフェロールが、前記免疫原性組成物の全体積の 1.0%～5.0% の量で存在する、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

前記 - トコフェロールが、前記免疫原性組成物の全体積の 2.5% の量で存在する、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

前記乳化剤が、前記免疫原性組成物の 0.01～5.0 重量 % (w/w) の量で存在する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記乳化剤が、前記免疫原性組成物の 0.1～2.0 重量 % (w/w) の量で存在する、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

前記水中油型エマルジョンが、2～10% のスクアレン、2～10% の - トコフェロール及び 0.3～3% のモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 80TM) を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

前記水中油型エマルジョンが、スクアレン、 - トコフェロール、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 80TM) 及び PBS から成る、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

抗原若しくは該抗原を含む病原体又はその変異体への曝露に伴う感染及び/又は疾患を予防するための請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物の製造における、

- (a) 前記抗原又は抗原性組成物、
- (b) 水中油型エマルジョンアジュバント、及び
- (c) 組成物 1 用量当たり 25 μg (w/v) の 3D MPL

を含む組成物の使用。

【請求項 13】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗原又は抗原性組成物、組成物 1 用量当たり 25 μg の 3D MPL 及び水中油型エマルジョンアジュバントを、それを必要とする個体又は集団に送達することを含むワクチン接種方法。

【請求項 14】

i) 改善された CD4 T 細胞応答、ii) 改善された B 細胞記憶応答、iii) 改善された前記抗原に対する抗体応答のうちの少なくとも 1 つを誘発するための、請求項 12 又は 13 に記載の使用又は方法。

【請求項 15】

免疫低下したヒト個体又は集団における、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の使用又は方法。

【請求項 16】

前記免疫原性組成物中の抗原が由来する病原体の変異体である病原体によって引き起こされた感染又は疾患に対する保護のための、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載の使用又は方法。

【請求項 17】

前記免疫原性組成物中の抗原の変異体である抗原を含む病原体によって引き起こされた感染又は疾患に対する保護のための、請求項 12～16 のいずれか 1 項に記載の使用又は方法。

【請求項 18】

感染した個体又は集団の体温によって保護が評価される、請求項 16 又は 17 に記載の使用又は方法。

【請求項 19】

前記免疫原性組成物がCD4 T細胞エピトープを有する抗原を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 20】

前記免疫原性組成物がB細胞エピトープを有する抗原を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 21】

抗原若しくは抗原性組成物又はその断片若しくは変異体、組成物1用量当たり25 μg(w/v)の3D MPL及び水中油型エマルジョンアジュバントを事前にワクチン接種した個体のワクチン再接種のための免疫原性組成物の製造における前記抗原の使用。

【請求項 22】

前記ワクチン再接種のための抗原が、事前のワクチン接種に使用した抗原又は抗原性組成物と共にCD4 T細胞エピトープを有する、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記ワクチン再接種のための抗原又は抗原性組成物にアジュバントが添加されている、請求項 21 又は 22 に記載の使用。

【請求項 24】

前記アジュバントが、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョンである、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記アジュバントが3D-MPLをさらに含む、請求項 23 又は 24 に記載の使用。

【請求項 26】

免疫原性組成物を調製するための方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョンを抗原又は抗原性組成物及び組成物1用量当たり25 μg(w/v)の3D MPLと組み合わせることを含む、前記方法。

【請求項 27】

薬学的に許容される担体と組み合わせた、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 28】

医薬において使用するための、

- (a) 抗原、
 - (b) 本明細書で定義される水中油型エマルジョンアジュバント、及び
 - (c) 組成物1用量当たり25 μg(w/v)の3D MPL
- を含む組成物。

【請求項 29】

抗原又は抗原性調製物が、インフルエンザウイルス及びHPVから成る一覧より選択される、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 30】

前記インフルエンザ抗原が、スプリットインフルエンザウイルス、全インフルエンザウイルス、サブユニットインフルエンザウイルス、インフルエンザビロソーム及びその抗原性調製物から成る一覧より選択される、請求項 29 に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 31】

前記HPV抗原が癌又は陰部疣瘍と関連している、請求項 29 に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 32】

前記癌関連HPVがHPV16型及び/又はHPV18型である、請求項 31 に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 3 3】

HPV16及び/又はHPV18抗原と共に、発癌性HPV型由来の1種又は複数の追加の抗原が使用され、前記追加の抗原がHPV31、HPV45、HPV33、HPV58及びHPV52のHPV型から選択される、請求項3 2に記載の組成物、使用又は方法。

【請求項 3 4】

前記抗原がウイルス様粒子の形態である、請求項3 2又は3 3に記載の組成物、使用又は方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2006/002838 |
|---|

| |
|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/39 A61K39/145 |
|--|

| |
|---|
| 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) A61K |
|---|

| |
|---|
| 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, BIOSIS, EMBASE |
|--|

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|------------------------------|
| X | WO 95/17210 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS ; MOMIN, PATRICIA, MARIE; GARCON, NATHA) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document | 1,5,8, 14,15, 28,30-36 |
| X | WO 99/11241 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; GARCON, NATHALIE; MOMIN, PATRICIA,) 11 March 1999 (1999-03-11) the whole document | 1-16, 28-36 |
| P,X | WO 2005/107797 A (CHIRON CORPORATION; PODDA, AUDINO; POPOVA, OLGA; PICCENETTI, FRANCESCA) 17 November 2005 (2005-11-17) the whole document | 1-36 |
| A | WO 90/14837 A (CHIRON CORPORATION) 13 December 1990 (1990-12-13) the whole document | |

| |
|---|
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. |
|---|

| |
|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
|--|

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier 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 |
|--|

| |
|---------------|
| 9 August 2006 |
|---------------|

| |
|------------|
| 24/08/2006 |
|------------|

| |
|---|
| Name and mailing address of the ISA/ 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 |
|---|

| |
|--------------------|
| Authorized officer |
|--------------------|

| |
|------------|
| Kalsner, I |
|------------|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/002838

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. Claims Nos.: 15, 16-22 (part.) because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 15 and claims 16-22 (insofar as they refer to claim 15) 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. Claims Nos.: 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:
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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/002838

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|--|--|--|
| WO 9517210 | A 29-06-1995 | AT AT AU AU AU AU AU AU CA CN DE DE DE DE DK WO EP ES ES GR HK JP NZ NZ PT SG SG US US ZA | 177322 T 265228 T 1316495 A 687494 B2 1316695 A 6803198 A 6803298 A 2179779 A1 1138298 A 69417063 D1 69417063 T2 69433750 D1 69433750 T2 735898 T3 9517209 A1 0735898 A1 2129801 T3 2219837 T3 3029750 T3 1012243 A1 9506887 T 277802 A 329661 A 868918 T 49257 A1 73578 A1 6623739 B1 6146632 A 9410176 A | 15-03-1999 15-05-2004 10-07-1995 26-02-1998 10-07-1995 09-07-1998 09-07-1998 29-06-1995 18-12-1996 15-04-1999 28-10-1999 03-06-2004 04-08-2005 23-08-1999 29-06-1995 09-10-1996 16-06-1999 01-12-2004 30-06-1999 12-05-2000 08-07-1997 27-04-1998 24-03-2005 31-08-2004 18-05-1998 20-06-2000 23-09-2003 14-11-2000 17-11-1995 |
| WO 9911241 | A 11-03-1999 | AU CA DE DE EP ES JP | 1145699 A 2302554 A1 69815692 D1 69815692 T2 1009382 A1 2201551 T3 2001514208 T | 22-03-1999 11-03-1999 24-07-2003 29-04-2004 21-06-2000 16-03-2004 11-09-2001 |
| WO 2005107797 | A 17-11-2005 | NONE | | |
| WO 9014837 | A 13-12-1990 | AT CA DD DE DE DE DK EP ES GR HK HU IE JP JP PT | 108327 T 2017507 A1 294633 A5 69010574 D1 69010574 T2 399843 T1 399843 T5 0399843 A2 2033626 T1 91300063 T1 107695 A 61203 A2 64766 B1 8032638 B 5508385 T 94168 A | 15-07-1994 25-11-1990 10-10-1991 18-08-1994 27-10-1994 02-05-1991 19-09-1994 28-11-1990 01-04-1993 15-11-1991 14-07-1995 28-12-1992 06-09-1995 29-03-1996 25-11-1993 08-01-1991 |

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 0505989.4
 (32) 優先日 平成17年3月23日(2005.3.23)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0506004.1
 (32) 優先日 平成17年3月23日(2005.3.23)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0510589.5
 (32) 優先日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0510591.1
 (32) 優先日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0510593.7
 (32) 優先日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0510596.0
 (32) 優先日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0510598.6
 (32) 優先日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0603789.9
 (32) 優先日 平成18年2月24日(2006.2.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0603788.1
 (32) 優先日 平成18年2月24日(2006.2.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0603790.7
 (32) 優先日 平成18年2月24日(2006.2.24)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(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, IS, IT, LT, LU, LV, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハノン, エマニュエル, ジュール
 ベルギー国 リキセンザール ビー-1330, リュード ランスティテュ 89, グラクソsmithkline
 スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72) 発明者 ステファン, ジャン
 ベルギー国 リキセンザール ビー-1330 リュード ランスティテュ 89, グラクソsmithkline
 スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4C076 AA17 BB15 CC35 DD09F DD59 DD63 FF16
 4C085 AA03 BA55 CC04 DD23 EE06 FF17 FF21