

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年10月8日(08.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/123119 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 39/39 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)  
A61K 39/12 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
A61P 31/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)  
A61P 31/16 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/056508
- (22) 国際出願日: 2009年3月30日(30.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-096244 2008年4月2日(02.04.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人徳島大学 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 木戸 博 (KIDO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP). 武井 恒知 (TAKEI, Tsunetomo) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP). 水野 大 (MIZUNO, Dai) [JP/JP]; 〒7708503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究センター内 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒1020073 東京都千代田区九段北4丁目3番14号 九段堀江ビル6F Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告(条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTIGEN-AND-DRUG VEHICLE COMPRISING SYNTHETIC PEPTIDE, AND MUCOSAL VACCINE USING THE SAME

(54) 発明の名称: 合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン

(57) Abstract: Disclosed are: an antigen-and-drug (AD) vehicle utilizing a novel synthetic peptide; and a mucosal vaccine. Specifically disclosed are: an antigen-and-drug (AD) vehicle comprising a complex of a lipid and a synthetic peptide which can induce the production of a secreted IgA antibody and comprises the amino acid sequence PVHLKRLm [wherein m represents a number of 11 to 15 or 16-20; e.g., the peptide depicted in SEQ ID NO:1] or KnLm [wherein n represents a number of 4 to 8 and m represents a number of 11 to 20; e.g., the peptide depicted in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3]; and a mucosal vaccine produced by allowing such an amount of an antigen that a mucosal immunity IgA can be induced to coexist with the AD vehicle, by contacting the above-mentioned amount of an antigen with the AD vehicle, by capturing above-mentioned amount of an antigen by the AD vehicle, or by adsorbing the above-mentioned amount of an antigen on the AD vehicle.

(57) 要約: 新規な合成ペプチドを利用した抗原薬物 (A D) ビークルと粘膜ワクチンとを提供する。分泌型 I g A 抗体の産生を誘導する以下のアミノ酸配列からなる合成ペプチド: PVHLKRLm (ただし m は 11-15 または 16-20、例えば配列番号 1 のペプチド) または KnLm (ただし n は 4-8、m は 11-20、例えば配列番号 2 または 3 のペプチド) と、脂質との複合体である抗原薬物 (A D) ビークルと、この A D ビークルに、粘膜免疫 I g A を誘導する量の抗原を共存、接触、捕捉又は吸着させることにより得られる粘膜ワクチン。

WO 2009/123119 A1

## 明 細 書

合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン  
技術分野

[0001] この発明は、経鼻、経粘膜及び経皮投与を可能にする抗原薬物(AD)ビークルと、このADビークルを用いた経鼻・粘膜ワクチンに関するものである。

## 背景技術

[0002] 特許文献1および2には、従来の不活化ワクチンやトキソイド等における欠点、粘膜ワクチンおよび免疫アジュバントの開発に関する現状等が詳細に記載されている。

[0003] これら特許文献1、2に記載のとおり、皮下や筋肉内等へ接種する従来ワクチンから、ウイルスの自然感染ルートである粘膜においてIgA抗体の産生を誘導する粘膜ワクチンへの切り替えの必要性は、広くかつ深く認識されている。特に、21世紀における次世代ワクチンとしては、IgA抗体の産生、局所免疫あるいは粘膜免疫を誘導する、いわゆる粘膜ワクチンの開発と実用化が全世界で待望されてはいるが、未だ達成されていない。

[0004] 本願発明者らはこのような課題に対して、肺サーファクタントプロテインBおよび／または肺サーファクタントプロテインCと、脂質との複合体である抗原薬物(AD)ビークルと、このADビークルと抗原とからなる粘膜ワクチンを発明し、特許出願している(特許文献1)。さらに本願発明者らは、ADビークル量(V)と抗原量(A)との重量比V/Aの調節によって、IgA抗体の選択的産生とIgA・IgG両抗体産生とが変換可能であることを見出し、これを作用機序とする粘膜ワクチンを特許出願している(特許文献2)。またこれらの特許文献1、2は、肺サーファクタントプロテインBおよびCの断片(ペプチド)の有効性についても開示している。

[0005] なお、肺サーファクタントプロテインに関連する合成ペプチドとしては、特許文献3-8が知られている。

特許文献1:国際公開WO 2005/097182号公報

特許文献2:国際公開WO 2007/018152号公報

特許文献3:特公第3009690号公報

特許文献4:特開2004-305006号公報

特許文献5:特表2006-504635号公報

特許文献6:国際公開WO 95/15980号公報

特許文献7:特表2003-523348号公報

特許文献8:国際公開WO 02/32451号公報

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本願発明者らは、肺サーファクタントプロテイン断片の様々な変異体について抗体産生増強作用を検討した結果、特許文献1、2に開示された部分ペプチドよりもサイズの小さいペプチドであるにもかかわらず、抗体産生の強い誘導あるいは増強作用、特に、分泌型IgA抗体の単独産生、また、分泌型IgAと血中IgGの両抗体産生の優れて効果的な誘導作用を有するペプチドを見出した。

[0007] 本願発明は、このような新規な合成ペプチドを利用した抗原薬物(AD)ビークルと粘膜ワクチンとを提供することを課題としている。

### 課題を解決するための手段

[0008] 前記の課題を解決するための第1の発明は、以下のアミノ酸配列からなる合成ペプチド:

PVHLKRLm(ただしmは11-15または16-20);または

KnLm(ただしnは4-8、mは11-20)

と脂質との複合体である抗原薬物(AD)ビークルである。

[0009] この薬物抗原(AD)ビークルにおいて、合成ペプチドは、好ましくは配列番号1から3のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0010] このADビークルにおける脂質は、好ましくは、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の少なくとも1種であり、さらに好ましくは、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールおよびパルミチン酸の3種脂質混合物である。

- [0011] 第2の発明は、前記の抗原薬物(AD)ビークルに、粘膜免疫IgAを誘導する量の抗原を共存、接触、捕捉又は吸着させることにより得られる粘膜ワクチンである。
- [0012] この粘膜ワクチンにおける抗原は、好ましくは伝染病病原体に由来の不活化抗原又は無毒化毒素である。
- [0013] 第3の発明は、前記の抗原薬物(AD)ビークルに、アレルゲン、アレルゲンエピトープ、又はアレルゲン由来抗原を共存、接触、捕捉又は吸着させることにより得られるアレルギー予防剤又は治療剤である。
- [0014] 第4の発明は、前記の粘膜ワクチンを、少なくとも2回投与することを特徴とする感染症の予防又は治療方法である。
- [0015] 第5の発明は、前記のアレルギー予防又は治療剤を、少なくとも2回投与することを特徴とするアレルギーの予防又は治療方法。
- [0016] 第4発明および第5発明の方法においては、好ましくは3回のワクチン投与を行うことが好ましい。

#### 発明の効果

- [0017] この発明が提供するADビークルの効果の特徴は、分泌型IgA抗体の単独産生、及び分泌型IgAと血中IgGの両抗体産生を優れて効果的に誘導することにある。このADビークルの適用・汎用により、多種多様な感染症に対する粘膜ワクチン、アレルギーの予防と治療剤、及び薬剤の経粘膜・経皮投与の実現と普及をもたらす。経鼻あるいは粘膜ワクチンは、自然感染の実態に即した免疫手段であるので、従来ワクチンに比し、著しく優れた感染防御効果を発揮する。また、ADビークルが誘導する鼻腔粘膜IgA及びIgGは、医療・保健・衛生を多大に向上させると共に、世界の医療・保健・衛生分野の従事者には待望の福音になる。併せて、従来及び未来のワクチンやトキシイド等を含む生物学的製剤、更に多種多様な薬物に広く、注射に比べ簡便な経粘膜投与及び経皮投与が可能な機能と性能を付加する手段を与える。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0018] 本願発明のADビークル(Antigen and Drug Vehicle)は、抗原や薬物等の経粘膜投与及び経皮投与が可能になるよう設計(デザイン)された、脂質と合成ペプチドとの複合体である。

### (1) 合成ペプチド

PVHLKRL<sub>m</sub> (ただし<sub>m</sub>は11-15または16-20) またはKnL<sub>m</sub> (ただし<sub>n</sub>は4-8、<sub>m</sub>は11-20) のアミノ酸配列からなるペプチドである。すなわち、PVHLKRL<sub>m</sub>は、PVHLKRLのC末側に<sub>m</sub>個のL (Leu) 残基が連続しており、KnL<sub>m</sub>はN末側の<sub>n</sub>個のK (Lys) 残基とC末側の<sub>m</sub>個のL残基が連続している。なお、PVHLKRL<sub>m</sub>における<sub>m</sub>=16は特許文献2の配列番号27よして公知のペプチドである、本願発明からは除外される。

[0019] このような合成ペプチドは、例えば以下のいずれかのペプチドである。なお、括弧内はペプチドの略号である。またアミノ酸残基は1文字記号で示している。

配列番号1 (SP-CL11): PVHLKRLLLLLLLLLLLLLL

配列番号2 (K6L16): KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLL

配列番号3 (K6L11): KKKKKKLLLLLLLLLLLLL

なお、配列番号1 (SP-CL11) は、肺サーファクタントプロテインC (SP-C) のアミノ酸配列における第7-12番アミノ酸配列 (PVHLKR) に11個のL (Leu) 残基が付加されている。配列番号2 (K6L16) は、N末側の6個のK (Lys) 残基とC末側の16個のL残基とからなる。配列番号3 (K6L11) は、N末側の6個のK (Lys) 残基とC末側の11個のL残基とからなる。

### (2) 脂質

リン脂質としては、肺サーファクタントが含有するリン脂質、例えばホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の使用が望ましい。その他、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン等を用いることができる。また、脂肪酸としては、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸等を用いることができる。更に、肺の膨張が活発なクジラ、イルカ等の水棲動物に由来の脂質を用いることができる。

### (3) ADビークルの組成

合成ペプチドは、約0.2～約12.0乾燥重量%、脂質は約88～約99.8乾燥重量%である。

### (4) ADビークルの調製例

例えば、メタノールに溶解した合成ペプチドを4 mg、クロロホルム-メタノール混液に溶解した脂質を96 mgを混合し、エバポレーターで減圧乾固した後、10%エタノールで懸濁し、凍結乾燥する。この乾燥物を5 mLの等張液、例えば生理的食塩水やリン酸緩衝液(PBS)中に均一に懸濁させる。得られた懸濁液は、ADビークル(100 mg/5 mL)液として使用に供する。該ビークルは、使用時にその都度、調製する。尚、懸濁には、超音波、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器等を用いることができる。

[0020] なお、脂質96 mgの内訳については、例えば、ホスファチジルコリン64.5mg、ホスファチジルグリセロール22.7mg、及びパルミチン酸8.8 mgの混合等を採用することができる。

#### (5) 粘膜ワクチンの調製

ワクチン中の抗原量(A)に対するADビークル量(V)の乾燥重量比V/Aが所望の値になるよう、ワクチン原液にADビークル液を添加混合し調製する。例えば、抗原含有量が50 mg/mLのワクチン原液50  $\mu$ Lに対し、重量比V/A=1を採用すると、上記(4)で調製したADビークル(50 mg/mL)液の添加混合量は50  $\mu$ Lである。尚、均一に混合するには、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器、攪拌器等を用いることができる。

[0021] 抗原とは、ワクチン用に高度精製された純度が約90%以上の細菌由来抗原、ウイルス抗原、トキソイド等、更に、スギ花粉やダニ等に由来の純度が約90%以上のアレルギー、タンパク質、糖タンパク質、高分子の糖質や核酸等を意味する。抗原質量のA値には、実測値を用いるか、あるいは抗原の純度、比活性、分子量、抗原抗体反応等からの計算値を用いることができる。

[0022] 本発明の粘膜ワクチンにおける抗原の乾燥重量(A)は約0.1~約50  $\mu$ g/kg、好ましくは約0.3~約30  $\mu$ g/Kgである。このような抗原量において、IgA抗体産生を優先的かつ選択的に誘導するためのV/Aは、約0.1~約1.0が望ましい。また、IgA及びIgG両抗体産生を誘導するためのV/Aは、約1.0~約100、好ましくは約5~約20の範囲を採用できる。

[0023] また、以上のとおりのV/Aにおいて、抗原の約60%以上がADビークルに結合し、それによって得られた粘膜免疫ワクチンはIgA抗体産生及び/またはIgG抗体産生を効率的に誘導することができる。



### (3) スプリット型インフルエンザワクチンの作製

インフルエンザウイルスA Aichi/68/2/H3N2株を接種した発育鶏卵由来浮遊液( $1 \times 10^8$  Plaque forming unit (PFU)) (川崎医科大学・微生物学教室 大内正信教授より供与された)を用いて以下の操作でスプリット型インフルエンザワクチンの作成を行った。0.004M PBS (タカラバイオ株式会社 日本・東京・滋賀)で一晩透析されたウイルス浮遊液に $\beta$ プロピオラクトン(和光純薬株式会社 日本・大阪)を液量の0.05%、最終濃度8 nMになるように添加し、氷浴中で18時間インキュベートした。その後、37°Cで1.5時間インキュベートすることで、 $\beta$ プロピオラクトンの加水分解を行った。その後、終濃度0.1%となるようにTween20(和光純薬株式会社)を加え、さらにTweenと等量のジエチルエーテル(和光純薬株式会社)を加え、4°Cで2時間転倒混和した。この液を2000 rpm、5分間遠心分離することにより水層を回収した。さらにAutomatic Environmental SpeedVac System (SAVANT INSTRUMENTS, INC. アメリカ・ニューヨーク)を用いて水層よりジエチルエーテルの除去を行った。これをMillex 0.45  $\mu$ mフィルター(MILLIPORE アメリカ・マサチューセッツ)で濾過し、不活化スプリット型インフルエンザワクチン(HA)として用いた。なお $\beta$ プロピオラクトンの代わりに、ホルマリンによる不活化スプリット型インフルエンザワクチンも同様に使用できる。

### (4) 粘膜ワクチンの調製

上記(3)で作製したスプリット型インフルエンザワクチン(HA)に、前記(2)で調製したADビークル(SSF-1~SSF-6)を混合し、粘膜ワクチン(HA+SSF-1~HA+SSF-6)を調製した。すなわち、各ADビークルをワクチン投与に必要な濃度で用時PBSに懸濁し、室温、5分間の超音波処理により均一な懸濁液とした。これにADビークルの乾燥重量で0.1  $\mu$ gに対してスプリット型インフルエンザワクチンを0.1  $\mu$ g加え、ボルテックスキサーで混合したのち、室温で1時間静置して使用した。

### (5) 動物

6週齢、メスBALB/cマウスを日本エスエルシー株式会社(日本・静岡)から購入して用いた。全ての動物実験は徳島大学医学部実験動物センターの感染動物舎(P2レベル)で行われ、徳島大学医学部動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

。



#### (6) 免疫法

ワクチンの経鼻投与においては、上記(4)の粘膜ワクチンを乾燥重量相当量として0.1  $\mu$ g/1  $\mu$ L Phosphate buffered saline (PBS) 溶液になるようにPBSで希釈し、これを1匹当たり片側1  $\mu$ Lづつを両側に投与して、合計2  $\mu$ Lをケタラール(62.6 mg/Kg)及びセラクター(12.4 mg/Kg)で麻酔したマウスの両側鼻腔に点鼻投与した。対照群にはワクチン液と同量のPBSを投与した。また、ウイルス抗原のHA単独投与も行った。4週間後に初回免疫と同様の方法によって2次免疫を行った。さらに、HA単独とHA+SSF-4については2次免疫後2週間後に3次免疫を行った。

#### (7) マウス鼻腔・肺胞洗浄液および血清の調製

2次免疫後2週間目のマウスの、鼻腔・肺胞洗浄液および血清を調製して、ウイルス特異的なIgA、IgGの測定を行った。また、HA単独とHA+SSF-4については3次免疫から2週間後に同様にしてIgA、IgGの測定を行った。

[0028] ワクチン投与マウスをペントバルビタール麻酔下で開腹開胸し、気管を切開しアトム静脈カテーテル節付3 Fr(アトムメディカル株式会社 日本・東京)を肺へ挿入後、生理食塩水1 mLを注入し、この液を回収した。これを3回繰り返して採取した液、計3 mLを肺胞洗浄液として用いた。肺洗浄液採取後、切開した気管から鼻腔方向へアトム静脈カテーテルを挿入し、1 mLの生理食塩水を注入し、鼻から出てきた液を採取した。この液を鼻洗浄液として用いた。さらに、心臓より採血を行い、5,000 rpm、10分間の遠心分離により血清を調製した。

#### (8) 抗インフルエンザ抗体の定量

鼻腔、肺胞洗浄液および血清中の抗インフルエンザIgA、IgG含有量を、ELISA assayにより定量した。ELISA assayはBETHYL LABORATORIES社(アメリカ・テキサス)のMouse ELISA quantitation kitの方法に従って行った。96ウェルNuncイムノプレート(Nalgen Nunc International アメリカ・ニューヨーク)各ウェルにワクチン1  $\mu$ g、ウシ血清アルブミン(BSA, SIGMA アメリカ・ミズーリ)1  $\mu$ g/mL PBS溶液100  $\mu$ Lを加え、4°Cで一晩固層化反応を行った。その後洗浄液(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)で3回すすぎワクチン液を除去した。各ウェルに0.15 M NaCl、1% BSAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)200  $\mu$ Lを加え、室温で1時間ブロッキング反

応を行った。各ウェルを洗浄液で3回すすいだのち、サンプル結合緩衝液(50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)にて適量に希釈した鼻洗浄液・肺洗浄液あるいは血清を100  $\mu$  L加え、室温で2時間反応させた。Goat anti-mouse IgAまたはIgG-horse rADish peroxidase (HRP) (BETHYL LABORATORIES INC.)を二次抗体として用い、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. アメリカ・メリーランド)を用いて発色反応を行った。各ウェルに100  $\mu$  L、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (和光純薬株式会社)を添加することによって反応を停止し、450 nmの吸光度をSPECTRAMax PLUS 384で測定した。定量のためのスタンダードとして、上記肺洗浄液から精製した抗インフルエンザIgAおよびIgG 10 ngについて同様にして得られた吸光度を用いた。

#### (9) 結果

抗インフルエンザ抗体の定量結果を表1に示す。HAワクチン単独投与群に比べ、SSF-1からSSF-6をそれぞれHAワクチンと混合した粘膜ワクチン(HA+SSF-1～HA+SSF-6)投与群で抗インフルエンザIgAおよび/またはIgGの産生量が高かった。特に「SP-CL11を含有するSSF-3」、「K6L16を含有するSSF-4」及び「K6L11を含有するSSF-6」で、天然のSP-C(1-35)に匹敵する強いIgAおよびIgG抗体の産生増強作用が確認された。また、SSF-1とSSF-5の抗体産生増強作用がほぼ同等なことから、SSF-3(SP-CL)の一部アミノ酸配列を変えたRK-SP-CLの抗体産生作用への関与は小さいことが確認された。

[0029] さらに、HA+SSF-4の3次免疫後の抗体価は鼻汁IgAおよび血清IgGの双方において大きく増加した。この結果から、本願発明の粘膜ワクチンによる治療では、少なくとも2回、好ましくは3回のワクチン投与が好ましいことが確認された。

[0030] [表1]

粘膜ワクチン	鼻腔洗浄液中の 抗 HA 特異抗体 (IgA:ng/mL)	血清中の 抗 HA 特異抗体 (IgG:ng/mL)	AD ビークル構成成分
対照	28.4±8.8	26.5±8.4	
HA	27.7±5.6	90.4±56.6	
HA (3)	14.9±12.8	281.6±313.6	
HA+SSF-1	69.5±34.4	374.3±176.8	DPPC/PG/PA
HA+SSF-2	257.9±90.7	1025.7±281.8	DPPC/PG/PA+SP-C(1-35)
HA+SSF-3	168.0±71.4	435.0±103.2	DPPC/PG/PA+SP-CL11
HA+SSF-4	167.5±66.0	1473.7±456.1	DPPC/PG/PA+K6L16
HA+SSF-4(3)	639.8±204.4	2129.6±626.7	DPPC/PG/PA+K6L16
HA+SSF-5	71.7±11.3	276.9±119.1	DPPC/PG/PA+RK-SP-CL
HA+SSF-6	50.2±56.9	1698.6±540.9	DPPC/PG/PA+K6L11

注：HA(3)とHA+SSF-4(3)は3次免疫後の結果を示す。

## 実施例 2

[0031] ミニブタモデルにおける粘膜ワクチンの抗体産生増強作用を試験した。

### (1) 方法の概略

ミニブタは5-10週齢(3-7 kg)のクラウン系統(ジャパンファーム・鹿児島)を用いた。ミニブタは初回免疫2週間前に下記の方法で鼻汁サンプルを採取し、ELISA法にて抗インフルエンザ抗体陰性の個体であることを確かめて接種試験に用いた。抗原はインフルエンザウイルスAニューカレドニア株(H1N1)を原料として作成されたホルマリン不活化エーテルスプリットワクチン(表中HA、以下文中ではワクチンと称す:阪大微生物病研究会(香川)より入手)を使用した。ミニブタ1頭あたりのワクチン接種量はヘマグルチニン量に換算して24  $\mu$ gとした。

[0032] ADビークル(SP-C(1-35)含有のSSF-2、SP-CL11含有のSSF-3およびK6L16含有のSSF-4)は実施例1と同様の方法で作成し、ワクチン総タンパク重量1に対してADビークル10の割合で混合した200  $\mu$ l生食懸濁液を文献(Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, Kubo I, Kido H. Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. J Immunol. 2006;176 :1122-30)の方法に従って作成した。この懸濁液を粘膜ワクチン(それぞれ、HA+SSF-2、HA+SSF-3、HA+SSF-4)とし、メドミジン(0.08 mg/Kg)とミタゾラム(0.08 mg/Kg)混合液で鎮静した後ケタラル(0.2 mg/Kg)の麻酔下に、ラット用経口ゾンデを用いて、片鼻あたり100  $\mu$ lずつミニブタの両側鼻腔内へ注入し、こ

れを経鼻ワクチン接種とした。

[0033] 初回のワクチン接種後3週目にブースター接種(2次免疫)を行い、初回投与時から5週目まで毎週鼻汁サンプルおよび頸静脈採血による血清のサンプリングを行った。ワクチン接種週(0、3週)のサンプル採取は、ワクチン接種の2日前に実施した。鼻汁サンプルの採取は、ミニブタ両鼻腔内を綿棒でぬぐいその綿棒を2 mLの生食中で洗浄し、鼻汁を回収した。各サンプルは試験に使用するまで-80°Cで保存した。また、HA単独、HA+SSF-2およびHA+SSF-4については2次免疫から2週目に3次免疫を行い、その後3次免疫から2週目(初回免疫から7週目)にサンプリングを行った。

[0034] 各サンプルに含まれる抗インフルエンザIgAおよびIgG抗体価を、実施例1のELISAを一部改変して測定した。抗インフルエンザ特異抗体の検出は、経鼻接種に用いたワクチン抗原をプレートに固相化し、ミニブタの鼻汁サンプルを4倍、血清サンプルを10倍から2倍ずつ段階希釈したものをを用いて抗体価の測定を実施した。コントロール群としての生理食塩水投与群の鼻汁サンプルの4倍希釈液と、血清サンプルの10倍希釈液の[450nm吸光度の平均値 + 2×標準偏差]を基準値として、これを超える吸光度を示した最大希釈倍率を各サンプルに含まれるIgAあるいはIgG抗体価とした。吸光度が基準値を超えないサンプルについては検出限界以下(N.D.)とした。

## (2) 結果

結果は表2に示したとおりである。血中、鼻汁の抗体価は、共に2次免疫を行った後、1、2週にかけて著しく増加した。5週目の最終抗体価で比較すると、ワクチン抗原のみの経鼻接種によって誘導された抗インフルエンザ抗体価は、鼻汁IgA、血清IgGでそれぞれ28、66であったのに対し、各ADビークル混合粘膜ワクチン接種群においては、IgAで448~784抗体価に、IgGで832~1280抗体価にまで誘導された。また、検定した3種のADビークルSP-C(1-35)、K6L16、およびSP-CL11の効果はいずれも有効で、ADビークル間に統計学的有意差は認められなかった。

[0035] さらに、HA+SSF-2およびHA+SSF-4についての3次免疫後(初回免疫から7週目)の抗体価は、鼻汁IgA抗体価はさらに増加し、HA+SSF-4の場合は血清IgG抗体価も大きく増加した。この結果は、2次免疫だけで7週目まで測定した場合(7週目\*)では、鼻汁IgAおよび血清IgGの抗体価が大きく低下していることから、3次免疫の有効性

を強く示すものである。この結果も、本願発明の粘膜ワクチンを用いた治療では、少なくとも2回、好ましくは3回のワクチン投与が好ましいことが確認された。

[0036] [表2]

		鼻汁 IgA 抗体価 (anti-A/New Caledonia)											
		HA			HA+SSF-2			HA+SSF-4			HA+SSF-3		
0週		N. D.			96	±	37	96	±	37	224	±	212
1週		3	±	2	88	±	48	120	±	99	232	±	208
2週		7	±	7	104	±	102	144	±	81	184	±	222
3週		7	±	7	144	±	81	520	±	405	354	±	458
4週		12	±	5	384	±	431	352	±	460	336	±	218
5週		28	±	27	448	±	128	784	±	869	768	±	862
7週		24	±	23	832	±	322	936	±	342			
7週*		11	±	9	152	±	126	260	±	216			

		血清 IgG 抗体価 (anti-A/New Caledonia)											
		HA			HA+SSF-2			HA+SSF-4			HA+SSF-3		
0週		N. D.			N. D.			N. D.			N. D.		
1週		N. D.			N. D.			N. D.			N. D.		
2週		2	±	1	128	±	91	33	±	64	41	±	60
3週		1	±	2	128	±	91	67	±	126	41	±	60
4週		132	±	134	1280	±	512	608	±	483	801	±	851
5週		66	±	67	1280	±	512	896	±	849	832	±	820
7週		28	±	27	1266	±	484	1250	±	503			
7週*		26	±	24	793	±	481	555	±	546			

注：7週\*は、2次免疫だけで（3次免疫を行わずに）7週目まで測定した結果を示す。

## 請求の範囲

- [1] 以下のアミノ酸配列からなる合成ペプチド：  
PVHLKRLm(ただしmは11-15または16-20)；または  
KnLm(ただしnは4-8、mは11-20)  
と脂質との複合体である抗原薬物(AD)ビークル。
- [2] 合成ペプチドが、配列番号1から3のいずれかのアミノ酸配列からなる請求項1の抗原薬物(AD)ビークル。
- [3] 脂質が、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の少なくとも1種である請求項1の抗原薬物(AD)ビークル。
- [4] 脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールおよびパルミチン酸の3種脂質混合物である請求項3の抗原薬物(AD)ビークル。
- [5] 請求項1から4のいずれかに記載の抗原薬物(AD)ビークルに、粘膜免疫IgAを誘導する量の抗原を共存、接触、捕捉又は吸着させることにより得られる粘膜ワクチン。
- [6] 抗原が伝染病病原体に由来の不活化抗原又は無毒化毒素である請求項5の粘膜ワクチン。
- [7] 請求項1から4のいずれかに記載の抗原薬物(AD)ビークルに、アレルゲン、アレルゲンエピトープ、又はアレルゲン由来抗原を共存、接触、捕捉又は吸着させることにより得られるアレルギー予防剤又は治療剤。
- [8] 請求項5に記載の粘膜ワクチンを、少なくとも2回投与することを特徴とする感染症の予防又は治療方法。
- [9] 請求項7に記載のアレルギー予防又は治療剤を、少なくとも2回投与することを特徴とするアレルギーの予防又は治療方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/056508

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/39(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i

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)

A61K39/39, A61K39/12, A61P31/00, A61P31/16, A61P37/08, A61P43/00, C07K7/08, C07K14/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/018152 A1 (UNIV TOKUSHIMA, JP), 15 February, 2007 (15.02.07), Particularly, Claims; page 10, line 17; example 3 & EP 1930025 A1 & CN 101257919 A	1, 3-7 1-7
Y	Tsunetomo TAKEI et al., "Hito Hai Surfactant Tanpakushitsu-C (SP-C) to sono Yudotai no Kozo to Hyomen Kassei ni Tsuite", Journal of Japanese Medical Society for Biological Interface, 1998, Vol.29, pages 65 to 68	1-7
A	STEER, D.L. et al, Comparison of the binding of alpha-helical and beta-sheet peptides to a hydrophobic surface, J Pept Res, 1998, Vol.51, No.6, p.401-12	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 May, 2009 (19.05.09)

Date of mailing of the international search report  
09 June, 2009 (09.06.09)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/056508

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOGA, T. et al, Surface modification of peptide nanofiber by using antigen-antibody interaction, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 2007, Vol.32, No.2, p.371-374	1-7
A	HARZER, U. et al, Alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: a CD, 15N and 31P solid-state NMR spectroscopy investigation, Biochemistry, 2000, Vol.39, No.43, p.13106-14	1-7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/056508

**Box No. 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.: 8, 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 and 9 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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 No. 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:

The inventions of claims 1-7 relate to an antigen-and-drug vehicle comprising a complex of a lipid and a synthetic peptide which comprises the amino acid sequence PVHLKRLm [wherein m represents a number of 11 to 15 or 16-20] or the amino acid sequence KnLm [wherein n represents a number of 4 to 8 and m represents a number of 11 to 20]. The two synthetic peptides are common in a fact that they have a leucine chain on the C-terminal side. Therefore, it appears that the common special technical feature among the antigen-and-drug vehicles of the inventions of claims 1-7 is the fact.

(continued to extra sheet)

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/056508

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

However, the use of a complex of a lipid and a synthetic peptide comprising the amino acid sequence PVHLKRL<sub>m</sub> [wherein *m* is 16] as an antigen-and-drug vehicle is already known (see WO 2007/018152 A1, p.10, line. 17, Example 3 and others). Therefore, the common matter does not make any contribution over the prior art and cannot be regarded as a special technical feature.

Consequently, the claims of the present application include two inventions respectively relating to an antigen-and-drug vehicle comprising a complex of a lipid and a synthetic peptide comprising the amino acid sequence PVHLKRL<sub>m</sub> [wherein *m* represents a number of 11 to 15 or 16-20] and an antigen-and-drug vehicle comprising a complex of a lipid and a synthetic peptide comprising the amino acid sequence KnL<sub>m</sub> [wherein *n* represents a number of 4 to 8 and *m* represents a number of 11 to 20], and it cannot be considered that there is any technical relationship which so links the inventions claimed in claims as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/39(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/39, A61K39/12, A61P31/00, A61P31/16, A61P37/08, A61P43/00, C07K7/08, C07K14/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), CPlus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2007/018152 A1 (UNIV TOKUSHIMA, JP) 2007.02.15, 特に、特許請求の範囲、第10頁第17行及び実施例3 & EP 1930025 A1 & CN 101257919 A	1, 3-7 1-7
Y	武井恒知他, ヒト肺サーファクタントタンパク質-C (SP-C) とその誘導体の構造と表面活性について, 日本界面医学会雑誌, 1998, Vol.29, p.65-68	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.05.2009

国際調査報告の発送日

09.06.2009

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)	4C	3634
大矢 由利子		
電話番号 03-3581-1101 内線		3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	STEER, D. L. et al, Comparison of the binding of alpha-helical and beta-sheet peptides to a hydrophobic surface, J Pept Res, 1998, Vol.51, No.6, p.401-12	1-7
A	KOGA, T. et al, Surface modification of peptide nanofiber by using antigen-antibody interaction, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 2007, Vol.32, No.2, p.371-374	1-7
A	HARZER, U. et al, Alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: a CD, 15N and 31P solid-state NMR spectroscopy investigation, Biochemistry, 2000, Vol.39, No.43, p.13106-14	1-7

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 8, 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 8, 9 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項1-7に係る発明は、PVHLKRLm（ただしmは11-15または16-20）またはKnLm（ただしnは4-8, mは11-20）のいずれかの合成ペプチドと脂質との複合体である抗原薬物ビークルであって、当該両合成ペプチドは、C末端側にロイシン鎖を有する点で共通しており、その点で、請求項1-7に係る発明の抗原薬物ビークルは共通の特別な技術的特徴を有するかに見えるが、PVHLKRLm（m=16）なる合成ペプチドと脂質との複合体を抗原薬物ビークルとして用いることが、公知であるから（WO 2007/018152 A1の第10頁第17行及び実施例3等参照）、上記共通点は、先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、本願上記請求項には、PVHLKRLm（ただしmは11-15または16-20）なる合成ペプチドと脂質との複合体である抗原薬物ビークルと、KnLm（ただしnは4-8, mは11-20）なる合成ペプチドと脂質との複合体である抗原薬物ビークルの、二つの発明が包含されており、これらが単一の一般的な発明概念を形成するように連関している技術的關係にあるとは認められない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。