

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/108521 A1

(43) 国際公開日

2011年9月9日(09.09.2011)

PCT

(51) 国際特許分類:

A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/32 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2011/054586

(22) 国際出願日:

2011年3月1日(01.03.2011)

(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 2010-045205 2010年3月2日(02.03.2010) 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2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). 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

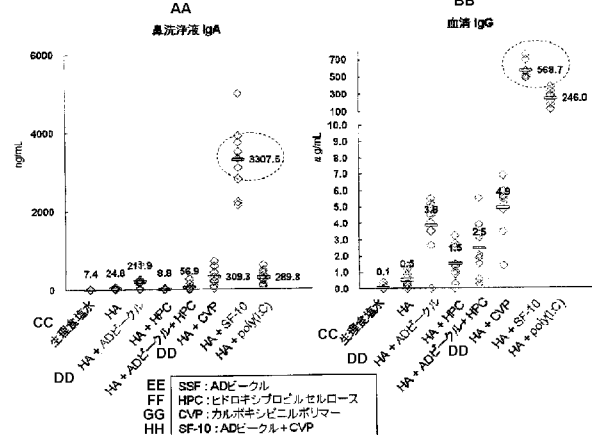
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: MUCOSAL VACCINE

(54) 発明の名称: 粘膜ワクチン

[図1]



AA NASAL LAVAGE FLUID IgA
BB BLOOD SERUM IgG
CC PHYSIOLOGICAL SALINE
DD AD VEHICLE
EE SSF: AD VEHICLE
FF HPC: HYDROXYPROPYL CELLULOSE
GG CVP: CARBOXYVINYL POLYMER
HH SF-10: AD VEHICLE + CVP

(57) Abstract: Disclosed is a mucosal vaccine which is characterized by comprising: (a) an AD vehicle that comprises a lipid and a synthetic peptide which comprises the amino acid sequence of KnLm (wherein n represents a number of 4-8 and m represents a number of 11-20); (b) a carboxyvinyl polymer; and (c) an antigen protein in such an amount that does not produce, by itself, mucosal immunity IgA and blood immunity IgG in such amounts that effective immune induction and protection against the infection can be achieved. The mucosal vaccine is also characterized by producing antigen-specific mucosal immunity IgA and blood immunity IgG in such amounts that effective immune induction and protection against the infection can be achieved. The mucosal vaccine has higher antibody producing ability than conventional mucosal vaccines, and is thus capable of achieving excellent effects with an extremely small amount of antigen.

(57) 要約: 以下の組成: (a) KnLm (ただし n は 4-8、m は 11-20) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなる AD ビークル; (b) カルボキシビニルポリマー; および (c) 単独では、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の粘膜免疫 IgA および血中免疫 IgG を産生させることのない量の抗原蛋白を含み、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫 IgA および血

中免疫 IgG を産生させることを特徴とする粘膜ワクチン。本発明の粘膜ワクチンは、従来の粘膜ワクチンよりもさらに強い抗体産生能を有し、その結果として極めて少量の抗原で優れた効果を発揮することができる。

WO 2011/108521 A1

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))

明 細 書

発明の名称： 粘膜ワクチン

技術分野

[0001] この発明は、粘膜免疫IgAと血中免疫IgGを効果的に誘導する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] さらに本願発明者らは、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合成ペプチドKnLm（ただしnは4-8、mは11-20）を成分とする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3）。

- [0006] なお、粘膜ワクチンと同一の投与経路をとる点鼻薬には、その粘度を高め、花粉症やアレルギーへの効能を持続的に発揮させるためにカルボキシビニルポリマー（CVP）やヒドロキシプロピルセルロース（HPC）が広く使用されている他、その他アルギン酸ナトリウムを始めとする増粘ゲル化剤が使用されている。例えば、HPCを含有する粘膜ワクチン（特許文献4）や、CVPを含有する粘膜適用型ワクチン製剤（特許文献5）および鼻腔内噴霧投与用インフルエンザワクチン（特許文献6）なども知られている。また、特許文献7には、抗原、アジュバント [特にPoly(I.C.)] および増粘剤（アルギン酸ナトリウム等）からなる粘膜投与用のワクチンが開示されている。

特許文献1：国際公開W0 2005/097182号公報

特許文献2：国際公開W0 2007/018152号公報

特許文献3：国際公開W0 2009/123119号公報

特許文献4：特開2008-231343号公報

特許文献5：国際公開W0 01/017556号公報

特許文献6：特開平03-38529号公報

特許文献7：特開2009-209086号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 特許文献3の粘膜ワクチンは強い抗体産生能を有するものであるが、粘膜ワクチンの共通の問題点として、経皮注射ワクチンよりも多量の抗原を必要とする問題点を有している。

- [0008] 有効なワクチン治療のためには、その標的となる感染症の流行範囲に対して十分な量のワクチンが必要となるが、現状の抗原生産量の規模を鑑みた場

合には、粘膜ワクチンの増産は困難である。従って、粘膜ワクチンにさらに強い抗体産生能を付与することが求められている。

[0009] 本願発明は、特許文献3に記載された粘膜ワクチンよりもさらに強い抗体産生能を有し、その結果として経皮注射ワクチンに匹敵するような少量の抗原で優れた効果を発揮することのできる改良型粘膜ワクチン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

[0010] 本願発明者らは、特許文献3の粘膜ワクチンの抗体誘導をさらに増強する手段として、点鼻薬や粘膜適用型ワクチンに使用されているゲル化剤（CVP、HPC）の中から、ADビークルに働いて抗原提示細胞に運ばれる抗原量を増加させ、粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを誘導する効果を試験し、以下を確認した。

(1)特許文献3の粘膜ワクチン（抗原＋合成ペプチド＋脂質）、または特許文献5、6の粘膜ワクチン（抗原＋CVP）に比較して、「抗原＋合成ペプチド＋脂質＋CVP」からなる粘膜ワクチンは遙かに優れた抗体誘導能を有しており、その効果は、特許文献3（抗原＋合成ペプチド＋脂質）と特許文献5、6（抗原＋CVP）の単なる組合せから予測される範囲を大きく超えること。

(2)CVPと同様に点鼻薬や粘膜ワクチンのゲル化剤として広く報告されているHPC賦形剤は、抗原と併用、あるいは抗原とADビークルに併用した場合には全く抗体誘導能を持たず、粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを誘導する効果も期待できないこと。

(3)特許文献3の粘膜ワクチン（抗原＋合成ペプチド＋脂質）において必要な量の約1/5以下に抗原量を減じて、「抗原＋合成ペプチド＋脂質＋CVP」の粘膜ワクチンは遙かに強力な抗体誘導効果を有すること。

[0011] 本発明は、以上の新規な知見に基づき完成された。

[0012] すなわち、本発明は、以下の組成：

(a) KnLm（ただしnは4-8、mは11-20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADビークル；

(b) カルボキシビニルポリマー；および

(c) 単独では、効果的な感染防御効果を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量の抗原蛋白

を含み、効果的な感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることを特徴とする粘膜ワクチンである。

[0013] 本発明の粘膜ワクチンにおいて抗原蛋白 (c) は、さらに、ADビークル (a) との組合せ、またはカルボキシビニルポリマー (b) との組合せによっても効果的な感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量である。

[0014] この粘膜ワクチンにおける一つの態様において、前記の合成ペプチドは配列番号1または2のアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0015] またこの粘膜ワクチンにおける別の態様において、脂質は、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種である。さらに具体的には、脂質は、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。

[0016] この粘膜ワクチンにおけるさらに別の態様において、抗原は病原体に由来の不活化抗原、精製抗原、部分精製抗原、リコンビナント抗原又は無毒化毒素、アレルギーの原因となるアレルゲンを含む。

[0017] さらに本発明は、以下の組成：

(a) KnLm (ただしnは4-8、mは11-20) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADビークル；

(b) カルボキシビニルポリマー；および

(c) 単独では効果的な免疫誘導を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量の抗原蛋白

を含み、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜

免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることを特徴とする粘膜ワクチンの製造法であって、

- (1) 前記 (a) および (c) を水に懸濁し、
- (2) 加温と攪拌とを1回以上反復し、
- (3) 凍結乾燥し、
- (4) 凍結乾燥体を生理食塩水に懸濁して所定濃度に調製し、
- (5) 前記 (b) の溶液を加える、

ことを特徴とする製造方法である。

[0018] 本発明において、「効果的な免疫誘導を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgG」とは、例えば、血液のウイルス感染阻止効果HIの値が国際的評価基準以上であるような量のIgAおよびIgGである。

[0019] なお、以下の説明において、合成ペプチドと脂質とからなる組成物を「ADビークル」と記載し、このADビークルと前記抗原とからなる組成物を「粘膜ワクチン」と記載することがある。これらの「ADビークル」および「粘膜ワクチン」は特許文献3に開示されたものと実施的に同一である。さらに、この粘膜ワクチンにCVPを添加した組成物を「CVP添加粘膜ワクチン」と記載することがある。また、本願発明は、前記の「脂質」に関しては特許文献1-3の開示内容、「合成ペプチド」および「ADビークル」に関しては特許文献3の開示内容を包含するものである。

発明の効果

[0020] 本願発明のCVP添加粘膜ワクチンは、ワクチン抗原特異的IgAおよびIgG抗体の極めて強い誘導効果と、誘導された抗体の国際基準をはるかに超える強いウイルス感染阻止効果（HI効果）を有している。これらの効果は、特許文献3に記載の粘膜ワクチン、あるいは「抗原+CVPワクチン」（特許文献5、6）と比較しても極めて顕著であり、特許文献3の粘膜ワクチン効果と特許文献5、6のCVP効果とからは予期しえないほどの優れた効果である。

[0021] このような強い抗体誘導能から、従来 of 粘膜ワクチンより少量の抗原を含有させることによって必要な感染防御効果が達成される。すなわち、本願発

明のCVP添加粘膜ワクチンは、従来の粘膜ワクチン（抗原+合成ペプチド+脂質）に使用する抗原量を1/5以下にまで減じて、はるかに強力な抗体誘導効果を示す。例えば、試験例2に示したように、特許文献3の粘膜ワクチンは、抗原としてインフルエンザ抗原を使用した場合には、抗原量が $0.2\mu\text{g}$ であっても血液のウイルス感染阻止効果HIはインフルエンザワクチンの国際的評価基準である $\text{HI}=40$ に満たないが、本発明のCVP添加粘膜ワクチンは抗原量が $0.1\mu\text{g}$ 、さらには抗原量が $0.03\mu\text{g}$ であってもHI値が100以上という優れたウイルス感染阻止効果を示す。

[0022] さらに、本願発明のCVP添加粘膜ワクチンの組成物（ADビークル、CVP）自身には、抗原認識細胞刺激効果は無く、そのため投与したワクチン抗原以外の抗原による予期しない副作用、例えば自己免疫疾患、ワクチン接種後のアレルギーの増悪等の起きる可能性は極めて低い。

[0023] また、本発明の粘膜ワクチン製造法によれば、抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGのさらに高い産生能を有する粘膜ワクチンを製造することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]試験1の結果であり、実施例1、比較例1-5の各ワクチン、HA抗原をそれぞれマウスに経鼻投与した場合の、鼻洗浄液IgA量（左）と血清IgG量（右）である。

[図2]試験1の結果であり、実施例1、比較例1、5の各ワクチン、HA抗原、比較対象としてHA+ADビークルをそれぞれマウスに経鼻投与した場合の、抗インフルエンザウイルスHA抗体が示すHI価である。

[図3]試験2において、抗原提示樹状細胞を、エンドトキシン（LPS）、poly(I.C.)、SF-10(CVP+ADビークル)でそれぞれ刺激し、細胞膜の活性化表示分子（MHC II、CD40、CD80 (B7-1)およびCD86 (B7-2)）の発現レベルを測定した結果である。左グラフは各膜分子の発現量が増加して陽性と判定される細胞（右のドット図でコントロールとして用いた生理食塩水処理から決められた中央近傍の陰性値上限表示バーの値を越えた細胞）の全細胞数における割合（

%)で示し、右はフローサイトメトリーの測定結果で、細胞膜上の活性化表示分子の量を可視化定量した図である。

[図4]試験4の結果であり、感染させたインフルエンザウイルスPFU量と生存率の関係を示す。

[図5]試験4の結果であり、マウス(各群10匹)に実施例1、実施例5、比較例5、比較例6の各ワクチンを経鼻投与した後、50 PFUのインフルエンザウイルスを感染させた場合の生存率の変化を示す。

[図6]試験4の結果であり、マウス(各群10匹)に実施例1、実施例5、比較例5、比較例6の各ワクチンを経鼻投与した後、800 PFUのインフルエンザウイルスを感染させた場合の生存率の変化を示す。

[図7]試験6の結果を示す透過型電子顕微鏡写真増である。(A)は比較例1の粘膜ワクチン、(B)は実施例1のCVP添加粘膜ワクチンとその部分拡大像(右図)である。

[図8]試験7において、樹状細胞から検出される蛍光標識抗原量をフローサイトメトリーにより測定した結果である。HA抗原の単独投与時の樹状細胞で検出される抗原の蛍光標識量を1としたときに、それぞれの測定条件で蛍光標識量が何倍促進されたかを縦軸に“Fold versus HA”=[各サンプル測定時のMFI]/[HA単独添加樹状細胞のMFI]として表示した。MFI: Mean Fluorescence Intensity **: $p < 0.01$ vs. HA (n = 3)。

[図9]試験8において、抗原提示樹状細胞を、poly(I.C.)、SF-10(CVP+ADビークル)でそれぞれ刺激し、細胞膜の活性化表示分子(CD86)の発現レベルを測定した結果である。□はHA抗原蛋白なし、■はHA抗原蛋白ありの結果である。MFI: Mean Fluorescence Intensity、*: $p < 0.05$ vs. Adjuvant alone (n = 3)。

[図10]試験9において、マウスにSF-10(CVP+ADビークル)アジュバントを抗原の存在下と非存在下に経鼻投与し、鼻腔組織から調製した樹状細胞のCD86発現レベルを測定した結果である。MFI: Mean Fluorescence Intensity。

発明を実施するための形態

[0025] 本願発明のCVP添加粘膜ワクチンは以下の組成からなる。

合成ペプチド

KnLm（ただしnは4-8、mは11-20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチドである。このKnLmはN末側のn個のK（Lys）残基とC末側のm個のL残基が連続している。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（K6L16）：KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL

配列番号2（K6L11）：KKKKKKLLLLLLLLLLLLL

配列番号1（K6L16）は、N末側の6個のK（Lys）残基とC末側の16個のL残基とからなり、配列番号2（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。これらの合成ペプチドは、公知の化学合成法に従って調製された、純度95%以上のものを使用する。

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。

カルボキシビニルポリマー（CVP）

CVPはアクリル酸を主成分として重合して得られる親水性ポリマーであり、ハイビスワコー103、ハイビスワコー104、ハイビスワコー105、Sigma社製のpAA130（Sigma, St. Louis, MO, Cat No. 181293）、pAA450（Sigma, Cat No. 181285）、pAA1250（Sigma, Cat No. 306215）などの市販品を用いることができる。中でも化粧品や医薬品用ゲルの作成に汎用されているハイビスワコー1

04、Sigma社製のpAA130、pAA1250が好ましい。CVPを純水あるいは生理食塩水で超音波処理下に0.2-2.0重量%溶解液を作成した後、NaOH中和液でpH5.0-10.5の作成が可能であるが、ワクチン抗原の安定性に影響しないpHを選択することが好ましい。例えば、インフルエンザスプリットワクチン抗原の場合では、pH6.8-8.0、好ましくはpH7.0-7.2に調整する。

抗原

抗原は、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、トキソイド等のタンパク質、糖タンパク質、アレルゲン、高分子の糖質や核酸等の抗原分子を含む。例えば、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、重症急性呼吸器感染症候群(SARS)ウイルス、ウエストナイルウイルス、ハンタウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、HIVウイルス、C型肝炎ウイルス、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎菌。コレラ菌、マラリア病原体、眠り病病原体などに対するワクチン用の抗原である。

[0026] これらの抗原は、それ単独、特にADビークル (a) との組合せまたはカルボキシビニルポリマー (CVP) との組合せによっても効果的な免疫誘導を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量を調製して使用する。

[0027] なお、インフルエンザ抗原蛋白の場合はHA抗原分子の他にM蛋白、ノイラミラーゼ、ヌクレオプロテイン等を含有する。以下の説明において、抗原蛋白量はこれらの抗原分子を含む蛋白質総量を意味する。HA抗原分子それ自体の量は、使用したロットのインフルエンザワクチンでは、抗原総蛋白量の約50%であった。

[0028] 次に、これらの材料からADビークルおよびCVP添加粘膜ワクチンを調製する方法を説明する。

ADビークルの調製

前記の脂質のうちの幾つかを任意の割合で混合し、脂質量として、例えば10mg/mLの濃度となるようにクロロホルム：メタノール（2：1（v/v））混合液に懸濁し、脂質成分とする。また、合成ペプチドは、例えば5.0mg/mL濃度となるようにエタノールに溶解する。次いで、この脂質成分と合成ペプチドとを混合する。混合比は、合成ペプチドが約0.2～約12.0乾燥重量%、脂質が約88～約99.8乾燥重量%である。この混合物をロータリーエバポレーターを用いて約40°Cで乾固し、任意の濃度で10%エタノールに再懸濁し、約45°Cの水浴中で15分間程度振盪混和し、均一分散液を調製し、凍結乾燥する。この乾燥物は約-30°Cで保存し、使用時にその都度、純水または生理食塩水を加えて懸濁したのち、超音波、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器等を用いて均一分散液とする。

CVP添加粘膜ワクチンの調製

前記のADビークル、CVPおよび抗原とを任意の割合で混合する。すなわち、インフルエンザワクチンの場合、ワクチン中の抗原蛋白量（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。マウス1匹当たりに投与する抗原蛋白の乾燥重量（A）は約0.01～約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、好ましくは約0.03～約5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重である。この抗原量は、特許文献3の粘膜ワクチン（抗原+ADビークル）における抗原量（約0.1～50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、好ましくは約0.3～30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重）の1/5以下である。

[0029] 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。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。

[0030] またCVPを加えた最終経鼻投与ワクチン液中のCVP濃度は約0.1%～1.0%、好ましくは0.3%～0.8%の割合で添加する。尚、ADビークル、抗原、CVPを均

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。

[0031] 具体的には、下記実施例 1 に示したように、抗原蛋白と AD ビークルを混合した後、3 分間超音波処理を行い、さらに室温で 2 時間回転混和した後、最後に 1% CVP 生理食塩水溶液を等量加えて CVP 添加粘膜ワクチンを製造することができる。この方法は、CVP を添加することを除き、特許文献 3 に記載された方法と同一である。ただし、この方法は、超音波処理による発熱でウイルス抗原が失活する場合のあること、超音波処理の行程は、使用する機材の種類、発振器の大きさ、発振器の状態などから、一定の条件を保持することが困難な場合があることといった不都合がある。

[0032] そこで、実施例 7 に示したような以下の工程からなる製造方法が好ましい。

- (1) AD ビークルと抗原蛋白とを水（純水）に懸濁
- (2) 加温と攪拌とを 1 回以上反復
- (3) 凍結乾燥
- (4) 凍結乾燥体を生理食塩水に懸濁して所定濃度に調製
- (5) 生理食塩水に溶解した CVP 溶液の添加

この方法は超音波処理による前記問題点を解決するだけでなく、後記試験 5 に示したように、さらに高い抗原特異的な IgA および IgG の産生を可能とする、優れた方法である。

[0033] 調製した CVP 添加粘膜ワクチンは、1 回の投与で使用することもできるが、2 回投与（初回免疫と 2 次免疫）または 3 回投与（初回免疫、2 次免疫、3 次免疫）として使用することが好ましい。このような複数回の免疫処置により、IgA および IgG の抗体価を著しく増加させることができる。なお、2 回または 3 回のワクチン投与は、1 週間から 3 週間、好ましくは約 2 週間の間隔で行うようにする。さらに、本願発明の CVP 添加粘膜ワクチンの投与経路は、鼻腔のほか、口腔内や腔腔への投与も可能である（例えば、Lubrizol Pharmaceutical Bulletin, Polymers for Pharmaceutical Applications, Lubrizol Adv

anced Materials, Inc. 2008)。

[0034] 以下、実施例を示して本願発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、本願発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例 1

[0035] [超音波処理を含む製造工程]

まず、以下のとおりにADビークルを調製した。

ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジルグリセロール(PG)、パルミチン酸(PA)を75:25:10 (w/w/w) の割合で混合し、リン脂質量として10 mg/mlの濃度になるようにクロロホルム:メタノール (2:1 (v/v)) 混合液に懸濁し、脂質成分とした。また純度95%以上の合成ペプチドK6L16 (KKK KKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL) (GenScript社製)を5.0 mg/mLになるようにメタノールに溶解した。脂質成分 (DPPC:PG:PA = 75:25:10, w/w/w) 溶液とK6L16ペプチド溶液を重量比として、リン脂質成分 : K6L16= 100: 2となるように混合し、ロータリーエバポレーターを用いて40°Cで乾固した。これをリン脂質量として4 mg/mLとなるように、10%エタノールに再懸濁し、45°Cの水浴中で15分間振盪混和し、均一分散液を調整した。これを凍結乾燥して、ADビークルとして-30°Cで保存した。

[0036] 次に、前記のADビークルを用いてCVP添加粘膜ワクチンを以下のとおりに調製した。

[0037] 凍結乾燥したADビークルは要事に生理食塩水に懸濁して用いた。インフルエンザワクチン(HA)抗原は阪大微生物病研究会より供与されたA/NewCaledonia/20/99(H1N1)、1.94 mg蛋白質/mL (リン酸ナトリウム緩衝液、塩化ナトリウム、チメロサル溶液 : 1 mL中にリン酸水素ナトリウム水和物3.53 mg、リン酸二水素ナトリウム0.54 mg、塩化ナトリウム8.50 mg、チメロサル0.008 mg) を用いた。ワクチンとADビークルの混合量は、抗原溶液の蛋白量 (A) に対するADビークル溶液のリン脂質量 (V) の量比V/A=10となるように混合し、超音波処理 を30秒間隔でオンとオフを3回繰り返す、合計90秒のオンと90秒のオフの合計3分間の超音波処理 (model S-250D、Branson Ultrasonics Danb

ury)を行い、さらに室温で2時間回転混和した後、生理食塩水に溶解し、中性に調整した1% CVP（ハイビスワコー104）で最終濃度で0.5%になるように加えた。すなわち、マウス一匹当たり、片鼻2 μL を両鼻に投与する合計4 μL に含まれる組成は、インフルエンザワクチン(HA)抗原蛋白量/ADビークル溶液のリン脂質量/CVP重量=0.2 μg /2.0 μg /20 μg となる。

なお、このCVP添加粘膜ワクチンのpHは、HA抗原蛋白の抗原性を維持する範囲(7.0—7.2)とした。

- [0038] 以下、このCVP添加粘膜ワクチンを「HA+SF-10」と記載する。なお、SF-10量は、前記のとおりADビークル(2.0 μg) + CVP(20 μg) = 22 μg であるが、下記の説明ではアジュバントのビークル作用の基本骨格となるADビークルのリン脂質量で表記して、SF-10(2.0 μg)と標記する。他の実施例におけるSF-10量もCVP量を除いた値で記載する。

実施例 2

- [0039] 実施例1の方法に準じて、HA抗原蛋白量が0.1 μg のCVP添加粘膜ワクチンを調製した。HA抗原蛋白、ADビークルおよびCVPの混合比は実施例1と同一とした(すなわち、抗原蛋白量の10倍のADビークルと、最終濃度0.5%のCVPを含む)。

実施例 3

- [0040] 実施例1の方法に準じて、HA抗原蛋白量が0.03 μg のCVP添加粘膜ワクチンを調製した。HA抗原蛋白、ADビークルおよびCVPの混合比は実施例1と同一とした(すなわち、抗原蛋白量の10倍のADビークルと、最終濃度0.5%のCVPを含む)。

[比較例 1]

- [0041] 特許文献3の粘膜ワクチン(HA+ADビークル)を調製した。HA抗原蛋白およびADビークルは実施例1と同一のものを使用し、ワクチンの調製は実施例1に準じた。HA抗原蛋白量は0.2 μg 、ADビークル量は2.0 μg である。

[比較例 2]

- [0042] 特許文献5、6に開示された粘膜ワクチン(HA+CVP)を調製した。HA抗原

蛋白およびCVPは実施例 1 と同一のものを使用し、ワクチンの調製は実施例 1 に準じた。HA抗原蛋白量は $0.2 \mu\text{g}$ 、CVPは最終濃度 0.5% である。

[比較例 3]

[0043] 特許文献 4 に開示された粘膜ワクチン (HA+HPC) を調製した。HA抗原蛋白は実施例 1 と同一のものを使用し、HPCは市販のHPC 6.0-10.0 (和光純薬) を使用した。ワクチンの調製は実施例 1 に準じた。HA抗原蛋白量は $0.2 \mu\text{g}$ 、HPC量は $20 \mu\text{g}$ である。

[比較例 4]

[0044] 特許文献 3 のHA+ADビークルに、さらにHPCを添加した粘膜ワクチン (HA+ADビークル+HPC) を調製した。HA+ADビークルは比較例 1 と同一のもの、HPCは比較例 3 と同一のものをそれぞれ使用し、ワクチンの調製は実施例 1 に準じた。HA抗原蛋白量は $0.2 \mu\text{g}$ 、ADビークル量は $2.0 \mu\text{g}$ 、HPC量は $20 \mu\text{g}$ である。

[比較例 5]

[0045] 樹状細胞のToll-Like Receptor (TLR) のリガンドであり、抗原提示細胞を強く刺激して抗体産生を促進するpoly (I.C.) (Alexis Corp.) を含む粘膜ワクチン (HA+poly (I.C.)) を文献 ((Asahi-Ozaki Y et al., Microbes Infect 2006; 8:2706-2714, Ichinohe T, et al., J Virol 2005; 79(5): 2910-2919) に記載の方法に準じて調製した。HA抗原蛋白量は $0.2 \mu\text{g}$ 、poly (I.C.)量は $2 \mu\text{g}$ である。

[比較例 6]

[0046] HA抗原を生理食塩水で希釈して、ワクチンとして使用した。1匹当たりのHA抗原蛋白投与量は $0.2 \mu\text{g}$ である。

[試験 1]

[0047] マウスを用いて、経鼻粘膜ワクチンの抗体産生増強作用を試験した。

1. 粘膜ワクチン

- ・ HA+SF-10 (実施例 1)
- ・ HA+ADビークル (比較例 1)

- ・ HA+CVP (比較例 2)
- ・ HA+HPC (比較例 3)
- ・ HA+ADビークル+HPC (比較例 4)
- ・ HA+poly (I. C.) (比較例 5)
- ・ HA単独 (比較例 6)

2. 動物

6-8週齢、メスBALB/c雌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。

3. 免疫法

ワクチンの経鼻投与においては、上記 1 の 5 種の粘膜ワクチンを、片鼻に 2 μ Lづつを両側に投与して、合計 4 μ L をケタラール (62.6 mg/Kg) 及びセラクタール (12.4 mg/Kg) で麻酔したマウスの両側鼻腔に点鼻投与した。対照には、ワクチン液と同量の生理食塩水投与群および比較例 6 (HA 抗原蛋白単独投与群) を用いた。各群は 9-10 匹のマウスから成る。

[0048] 免疫は初回免疫後 2 週目に同様の組成からなる検体を、それぞれの群に 2 次免疫として同量経鼻投与した。2 次免疫後 2 週目に同様な方法で 3 次免疫を行い、その後 2 週目に検体を採取した。なお、ワクチンの投与は合計 3 回おこなっているが、2 次免疫で終了してもほぼ同様の結果が得られる。

4. マウス鼻腔・肺胞洗浄液および血清の調製

3 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 HA 抗原特異的な IgA、IgG の測定を行った。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) 記載の方法に準じて、以下のとおりに行った。

[0049] 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。

5. 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、前記文献（Mizuno D, et al. J Immunol. 2006;176 :1122-30）の記載に従い、ELISA assayにより定量した。

[0050] 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 μ g、ウシ血清アルブミン（BSA, SIGMA アメリカ・ミズーリ）1 μ g/mL PBS溶液100 μ 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 μ 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 μ 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 μ L、2 M H₂SO₄（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。

6. 結果

抗インフルエンザHA抗体の誘導結果を、鼻洗浄液中のIgA（左図1）、血液中のIgG（右図1）に示す。また、それぞれの測定値を表1に示す。また、図2および表2は各試験群のHI価を示す。

(1) HA抗原単独投与群（比較例6）のIgA量は24.77ng/mL、IgG量は0.54 μ g/mLに対して、HA+SF-10（実施例1）投与群ではIgA量が3307.60ng/mL、IgG量は568.75 μ g/mLであり、鼻洗浄液中のIgAで132倍に、血清中のIgGで1137倍に増強した。本願発明のCVP添加粘膜ワクチン（HA+SF-10）が極めて強い抗体誘導効果を有することが確認された（図1、表1）。

(2) HA+SF-10（実施例1）投与群における抗体産生量は、HA+ADビークル（比較例1）よりもIgAで15.6倍、IgGで150倍であり、HA+CVP（比較例2）よりもIgAで10.7倍、IgGで115.4倍であった（図1、表1）。HA+SF-10におけるこのような顕著に優れた抗体誘導効果は、特許文献3において公知の粘膜ワクチン（HA+ADビークル）と、特許文献5、6において公知のCVPとの単純な組み合わせから予測される範囲を遙かに超えるものであった。

(3) HA+HPC（比較例3）投与群の抗体産生量は、HA単独投与群（比較例6）と同様またはそれ以下であった。また、HA+ADビークル+HPC（比較例4）投与群の抗体産生量は、HA+ADビークル（比較例1）よりも低かった（図1、表1）。以上の結果から、CVPと同様に点鼻薬や粘膜ワクチンにおいてゲル化剤として広く知られているHPCは、抗原との併用およびADビークルとの併用において免疫誘導増強効果を持たないことが確認された。このことから、ADビークルのアジュバント効果の増強には、単に増粘効果を持つ賦形剤ではなくADビークルの特性を基盤としたその増強効果であることが推定される。

(4) HA+SF-10（実施例1）投与群における抗体産生量は、HA+poly(I.C.)（比較例5）よりも鼻洗浄液中のIgAで11.4倍、血清中のIgGで2.3倍であった（図1、表1）。この結果から、本願発明のCVP添加粘膜ワクチン（HA+SF-10）は、抗原提示細胞を強く刺激して抗体産生を促進するpoly(I.C.)よりも

強い免疫誘導効果を有することが確認された。

[0051] [表1]

抗体価

	nasal wash IgA (ng/mL)			serum IgG (μ g/mL)		
	mean	S.D.	S.E.	mean	S.D.	S.E.
生理食塩水	7.45	4.79	1.51	0.06	0.14	0.04
HA	24.77	25.83	8.17	0.54	0.48	0.15
HA + ADビークル	211.94	167.90	53.10	3.84	0.91	0.29
HA + HPC	8.82	4.96	1.65	1.51	1.12	0.37
HA + ADビークル + HPC	56.92	89.05	29.68	2.46	1.67	0.56
HA + CVP	309.34	231.08	77.03	4.93	1.61	0.54
HA + SF-10	3307.60	882.55	294.18	568.75	95.18	31.73
HA + poly(I:C)	289.78	136.40	43.13	246.04	90.93	28.76

[0052] (5) インフルエンザワクチンの国際的評価基準では、血液のウイルス感染阻止効果HI=40を超えたワクチンを有効と判定しているが、HA+ADビークル（比較例1）ではHI=40を越えた検体が50%で、平均値でHI=39を示した。これに対して、HA+SF-10（実施例1）では全例がHI=40を越え、平均値でHI=213.3と高値を示し、またHA+poly(I.C.)（比較例5）のHI=137.0に比べて1.56倍の強いウイルス感染阻止効果を示した（図2、表2）。

[0053] [表2]

HI titer

	mean	S.D.	S.E.
生理食塩水	10.6	6.60	2.09
HA	15.3	5.91	1.87
HA + SSF	39.0	30.35	9.60
HA + SF-10	213.3	80.00	26.67
HA + poly(I:C)	137.0	105.63	33.40

[試験2]

[0054] 調整した抗原提示樹状細胞（Mizuno D et al., J Immunol 2006;176:1122-1130）を、エンドトキシン（LPS: 100 ng/1 \times 10⁵ 細胞）（Grauer O, et al., Histochem Cell Biol 2002; 117:351-362）、poly(I.C.) (10 μ g/1 \times 10⁵ 細胞)、SF-10(CVP添加ADビークル10 μ g/1 \times 10⁵ 細胞)でそれぞれ刺激し、細胞膜の活性化表示分子（MHC II、CD40、CD80(B7-1)およびCD86(B7-2)）の発現レベルを測定した。

[0055] 結果は図3に示したとおりである。LPSおよびpoly(I.C.)はCD40およびCD86

の発現を著明に増加させ、抗原提示樹状細胞を活性化させたが、SF-10は抗原提示樹状細胞上のMHC II、CD40、CD80およびCD86の発現を増加させず、対照（無処理細胞）の発現量とほぼ同等のレベルであった。

[0056] 以上の結果から、SF-10は抗原提示樹状細胞を直接活性化することなしに、抗原提示能を増強して抗体産生量を増加させていること、すなわち、SF-10が効果的に抗原を抗原提示樹状細胞に運搬して抗体産生を誘導することが推定された

[試験3]

[0057] 実施例1（HA抗原蛋白量：0.2 μ g）、実施例2（HA抗原蛋白量：0.1 μ g）、実施例3（HA抗原蛋白量：0.03 μ g）の各CVP添加粘膜ワクチンを試験1と同様にマウス（各群10匹）に投与し、試験1と同様に鼻洗浄液中のIgA、血液中のIgGを測定した。

[0058] 結果は表3に示したとおりである。実施例1（HA抗原蛋白量：0.2 μ g）および実施例2（HA抗原蛋白量：0.1 μ g）はほぼ同等の抗体誘導効果を示した。さらに、実施例1よりも抗原蛋白量が1/6以下の実施例3（HA抗原蛋白量：0.03 μ g）も、試験例1（表1）の比較例2：HA+ADビークル（HA抗原蛋白量：0.2 μ g）および比較例3：HA+CVP（HA抗原蛋白量：0.2 μ g）に比べて遙かに強力な抗体誘導効果を示した。すなわち、実施例3投与群のIgA量は比較例2の11.7倍、比較例3の8.0倍であり、IgG量は比較例2の77.2倍、比較例3の60.1倍であった。

[0059] 以上の結果から、本願発明のCVP添加粘膜ワクチンは、特許文献3（HA+ADビークル）や特許文献5、6（HA+CVP）の粘膜ワクチンよりも、遙かに少ない抗原量によって十分な抗体産生が可能であることが確認された。またウイルス感染阻止効果（HI効果）においても、CVP添加粘膜ワクチンではHA抗原蛋白量：0.03 μ gでもHI=198.0と十分な感染抑止効果を示した。

[0060]

[表3]

CVP 添加ワクチン (HA+SF-10) 中の HA 抗原の濃度変化と、鼻洗浄液と血液中の抗インフルエンザ抗体誘導効果

HA+SF-10 HA protein dose ($\mu\text{g}/\text{head}$)	Nasal wash IgA (ng/mL)			Serum IgG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Serum HI titer		
	mean	S.D.	S.E.	mean	S.D.	S.E.	mean	S.D.	S.E.
HA = 0	7.30	4.21	1.12	0.06	0.11	0.03	5.8	6.12	1.89
HA = 0.03	2480.41	651.24	223.11	296.32	83.43	27.58	198.0	80.36	23.32
HA = 0.10	3100.22	781.13	263.36	588.61	94.30	30.42	220.0	82.73	29.27
HA = 0.20	3200.18	803.45	291.10	550.60	93.10	29.31	256.7	88.15	30.02

実施例 4

[0061] 実施例 1 の方法に準じて、AD ビークル量が $0.3 \mu\text{g}$ 、HA 抗原蛋白量が $0.03 \mu\text{g}$ の CVP 添加粘膜ワクチンを調製した。HA 抗原蛋白、AD ビークルおよび CVP の混合比は実施例 1 と同一とした（すなわち、抗原蛋白量の 10 倍の AD ビークルと、最終濃度 0.5% の CVP を含む）。

[試験 4]

[0062] マウス（各群 10 匹）に、実施例 1（AD ビークル： $2.0 \mu\text{g}$ 、HA 抗原蛋白量： $0.2 \mu\text{g}$ ）および実施例 4（AD ビークル： $0.3 \mu\text{g}$ 、HA 抗原蛋白量： $0.03 \mu\text{g}$ ）の各 CVP 添加粘膜ワクチンを試験例 1 と同様にしてそれぞれ投与し、2 回目のブースターワクチン投与（合計 3 回免疫）から 14 日後に 50 PFU および 800 PFU のインフルエンザウイルス（A/PR8 (N1H1)/ μL ）を感染させた。

[0063] なお、図 4 に示したように、半数死亡率（LD50）が得られる感染ウイルス量は PFU < 5 であり、ワクチン処置を行わない場合、50 PFU は感染後 9 日、100 PFU 以上では 8 日目以内に全マウスが死亡した。

[0064] ワクチン接種の生存率への果は図 5、図 6 に示したとおりである。コントロール（生理食塩水）および比較例 6（HA 抗原蛋白単独）の場合は共に、50 PFU のウイルス感染から 7-9 日で、800 PFU のウイルス感染では 7 日後に全例が死亡した。また比較例 5（HA+poly (I.C.)）の場合は、800 PFU のウイルス感染では 10 匹中 9 匹が 9 日後までに死亡した。

[0065] これに対して、実施例 1 および実施例 4 の CVP 粘膜ワクチンを投与したマウ

スは、50 PFUのウイルス感染では全例が15日間生存した。また、800 PFUのウイルス感染では、実施例1のワクチンでは死亡は10匹中1匹（8日以後）であり、実施例4のワクチンでは10匹中5匹（10日後）であった。

[0066] 以上の結果から、本発明のCVP添加粘膜ワクチンは優れた感染予防効果を有することが確認された。

実施例 5

[0067] [超音波処理を含まない製造工程B]

実施例1と同様のHA抗原蛋白液に、凍結乾燥したADビークル粉末を純水に溶解して加え、次いでこの混合液に純水に溶解した1.0% CVPを等量混合して懸濁液を調整した。これを、超音波処理すること無くウォーターバスを用いて10分間42°Cに加温処理し、加温処理中3分、7分時にミキサーで10秒間攪拌して液を均一化した。加温処理後、懸濁液を-30°C~-75°Cで一晩凍結させ、凍結乾燥を行って乾燥粉末体を作成した。凍結乾燥粉末は-30°Cで保存した。要事に凍結乾燥粉末を生理食塩水に懸濁して、CVP添加粘膜ワクチンとした。マウス1匹当たり片鼻2 μ Lを両鼻に投与する合計4 μ Lに含まれるワクチン液中のCVPは0.5%、HA抗原蛋白量は0.2 μ g、ADビークルのリン脂質量は2.0 μ gに調整した。以下、このCVP添加粘膜ワクチンをHA+SF-10-Bと記載する。

実施例 6

[0068] [超音波処理を含まない製造工程C]

実施例と同様のHA抗原蛋白液に、凍結乾燥したADビークル粉末を純水に溶解して混合調整した。この懸濁液を、ウォーターバスを用いて10分間42°Cに加温処理し、加温処理中3分、7分時にミキサーで10秒間攪拌して液を均一化した。加温処理後、懸濁液を-30°C~-75°Cで一晩凍結させ、凍結乾燥を行って乾燥粉末体を作成した。凍結乾燥粉末は-30°Cで保存した。要事に凍結乾燥粉末を、あらかじめ生理食塩水に溶解した0.5% CVP液で泡立たないように軽く攪拌、溶解してCVP添加粘膜ワクチンとした。マウス1匹当たり片鼻2 μ Lを両鼻に投与する合計4 μ Lに含まれるHA抗原蛋白量は0.2 μ g、ADビークルのリン脂質量は2.0 μ gである。以下、このCVP添加粘膜ワクチンをHA+SF-10-C

と記載する。

[試験 5]

[0069] 実施例 1（以下、「HA+SF-10-A」と記載する）、実施例 5（HA+SF-10-B）、および実施例 6（HA+SF-10-C）の各CVP添加粘膜ワクチンを、それぞれマウス（各群10匹）に試験例 1 と同様に接種（2週間間隔で 3 回）し、試験例 1 と同様に抗インフルエンザIgAおよびIgG抗体を測定した。

[0070] 結果は表 4 に示したとおりである。実施例 6（HA+SF-10-C）は、実施例 1（HA+SF-10-A）および実施例 5（HA+SF-10-B）と比べてIgA量において約 2 – 4 倍、IgG量において約 2 倍の抗体誘導効果を示した。すなわち、実施例 6 の方法（工程C）は、超音波処理工程を含まないことと、CVP液の添加を最終工程で行なうことによって、その優れた抗体誘導効果をもたらすことが推定された。

[0071] [表4]

ワクチン製造行程の違いによる抗体誘導効果の比較

	Anti-influenza A/New Caledonia 抗体価 (μg/mL)				
	生理食塩水	HA	HA-SF-10 (A 工程)	HA-SF-10 (B 工程)	HA-SF-10 (C 工程)
Nasal IgA	0.01±0.01	0.28±0.12	4.98±0.73*	10.65±2.52*	24.06±2.24*
Serum IgG	0.06±0.04	5.64±0.48	624.10±59.01*	586.27±52.3*	1264.48±143.55*

[試験 6]

[0072] 本発明のCVP添加粘膜ワクチンの各組成（HA抗原蛋白、ADビークル、CVP）の状態を、透過型電子顕微鏡で観察した。図 7 に示したように、CVPは抗原とADビークルとの結合を大幅に増加させていることが確認された。

[0073] CVPは、鼻腔内での有効成分の滞留性を改善する増粘剤ポリマーの一つとして、ヒドロキシプロピルセルロース（特許文献 4）、アルギン酸ナトリウム（特許文献 7）、その他の賦形剤と同様に、増粘剤として使用されてきた（特許文献 5、6）。しかし、この試験 6 の結果が示すように、本発明におけるCVPがADビークルとの組合せにおいて、抗原とADビークルとの結合を増強さ

せ、抗原提示細胞に取り込まれる抗原量を増加させ、ADブークル効果を増強していることが判明した。

[試験 7]

[0074] 実施例 1 に記載した SF-10 (ADブークル+CVP) (20 μ g) と、蛍光色素 ATT0488 でラベルした実施例 1 記載の HA 抗原蛋白 (2 μ g) とを混合して、マウス骨髄由来樹状細胞 (2 \times 10⁵ cells) に添加し、1 時間後に蛍光色素標識 HA 抗原蛋白によってラベルされた樹状細胞の蛍光標識量をフローサイトメトリーにより測定した。また、比較例 5 に記載の poly (I:C) (10 μ g) と前記の蛍光標識 HA 抗原蛋白 (2 μ g) とを混合し、同じく樹状細胞が示す蛍光標識抗原量を測定した。樹状細胞が示す蛍光は、蛍光色素標識 HA 抗原蛋白の細胞への結合と取り込み量を反映する。

[0075] 結果は図 8 に示したとおりである。Poly (I:C) には蛍光色素標識 HA 抗原蛋白の樹状細胞への結合と取り込み量を促進しなかったが、SF-10 は有意な促進効果を示した。

[0076] 以上の結果から、本発明の SF-10 粘膜ワクチンは、抗原提示細胞への抗原蛋白の結合及び取り込みを促進することによって、抗体産生量を増加させ、さらには優れた感染防御能を発揮していることが確認された。

[試験 8]

[0077] 1 mL の cRPMI 培地で培養したマウス骨髄由来樹状細胞 (2 \times 10⁵ cells) に、以下を添加し、1 時間後の樹状細胞の活性化を樹状細胞の活性化マーカーの一つである CD86 発現増加を指標にフローサイトメトリーにより測定した。なお、計測には FACSCalibur cytometer (BD Biosciences、アメリカ、マサチューセッツ) を、データ処理には CellQuest software (BD Bioscience、アメリカ、マサチューセッツ) を用い CD86 の発現を測定した。

- ・生理食塩水
- ・生理食塩水 + HA 抗原蛋白
- ・SF-10
- ・SF-10 + HA 抗原蛋白

- ・ Poly(I. C.)
- ・ Poly(I. C.) + HA抗原蛋白

なお、HA抗原蛋白 (2 μ g) およびSF-10 (20 μ g) は実施例 1 に記載のものであり、Poly(I. C.) (10 μ g) は比較例 5 と同一のものを使用した。

[0078] 結果は図9に示したとおりである。Poly(I:C)は、試験 2 と同様に単独でCD86の発現を増加（樹状細胞を活性化）するが、抗原を添加してもCD86の発現はさらに増加することはなかった。これに対して、SF-10はそれ単独で樹状細胞を活性化しないが、抗原の共存下でのCD86発現量は約2倍に増強された。

[0079] 以上の結果から、本発明のCVP添加粘膜アジュバントのSF-10は、抗原を抗原提示樹状細胞に運搬して樹状細胞を活性化し、抗体産生を促進していることが推定された。

[0080] なお、同じく樹状細胞の活性化マーカーの一つであるCD40でも同様の結果が得られた。

[試験 9]

[0081] 試験 8 において、in vitroで確認したSF-10の抗原運搬に依存した樹状細胞活性化をマウス個体 (in vivo) で試験するため、試験 8 と同一の以下をマウス鼻腔内に投与した。

- ・ 生理食塩水
- ・ 生理食塩水 + HA抗原蛋白
- ・ SF-10
- ・ SF-10 + HA抗原蛋白

なお、動物実験は試験 1 に準じておこなった。HA抗原蛋白 (0.2 μ g) およびSF-10 (2 μ g) は実施例 1 に記載のものであり、Poly(I. C.) (2 μ g) は比較例 5 と同一のものを使用した。

[0082] 経鼻接種後48時間にマウスから頭部を切断し、鼻腔内組織を採取し、コラゲナーゼ処理 (1 mg/mL、37°C、30分振蕩) を行った。メッシュでろ過した後、遠心 (4°C、10分、200 \times g) により回収した細胞から、Anti-CD11c (N-418) -conjugated magnetic beads (Miltenyl Biotech、ドイツ、ベルギッシュグ

ラートバッハ)、LSカラムを用いたVariomACS (Miltenyi Biotec、ドイツ、ベルギッシュグラートバッハ) 法にて、説明書に記載された方法に従い樹状細胞を調整した。次いで試験8と同様な方法で、CD86の発現増加を測定した。

[0083] 結果は図10に示したとおりである。マウスの鼻腔においても、SF-10の抗原運搬に依存した樹状細胞活性化が確認された。

[試験10]

[0084] CVPの好ましい濃度を試験した。

CVPとしてSigma社製のpAA130を使用し、その濃度を0.1%、0.25%、0.5%、0.75%または1.0%とした以外は、実施例6と同様の方法によりCVP添加粘膜ワクチンを製造し、試験例1記載の方法によりマウスの鼻洗浄液IgAおよび血清IgGを測定した。

[0085] 結果は表5に示したとおりであり、IgA、IgGともにCVP pAA130濃度0.5%まではCVP量の増加に従った抗体誘導効果の上昇が認められた。CVP 0.5%をピークとしてこれよりも高い濃度のCVPを用いた際には逆に抗体誘導効果が減少する傾向が認められた。

[0086] [表5]

HA-SF-10 経鼻ワクチンにおける CVP 濃度の影響

	anti-A/NewCaledonia 抗体価	
	Nasal wash IgA (μg/mL)	Serum IgG (μg/mL)
生理食塩水	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.04
HA	0.28 ± 0.12	5.64 ± 0.48
<u>HA-SF-10</u>		
CVP 0.1%	9.52 ± 1.41	624.17 ± 59.53
CVP 0.25%	14.03 ± 1.31	488.16 ± 152.70
CVP 0.5 %	24.06 ± 2.24	1264.48 ± 143.55
CVP 0.75%	14.18 ± 1.33	875.62 ± 82.90
CVP 1.0%	10.85 ± 1.42	875.60 ± 64.52

請求の範囲

- [請求項1] 以下の組成：
- (a) KnLm（ただしnは4-8、mは11-20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADビークル；
 - (b) カルボキシビニルポリマー；および
 - (c) 単独では、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量の抗原蛋白を含み、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることを特徴とする粘膜ワクチン。
- [請求項2] 抗原蛋白（c）が、ADビークル（a）との組合せ、またはカルボキシビニルポリマー（b）との組合せによっても効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量である請求項1の粘膜ワクチン。
- [請求項3] 合成ペプチドが、配列番号1または2のアミノ酸配列からなる請求項1の粘膜ワクチン。
- [請求項4] 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の粘膜ワクチン。
- [請求項5] 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の粘膜ワクチン。
- [請求項6] 抗原蛋白が病原体に由来の不活化抗原、精製抗原、部分精製抗原、リコンビナント抗原又は無毒化毒素、アレルギーの原因となるアレルゲンである請求項1の粘膜ワクチン。
- [請求項7] 以下の組成：

(a) KnLm (ただしnは4-8、mは11-20) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADビークル；

(b) カルボキシビニルポリマー；および

(c) 単独では、効果的な免疫誘導を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量の抗原

を含み、効果的な免疫誘導を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgA

および血中免疫IgGを産生させることを特徴とする粘膜ワクチンの製造法であって、

(1) 前記 (a) および (c) を水に懸濁し、

(2) 加温と攪拌とを1回以上反復し、

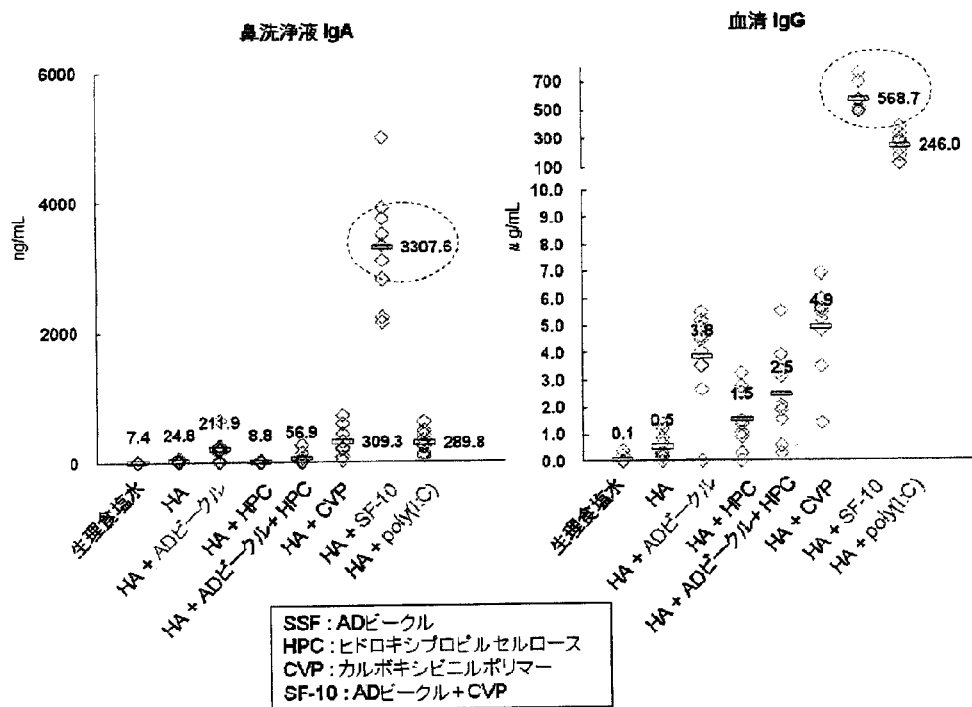
(3) 凍結乾燥し、

(4) 凍結乾燥体を生理食塩水に懸濁して所定濃度に調製し、

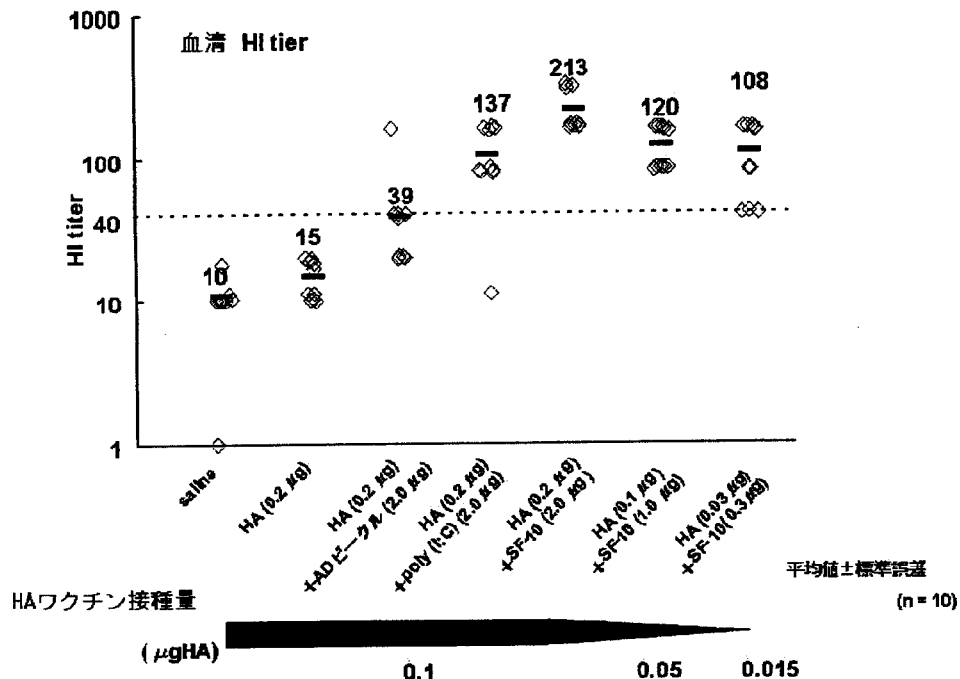
(5) 前記 (b) の溶液を加える、

ことを特徴とする製造方法。

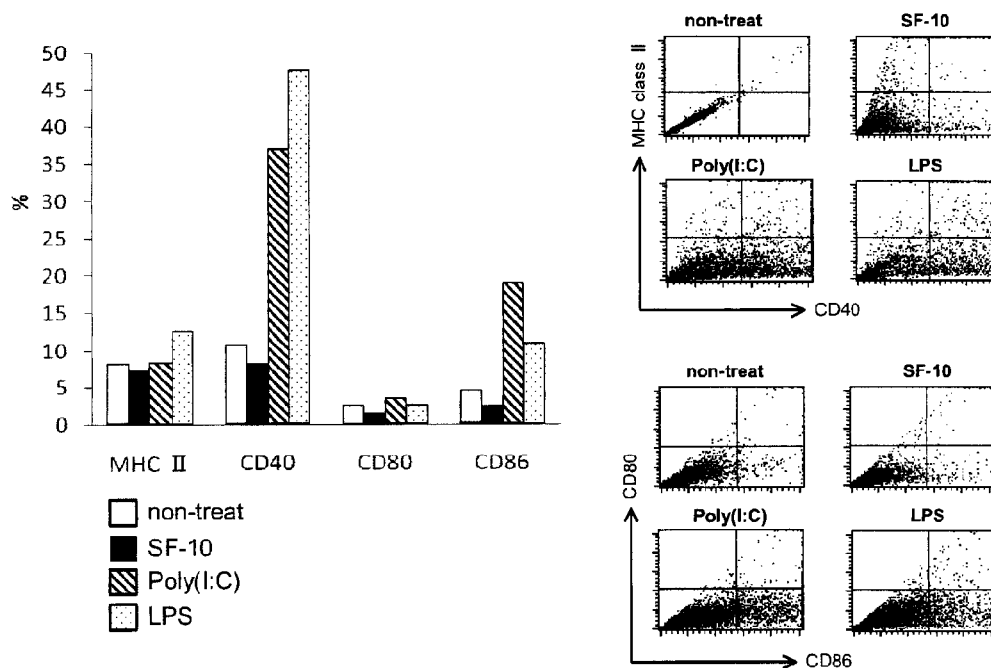
[図1]



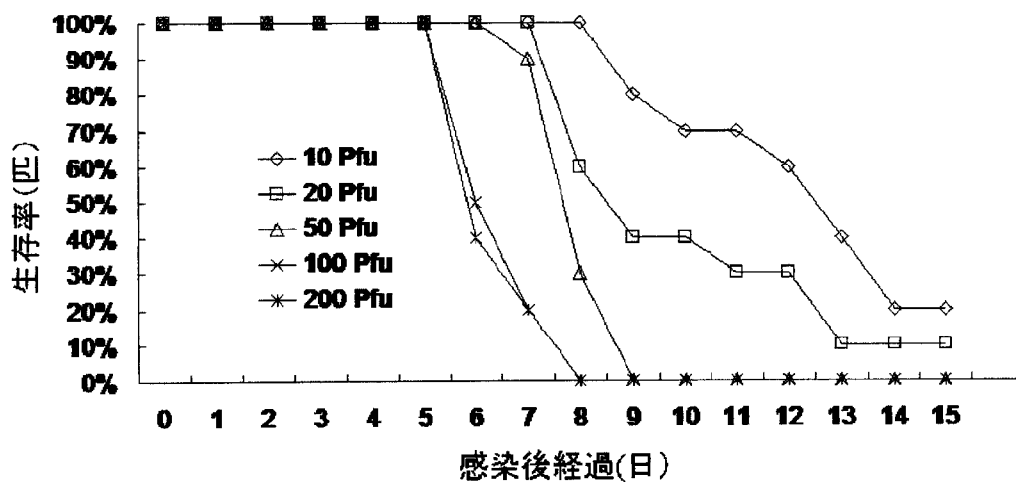
[図2]



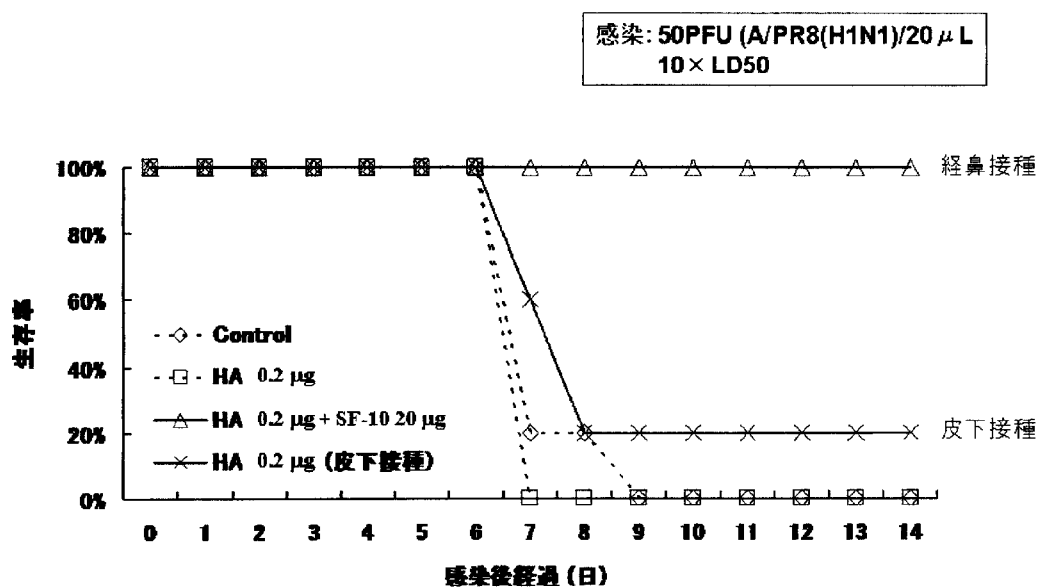
[圖3]



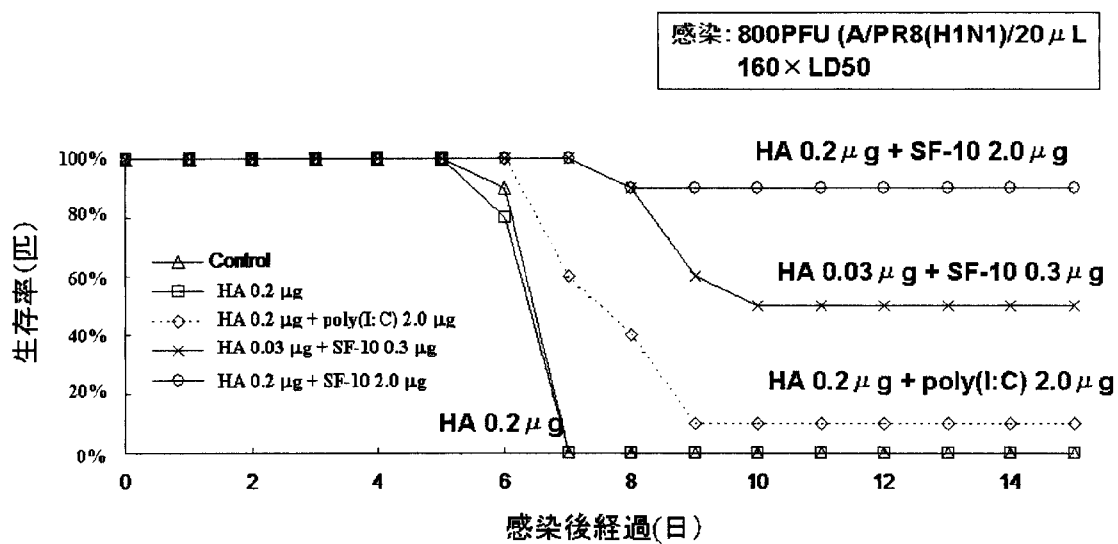
[圖4]



[图5]

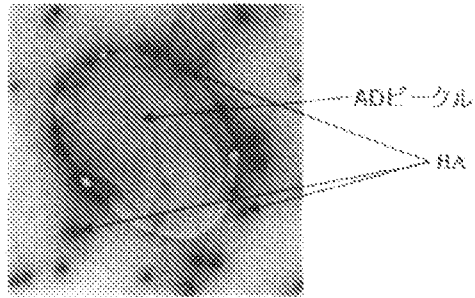


[图6]

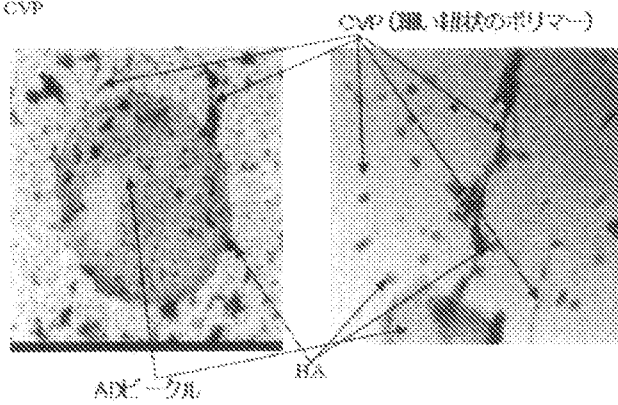


[図7]

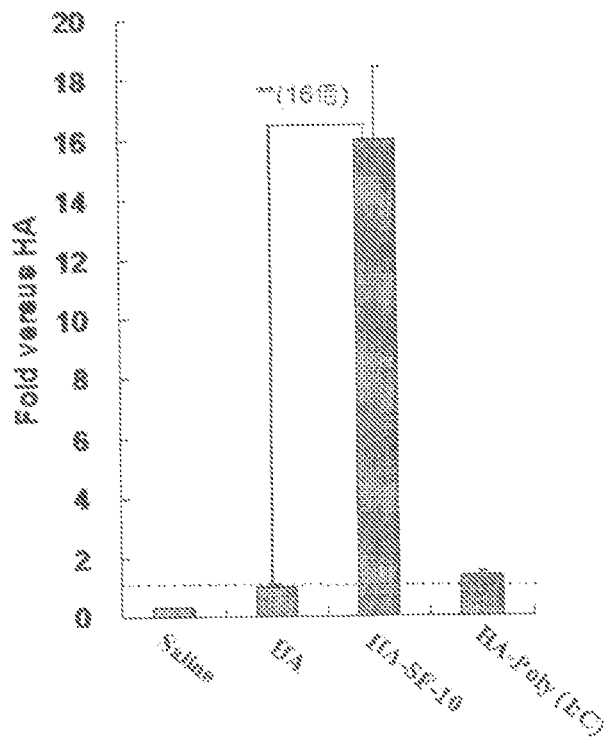
(A) ADE-ゲル+HA



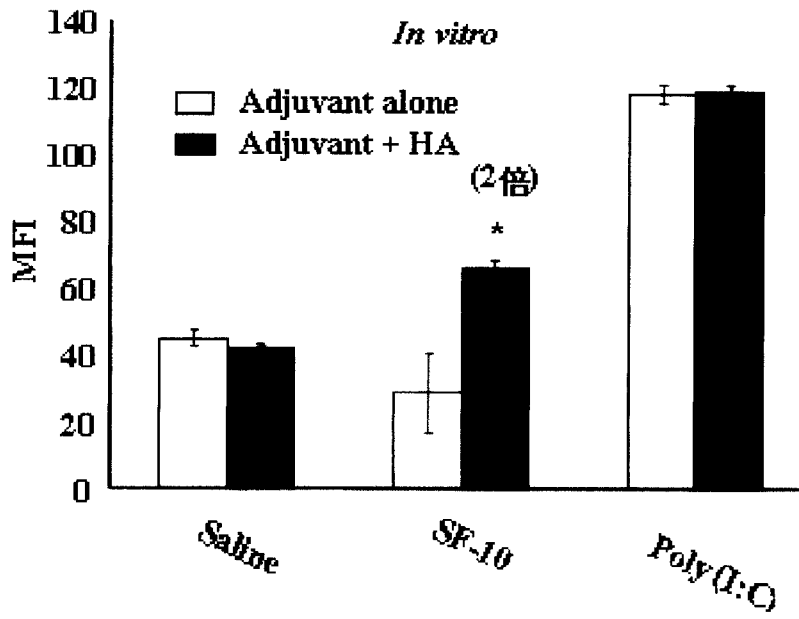
(B) ADE-ゲル+HA+CVP



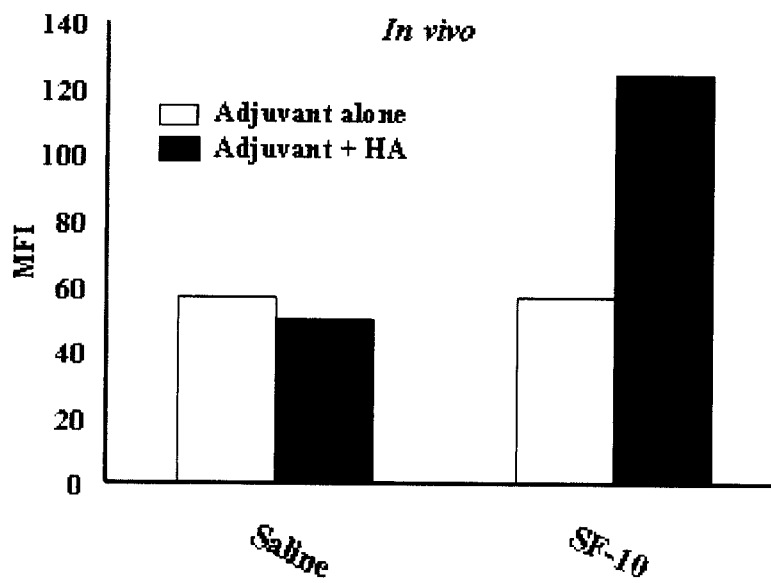
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/054586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/00(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K39/02(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/35(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/32(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/16(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)

A61K39/00-39/44, A61K9/00-9/72, A61K47/00-47/48, A61P31/00, A61P31/16

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/17556 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 15 March 2001 (15.03.2001), (Family: none)	1-7
A	JP 3-38529 A (Toko Yakuhin Kogyo Co., Ltd.), 19 February 1991 (19.02.1991), & EP 391342 A1 & US 5158761 A	1-7
A	WO 09/123119 A1 (The University of Tokushima), 08 October 2009 (08.10.2009), (Family: none)	1-7
A	Tiwari, S. et.al., Liposome in situ gelling system: Novel carrier based vaccine adjuvant for intranasal delivery of recombinant protein vaccine, Procedia in Vaccinology, 2009, Vol.1, No.1, p.148-163	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
20 April, 2011 (20.04.11)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2011 (10.05.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/00(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K39/02(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/35(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/32(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/16(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. A61K39/00-39/44, A61K9/00-9/72, A61K47/00-47/48, A61P31/00, A61P31/16

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
A	WO 01/17556 A1 (塩野義製薬株式会社) 2001.03.15, (ファミリーなし)	1-7
A	JP 3-38529 A (東興薬品工業株式会社) 1991.02.19, & EP 391342 A1 & US 5158761 A	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、一般的な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

20.04.2011

国際調査報告の発送日

10.05.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)

中村 浩

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

4764

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	WO 09/123119 A1 (国立大学法人徳島大学) 2009. 10. 08, (ファミリーなし)	1-7
A	Tiwari, S. et. al., Liposome in situ gelling system: Novel carrier based vaccine adjuvant for intranasal delivery of recombinant protein vaccine, Procedia in Vaccinology, 2009, Vol.1, No.1, p.148-163	1-7