

明 細 書

発明の名称： インフルエンザワクチンを含む組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ワクチンアジュバントとユニバーサルインフルエンザワクチン抗原を含む組成物に関する。

背景技術

[0002] ウイルス由来のタンパク質もしくはその部分ペプチドからなる成分ワクチンは、生ワクチンや全粒子不活化ワクチンよりも安全性の面で優れている。しかし、一方で、成分ワクチンは、免疫賦活の効能が低い傾向がある。このことから、エピトープの免疫原性を強化し、ワクチンの免疫賦活活性を向上させるために、アジュバントと抗原を併用する方法が検討されている。アジュバントは、抗原に対する液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を高める添加剤であり、アラム（Alum）、サポニン（saponin）等がワクチンアジュバントとして用いられている。

[0003] 最近、Toll様受容体（Toll-like Receptor; TLR）が微生物に対する生体の防御機構の一つである、自然免疫の賦活に重要な役割を果たしており、モノホスホリルリピッドA（MPL）、非メチル化シチジルグアノシル（CpG）配列を含むオリゴデオキシヌクレオチド（CpG ODN）等が、TLRを介して免疫賦活作用を示していることが判明した。ヒトで特定されている既知の13のTLRのうち、5つは細菌の構成成分の認識に関連し（TLR1, 2, 4, 5, 6）、他の4つ（TLR3, 7, 8, 9）はウイルスの核酸の認識にも関与すると言われる（非特許文献1を参照）。さらに、TLR7およびTLR8の場合、その作動薬（Activator）として、天然リガンドであるウイルスの一本鎖RNAを模倣した低分子が知られている。例えば、ピリミジン化合物（特許文献1および2を参照）およびイミダゾキノリン化合物（特許文献3を参照）等の合成化合物が報告されている。

[0004] TLR7および／またはTLR8がその作動薬で活性化されることにより、TLRおよ

びミエロイド系分化因子88 (MyD88) 依存性のシグナル伝達経路を介して樹状細胞 (DC) が活性化される。その結果、T細胞共刺激分子群co-stimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) の発現増強やI型インターフェロン (特にIFN α)、TNF α 、IL-6またはIL-12を含む炎症性サイトカインが産生される。

[0005] また、TLR7および/またはTLR8作動薬 (Activator) は、DC活性化に加えて、T細胞やB細胞を活性化し、さらにNK細胞を刺激してIFN γ 産生を促すなどの活性が知られており、ワクチンアジュバント活性を有することが期待される。実際に、レジキモド (Resiquimod) またはイミキモド (Imiquimod) などのTLR7および/またはTLR8作動薬のワクチンアジュバント活性が報告されている (非特許文献2を参照)。

[0006] TLR7および/または8作動薬と他の物質との複合体としては、脂肪酸とイミダゾキノリン化合物を共有結合で連結させたワクチンアジュバント (特許文献4、5、6および非特許文献4を参照) や、リン脂質とアデニン化合物のコンジュゲート化合物 (特許文献7、8、9を参照)、脂肪酸とアデニン化合物のコンジュゲート化合物 (非特許文献5)、脂肪酸グリセリドやリン脂質とアデニン化合物のポリエチレングリコールを介したコンジュゲート化合物 (特許文献10を参照)、スクワレン類とアデニン化合物のコンジュゲート化合物 (特許文献11を参照)、スクワレン類とピリミジン化合物のコンジュゲート化合物 (特許文献12を参照) が知られている。

[0007] 現行のインフルエンザヘマグルチニン (以下、ヘマグルチニンを「HA」と記載することがある。) ワクチンはインフルエンザHAスプリットワクチンとも呼ばれ、HA抗体を誘導することで感染防御効果を発揮する。HA抗体は、ヘマグルチニンにおける球状部領域 (head region) と呼ばれるウイルス膜から外側に露出した部分に結合するが、この部分はウイルス株間で最も構造変化に富む領域となる。その結果、ワクチン株と異なる抗原変異ウイルス感染に対して、HA抗体が結合できずワクチンが奏功しないケースがある。

[0008] 近年、抗原変異を起こしにくいヘマグルチニンの幹領域 (stem region) に結合する抗体 (ステム抗体) の中に、感染防御抗体が含まれることが明らか

にされた(特許文献13を参照)。ステム抗体を効率的に誘導するために、ヘマグルチニンに人工的な変異やリンカーを結合させることで、不安定なステム部分の安定化に成功したHAステムタンパクが開発され、ヒト臨床試験が実施されている。しかし、当該HAステムタンパクの実用化においては依然、免疫原性の向上および製造面での課題が残されている。

- [0009] ステム抗体の感染防御能はその抗原結合性と抗体量に依存するのみならず、誘導されるIgG抗体のサブクラスにも強く依存することが報告されている(非特許文献3を参照)。具体的には、ステムIgG2抗体は機能性かつ交差反応性であり、ステムIgG2抗体を強く誘導するワクチンは広い範囲のインフルエンザの感染防御に効果的であることが示された。しかしながら、ステムIgG2抗体の誘導能を効果的に高める方法は見出されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：国際公開第00／12487号
特許文献2：国際公開第2009／067081号
特許文献3：米国特許公報第4689338号
特許文献4：国際公開第2005／001022号
特許文献5：国際公開第2005／018555号
特許文献6：国際公開第2012／024284号
特許文献7：国際公開第2010／048520号
特許文献8：国際公開第2011／017611号
特許文献9：国際公開第2011／139348号
特許文献10：国際公開第2010／093436号
特許文献11：国際公開第2017－061532号
特許文献12：国際公開第2017－056494号
特許文献13：特表2016－516090号公報
特許文献14：国際公開第2016／109792号

非特許文献

- [0011] 非特許文献1 : Iwasaki, A., Nat. Immunol. 2004, 5, 987
非特許文献2 : Vaccine 2011, 29, 3341・M. A. Tomai et al, Exp. Rev. Vaccine, 6, 835
非特許文献3 : DiLillo, DJ., Nat. Medicine 2014, 20, 143
非特許文献4 : Vaccine. 2011 Jul 26;29(33):5434-42
非特許文献5 : Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1194-1200
非特許文献6 : Curr Opin Virol. 2016, 17, 95-103
非特許文献7 : Nat Med. 2015, 21, 1065-70
非特許文献8 : Science. 2015, 349, 1301-6

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明が解決しようとする課題は、抗原変異を起こしにくいインフルエンザウイルスのHA幹領域に結合する抗体を効果的に産生するインフルエンザHAスプリットワクチンを見出し、そのIgG2抗体の誘導能を向上するための方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、鋭意検討の結果、現行のインフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことによりヘマグルチニンの幹領域が外部に露出した形状となり、当該酸性処理後のインフルエンザHAスプリットワクチンは、HA幹領域のLAH(long alpha helix)に結合する交差反応性抗体を産生できることにより、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原として機能し得ることを見出した。さらに、当該酸性処理後のインフルエンザHAスプリットワクチンにTLR7の生理活性を亢進する化合物を添加することにより、その化合物がワクチンアジュバントとして機能し、そのIgG2抗体誘導能は向上されることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0014] すなわち、本発明は、以下のものに関する。
- [0015] [項1] 以下の(1)および(2)を含む組成物；
(1) ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原；および

(2) ワクチンアジュバント。

[0016] [項2] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、H A幹領域のL A Hに結合する抗体を産生することができるインフルエンザH Aスプリットワクチン抗原である、項1に記載の組成物。

[項3] 該インフルエンザH Aスプリットワクチン抗原のH A幹領域が外部に露出した形状である、項2に記載の組成物。

[0017] [項4] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、H A幹領域が外部に露出した形状であることによりH A幹領域のL A Hの抗原性が高められており、かつ、H A幹領域のL A Hに結合する抗体を産生することができる、インフルエンザH Aスプリットワクチン抗原である、項1に記載の組成物。

[0018] [項5] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、インフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

[0019] [項6] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、ホルマリン処理をしていないインフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

[0020] [項7] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、インフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施す工程と、その後ホルマリン処理を施す工程とを含む製造プロセスにより製造される、項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

[0021] [項8] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、単独のHA亜型であるインフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

[0022] [項9] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、それぞれ単独のHA亜型であるインフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造されるインフルエンザH Aスプリットワクチン抗原の二種またはそれ以上を含むワクチン抗原である、項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

[0023] [項 1 0] 該ワクチンアジュバントが、T L R の生理活性を亢進する物質である、項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

[項 1 1] 該ワクチンアジュバントが、T L R 7、T L R 8、およびT L R 9 からなる群から選択される一つもしくはそれ以上のT L R の生理活性を亢進する物質である、項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

[項 1 2] 該ワクチンアジュバントが、少なくともT L R 7 の生理活性を亢進する物質である、項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の組成物。

[項 1 3] 該ワクチンアジュバントが、少なくともT L R 8 の生理活性を亢進する物質である、項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

[項 1 4] 該ワクチンアジュバントが、少なくともT L R 9 の生理活性を亢進する物質である、項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

[0024] [項 1 5] 該T L R 7 の生理活性を亢進する物質が、T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物、またはT L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物である、項 1 1 または 1 2 に記載の組成物。

[項 1 6] 該T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物または該コンジュゲート化合物に含まれる該T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物が、分子量 2 0 0 ～ 6 0 0 を有し、かつ、アデニン骨格、ピリミジン骨格、イミダゾキノリン骨格、イミダゾピリジン骨格、またはキナゾリン骨格を有する、項 1 5 に記載の組成物。

[項 1 7] 該T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物または該コンジュゲート化合物に含まれる該T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物が、ピリミジン骨格、アデニン骨格またはイミダゾキノリン骨格を有する、項 1 6 に記載の組成物。

[項 1 8] 該脂質が、スクワレンまたはスクワランから誘導される脂質である、項 1 5 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

[0025] [項 1 9] 該T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、アデニン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがス

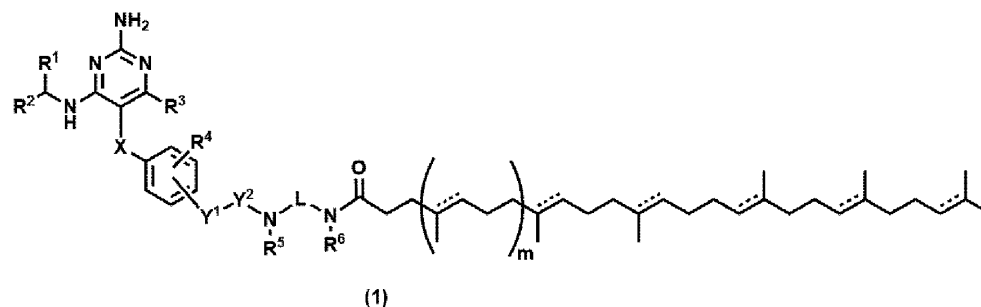
ペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物またはその製薬学的に許容される塩である、項 15～18 のいずれか一項に記載の組成物

。

[0026] [項 20] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物またはその製薬学的に許容される塩である、項 15～18 のいずれか一項に記載の組成物。

[0027] [項 21] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、下記式 (1) :

[化1]



[式 (1) 中、Xは、メチレンを表し、

R¹は水素原子、またはヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R²は、水素原子、または炭素数 1～6 のアルキル基を表し、

R³は、炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R⁴は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素数 1～3 のアルキル基または炭素数 1～3 のアルコキシ基を表し、

Y¹は、単結合またはメチレンを表し、

Y²は、単結合または—C(O)—を表し、

Lは、炭素数 2 または 3 の直鎖アルキレンを表し、

R⁵およびR⁶は、独立して水素原子または炭素数 1～3 のアルキル基を表すか、

あるいは、R⁵は、R⁶と一緒に置換もしくは無置換の 5～8 員の含窒素飽

和ヘテロ環を形成してもよく、前記5～8員の含窒素飽和ヘテロ環が置換されている場合、ヒドロキシ基およびハロゲン原子から選択される同一もしくは異なる1～4個の置換基で置換されていてもよく、

mは0または1を表し、

[化2]

は、全て二重結合を表す]

で示される化合物、またはそれらの製薬学的に許容される塩である、項15～18、および20のいずれか一項に記載の組成物。

[項22] 該コンジュゲート化合物が、

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-{(2-アミノ-4-{[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル}ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-{(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル}-3-メトキシベンジル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-{(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル}-3-メトキシベンゾイル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン;

4-{(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル}-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド;

4-{(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル}-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘ

キサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル](メチル)アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド ;

またはそれらの製薬学的に許容される塩である、項 15 ~ 18、20 および 21 のいずれか一項に記載の組成物。

[項 23] 該 TLR7 の生理活性を亢進する化合物が、

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ}エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド ;

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド ;

またはそれらの製薬学的に許容される塩である、項 15 ~ 18、および 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物。

[0028] [項 24] 項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物を含む、インフルエンザワクチン。

[0029] [項 25] 予防が必要な温血動物に、予防上の有効量の項 1 ~ 23 のいずれかに記載の組成物を投与することを含む、インフルエンザを予防するための方法。

[項 26] 予防が必要な温血動物に、予防上の有効量のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と、予防上の有効量のワクチンアジュバント（例えば TLR7 の生理活性を亢進する物質）を投与することを含む、インフルエンザを予防するための方法。

[0030] [項 27] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原、およびワクチンアジュバント（例えば TLR7 の生理活性を亢進する物質）を含む、インフルエンザを予防するためのキット。

[0031] [項 28] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と組み合わせたインフ

ルエンザの予防における使用のための、ワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）。

[項29] ワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）と組み合わせたインフルエンザの予防における使用のための、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原。

[0032] [項30] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原を含むインフルエンザの予防のための組成物の製造における、ワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）の使用。

[項31] ワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）を含むインフルエンザの予防のための組成物の製造における、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の使用。

[0033] [項32] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）とが、同時にまたは別々に投与される、項25および26に記載の方法、項27に記載のキット、項28に記載のワクチンアジュバント、または項29に記載の該抗原。

[項32-1] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原がワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）の投与前にもしくは投与後に、または同時に投与される、項25および26に記載の方法、項27に記載のキット、項28に記載のワクチンアジュバント、または項29に記載の該抗原。

[0034] [項33] 以下の工程を含む、インフルエンザHAスプリットワクチン抗原およびワクチンアジュバント（例えばTLR 7の生理活性を亢進する物質）を含む組成物の製造方法：

- a) ホルマリン処理をしていないインフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原を製造する工程；および
- b) 工程a) で得られたワクチン抗原と、ワクチンアジュバントとを混合する工程。

- [0035] [項34] 以下の工程を含む、インフルエンザHAスプリットワクチン抗原およびワクチンアジュバント（例えばTLR7の生理活性を亢進する物質）を含む組成物の製造方法：
- a) インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す工程、
 - b) その後ホルマリン処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原を製造する工程；および
 - c) 工程b) で得られたワクチン抗原と、ワクチンアジュバントとを混合する工程。
- [0036] [項35] 以下の工程を含む、インフルエンザHAスプリットワクチン抗原およびワクチンアジュバント（例えばTLR7の生理活性を亢進する物質）を含むキットの製造方法：
- a) ホルマリン処理をしていないインフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原を製造する工程；および
 - b) 工程a) で得られたワクチンと、ワクチンアジュバントとを組み合わせるキットとする工程。
- [0037] [項36] 以下の工程を含む、インフルエンザHAスプリットワクチン抗原およびワクチンアジュバント（例えばTLR7の生理活性を亢進する物質）を含むキットの製造方法：
- a) インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す工程、
 - b) その後ホルマリン処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原を製造する工程；および
 - c) 工程b) で得られたワクチンと、ワクチンアジュバントとを組み合わせるキットとする工程。

発明の効果

- [0038] 本発明により、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が提供され、加

えて、ワクチンアジュバントを添加することにより、さらにそのワクチン活性を向上することができる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]インフルエンザウイルスを説明する模式図である。

[図2]H3N2型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの血清中のLAH抗体価の上昇を示す図である。

[図3]H3N2型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株に対する交差防御能の向上を示す図である。

[図4]H1N1型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの血清中のLAH抗体価の上昇を示す図である。

[図5]H1N1型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株に対する交差防御能の向上を示す図である。

[図6]LAH結合性モノクローナル抗体が、現行HAスプリットワクチンよりも膜融合型HAスプリットワクチンに対して強く結合することを示す図である。

[図7]A-1、A-2、もしくはCpGを添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c誘導活性を示す図である。

[図8]A-1、A-2、もしくはCpGを添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG1誘導活性を示す図である。

[図9]A-1、A-2、もしくはCpGを添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c/IgG1比を示す図である。

[図10]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c誘導活性を示す図である。

[図11]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG1誘導活性を示す図である。

[図12]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c/IgG1比を示す図である。

[図13]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加したH3N2膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株に対する交差防御能を示す図であ

る。

[図14]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加したH3N2膜融合型HAスプリットワクチンの、抗原変異株感染によるマウス体重減少に対する抑制作用を示す図である。

[図15]LAH結合性モノクローナル抗体が、酸性処理後にホルマリン処置を施した膜融合型HAスプリットワクチンに対して強く結合することを示す図である。

。

[図16]H3N2型の膜融合型HAスプリットワクチン ((pre-fix) および (post-fix)) を接種したマウスの血清中のLAH抗体価の上昇を示す図である。

[図17]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c誘導活性を示す図である。

[図18]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG1誘導活性を示す図である。

[図19]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加した膜融合型HAスプリットワクチンの交差反応性IgG2c/IgG1比を示す図である。

[図20]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加したH1N1膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株に対する交差防御能を示す図である。

[図21]A-1、A-3、もしくはAddaVax (TM) を添加したH1N1膜融合型HAスプリットワクチンの、抗原変異株感染によるマウス体重減少に対する抑制作用を示す図である。

発明を実施するための形態

[0040] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

[0041] 本明細書において、ワクチンアジュバントとは、免疫増強作用を有する物質もしくはそれを含む製剤等であり、抗原に添加することによって抗原の免

疫原性を向上させる物質を意味する。

- [0042] 本明細書におけるワクチンアジュバントには、ミョウバン、エマルション（例えば、フロイントアジュバント、MF59（登録商標）、AddaVax（TM）、AS03など）、NOD受容体の生理活性を亢進する物質、RIG-I受容体の生理活性を亢進する物質、Cタイプレクチン受容体の生理活性を亢進する物質、細胞質内DNA受容体の生理活性を亢進する物質、STINGの生理活性を亢進する物質、T L Rの生理活性を亢進する物質等が含まれる。
- [0043] 本明細書におけるワクチンアジュバントとして好ましくは、T L Rの生理活性を亢進する物質が挙げられる。
- [0044] 本明細書においてT L Rの生理活性を亢進する物質とは、T L R受容体アゴニスト活性を有するT L Rアゴニストを意味し、T L R受容体の機能を亢進する物質である限り、特に限定されない。
- [0045] 本明細書におけるT L Rの生理活性を亢進する物質の例として、モノホスホリルリピドAやその誘導体、アデニン化合物、ピリミジン化合物、イミダゾキノリン化合物、ベンザピン化合物、イミダゾピリジン化合物、キナゾリン化合物、グアニン化合物、ジヒドロプテリジン化合物、CpG ODN等が挙げられる。
- [0046] 本明細書におけるT L Rの生理活性を亢進する物質として好ましくは、T L R 7、T L R 8、およびT L R 9からなる群から選択される一つもしくはそれ以上のT L Rの生理活性を亢進する物質が挙げられ、より好ましくは、少なくともT L R 7の生理活性を亢進する物質が挙げられる。
- [0047] 本明細書においてT L R 7の生理活性を亢進する物質とは、T L R 7受容体アゴニスト活性を有するT L R 7アゴニストを意味し、T L R 7受容体の機能を亢進する物質である限り、特に限定されない。
- [0048] 本明細書においてT L R 8の生理活性を亢進する物質とは、T L R 8受容体アゴニスト活性を有するT L R 8アゴニストを意味し、T L R 8受容体の機能を亢進する物質である限り、特に限定されない。
- [0049] 本明細書においてT L R 9の生理活性を亢進する物質とは、T L R 9受容

体アゴニスト活性を有する TLR9 アゴニストを意味し、TLR9 受容体の機能を亢進する物質である限り、特に限定されない。

- [0050] 本明細書における TLR7 の生理活性を亢進する物質の例には、TLR7 の生理活性を亢進する物質、または TLR7 および TLR8 の生理活性を亢進する物質が含まれる。
- [0051] 本明細書における TLR7 の生理活性を亢進する物質として好ましくは、TLR7 選択的アゴニストが挙げられる。ここで TLR7 選択的とは、TLR7 以外の TLR 受容体アゴニスト活性が、TLR7 受容体アゴニスト活性よりも弱いことを意味し、例えば TLR7 受容体アゴニスト活性が、単鎖 RNA を内在性リガンドとする TLR8 受容体アゴニスト活性よりも強い場合、更に具体的には TLR7 受容体アゴニスト活性 (EC50 値) が TLR8 受容体アゴニスト活性の 10 倍以上である場合を例示することができる。
- [0052] 本明細書における TLR7 の生理活性を亢進する物質の例には、TLR7 の生理活性を亢進する低分子量化合物、および該 TLR7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスパーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物が含まれる。
- [0053] 本明細書における TLR7 の生理活性を亢進する低分子量化合物の例として、具体的には分子量 200～600、好ましくは分子量 250～500、より好ましくは分子量 300～500 を有するものが挙げられる。
- [0054] 本明細書における TLR7 の生理活性を亢進する低分子量化合物として好ましくは、アデニン骨格、ピリミジン骨格、イミダゾキノリン骨格、イミダゾピリジン骨格、キナゾリン骨格、グアニン骨格、またはジヒドロプテリジン骨格を有する化合物が挙げられ、更に好ましくは、アデニン骨格、ピリミジン骨格、イミダゾキノリン骨格を有する化合物が挙げられる。
- [0055] アデニン骨格を有する化合物の例としては、4-アミノ-8-オキソプリン (8-オキソアデニン) 骨格を有する化合物が挙げられ、例えば 9 位が 5～6 員の芳香族炭素環、5～6 員の芳香族複素環もしくは 4～7 員の脂肪族含窒素複素環で置換されていてもよいアルキル基 (例えば炭素数 1～6 の

直鎖アルキル基)で置換された4-アミノ-8-オキソプリン骨格を有する化合物が挙げられる。具体的には、GSK-2245035〔6-アミノ-2-{〔(1S)-1-メチルブチル〕オキシ}-9-[5-(1-ピペリジニル)ペンチル]-7,9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン〕、PF-4171455〔4-アミノ-1-ベンジル-6-トリフルオロメチル-1,3-ジヒドロイミダゾ〔4,5-c〕ピリジン-2-オン〕等のMedChemComm 2011, 2, 185. に記載された化合物、または、W098/01448、W099/28321、W002/085905、W02008/114008、W02008/114819、W02008/114817、W02008/114006、W02010/018131、W02010/018134、W02008/101867、W02010/018133、W02009/005687、W02012/080730等に記載された化合物が挙げられる。

[0056] アデニン骨格を有する化合物として好ましくは、以下の化合物またはそれらの製薬学的に許容される塩が挙げられる：

6-アミノ-9-({6-[2-(ジメチルアミノ)エトキシ]ピリジン-3-イル}メチル)-2-エトキシ-7,9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン；

6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-9-({6-[2-(ジメチルアミノ)エトキシ]ピリジン-3-イル}メチル)-7,9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン；

N-(4-{〔6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル〕メチル}ベンゾイル)グリシン；

メチル (3-{〔〔3-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)プロピル〕 (3-モルホリン-4-イルプロピル)アミノ〕メチル}フェニル)アセテート (英語名：Methyl (3-{[[3-(6-amino-2-butoxy-8-oxo-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)propyl](3-morpholin-4-ylpropyl)amino]methyl}phenyl)acetate)；または

メチル (4-{〔〔3-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)プロピル〕 (3-ピペリジン-1-イルプロピル)アミノ〕メチル}フェニル)アセテート (英語名：methyl

(4-{{[3-(6-amino-2-butoxy-8-oxo-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)propyl](3-piperidin-1-ylpropyl)amino]methyl}phenyl)acetate)。

[0057] ピリミジン骨格を有する化合物の例としては、2, 4-ジアミノピリミジン骨格を有する化合物が挙げられ、例えば、6位は適宜アルキル基等で置換され、5位は5～6員の芳香族炭素環、5～6員の芳香族複素環もしくは4～7員の脂肪族含窒素複素環で置換されていてもよいアルキル基（例えば炭素数1～6の直鎖アルキル基）で置換された2, 4-ジアミノピリミジンが挙げられる。具体的には、W000/12487、W02010/133885、W02013/172479またはW02012/136834に記載された化合物を挙げることができる。

[0058] イミダゾキノリン骨格を有する化合物の例としては、イミキモド (Imiquimod)、レジキモド (resiquimod) または852A [N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド]をはじめとする4-アミノ-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン骨格を有する化合物が挙げられ、例えば1位がC1-6アルキル基もしくはC1-6アルコキシ基で置換され、2位がC1-6アルキル基もしくはC1-6アルコキシ基で置換された4-アミノ-1H[4, 5-c]キノリンが挙げられる。具体的には、W02010/48520、W02008/135791、US4689338、US 4698348、またはW02007/030777に記載された化合物を挙げることができる。イミダゾキノリン骨格を有する化合物として好ましくは、イミキモド (Imiquimod) が挙げられる。

[0059] イミダゾピリジン骨格を有する化合物の例としては、4-アミノ-1, 3-ジヒドロ-2H-イミダゾ[4, 5-c]ピリジン-2-オン骨格を有する化合物が挙げられ、例えば6位または7位がハロゲン原子で置換されていてもよいC1-6アルキル基もしくはC1-6アルコキシ基で置換され、1位は5～6員の芳香族炭素環、5～6員の芳香族複素環もしくは4～7員の脂肪族含窒素複素環で置換されていてもよいアルキル基（例えば炭素数1～4の直鎖アルキル基）で置換されている4-アミノ-1, 3-ジヒドロ-2H-イミダゾ[4, 5-c]ピリジン-2-オン骨格を有する化合物が挙げられる。

。具体的には、W02007/93901に記載された化合物またはPF-4171455〔4-アミノ-1-ベンジル-6-(トリフルオロメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-オン〕を例示することができる。

[0060] キナゾリン骨格を有する化合物の例としては、2,4-ジアミノキナゾリン骨格を有する誘導体が挙げられ、4位が適宜水酸基もしくはハロゲン原子等で置換されていてもよいアルキル基（例えば直鎖もしくは分枝の炭素数1～8のアルキル基）で置換された2,4-ジアミノキナゾリン骨格を有する化合物が挙げられる。具体的には、W02012/156498またはW02014/76221に記載された化合物が挙げられる。

[0061] グアニン骨格を有する化合物の例としては、2-アミノ-6-オキソプリン骨格を有する化合物が挙げられ、具体的にはロキシリビン（Loxoribine）が挙げられる。

[0062] ジヒドロプテリジン骨格を有する化合物としては、4-アミノ-7,8-ジヒドロプテリジン-6(5H)-オン骨格を有する化合物が挙げられ、具体的にはベサトリモド〔4-アミノ-2-ブトキシ-8-[[3-[(ピロリジン-1-イル)メチル]フェニル]メチル]-7,8-ジヒドロプテリジン-6(5H)-オン〕が挙げられる。

[0063] TLR7アゴニストである低分子量化合物の別の例として、イサトリビン（Isatoribine）、ANA-773、およびW02010/077613に記載の化合物を例示することができる。

[0064] 本明細書のTLR7の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスパーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物における脂質の例としては、炭素数100未満の飽和または不飽和の脂肪酸；炭素数10～30の飽和または不飽和の脂肪酸とグリセリンのジグリセリド；炭素数10～30の飽和または不飽和の脂肪酸とグリセリンのジグリセリドに更にリン酸が結合したホスファチジン酸を含むリン脂質等が挙げられる。好ましくは、炭素数18～30の飽和または不飽和の脂肪酸が挙げられ、さらに好ましくは、スクワレンまたはスクワランから誘導される脂肪酸が挙げられる。

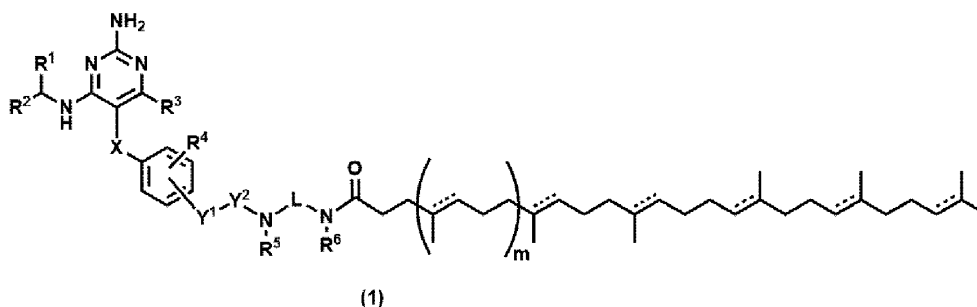
- [0065] スクワレンから誘導される脂肪酸としては、(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン酸 ((4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-Hexamethylhexacos-4, 8, 12, 16, 20, 24-hexaenoic acid) などが挙げられる。スクワレンから誘導される脂質としては、4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサン酸 (4, 8, 12, 17, 21, 25-hexamethylhexacosanoic acid) などが挙げられる。適宜当業者に周知の方法で、スクワレンまたはスクワランから導かれる化合物をスペーサーと連結することにより、当該コンジュゲート化合物へ導くことができる。
- [0066] 本明細書の T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物における T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物部分の例としては、上記の T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物が挙げられる。
- [0067] 本明細書の T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物の例としては、脂肪酸とイミダゾキノリン化合物を共有結合で連結させたワクチンアジュバント（特許文献 4、5、6、および非特許文献 4）、リン脂質とアデニン化合物のコンジュゲート化合物（特許文献 7、8、9）、脂肪酸とアデニン化合物のコンジュゲート化合物（非特許文献 5）、脂肪酸グリセリドとアデニン化合物のポリエチレングリコールを介したコンジュゲート化合物（特許文献 10）、スクワレン類とアデニン化合物のコンジュゲート化合物（特許文献 11）、スクワレン類とピリミジン化合物のコンジュゲート化合物（特許文献 12）等が挙げられる。
- [0068] 本明細書の T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物として好ましくは、例えば、アデニン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物、ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合

しているコンジュゲート化合物、およびその製薬学的に許容される塩が挙げられる。

[0069] アデニン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物の好ましい例として、特許文献 11 に記載の化合物等が挙げられる。

[0070] ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物の好ましい例として、特許文献 12 に記載の化合物等が挙げられる。さらに好ましくは、下記式 (1) で示される化合物またはその製薬学的に許容される塩が挙げられる。

[0071] [化3]



[式 (1) 中、Xは、メチレンを表し、

R¹は水素原子、またはヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R²は、水素原子、または炭素数 1～6 のアルキル基を表し、

R³は、炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R⁴は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素数 1～3 のアルキル基または炭素数 1～3 のアルコキシ基を表し、

Y¹は、単結合またはメチレンを表し、

Y²は、単結合または—C(O)—を表し、

Lは、炭素数 2 または 3 の直鎖アルキレンを表し、

R⁵およびR⁶は、独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表すか、あるいは、R⁵は、R⁶と一緒に置換もしくは無置換の5～8員の含窒素飽和ヘテロ環を形成してもよく、前記5～8員の含窒素飽和ヘテロ環が置換されている場合、ヒドロキシ基およびハロゲン原子から選択される同一もしくは異なる1～4個の置換基で置換されていてもよく、
mは0または1を表し、

[化4]

は、全て二重結合を表す]。

- [0072] 「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、およびヨウ素原子が挙げられ、好ましくは、フッ素原子又は塩素原子が挙げられる。
- [0073] 「炭素数2または3の直鎖アルキレン」の例として、エチレンおよびn-プロピレンが挙げられるがこれらに限定されない。
- [0074] 「炭素数1～3のアルキル基」としては、炭素数1～3の直鎖もしくは分枝のアルキル基が挙げられる。例として、メチル、エチル、プロピル、およびイソプロピルが挙げられるがこれらに限定されない。
- [0075] 「炭素数1～3のアルコキシ基」としては、炭素数1～3の直鎖もしくは分枝のアルコキシ基が挙げられる。例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシが挙げられるがこれらに限定されない。
- [0076] 「5～8員の含窒素飽和ヘテロ環」としては、2もしくは3個の窒素原子、0もしくは1個の酸素原子及び0もしくは1個の硫黄原子から選択される少なくとも2個の窒素原子を含む1～3個のヘテロ原子を環内に含む、5～8員の含窒素飽和ヘテロ環が挙げられる。具体的には、ピロリジン、ピペリジン、パーヒドロアゼピン、イミダゾリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、パーヒドロ-1,4-ジアゼピン等が挙げられる。

当該含窒素飽和ヘテロ環が置換される場合の置換基として、好ましくは、メチル基、エチル基、プロピル基、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、カルボニル基、ヒドロキシ基又はハロゲン原子、更に好ましくはヒドロ

キシ基又はハロゲン原子が挙げられ、同一もしくは異なる 1 ～ 4 個の置換基で置換されていてもよい。

[0077] ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物のより好ましい例として、

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド (特許文献 1 2、実施例 1 の化合物、下記式 (2)) ;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンジル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン (特許文献 1 2、実施例 2 の化合物) ;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンゾイル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン (特許文献 1 2、実施例 3 の化合物) ;

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド (特許文献 1 2、実施例 4 の化合物、下記式 (3)) ;

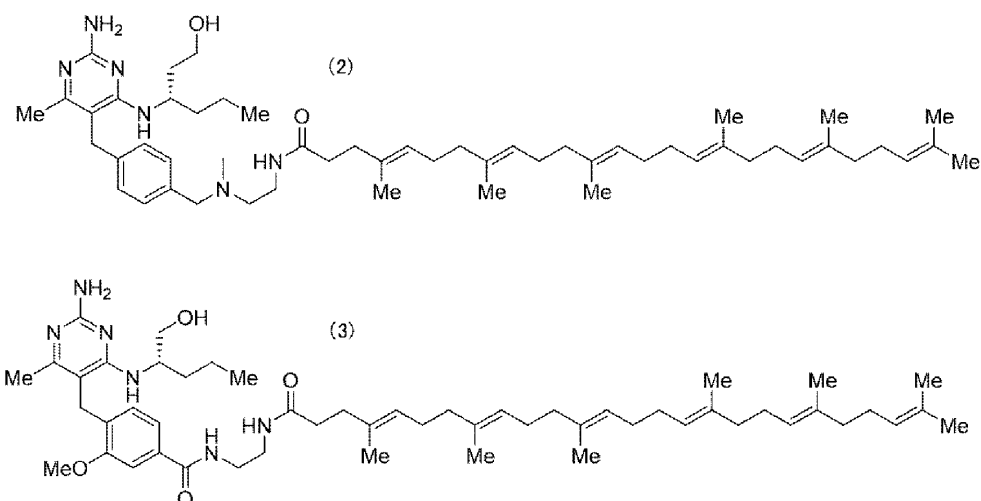
4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル](メチル)アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド (特許文献 1 2、実施例 5 の化合物) ;

またはそれらの製薬学的に許容される塩が挙げられる。

[0078] ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランか

ら誘導される脂質とがスパーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物のさらにより好ましい例として、(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ}エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド（特許文献 1 2、実施例 1 の化合物、下記式 (2)）、または4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド（特許文献 1 2、実施例 4 の化合物、下記式 (3)）、またはそれらの製薬学的に許容される塩が挙げられる。

[0079] [化5]



[0080] 本願において、製薬学的に許容される塩としては、例えば、酸付加塩又は塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、例えば無機又は有機酸（塩酸、臭化水素酸、硫酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸又はマレイン酸等）との酸付加塩等が挙げられる。塩基付加塩としては、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられる。

[0081] 本願において、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とは、インフル

エンザ（変異ウイルスを含む）を幅広く防御しうる抗体（例えば交差防御抗体）を誘導するインフルエンザワクチン抗原を意味する。

[0082] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原として、例えば特許文献14に示されるインフルエンザウイルス由来蛋白質を含む粒子抗原や、非特許文献6、7、8に示されるインフルエンザHA抗原等が挙げられる。

[0083] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の好ましい例としては、「HA幹領域LAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原」が挙げられる。さらに好ましくは「HA幹領域が外部に露出した形状であり、HA幹領域LAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原」（以下、本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンという）が挙げられ、これは例えば下記に説明する酸性処理を施す工程を含む方法で製造されうる。

[0084] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンは、抗原変異を起こしにくいヘマグルチニンの幹領域のLAHに結合する抗体を誘導するため、従来のインフルエンザHAスプリットワクチンによって誘導される抗体が結合する抗原部位（これはヘマグルチニンにおける球状部領域にある）が変異したインフルエンザウイルスに対しても有効でありうる。

[0085] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンは、LAH結合性モノクローナル抗体に対して、現行HAスプリットワクチンよりも強く結合することが好ましい。例えば、LAH結合性モノクローナル抗体に対して、現行HAスプリットワクチンよりも1.05倍以上、好ましくは1.1倍以上、より好ましくは1.5倍以上、更に好ましくは2倍以上強く結合することが好ましい。ここで、現行HAスプリットワクチンよりも1.05倍、1.1倍、1.5倍、または2倍以上強く結合するとは、例えば、回帰によって求めた吸光度が0.7を示した時の抗体濃度の逆数が、現行HAスプリットワクチンの抗体濃度の逆数の、それぞれ1.05倍、1.1倍、1.5倍、または2倍以上であることをいう。現行HAスプリットワクチンと比較した本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンのLAH結合性モノクローナル抗体に対する結合性は高い方が好ましく、上限は特に限定されるものでは

ないが、例えば1.05～200倍、1.1～150倍、1.5～100倍、2～50倍の範囲が例示される。あるいは現行HAスプリットワクチンと比較した本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンのLAH結合性モノクローナル抗体に対する結合性の範囲は、1.05、1.1、1.5、2、3、4、および5から選択される下限値と200、150、100、50、30、および20から選択される上限値との組合せにより示される。LAH結合性モノクローナル抗体に対するインフルエンザHAスプリットワクチンの結合性の測定方法は特に限定されず、当業者に知られる一般的な方法で行うことができるが、例えば本願実施例の方法に従って測定することができる。

[0086] 本願において、LAH結合性モノクローナル抗体とは、LAHに結合するモノクローナル抗体を意味し、その製造方法は特に限定されず、当業者に知られる一般的な方法により製造することができる。LAH結合性モノクローナル抗体に対するインフルエンザHAスプリットワクチンの結合性の測定においては、LAH結合性モノクローナル抗体は当該インフルエンザHAスプリットワクチンが由来するインフルエンザウイルスのLAHの少なくとも一部に相当するペプチドに結合することができるものであることを意味する。

[0087] 本願において、現行HAスプリットワクチンとは、エーテルで全粒子ワクチンを処理して発熱物質となる脂質成分を除いたものを意味し、例えば本願実施例1の方法により製造することができる。また、現行HAスプリットワクチンは、以下の酸性処理を施す工程を有する方法により製造された本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンに対して、酸性処理を施さずに製造されたインフルエンザHAスプリットワクチンであり得る。

[0088] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法の例を以下に説明する。当該製造方法は、インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す工程を有する。

[0089] インフルエンザHAスプリットワクチンは、エーテルで全粒子ワクチンを処理して発熱物質となる脂質成分を除いたものであり、また、免疫に必要なウイルス粒子表面のHA蛋白を密度勾配遠沈法により回収して製造するためHA蛋

白が主成分となっている。

- [0090] インフルエンザウイルスの表面には、スパイクタンパクという糖タンパク質が突き出ている(図1)。A型インフルエンザウイルスには、HAとNA(ノイラミニダーゼ)の二種類のスパイクタンパクがあり、ウイルスが感染を起こすための役割を果たす。HAは感染しようとする細胞に結合し、ウイルスを細胞の中に取り込む役割をする。HAは頻繁に抗原変異を起こす。NAは、感染した細胞とHAの結合を切って、複製されたウイルスを細胞から放出させる役割を持つ。
- [0091] インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HAタンパクは膜融合型と呼ばれる構造に変化する。膜融合型HAタンパクでは、抗原ステム立体構造の大きな変化を伴いながら、球状部領域に代わり幹領域がウイルス膜から外部に露出した形状となる。融合型HAをワクチンとして使用したとき、幹領域のLAHに結合する抗体が誘導され、この抗体が抗原変異ウイルスへの防御効果を有することをin vivoで新知見として見出した。
- [0092] 酸性処理は、特に限定されないが、例えばpH3.0～6.5、好ましくは4.0～6.0、更に好ましくは4.4～5.8である。酸性処理を施すために使用される酸は、特に限定されるものではないが、例えばリン酸、クエン酸、マレイン酸等を使用することが可能である。
- [0093] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造において、ホルマリン処理を行ってもよい。インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す際のタイミングとしては、ホルマリン処理を施す前が好ましい。本発明のインフルエンザHAスプリットワクチン抗原(HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原)の製造に際しては、現行のインフルエンザHAスプリットワクチンに用いるHA画分に酸性処理を施し、その後ホルマリン処理をするという工程を経ることにより、交差反応性抗体を産生する作用が強く、したがってユニバーサルインフルエンザワクチン抗原としてより好ましいインフルエンザHAスプリットワクチン抗原を得ることができる。すなわち、本願において、エーテ

ル等でウイルス粒子を処理し、脂溶剤を除いたHA画分に対して、酸性処理を施した後にホルマリン処理を施すことが好ましい。

[0094] 本願において、酸性処理を施す前のインフルエンザHAスプリットワクチンは、ホルマリン処理をしていないスプリットワクチンであることが好ましい。

市販のインフルエンザHAワクチン（販売名）は、生物学的製剤基準（平成16年3月30日 厚生労働省告示 第155号，最終改正：平成30年11月30日 厚生労働省告示 第409号）に記載の通り、エーテル等でウイルスを分解後、脂溶剤を除去した後にホルムアルデヒド又はこれと同等な作用を有する物質により処理する工程が既に施されている。市販のインフルエンザHAワクチン（販売名）はインフルエンザHAスプリットワクチンであるものの、既にホルムアルデヒド等の処理が施されているため、本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造には用いないことが好ましい。

[0095] 酸性処理を施したインフルエンザHAスプリットワクチンにホルマリンを施す際のホルマリン処理液におけるホルマリンの濃度としては、例えば0.0005v/v%～10v/v%、好ましくは0.001v/v%～1v/v%、さらに好ましくは0.003v/v%～0.5v/v%、さらにより好ましくは0.005v/v%～0.1v/v%が挙げられる。

使用されるホルマリンのグレードとしては、医療用として使用可能なグレードであることが好ましい。

[0096] 抗原性の違いからA型インフルエンザウイルスのHAは18の亜型(H 1～H 18)に、NAは9の亜型(N 1～N 9)に分けられるが、本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンはこれら全ての亜型を対象とすることが可能である。また本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法ではA型のみならず、HAを有するB型のワクチンも製造可能であることから、A型およびB型のワクチンが本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの範疇である。

本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンの好ましい例として、H3N2型インフルエンザウイルスおよびH1N1型インフルエンザウイルスに由来する

ものが挙げられる。

[0097] 本願において「単独のHA亜型であるインフルエンザHAスプリットワクチン」とは、A型インフルエンザウイルスの18の亜型(H1～H18)、または、B型インフルエンザウイルスから選択される、1種のHA亜型であるインフルエンザHAスプリットワクチンを意味する。単独のHA亜型であれば、NAの亜型は同一であっても異なってもよい。

好ましいHA亜型としてはH1型、H3型およびB型が挙げられる。

[0098] 二種以上のHA亜型が含まれる混合ワクチンである場合は、それぞれ単独のHA亜型からなるインフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施し、得られたインフルエンザHAスプリットワクチンを複数種（二種またはそれ以上）混合して製造する事ができる。また、最初に二種以上のHA亜型を混合したインフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施して製造する事もできる。

複数種の亜型を含むワクチンとして接種される場合には、H1型、H3型およびB型からなる群から選択される1～3種の亜型が含まれていることが好ましい。

[0099] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンは、変異の少ないLAHに結合する抗体を産生することから、同一のHAの亜型内であれば、抗原変異株として知られるインフルエンザウイルスに対しても交差防御が可能であり得る。さらに、LAHのアミノ酸配列が類似しているHA亜型間（例えば、H3型とH7型）では交差反応性を示しうる。

[0100] 上記の製造方法で得られたインフルエンザHAスプリットワクチンは、抗原変異ウイルス株への防御効果を有する。例えば、H3N2型インフルエンザウイルス粒子(A/Fujian/411/02(H3N2))から現行HAスプリットワクチンを調整し、酸性処理を施した場合、A/Fujian/411/02(H3N2)のみならず、例えば、A/Guizhou/54/89(H3N2)、A/OMS/5389/88(H3N2)、A/Beijing/32/92(H3N2)、A/England/427/88(H3N2)、A/Johannesburg/33/94(H3N2)、A/Leningrad/360/86(H3N2)、A/Mississippi/1/85(H3N2)、A/Philippines/2/82(H3N2)、A/Shangdong/9/9

3(H3N2)、A/Shanghai/16/89(H3N2)、A/Shanghai/24/90(H3N2)、A/Sichuan/2/87(H3N2)、A/Kitakyushu/159/93(H3N2)、A/Akita/1/94(H3N2)、A/Panama/2007/99(H3N2)、A/Wyoming/03/03(H3N2)、A/New York/55/2004(H3N2)またはA/Hiroshima/52/2005(H3N2)等に

対しても感染防御効果を有しうる。また例えばH1N1型インフルエンザウイルス粒子(A/Puerto Rico/8/34(H1N1))から現行HAスプリットワクチンを調整し、酸性処理を施した場合、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)のみならず、例えば、A/Narita/1/09 (H1N1)、A/Beijing/262/95 (H1N1)、A/Brazil/11/78 (H1N1)、A/Chile/1/83 (H1N1)、A/New Jersey/8/76 (H1N1)、A/Taiwan/1/86 (H1N1)、A/Yamagata/32/89 (H1N1)、A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1)またはA/Mexico/4108/2009 (H1N1)等に対しても感染防御効果を有しうる。

[0101] 本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンは、TLR7の生理活性を亢進する化合物を組み合わせることによりステムIgG2抗体の誘導能が高められ、優れたワクチン活性を示す。

[0102] 本願におけるユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの一態様として、特許文献14に示されるインフルエンザウイルス由来蛋白質を含む粒子抗原、非特許文献6、7、8に示されるインフルエンザHA抗原、または膜融合型インフルエンザHAスプリットワクチン抗原から選択されるユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と、ミョウバン、エマルション（例えば、フロイントアジュバント、MF59（登録商標）、AddaVax（TM）、AS03など）、NOD受容体の生理活性を亢進する物質、RIG-I受容体の生理活性を亢進する物質、Cタイプレクチン受容体の生理活性を亢進する物質、細胞質内DNA受容体の生理活性を亢進する物質、STINGの生理活性を亢進する物質、またはTLRの生理活性を亢進する物質から選択されるワクチンアジュバントの組み合わせが挙げられる。

[0103] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域LAHに結合する抗体を産生するインフルエ

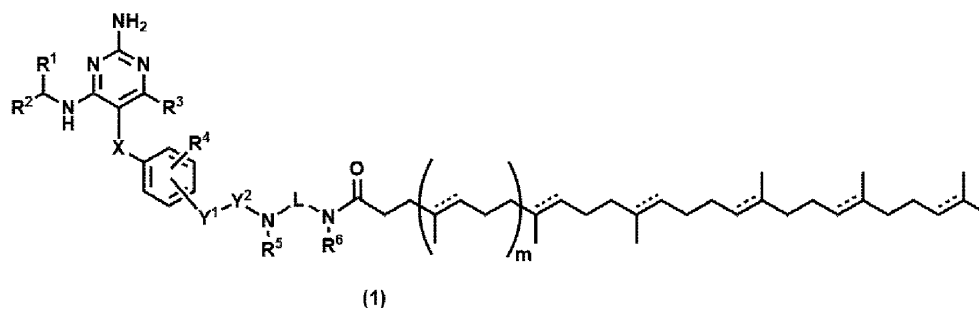
ンザHAスプリットワクチン抗原と、T L Rの生理活性を亢進する物質との組み合わせが挙げられる。

- [0104] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であり、HA幹領域L AHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、T L R 7の生理活性を亢進する低分子量化合物、またはT L R 7の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物から選択されるT L R 7の生理活性を亢進する物質との組み合わせが挙げられる。
- [0105] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であり、HA幹領域L AHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、分子量200～600を有し、かつ、アデニン骨格、ピリミジン骨格、イミダゾキノリン骨格、イミダゾピリジン骨格、またはキナゾリン骨格を有するT L R 7の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質がスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物との組み合わせが挙げられる。
- [0106] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であることによりHA幹領域のL AHの抗原性が高められており、かつ、HA幹領域のL AHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物の組み合わせが挙げられる。
- [0107] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であることによりHA幹領域のL AHの抗原性が高められており、かつ、HA幹領域のL AHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、下記式(1)で表されるT L R 7の生理活性を亢進する化合物

との組み合わせが挙げられる；

式（１）：

[化6]



[式（１）中、Xは、メチレンを表し、

R¹は水素原子、またはヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基を表し、

R²は、水素原子、または炭素数１～６のアルキル基を表し、

R³は、炭素数１～３のアルキル基を表し、

R⁴は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素数１～３のアルキル基または炭素数１～３のアルコキシ基を表し、

Y¹は、単結合またはメチレンを表し、

Y²は、単結合または－C(O)－を表し、

Lは、炭素数２または３の直鎖アルキレンを表し、

R⁵およびR⁶は、独立して水素原子または炭素数１～３のアルキル基を表すか、あるいは、R⁵は、R⁶と一緒に置換もしくは無置換の５～８員の含窒素飽和ヘテロ環を形成してもよく、前記５～８員の含窒素飽和ヘテロ環が置換されている場合、ヒドロキシ基およびハロゲン原子から選択される同一もしくは異なる１～４個の置換基で置換されていてもよく、

mは０または１を表し、

[化7]

は、全て二重結合を表す]

で示される化合物、またはそれらの製薬学的に許容される塩。

ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であることによりHA幹領域のLAHの抗原性が高められており、かつ、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、以下から選択されるTLR7の生理活性を亢進する化合物との組み合わせが挙げられる；

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド；

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンジル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン；

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンゾイル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン；

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド；

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル](メチル)アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド；

またはそれらの製薬学的に許容される塩。

ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、HA幹領域が外部に露出した形状であることによりHA幹領域のLAHの抗原性が高められており、かつ、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、以下から選択されるTLR7の生理活性を亢進する化合物との組み合わせが挙げられる；

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド；

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド；

またはそれらの製薬学的に許容される塩。

ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントの組み合わせの別の態様として、インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生することができるインフルエンザHAスプリットワクチン抗原と、以下から選択されるTLR7の生理活性を亢進する化合物との組み合わせが挙げられる；

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド；

4-[(2-アミノ-4-[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド；

またはそれらの製薬学的に許容される塩。

- [0108] 本願において、予防上の有効量とは、インフルエンザ予防における利益を対象に与えるために必要なユニバーサルインフルエンザワクチン抗原および／またはワクチンアジュバントの量である。
- [0109] 本願において、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントは、1つの組成物中に併せて含まれてもよく、別の組成物としてそれぞれ調製されてもよいが、患者負担の軽減の観点から、投与する際には、同時に投与可能なようにユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントは1つの組成物中に含まれていることが好ましい。
- [0110] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバントが別の組成物に調製された場合には、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原組成物とワクチンアジュバント組成物の投与経路は同じであっても、異なってもよい。本願において、ワクチン抗原とワクチンアジュバントは同時または時間差で投与することができ、すなわち、ワクチン抗原組成物とワクチンアジュバント組成物は同時に投与されても良く、別に（例えばワクチン抗原組成物の投与前にまたは投与後にワクチンアジュバント組成物が投与される）投与されても良い。ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原組成物とワクチンアジュバント組成物はこれらを含むキットとして提供されても良い。
- [0111] 本願において、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原および／またはワクチンアジュバントを含む組成物は、1以上の薬学上許容される希釈剤もしくは担体をさらに添加して、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の経口剤、或いは外用剤、坐剤、注射剤、点眼剤、経鼻剤、経肺剤等の非経口剤の形態に、通常の方法で調製されうる。好ましい製剤形の例として、注射用または点鼻用の液剤、または前記液剤を凍結乾燥して調製される凍結乾燥製剤等が挙げられる。
- [0112] 注射用液剤としては、例えば水性の溶液および油状組成物を含むエマルションやリポソーム、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原および／またはワクチンアジュバント（例えば式（1）で表される化合物またはその製薬学

的に許容される塩)を水に溶解または分散させた水性溶液製剤もしくは水性懸濁液剤、またはユニバーサルインフルエンザワクチン抗原および/またはワクチンアジュバント(例えば式(1)で表される化合物またはその製薬学的に許容される塩)を油に溶解または分散させた油性溶液製剤もしくは油性懸濁液剤等が挙げられる。

- [0113] ここで水性の溶液、水性溶液製剤もしくは水性懸濁液剤の例としては、注射用蒸留水、ならびに適宜緩衝剤、pH調節剤、安定化剤、等張化剤および/または乳化剤を含む水溶液もしくは水性懸濁液等が挙げられる。
- [0114] 油状組成物、油性溶液製剤もしくは油性懸濁液剤の例としては、植物性油脂、動物性油脂、炭化水素類、脂肪酸エステル類、リン脂質類等を含む組成物が挙げられ、更に具体的にはスクワレン、スクワラン等を含む組成物が挙げられる。
- [0115] 乳化剤の例としては、親水性界面活性剤や疎水性界面活性剤が挙げられる。
- [0116] 本願における組成物は、スクロース、スクラロース、トレハロース、マンニトール、グリシン、メチオニン、クエン酸、乳酸、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸およびpH調整剤からなる群から選択される1以上の製薬学的に許容される担体を含んでもよい。
- [0117] 本願における組成物、キット等の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。前記投与方法としては、例えば、非経口投与、具体的には、血管内(例えば静脈内)、皮下、皮内、筋肉内、経鼻、経皮投与が挙げられる。
- [0118] 本願においてワクチンアジュバントおよびワクチン抗原の投与量は、特に限定されず、投与方法、対象、対象の年齢、剤形、投与ルート等により適宜選択される。
- [0119] 例えば、ワクチンアジュバントが式(1)で表される化合物またはその製薬学的に許容される塩であるとき、その投与量は、温血動物に対し、通常5〜5000mg/m²(体表面積)、即ち、約0.1ng/kg〜100mg

／k g の範囲の単位用量にて投与され、これは通常、予防上有効な用量をもたらす。注射剤、錠剤またはカプセルのような単位投与形態は、通常、例えば1 n g ～250 m g の式（1）で表される化合物またはその製薬学的に許容される塩を含有する。好ましくは、1日あたり1 n g ～50 m g ／k g の範囲の投与量で用いられる。但し、この1日あたりの用量は、処置を受ける宿主、具体的な投与経路および処置される疾患の重症度によって変更する必要もある。したがって、至適用量は、個別の患者もしくは温血動物を処置する施術者が決定することもできる。ワクチンアジュバントがユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と同時に投与される場合には、ワクチンアジュバントは例えば下記のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の投与スケジュールに従って投与される。ワクチンアジュバントがユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と別に投与される場合にも、例えば下記のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の投与スケジュールを考慮して投与されることができる。

[0120] 本願において、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原（例えば本発明のインフルエンザHAスプリットワクチン）の投与量、組成物の剤形、投与回数、一回の投与にかかる時間などは、対象の年齢、標的部位などの条件に応じて適宜選択できる。ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原（例えば本発明のインフルエンザHAスプリットワクチン）は、例えば一回の接種のみ行うことも可能であるし、初回接種の後、所定期間の経過後に追加接種するように使用されることも可能である。初回接種の後、追加接種されるまでの期間は、特に限定されるものではないが、例えば20日～3年であり、好ましくは3月～2年であり、より好ましくは6月～1年である。初回接種および追加接種のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の量は、特に限定されるものではないが、1用量あたり例えば1 μ g ～200 μ g であり、好ましくは10 μ g ～30 μ g であり、より好ましくは15 μ g である。1用量は例えば0.5 mL である。初回接種および追加接種のTLR7の生理活性を亢進する物質の量としては、通常、0.0001 m g ～1000 m g、好ましくは、

0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgである。初回接種および追加接種では、投与方法は特に限定されるものではないが、例えば経鼻、皮下、皮内、経皮、眼内、粘膜または経口投与であり、好ましくは筋肉内投与である。

[0121] 本明細書において、「温血動物」には、ヒトおよび非ヒト動物類が含まれる。非ヒト動物には、特に限定されないが、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシのような哺乳類が含まれる。温血動物の中では、ヒト、特に、インフルエンザの予防を必要としているヒトが好ましい。

[0122] 本願におけるインフルエンザを予防するための方法の実施態様としては、上記のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原およびワクチンアジュバントを含む組成物を投与することを含む方法が挙げられる。別の実施形態として、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原組成物とワクチンアジュバント組成物を投与することを含む方法が挙げられる。

実施例

[0123] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

[0124] 実施例1：本発明のインフルエンザHAスプリットワクチン

[0125] 1. HAスプリットワクチンの調整

リン酸緩衝生理食塩水に懸濁したH3N2型インフルエンザウイルス粒子（X31株）もしくはH1N1型インフルエンザウイルス粒子（A/Puerto Rico/8/34株）に、最終濃度が0.1v/v%になるようTween80を添加し懸濁した。ジエチルエーテルを加えさらに懸濁し、水層とジエチルエーテル層が完全に分離するまで静置した後、ジエチルエーテル層を取り除いた。このエーテル抽出を繰り返した後、回収した水層に残存するジエチルエーテルを常圧で留去し、HAスプリットワクチンとした。

[0126] 2. 酸性処理

HAスプリットワクチンをリン酸緩衝生理食塩水で懸濁後、酸性処理として0.15Mクエン酸緩衝液（pH 3.5）を添加しpHを5.0にした。室温で30分静置した

後、1M Tris緩衝液 (pH8.0)を加えて、pHを7.3に戻した。その後、遠心分離を行い、膜融合型HAスプリットワクチンとした。作製した膜融合型HAスプリットワクチンに、最終濃度0.05v/v%になるようホルマリンを加えて数日静置した。

[0127] なお、現行HAスプリットワクチンの場合は、1.で調整したHAスプリットワクチンに対して酸性処理を施さない以外は上記と同様の処理を行った。

[0128] 3. ELISA法によるLAH抗体価の測定

3-1. H3N2型インフルエンザワクチンの接種

BALB/cマウス (メス、6~12週令) に、H3N2型の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチン (10 μ gワクチン + 10 v/v % AddaVax アジュバント (InvivoGen) をリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、液量200 μ lにする) を腹腔内接種した。初回ワクチン接種28日後に、膜融合型HAワクチン (10 μ gワクチンのみをリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、液量200 μ lにする) を腹腔内接種した。追加ワクチン接種から14日後以降に、ワクチンを接種したマウスより採血を行い、血清を回収した。

[0129] 3-2. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)にて、H3N2型の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体濃度を測定した。

[0130] 即ち、ステム部分の一部 (long alpha helix) に相当する合成ペプチド (H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFKTRRQLRENADYKDDDDK C) (配列番号1) を10 μ g/mlにてリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.3) に溶解し、96ウェルプレートに100 μ lずつ添加した。4°Cで一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150 μ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、Tween20を0.05v/v%と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したマウス血清と、濃度既知の標準モノクローナル抗体 (H3; クローン名V15-5) を各ウェルに100 μ lずつ

つ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、0.05v/v%Tween20と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（Southern Biotech）を各ウェルに100 μ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液（pH 5.0）60 mlにo-phenylenediamine tablet（シグマ）30 mgと24 μ lの30%過酸化水素水（30%w/w；シグマ）を加えたものを調整し、それを各ウェルに100 μ lずつ添加した。発色後50 μ lの1mol/L硫酸（和光純薬工業）で反応を止め、Microplate Reader 450型（Biorad）を用いて490 nmの吸光値を測定した。

[0131] 図2に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価は、現行HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価よりも、有意に上昇していた。

[0132] 4. 抗原変異株に対する交差防御

H3N2型ウイルス感染防御実験では、ワクチン非接種マウス、または、H3N2型の現行HAスプリットワクチン若しくは膜融合型HAスプリットワクチン接種後のマウスより回収した血清を、BALB/cマウス（メス、6～12週令）に200 μ lずつ腹腔内投与した。

[0133] 血清投与から3時間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス（A/Guizhou/54/89）を5マウス lethal dose₅₀（50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍）にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。

[0134] ウイルス感染から21日間、毎日マウスの体重測定および観察を行い、体重の推移と生存率を調べた。25%の体重減少が認められたマウスが生じた場合は、安楽殺処分とした。

[0135] 図3に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを接種したBALB/cマウスでは、抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス感染後9日目から有意に生存率低下を抑制できた。

[0136] 5. ELISA法によるLAH抗体価の測定

5-1. H1N1型インフルエンザウイルス粒子

C57BL/6マウス（メス、6～12週令）に、H1N1型の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチン（10 μ gワクチン + 10 μ g CpG-ODN 1760をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、等量のFreund' s incomplete adjuvant（ROCKLAND）と混合して液量200 μ lにする）を腹腔内接種した。初回ワクチン接種28日後に、膜融合型HAスプリットワクチン（初回ワクチン接種と同様に、10 μ gワクチン + 10 μ g CpG-ODNをリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、等量のFreund' s incomplete adjuvant（ROCKLAND）と混合して液量200 μ lにする）を腹腔内接種した。追加ワクチン接種から14日後以降に、ワクチンを接種したマウスより採血を行い、血清を回収した。

[0137] 5-2. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法にて、H1N1型の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体濃度を測定した。

[0138] ステム部分の一部（long alpha helix）に相当する合成ペプチド（H1；Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNADYKDDDDKC）（配列番号2）を使用し、濃度既知の標準モノクローナル抗体（H1；クローン名F2）を使用した以外は、上記と同様の手法を用いた。

[0139] 図4に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体価は、現行HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体価よりも、有意に上昇していた。

[0140] 6. 抗原変異株に対する交差防御

H1N1型ウイルス感染防御実験では、ワクチン非接種マウス、または、H1N1型の現行HAスプリットワクチン若しくは膜融合型HAスプリットワクチン接種後のマウスより回収した血清を、C57BL/6マウス（メス、6～12週令）に200 μ lずつ腹腔内投与した。

[0141] 血清投与から3時間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH1N1型インフル

エンザウイルス (A/Narita/1/09)を5マウス lethal dose50 (50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍)にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。

[0142] ウイルス感染から20日間、毎日マウスの観察を行い、生存率を調べた。図5に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを接種したC57BL/6マウスでは、抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス感染後9日目から有意に生存率低下を抑制できた。

[0143] 7. LAH epitopeに対する抗体結合性

[0144] ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)により、X31株を感染させたマウスもしくはヒト末梢血より作製したLAH結合性モノクローナル抗体(図6における#1~#5)の、現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンに対する結合を測定した。H3N2型インフルエンザウイルス(X31株)の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンをリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.3)に溶解し、96ウェルプレートに50 μ lずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150 μ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05v/v%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したLAH結合性のモノクローナル抗体を50 μ lずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05v/v%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、0.05v/v%Tween20と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Southern Biotech)を各ウェルに100 μ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05v/v%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液(pH 5.0) 60 mlにo-phenyldiamine tablet (シグマ) 30 mgと24 μ lの30%過酸化水素水(30w/w; シグマ)を加えたものを調製し、それを各ウェルに50 μ lずつ添加した。発色後25 μ lの1 mol/L硫酸(和光純薬工業)で反応を止め、Microplate Reader 450型(Biorad)を用いて49

0 nmの吸光値を測定した。測定した現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンに対するそれぞれの吸光値より、結合性の変化を算出した。

[0145] 図6に示されるように、LAH結合性モノクローナル抗体が膜融合型HAスプリットワクチンに対して現行HAスプリットワクチンよりも1.05~21倍強く結合した。これらの結果は、HAスプリットワクチンの酸性処理により、LAH epitopeに対する抗体結合性が亢進することを示すものである。

[0146] 実施例2：本願のTLRアゴニストとインフルエンザHAスプリットワクチンを含む組成物

[0147] 1. TLR7の生理活性を亢進する化合物を含むアジュバント組成物の調整

A-1

調製法

2.96gのジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、2.04gの卵黄ホスファチジルグリセロール (EPG)、および0.5gのTLR7アゴニスト ((4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド) (以下、化合物Aという)をそれぞれはかり取り、さらに、シクロヘキサン20g、エタノール0.4gを加え、溶解した。0.2 μmのメンブランフィルターを用いてろ過を行い、凍結乾燥した。9v/v%スクロース水溶液を用いて添加分散した。エクストルーダーを用いてリポソーム液を調製し、0.22 μmのろ過フィルターを通した後、凍結乾燥した。復水は注射用蒸留水を用いて要時行った。

A-2

調製法

4mgのTLR7アゴニスト (メチル (4- { [[3- (6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル) プロピル] (3-ピペリジン-1-イルプロピル) アミノ] メチル} フェニル) アセテ

ート・塩酸塩）（以下、化合物Bという）を秤量し、1mLの0.1v/v% Tween80を含有する0.6v/v% リン酸緩衝生理食塩水(pH6)を添加して懸濁した。

A-3

調製法

TLR7アゴニスト（化合物A）、スクワラン、トリオレイン酸ソルビタン、 α -トコフェロール、が1：225：25：25の重量比となるように、化合物Aを油性成分（スクワラン、トリオレイン酸ソルビタン及び α -トコフェロール）に溶解させた。化合物A、アスコルビン酸Na、ポリソルベート80、スクロースが1：10：25：500の重量比となるように、注射用水に水性成分（スクロース、ポリソルベート80及びアスコルビン酸ナトリウム）を溶解後、上記油性組成物を加えて予備混合を行い、超高压乳化分散機を用いて乳化分散させた。0.2 μ mの滅菌フィルターを通してろ過した後、ガラス製バイアルに1 mLずつ充填し、凍結乾燥した。復水は注射用蒸留水を用いて要時行った。

[0148] 2. 本願のインフルエンザHAスプリットワクチンとTLR7の生理活性を亢進する化合物を含む組成物の投与

X31型由来膜融合型HAスプリットワクチン（10 μ g）に、リン酸緩衝生理食塩水、50 μ gのTLR7アゴニスト（化合物A）を含むA-1、200 μ gのTLR7アゴニスト（化合物B）を含むA-2、10 μ gのTLR7アゴニスト（化合物A）を含むA-3、X31型由来膜融合型HAスプリットワクチン液と等容量のAddaVaxアジュバント（InvivoGen）、もしくは10 μ gのCpG-ODN1760をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し等量のFreund' s incomplete adjuvant（ROCKLAND）と混合したものをそれぞれ調製した。C57BL/6マウス（メス、6～12週令）の大腿部皮内もしくは大腿部の筋肉内（片側50 μ lで合計100 μ l）に接種した。3週間後に同じマウスに同じ抗原および同じ条件で追加免疫を行い、追加免疫2週間後に採血を行い、血清を回収した。

[0149] 3. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法にてマウスの血清中のHA抗体濃度を測定した。

即ち、組換えHA蛋白質（H3N2型インフルエンザウイルスのX31株もしくはA/Uuguay/716/2007）を10 $\mu\text{g/ml}$ にてリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.3）に溶解し、96ウェルプレートに100 μl ずつ添加した。4°Cで一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、Tween20を0.05v/v%と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したマウス血清と、濃度既知の標準モノクローナル抗体（H3；クローン名V15-5）を各ウェルに100 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、0.05v/v%Tween20と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG1抗体もしくは抗IgG2c抗体（Southern Biotech）を各ウェルに100 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液（pH 5.0）60 mlにo-phenyldiamine tablet（シグマ）30 mgと24 μl の30%過酸化水素水（30%w/w；シグマ）を加えたものを調整し、それを各ウェルに100 μl ずつ添加した。発色後50 μl の1 mol/L硫酸（和光純薬工業）で反応を止め、Microplate Reader 450型（Biorad）を用いて490 nmの吸光値を測定した。

[0150] 図7に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチン接種群のX31型由来HA IgG2c抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。また、A-1投与群は、CpG-ODN1760/Freund's incomplete adjuvant (CpG/IFA) よりも高いX31型由来HA IgG2c抗体価を誘導した。中でもA-1投与群は、最も高いX31型由来HA IgG2c抗体価を誘導した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性IgG2抗体の誘導を示すものである。

[0151] 図8に示されるように、全てのアジュバント添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群のX31型由来HA IgG1抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HA

スプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。中でもCpG-ODN 1760/Freund' s incomplete adjuvant (CpG/IFA) は、最も高いX31型由来HA IgG1抗体価を誘導した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による交差反応性抗体の誘導を示すものである。

[0152] 図9に示されるように、A-1投与群は、CpG-ODN1760/Freund' s incomplete adjuvant (CpG/IFA) よりも高いX31型由来HA IgG2c/IgG1抗体比を示した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様のHA IgG2c/IgG1抗体比を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性抗体の誘導を示すものである。

[0153] 図10に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチン接種群のX31型由来HA IgG2c抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。また、A-1およびA-3投与群は、AddaVaxアジュバント投与群よりも高いX31型由来HA IgG2c抗体価を誘導した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性IgG2抗体の誘導を示すものである。

[0154] 図11に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチン接種群のX31型由来HA IgG1抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。中でもA-3およびAddaVaxアジュバント投与群は、最も高いX31型由来HA IgG1抗体価を誘導した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による交差反応性抗体の誘導を示すものである。

[0155] 図12に示されるように、A-1およびA-3投与群は、AddaVaxアジュバント投与群よりも高いX31型由来HA IgG2c/IgG1抗体比を示した。さらに、Urg型由来HAに対しても全く同様のHA IgG2c/IgG1抗体比を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性抗体の誘導を

示すものである。

[0156] 4. 抗原変異株に対する交差防御

追加免疫から3週間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス (A/Guizhou/54/89)を5マウス lethal dose₅₀ (50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍)にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。ウイルス感染から14日間、毎日マウスの体重測定および観察を行い、体重の推移と生存率を調べた。25%の体重減少が認められたマウスが生じた場合は、安楽殺処分とした。

[0157] 図13に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスでは、抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス感染後7日目から有意に生存率低下を抑制できた。中でもA-1およびA-3は、100%の生存率を示し、最も強い感染防御作用を示した。

[0158] 図14に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスにおいて、抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス感染による体重減少を抑制した。中でもA-3は、AddaVaxアジュバント投与群よりも強い体重減少抑制作用を示した。

[0159] 5. 本願のインフルエンザHAスプリットワクチンとTLR7の生理活性を亢進する化合物を含む組成物の投与

H1N1型インフルエンザウイルスのPR8株由来膜融合型HAスプリットワクチン (10 μ g) に、リン酸緩衝生理食塩水、50 μ gのTLR7アゴニスト (化合物A) を含むA-1、10 μ gのTLR7アゴニスト (化合物A) を含むA-3、もしくはPR8株由来膜融合型HAスプリットワクチン液と等容量のAddaVaxアジュバント (InvivoGen) と混合したものをそれぞれ調製した。C57BL/6マウス (メス、6~12週令) の大腿部皮内もしくは大腿部の筋肉内 (片側50 μ lで合計100 μ l) に接種した。3週間後に同じマウスに同じ抗原および同じ条件で追加免疫を行い、追加免疫2週間後に採血を行い、血清を回収した。

[0160] 6. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法にてマウスの血清中のHA抗体濃度を測定し

た。

即ち、組換えHA蛋白質（H1N1型インフルエンザウイルスのPR8株もしくはA/Narita/1/09）を10 $\mu\text{g/ml}$ にてリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.3）に溶解し、96ウェルプレートに100 μl ずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、Tween20を0.05v/v%と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したマウス血清と、濃度既知の標準モノクローナル抗体（H1；クローン名F2）を各ウェルに100 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、0.05v/v%Tween20と1v/v%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG1抗体もしくは抗IgG2c抗体（Southern Biotech）を各ウェルに100 μl ずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05v/v%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液（pH 5.0）60 mlにo-phenyldiamine tablet（シグマ）30 mgと24 μl の30%過酸化水素水（30w/w；シグマ）を加えたものを調整し、それを各ウェルに100 μl ずつ添加した。発色後50 μl の1 mol/L硫酸（和光純薬工業）で反応を止め、Microplate Reader 450型（Biorad）を用いて490 nmの吸光値を測定した。

[0161] 図17に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチン接種群のPR8株由来HA IgG2c抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。また、A-1投与群は、AddaVaxアジュバント投与群よりも高いPR8株由来HA IgG2c抗体価を誘導した。中でもA-3投与群は、最も高いPR8株由来HA IgG2c抗体価を誘導した。さらに、A/Narita/1/09由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性IgG2抗体の誘導を示すものである。

[0162] 図18に示されるように、全てのアジュバント添加膜融合型HAスプリット

ワクチン接種群のPR8株由来HA IgG1抗体価は、アジュバント非添加膜融合型HAスプリットワクチン接種群と比較して、有意に上昇していた。中でもA-3投与群は、最も高いPR8株由来HA IgG1抗体価を誘導した。さらに、A/Narita/1/09由来HAに対しても全く同様の反応性を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による交差反応性抗体の誘導を示すものである。

[0163] 図19に示されるように、A-1およびA-3投与群は、AddaVaxアジュバント投与群よりも高いPR8株由来HA IgG2c/IgG1抗体比を示した。さらに、A/Narita/1/09由来HAに対しても全く同様のHA IgG2c/IgG1抗体比を示した。すなわちこれらの結果は、本願の組成物の接種による感染防御効果の高い交差反応性抗体の誘導を示すものである。

[0164] 7. 抗原変異株に対する交差防御

追加免疫から4週間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス (A/Narita/1/09)を5マウス lethal dose50 (50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍)にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。ウイルス感染から14日間、毎日マウスの体重測定および観察を行い、体重の推移と生存率を調べた。25%の体重減少が認められたマウスが生じた場合は、安楽殺処分とした。

[0165] 図20に示されるように、A-1もしくはA-3のアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスでは、抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス感染後7日目から有意に生存率低下を抑制でき、強い感染防御作用を示した。

[0166] 図21に示されるように、全てのアジュバントを添加した膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスにおいて、抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス感染による体重減少を抑制した。中でもA-1およびA-3投与群は、AddaVaxアジュバント投与群よりも強い体重減少抑制作用を示した。

[0167] 実施例3：ホルマリン処理順序の抗体結合性および抗体誘導能への影響

[0168] 1. ホルマリン前処理HAスプリットワクチンの調製

リン酸緩衝生理食塩水に懸濁したH3N2型インフルエンザウイルス粒子 (X31株

）に、最終濃度が0.1v/v%になるようTween80を添加し懸濁した。ジエチルエーテルを加えさらに懸濁し、水層とジエチルエーテル層が完全に分離するまで静置した後、ジエチルエーテル層を取り除いた。このエーテル抽出を繰り返した後、回収した水層に残存するジエチルエーテルを常圧で留去した。さらに、最終濃度0.05v/v%になるようホルマリンを加えて数日静置し、ホルマリン前処理HAスプリットワクチンとした。

[0169] 2. ホルマリン前処理HAスプリットワクチンの酸性処理

ホルマリン前処理HAスプリットワクチンをリン酸緩衝生理食塩水で懸濁後、酸性処理として0.15Mクエン酸緩衝液（pH 3.5）を添加しpHを5.0にした。室温で30分静置した後、1M Tris緩衝液（pH8.0）を加えて、pHを7.3に戻した。その後、遠心分離を行った。

[0170] 3. LAH epitopeに対する抗体結合性

LAH epitopeに対する抗体結合性は、実施例1における7.と同様の操作を実施し、結合性の変化を算出した。ここで、モノクローナル抗体は、図6における#2、#4及び#5と同じ抗体、およびコントロールとしてHAヘッド領域に結合するモノクローナル抗体#6を用いた。

[0171] 4. ELISA法によるLAH抗体価の測定

4-1. H3N2型インフルエンザワクチンの接種

BALB/cマウス（メス、6～12週令）に、H3N2型の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチン（10 μ gワクチン + 10 v/v % AddaVaxアジュバント（InvivoGen）をリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、液量200 μ lにする）を腹腔内接種した。接種から12日後以降に、ワクチンを接種したマウスより採血を行い、血清を回収した。

4-2. ELISA法による測定

LAH抗体価は、実施例1における3-2.と同様の操作を実施し、測定した。

[0172] 図15に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンの調製工程においてホルマリン処理を酸性処理の後に施したワクチン（post-fix）は、酸性処理の前に施したワクチン（Pre-fix）と比べて、LAH結合性モノクローナル抗

体がより強く結合した。これらの結果は、HAスプリットワクチンの酸性処理によるLAH epitopeに対する抗体結合性の亢進において、ホルマリン処理の時期が作用に影響を及ぼし、また、その処置は酸性処理の後が望ましいことを示すものである。ここで、図15および図16において、実施例3の手順により、HAスプリットワクチンに対して、ホルマリン処理後に酸性処理を施したワクチンを、「膜融合型スプリットワクチン (Pre-fix)」と表記する。また、実施例1の手順により、HAスプリットワクチンに対して、酸性処理後にホルマリン処理を施したワクチンを、「膜融合型スプリットワクチン (Post-fix)」と表記する。

- [0173] 図16に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価は、現行HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価よりも上昇した。さらに、膜融合型HAスプリットワクチン (post-fix) は、膜融合型スプリットワクチン (Pre-fix) と比べて、LAH抗体価は上昇した。

産業上の利用可能性

- [0174] 本発明は、インフルエンザワクチンの開発、または製造分野において利用可能である。

配列表フリーテキスト

- [0175] 配列番号1、2：合成ペプチド

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（１）および（２）を含む組成物；
（１）ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原；および
（２）ワクチンアジュバント。
- [請求項2] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、H A幹領域のL A Hに結合する抗体を産生することができるインフルエンザH Aスプリットワクチン抗原である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 該インフルエンザH Aスプリットワクチン抗原のH A幹領域が外部に露出した形状である、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、H A幹領域が外部に露出した形状であることによりH A幹領域のL A Hの抗原性が高められており、かつ、H A幹領域のL A Hに結合する抗体を産生することができる、インフルエンザH Aスプリットワクチン抗原である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項5] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、インフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項6] 該ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原が、インフルエンザH Aスプリットワクチンに酸性処理を施す工程と、その後ホルマリン処理を施す工程とを含む製造プロセスにより製造される、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項7] 該ワクチンアジュバントが、T L Rの生理活性を亢進する物質である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 該ワクチンアジュバントが、T L R 7、T L R 8、およびT L R 9からなる群から選択される一つもしくはそれ以上のT L Rの生理活性を亢進する物質である、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項9] 該ワクチンアジュバントが、少なくともT L R 7の生理活性を亢進

する物質である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 該ワクチンアジュバントが、少なくとも T L R 8 の生理活性を亢進する物質である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 該ワクチンアジュバントが、少なくとも T L R 9 の生理活性を亢進する物質である、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項12] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する物質が、 T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物、または T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物と脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物である、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

[請求項13] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物または該コンジュゲート化合物に含まれる該 T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物が、分子量 2 0 0 ～ 6 0 0 を有し、かつ、アデニン骨格、ピリミジン骨格、イミダゾキノリン骨格、イミダゾピリジン骨格、またはキナゾリン骨格を有する、請求項 1 2 に記載の組成物。

[請求項14] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物または該コンジュゲート化合物に含まれる該 T L R 7 の生理活性を亢進する低分子量化合物が、ピリミジン骨格、アデニン骨格またはイミダゾキノリン骨格を有する、請求項 1 3 に記載の組成物。

[請求項15] 該脂質が、スクワレンまたはスクワランから誘導される脂質である、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

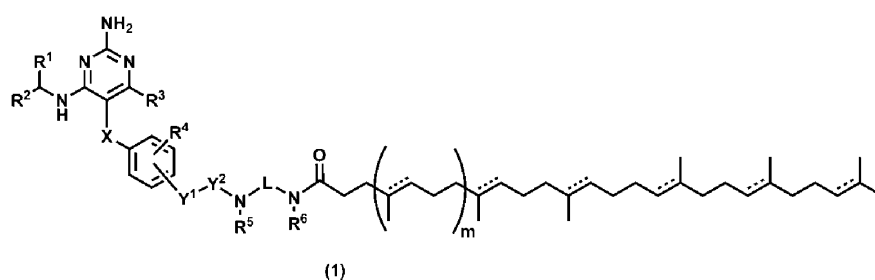
[請求項16] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、アデニン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物またはその製薬学的に許容される塩である、請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項17] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、ピリミジン骨格を有する低分子量化合物とスクワレンまたはスクワランから誘導される脂質とがスペーサーを介して化学的に結合しているコンジュゲート化合物

またはその製薬学的に許容される塩である、請求項 12～15 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項18] 該 T L R 7 の生理活性を亢進する化合物が、下記式 (1) :

[化1]



[式 (1) 中、Xは、メチレンを表し、

R¹は水素原子、またはヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R²は、水素原子、または炭素数 1～6 のアルキル基を表し、

R³は、炭素数 1～3 のアルキル基を表し、

R⁴は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素数 1～3 のアルキル基または炭素数 1～3 のアルコキシ基を表し、

Y¹は、単結合またはメチレンを表し、

Y²は、単結合または -C(O)- を表し、

Lは、炭素数 2 または 3 の直鎖アルキレンを表し、

R⁵および R⁶は、独立して水素原子または炭素数 1～3 のアルキル基を表すか、あるいは、R⁵は、R⁶と一緒に置換もしくは無置換の 5～8 員の含窒素飽和ヘテロ環を形成してもよく、前記 5～8 員の含窒素飽和ヘテロ環が置換されている場合、ヒドロキシ基およびハロゲン原子から選択される同一もしくは異なる 1～4 個の置換基で置換されていてもよく、

mは 0 または 1 を表し、

[化2]

は、全て二重結合を表す]

で示される化合物、またはそれらの製薬学的に許容される塩である、請求項 12～15、および 17 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項19]

該コンジュゲート化合物が、

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-{[(3S)-1-ヒドロキシヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド ;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンジル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン ;

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-1-(4-{4-[(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-3-メトキシベンゾイル}ピペラジン-1-イル)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエン-1-オン ;

4-[(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド ;

4-[(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル}(メチル)アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド ;

またはそれらの製薬学的に許容される塩である、請求項 12～15、17 および 18 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項20]

該 TLR7 の生理活性を亢進する化合物が、

(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-N-{2-[4-[(2-アミノ-4-{[(3S)-1-ヒドロキシ

ヘキサン-3-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]ベンジル}(メチル)アミノ]エチル}-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエンアミド ;

4-[(2-アミノ-4-{[(2S)-1-ヒドロキシペンタン-2-イル]アミノ}-6-メチルピリミジン-5-イル)メチル]-N-(2-{[(4E, 8E, 12E, 16E, 20E)-4, 8, 12, 17, 21, 25-ヘキサメチルヘキサコサ-4, 8, 12, 16, 20, 24-ヘキサエノイル]アミノ}エチル)-3-メトキシベンズアミド ;

またはそれらの製薬学的に許容される塩である、請求項 12 ~ 15、および 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項21] 請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物を含む、インフルエンザワクチン。

[請求項22] 予防が必要な温血動物に、予防上の有効量の請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物を投与することを含む、インフルエンザを予防するための方法。

[請求項23] 予防が必要な温血動物に、予防上の有効量のユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と、予防上の有効量のワクチンアジュバントを投与することを含む、インフルエンザを予防するための方法。

[請求項24] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原、およびワクチンアジュバントを含む、インフルエンザを予防するためのキット。

[請求項25] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原と組み合わせたインフルエンザの予防における使用のための、ワクチンアジュバント。

[請求項26] ワクチンアジュバントと組み合わせたインフルエンザの予防における使用のための、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原。

[請求項27] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原を含むインフルエンザの予防のための組成物の製造における、ワクチンアジュバントの使用。

[請求項28] ワクチンアジュバントを含むインフルエンザの予防のための組成物の製造における、ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原の使用。

[請求項29] ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原とワクチンアジュバント

とが、同時にまたは別々に投与される、請求項 2 2 および 2 3 に記載の方法、請求項 2 4 に記載のキット、請求項 2 5 に記載のワクチンアジュバント、または請求項 2 6 に記載の該抗原。

[請求項30]

ユニバーサルインフルエンザワクチン抗原がワクチンアジュバントの投与前にもしくは投与後に、または同時に投与される、請求項 2 2 および 2 3 に記載の方法、請求項 2 4 に記載のキット、請求項 2 5 に記載のワクチンアジュバント、または請求項 2 6 に記載の該抗原。