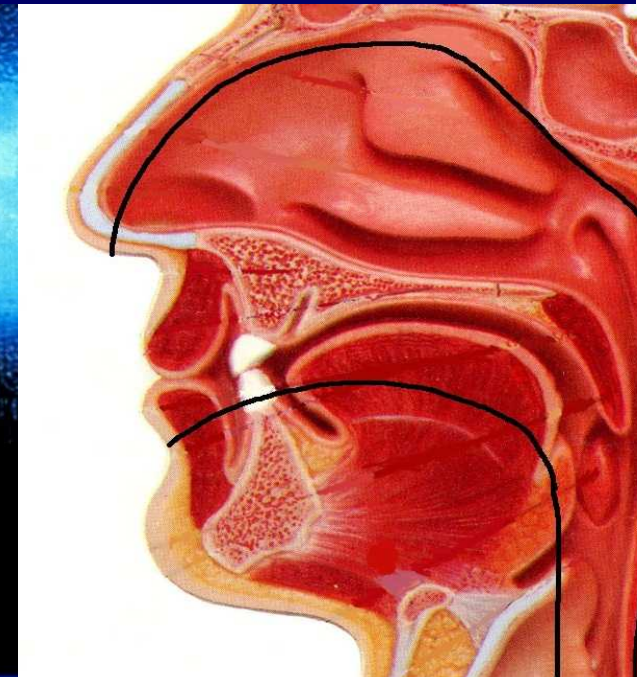


安全性と有効性の高い肺サーファクタント類似SF-10、 SF-11アジュバントを用いた経鼻接種ワクチン開発



HA vaccine + SF-10



開発コンセプト：安全性と有効性を両立させる戦略

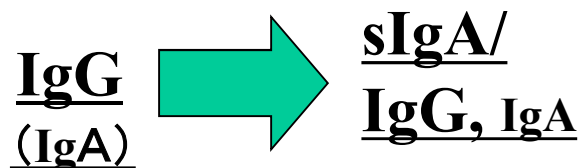
- 安全性：ヒトの生体成分を有効成分とする代謝の早いアジュバントSF-10
- 有効性：自然感染ルート（経鼻）を使用することで、生体を持つ全ての防御機能を動員する

ワクチン開発の現状と次世代戦略

皮下（筋肉内）注射



世界の動き



経鼻摂取



- ・ **効果的**で、**安全性**の高い経鼻ワクチンの開発が望まれる
- 死亡率の高い**2歳以下の乳幼児**のワクチン開発が望まれる

		皮下（筋肉内）注射	経鼻摂取
1) 肺炎防止（重症化予防）	血液IgG	○	○
2) 感染予防（感染しにくくする）	鼻汁/気道sIgA	—	○
3) 周囲の人に感染させない	鼻汁/気道sIgA	—	○

これまでに開発された主要な粘膜アジュバント

Mucosal adjuvant and Delivery system	Route	Systemic response	Mucosal responses
--------------------------------------	-------	-------------------	-------------------

1) 粘膜の樹状細胞刺激物質

Toxin-based adjuvants

CT	ON	+	+
mutant CT	N	+	+
HLT	ON	+	+
mutant HLT	N	+	+
CTA/HLTB	ON	+	+
mutant CTA/HLTB	N	+	+
mutant PTX	N	+	+
mutant STX	N	+	+
STXB	N	+	+

Cytokine-based adjuvants

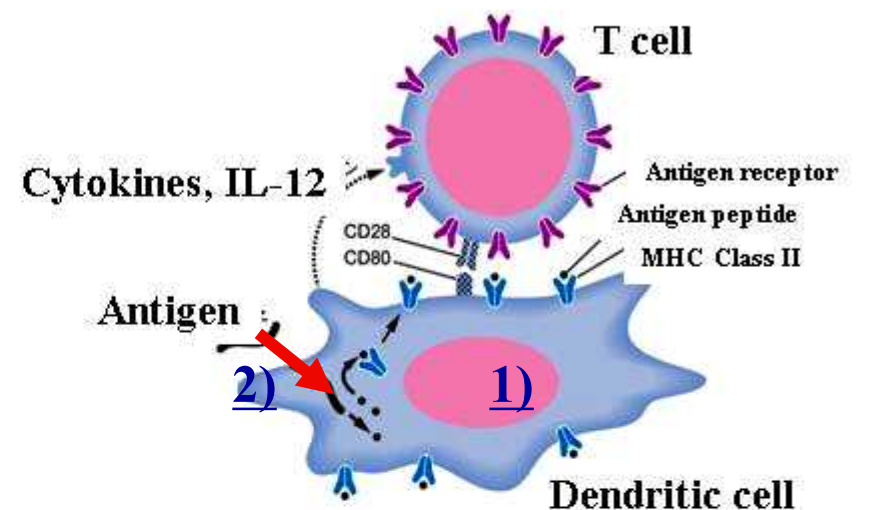
IL-1	N	+	+
IL-6	N	+	-
IL-12	N	+	+
Type I IFN	N	+	+

Innate immunity associated adjuvants

Lptn	N	+	+
RANTES	N	+	+
Defensin	N	+	-
CpG DNA	ON	+	+
Poly(I:C)	ON	+	+
Saponin(QS-21)	O	+	+

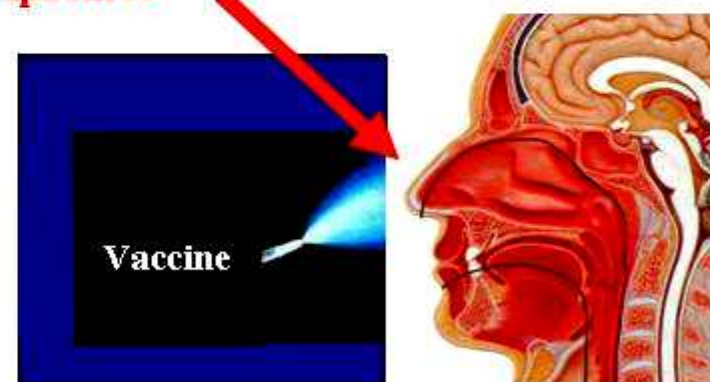
2) 粘膜の樹状細胞への抗原運搬体

ISCOM	ON	+	+
Liposome	N	+	+
Live attenuated vectors			
rSalmonella	O	+	+
rBCG	N	+	-
Chitosan	N	+	+
Mucosal DNA vaccine	ON	+	+
Edible vaccine	ON	+	+
Pulmonary Surfactant (SF-10)	N	+	+



Unexpected antigen exposures

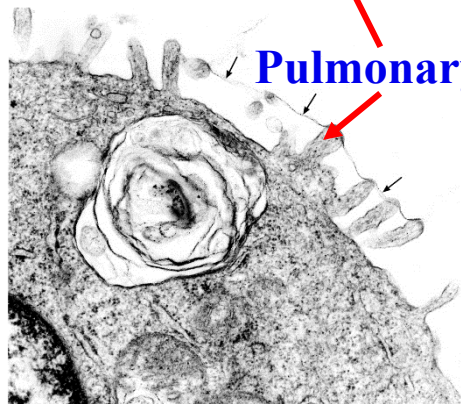
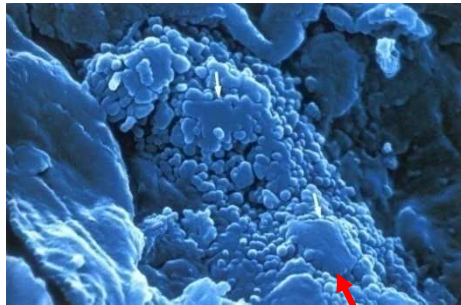
Side effects



アジュバント単独で樹状細胞を刺激すること無く、抗原共存下でのみ樹状細胞を刺激する代謝回転（体内分解）の早い生体成分アジュバントが、安全性確保の上で最適である

**肺サーファクタントは、効果的な
ヒト由来のリポソーム様Delivery
Vehicleとして作用し、強力な
粘膜アジュバント作用を示す**

呼吸窮迫症候群治療薬、肺サーファクタント製剤 サーファクテンに粘膜アジュバント効果を見出す

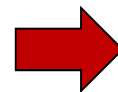


Pulmonary surfactant



サーファクテン120-500 mg/体重1 Kg

サーファクテンは、過去23年以上世界で安全に使用され、副作用が報告されていない

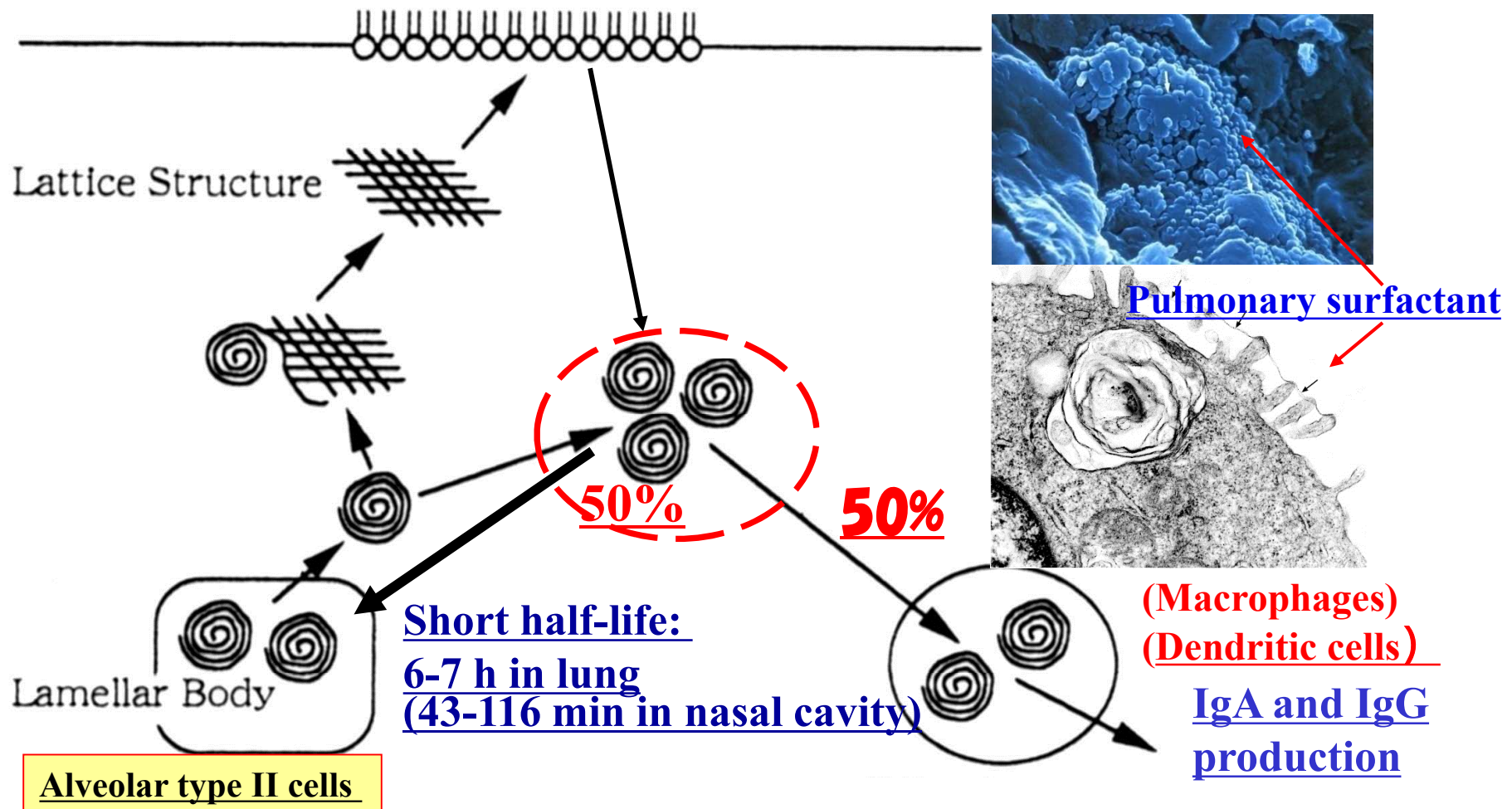


乳幼児に適用可能、安全性で実績のある肺サーファクタント製剤



粘膜アジュバント開発⁵

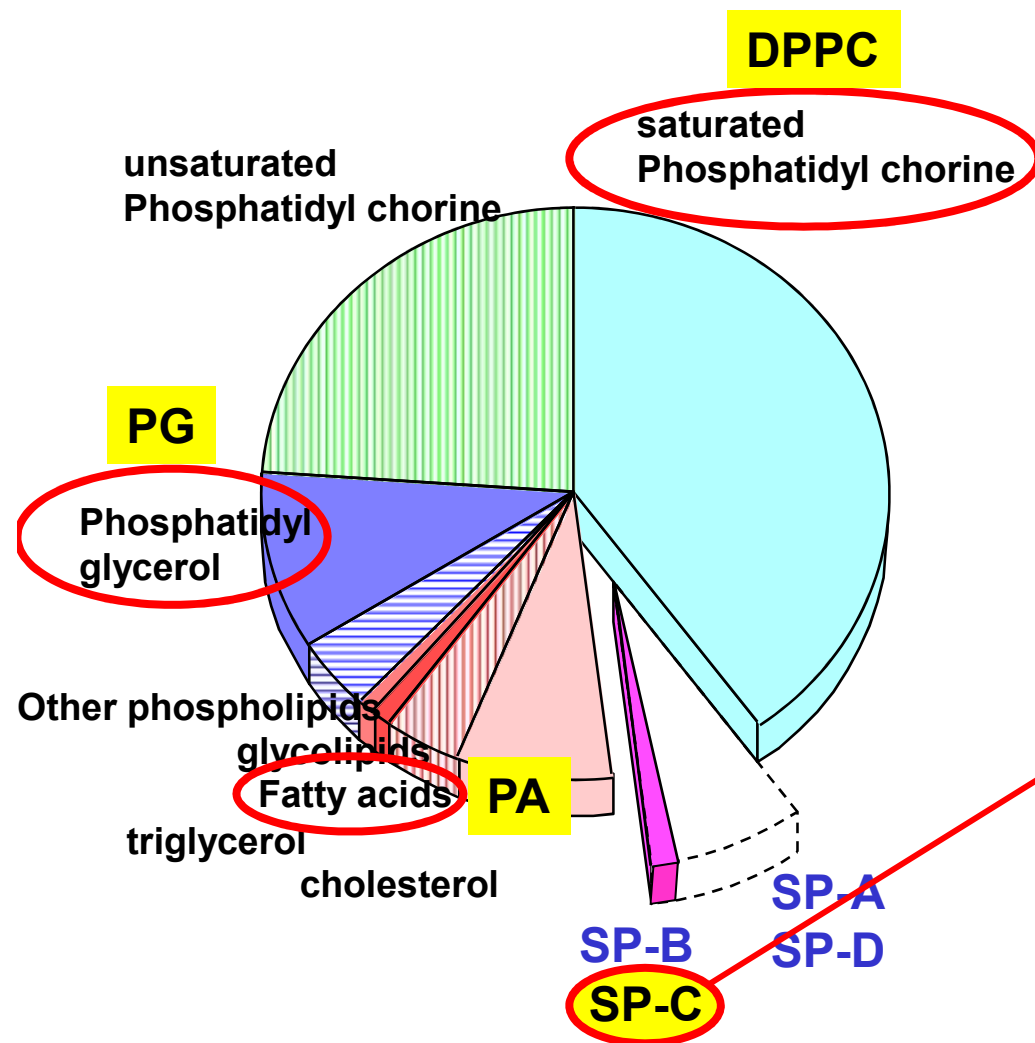
肺サーファクタントのhalf-lifeは、肺で6-7時間、鼻腔で43-116分で、早い代謝回転を示した(高い安全性)



出生後の第一呼吸が感染防御の始まりであり、マクロファージ、DCは生後48時間で肺に出現するが、肺サーファクタントはこれらの細胞の活性化、増殖と抗原提示に参与している。

**大量生産可能な人工合成
肺サーファクタント様粘膜アジュバ
ント製剤SF-10と、その微粒子化
剤添加SF-11の完成**

粘膜アジュバント活性に必要な肺サーファクタント成分



Surfactant proteins

K6L16 Synthetic peptide **KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL**

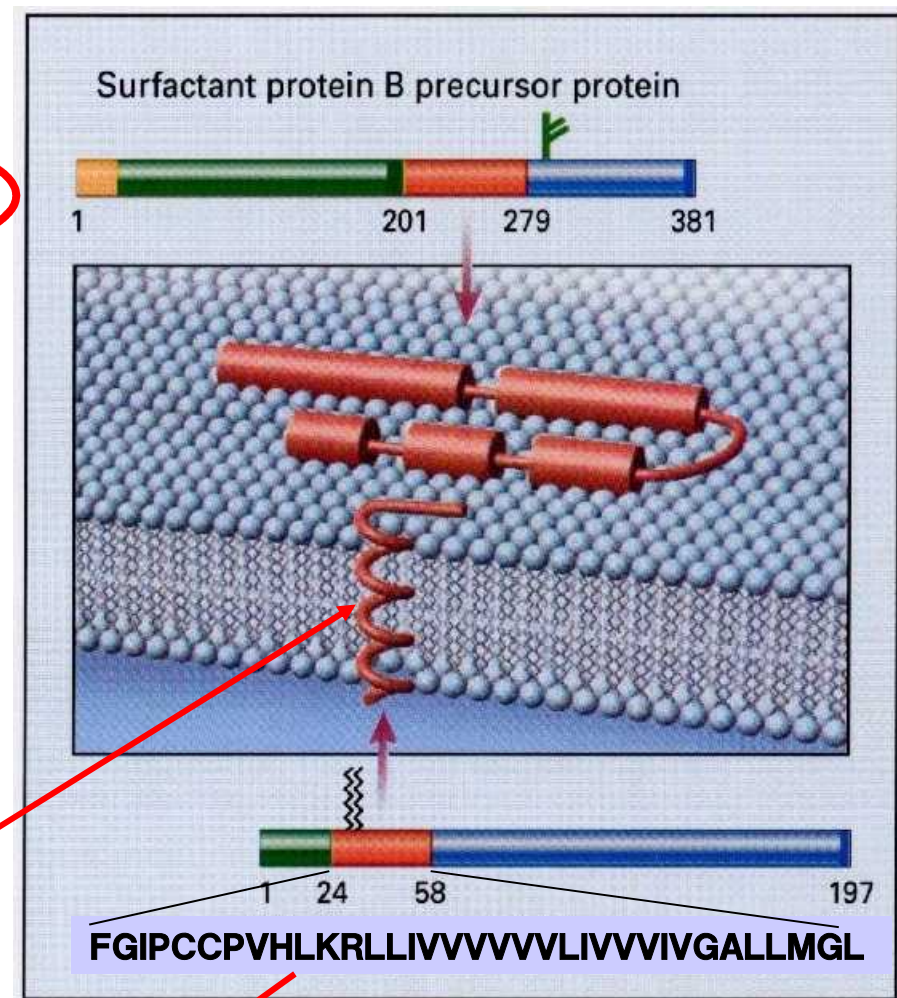
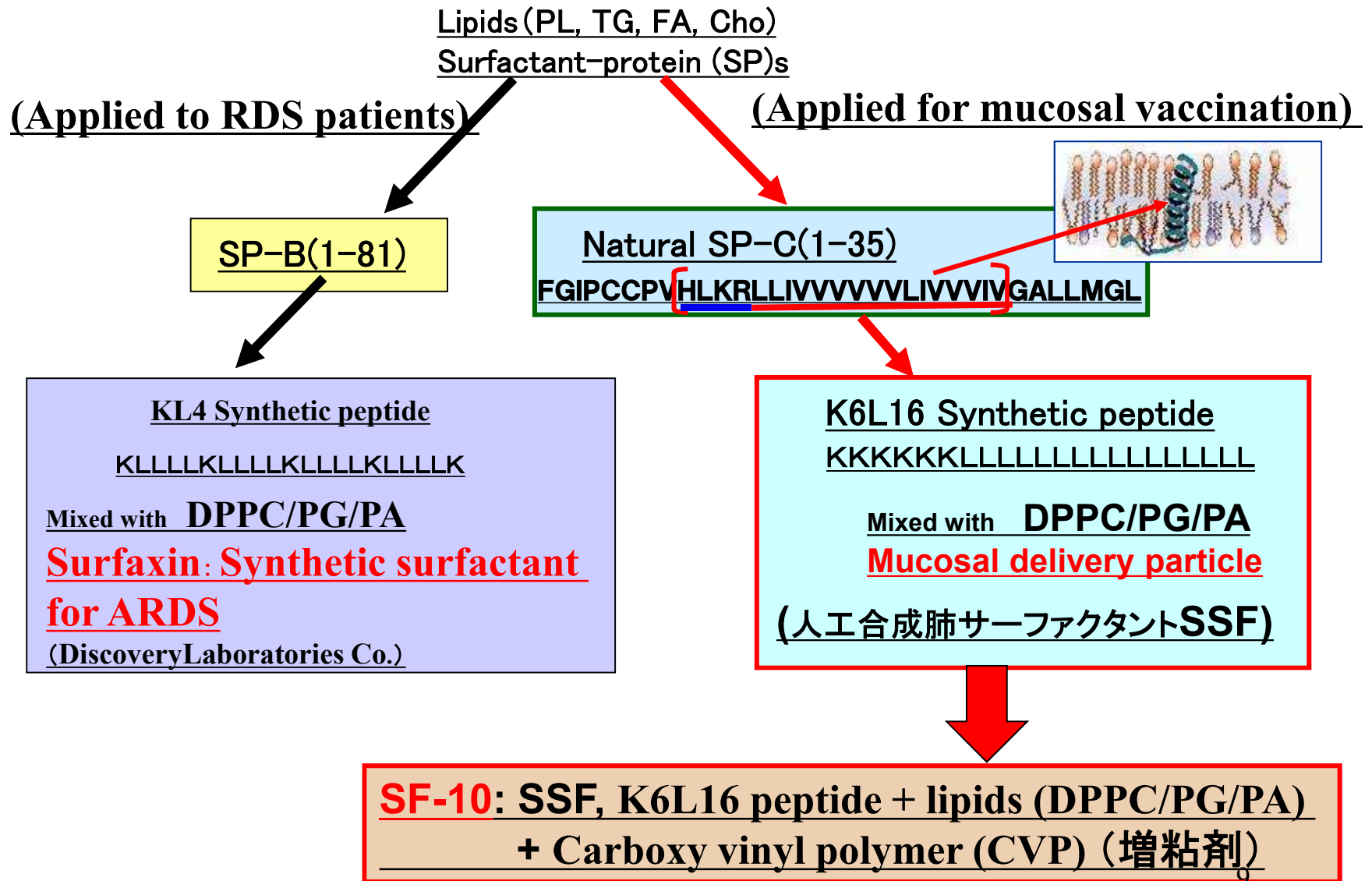


Figure 2. Proteolytic Processing of Surfactant Proteins B and C.

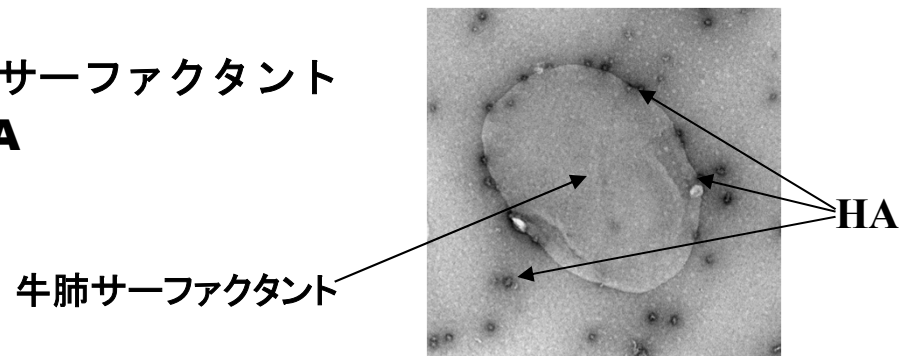
Whitsett, N Engl. J. Med., 347, 2141 (2002)

ヒト肺サーファクタントを基盤に作られた2つの薬剤
ARDS治療薬: Surfaxin 粘膜アジュバント: SSF, SF-10



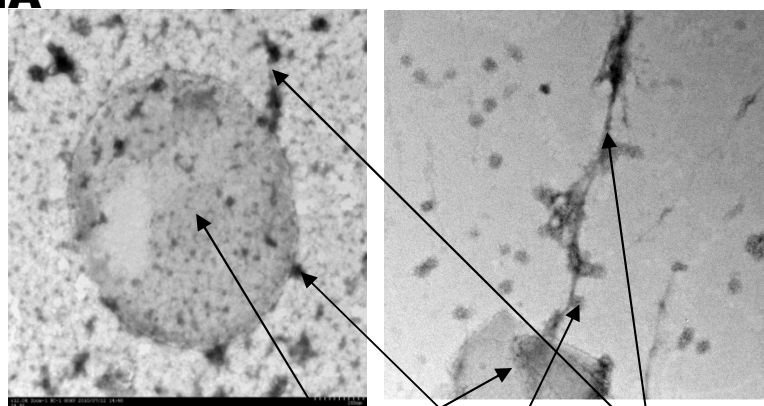
HA抗原添加牛肺サーファクタントと、人工合成肺サーファクタント SF-10とのHA複合体形成

(A)
牛肺サーファクタント
+ HA



(B) **SF-10**: SSF, K6L16 peptide + lipids (DPPC/PG/PA)
+ Carboxy vinyl polymer (CVP) (増粘剤)

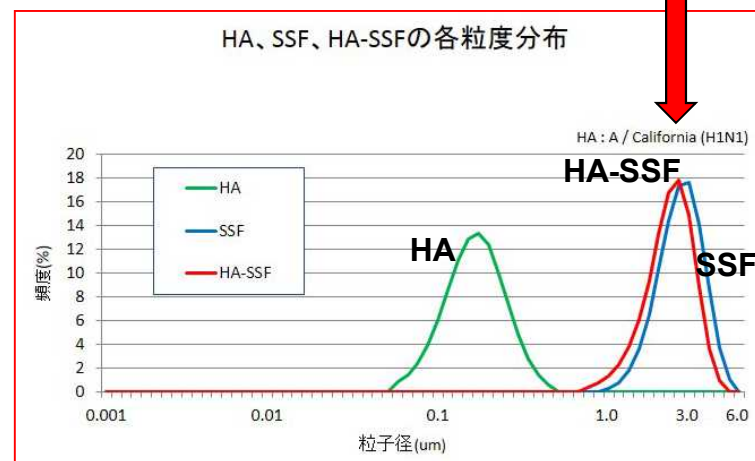
SF-10 + HA



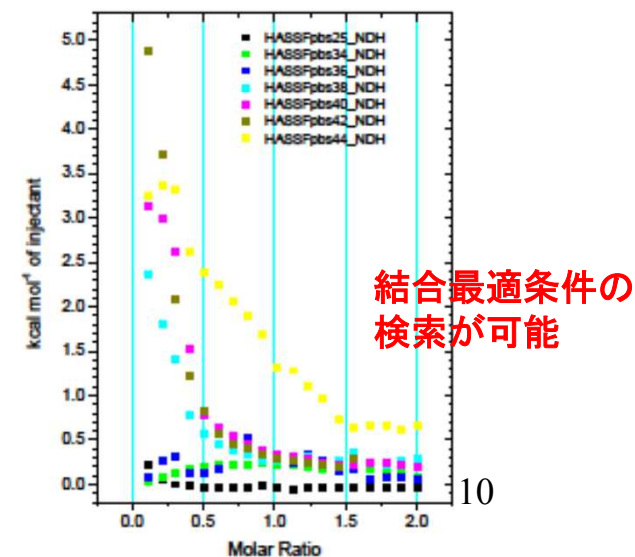
人工合成サーファクタント: **SSF** **HA** CVP

SSF+CVP = SF-10

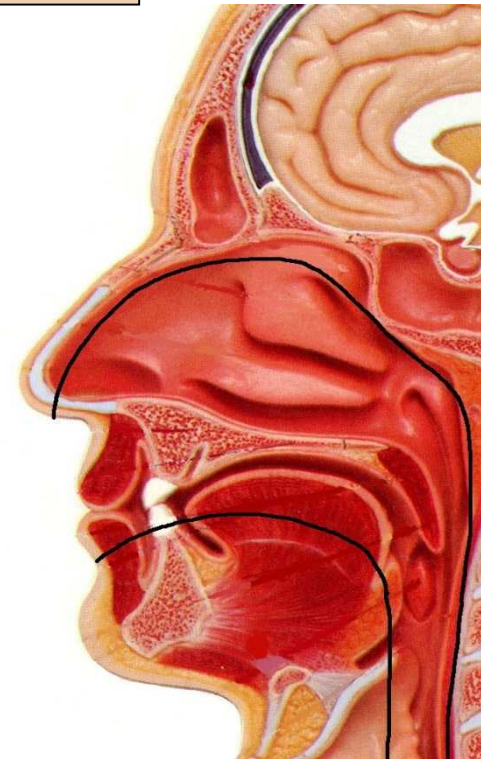
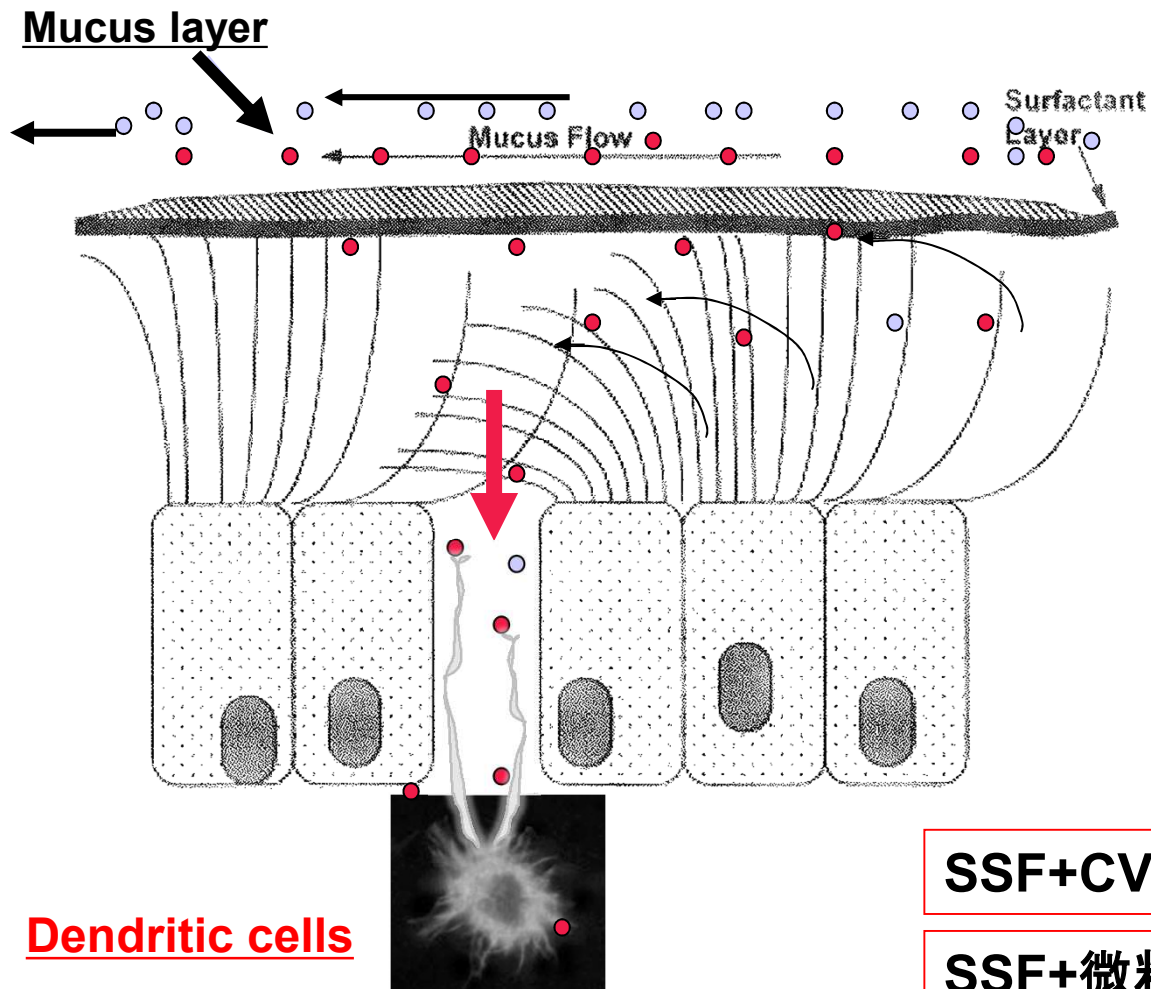
HAとSSFが結合して **1 峰性の粒度分布**
になると抗体誘導が増強される



各反応温度におけるHA-SSF モル比あたりの結合
エンタルピー量の変化



SF-10、SF-11の抗原デリバリー効果

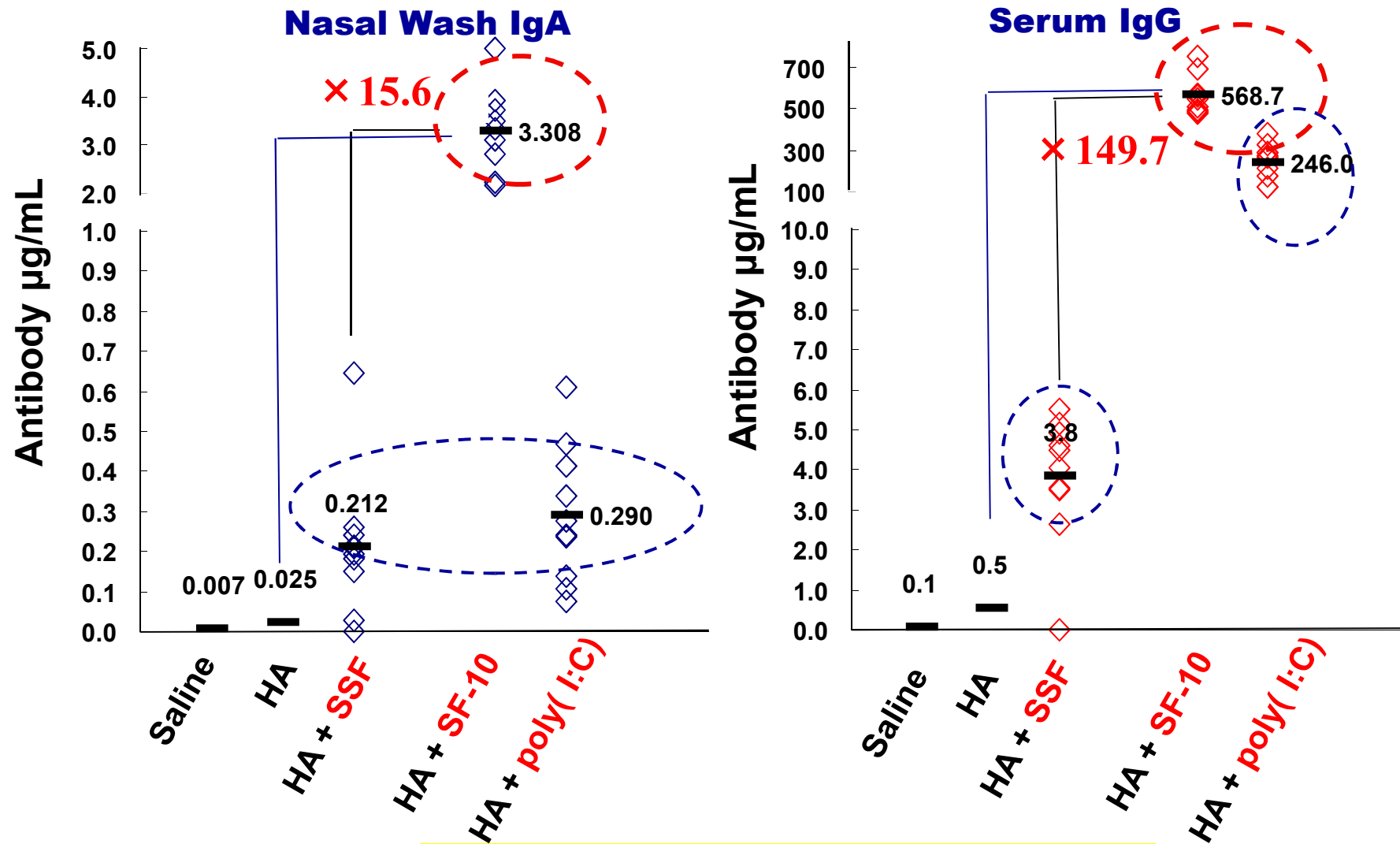


SSF+CVP = SF-10

SSF+微粒子化剤 = SF-11

**粘膜アジュバント製剤SF-10と、
その微粒子化剤添加SF-11は、
抗体誘導効果において、
世界のトップレベルを示した**

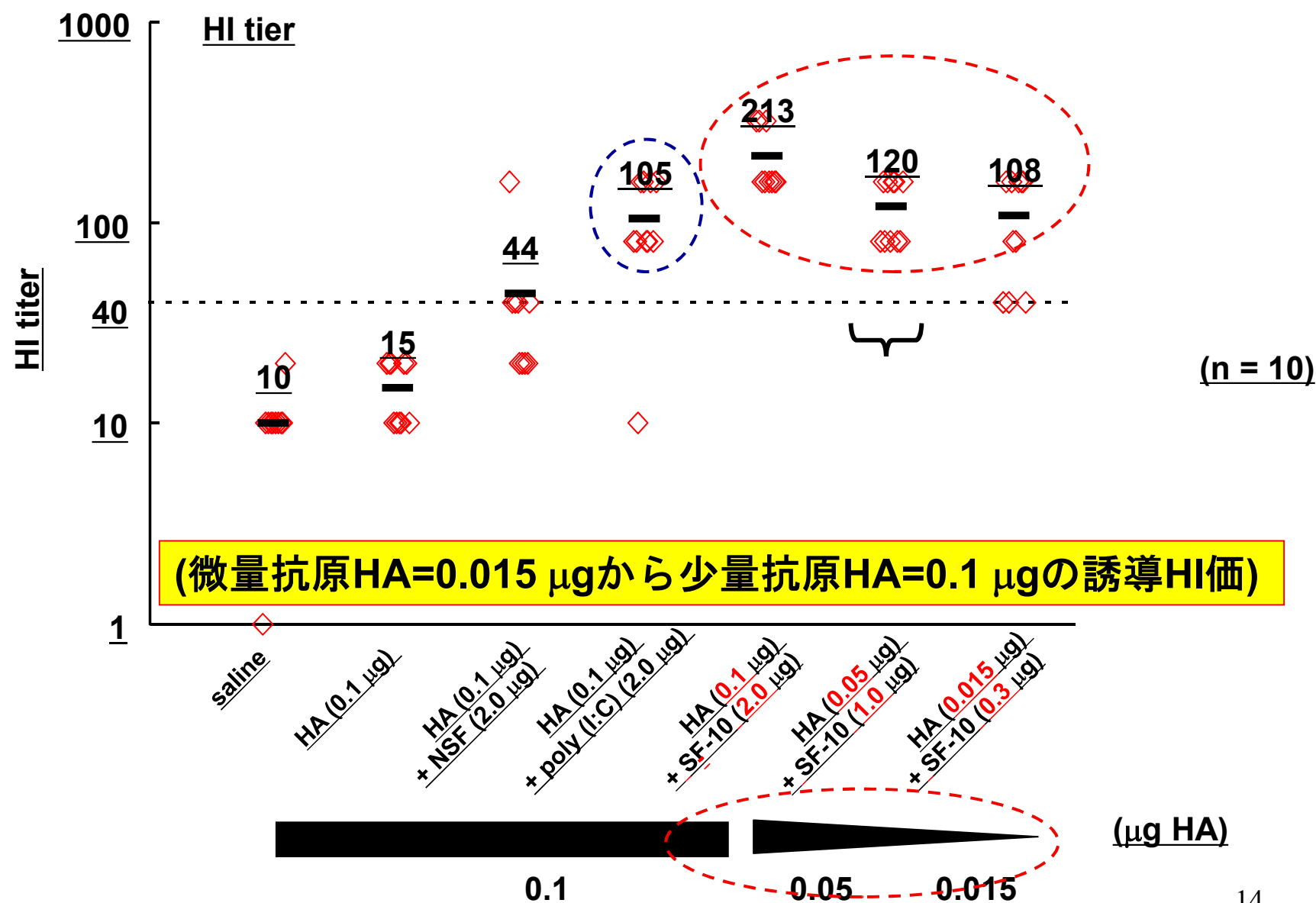
SF-10による鼻汁中の抗HA IgA抗体と血液中の抗HA IgG抗体の誘導増強効果



(少量抗原、HA=0.1 μg での誘導効果)

研究室レベル (2011年)でのSF-10製造

SF-10アジュバントによる顕著な感染抑制性HI価の誘導



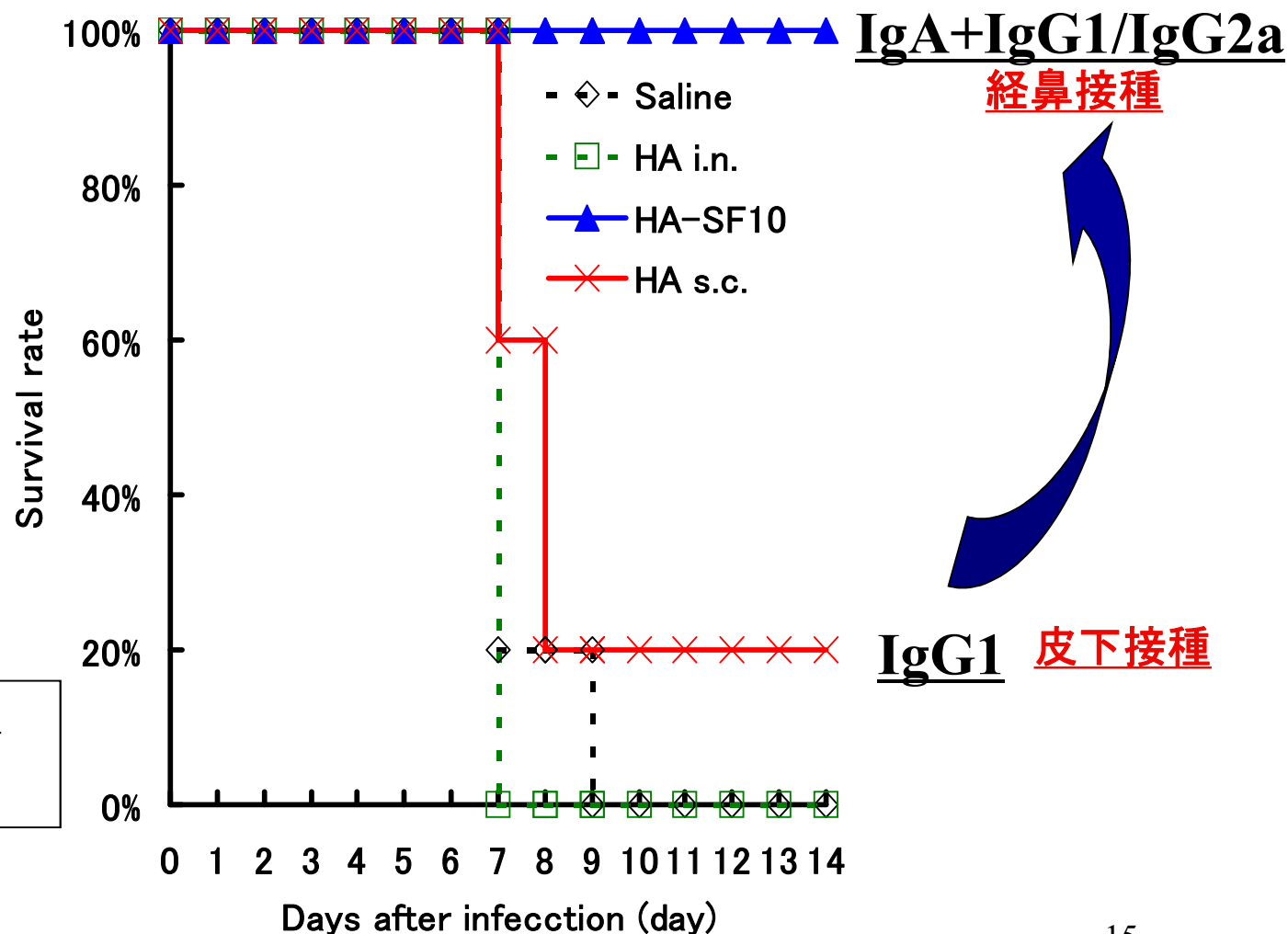
SF-10経鼻粘膜ワクチンは、皮下注射型ワクチンに比べて 顕著な生存率の改善効果を示した

(n = 10)



200 PFU (A/PR8 (H1N1))

/20 μ L) **40 $\times$ LD50**



大量生産を目指したワクチンの製造工程

HA+SSF

SSF を MilliQ で溶解
(リン脂質量として 10mg/mL の懸濁液)

SSF 懸濁液と HA ワクチン水溶液を混合

42℃ に加温 (3分加温、10秒攪拌)

バイアルビンに分注

- 80℃ に 1 over night

凍結乾燥

一部を粒度分布測定

1% CVP液

ハイビスワコー104 を生食で溶解

ソニケーション (10分間)

pH7.0 に NaOH にて調整

粘度測定

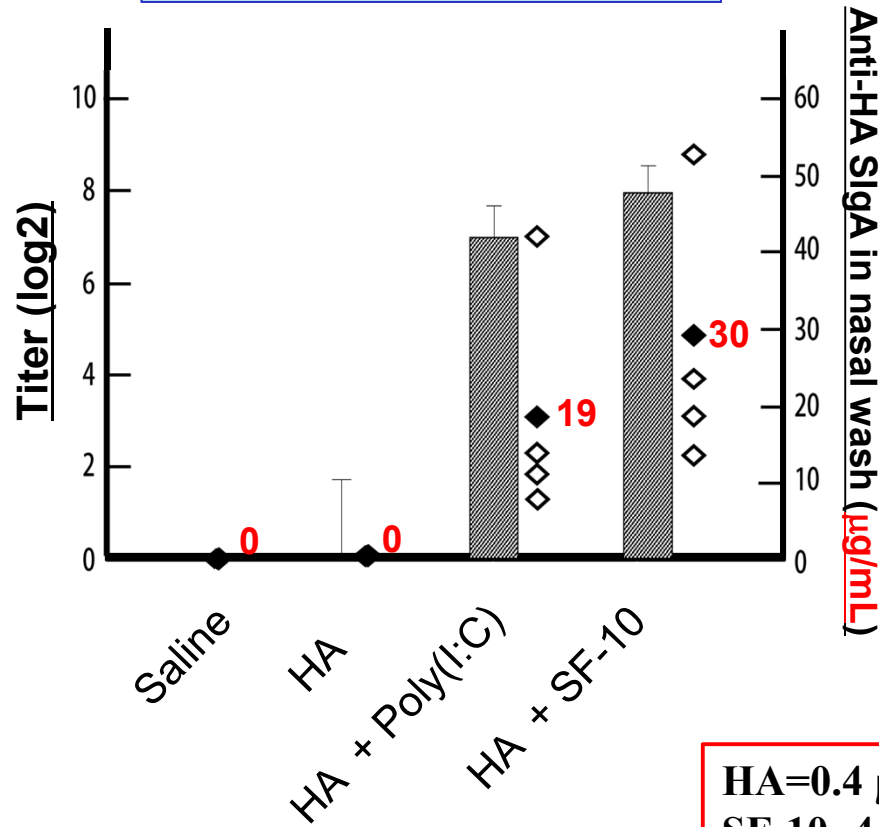
(粘度 60~80 mPa · s)

凍結乾燥後、生理食塩水にて溶解、等量の 1% CVP/生理食塩水を混合

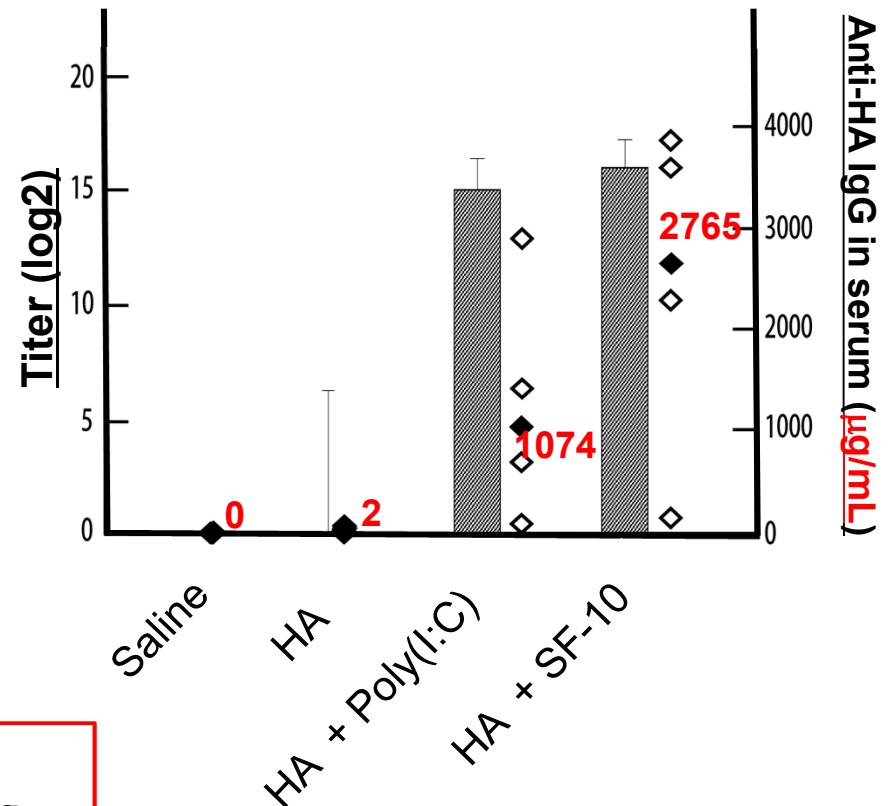
経鼻摂取 (片鼻 3 μL)

大量生産条件下で製造されたHA-SF-10 の抗体誘導効果

Anti-HA SIgA in nasal wash



Anti-HA IgG in serum IgG

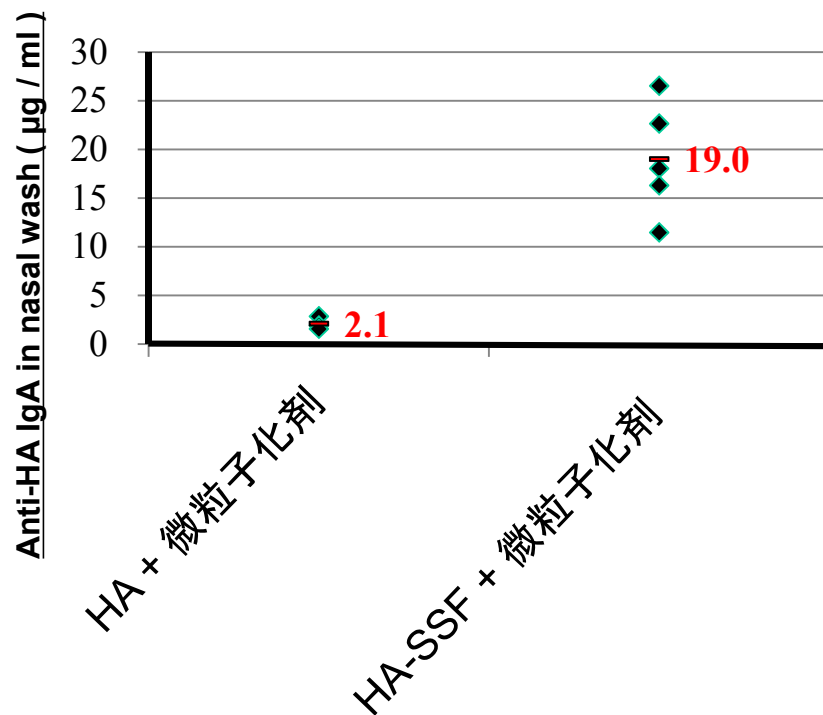


HA=0.4 μg
SF-10=4 μg
Poly(I:C)=4 μg

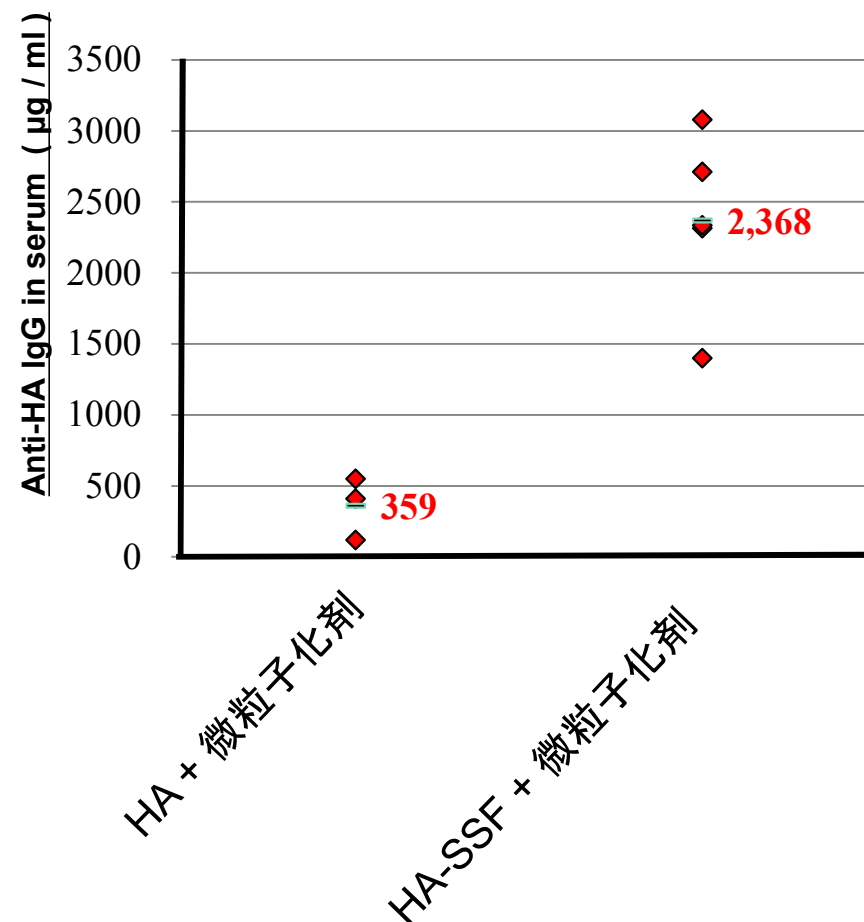
鼻汁の10–50 μg/mL SIgA、血液の2–4 mg/mL IgG抗体価の誘導はこれまでの報告中で、世界トップレベルの抗体誘導効果を示した

HA-SSF 微粒子化剤添加経鼻ワクチンSF-11による抗体誘導

Anti-HA IgA in nasal wash



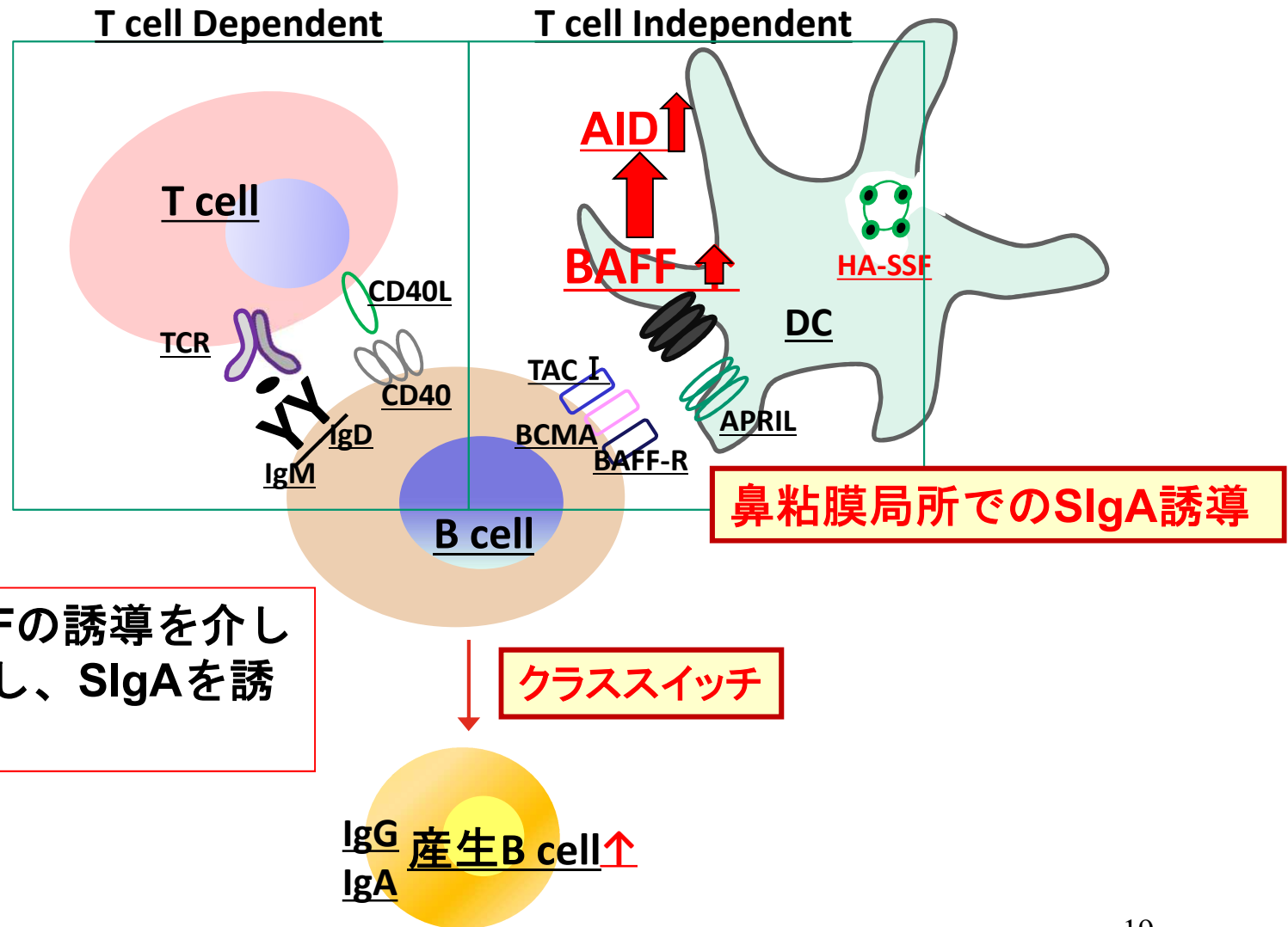
Anti-HA IgG in serum IgG



微粒子化剤添加 HA-SSF のマウスへの経鼻ワクチンにおいて液体 HA-SF-10 と同様に鼻腔洗浄液中 IgA 及び血清中 IgG の抗体誘導がみられた

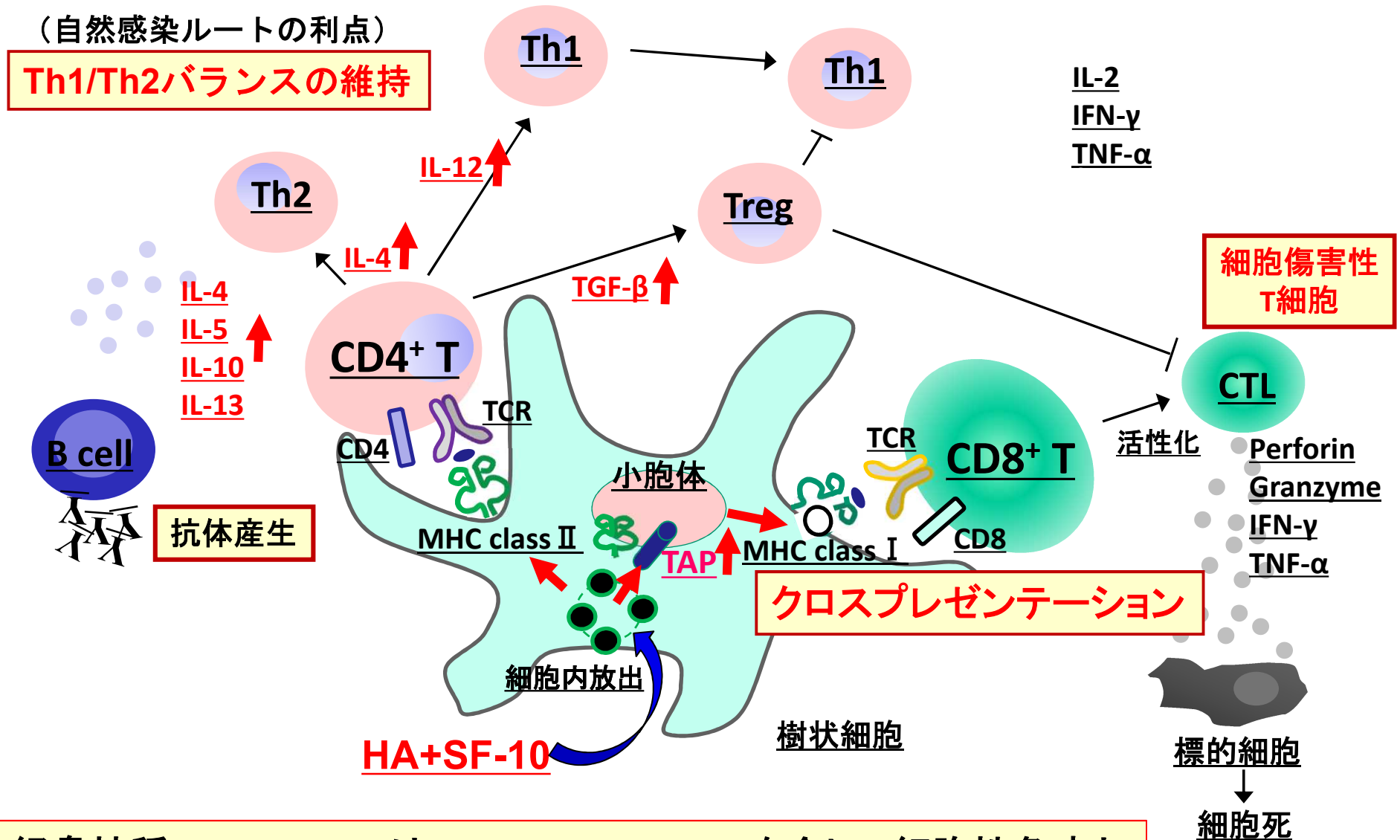
作用機序 1

[T cell Independent 経路を経由したSF-10のクラススイッチ促進]



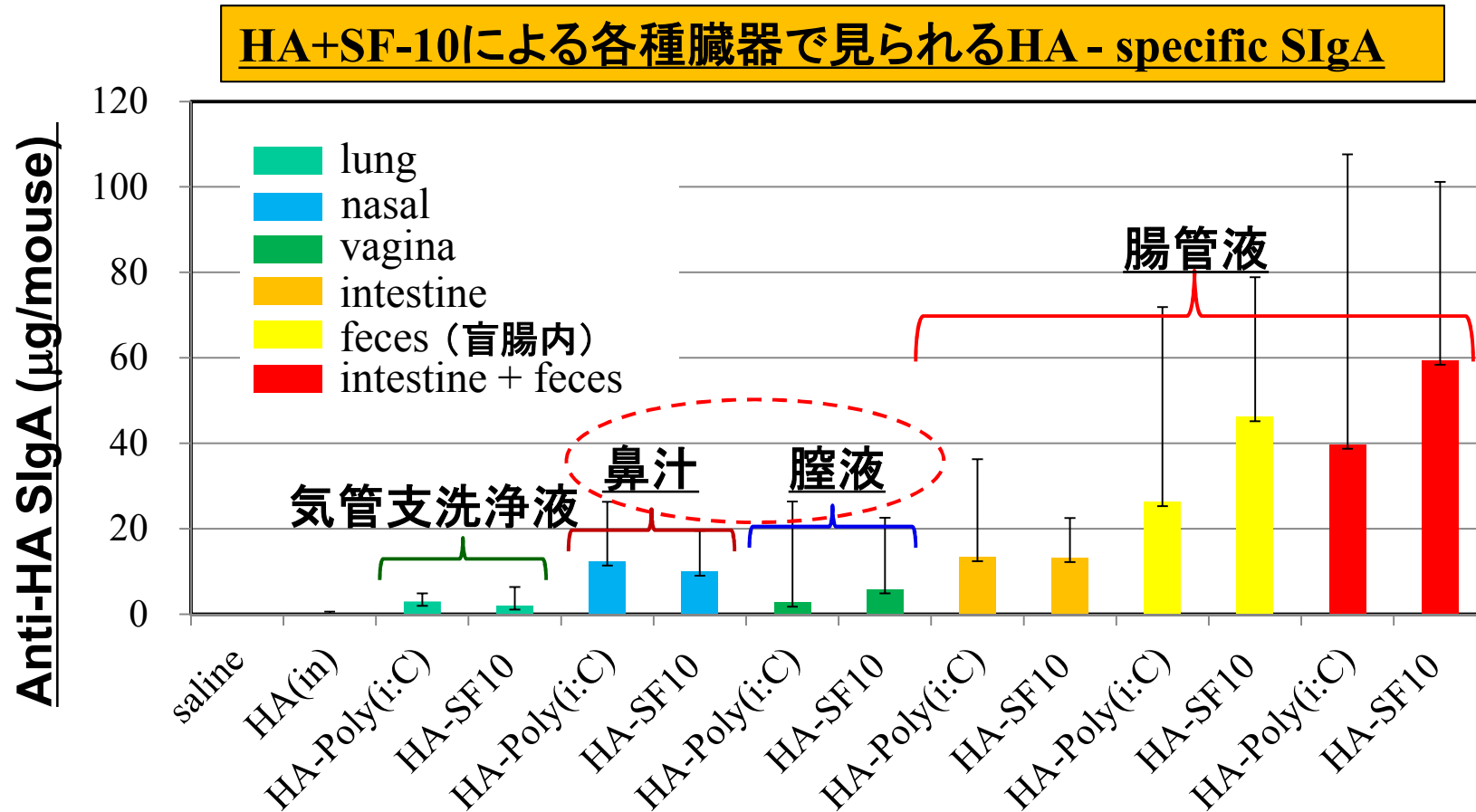
作用機序 2

SF-10アジュバントの作用機序の解析



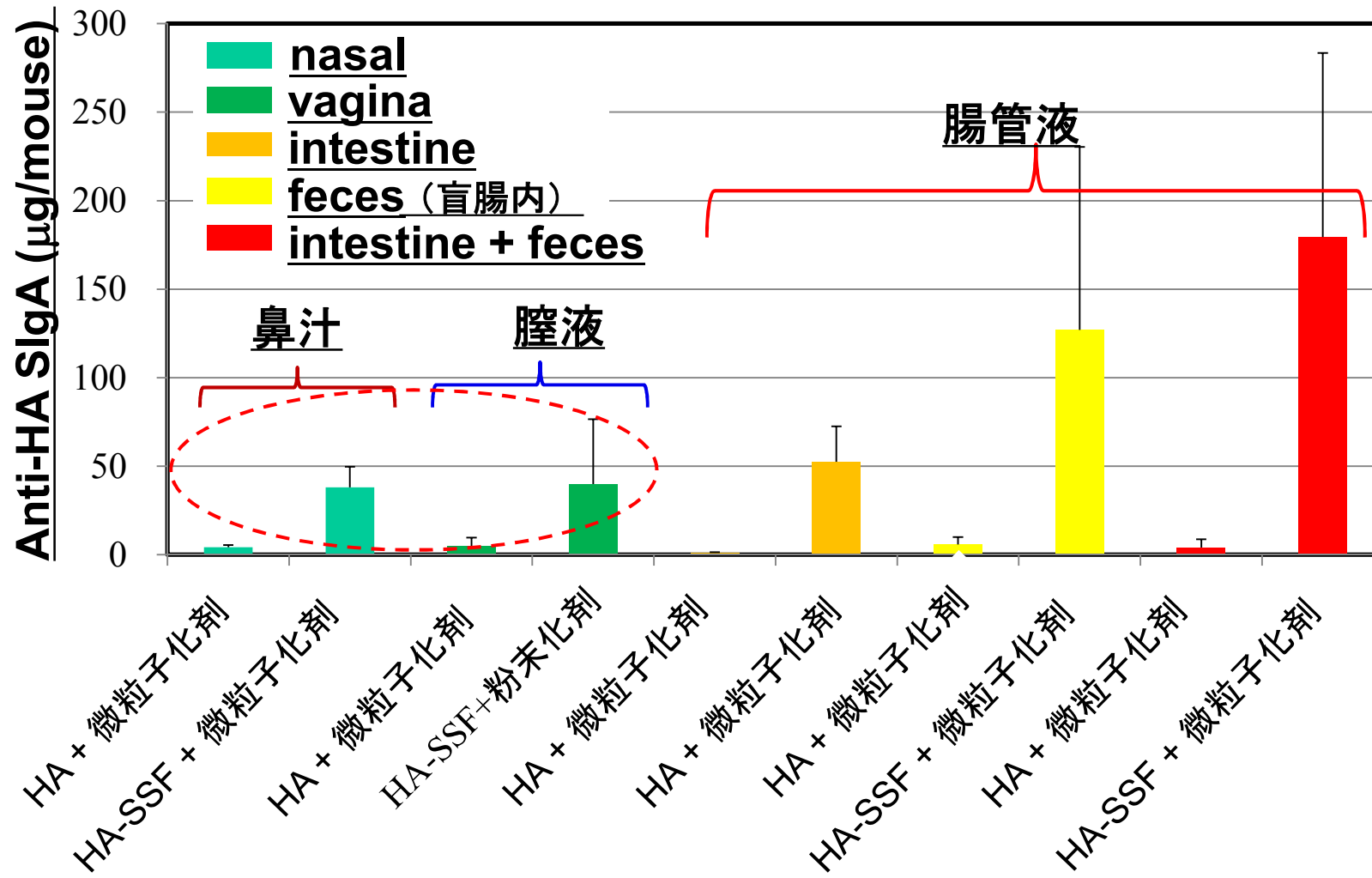
経鼻接種のHA+SF-10は、MHC class I、IIを介して細胞性免疫と液性免疫を共に誘導した

(自然感染ルートの特長:全身粘膜での防御機能の動員力)



(自然感染ルートの特長:全身粘膜での防御機能の動員力)

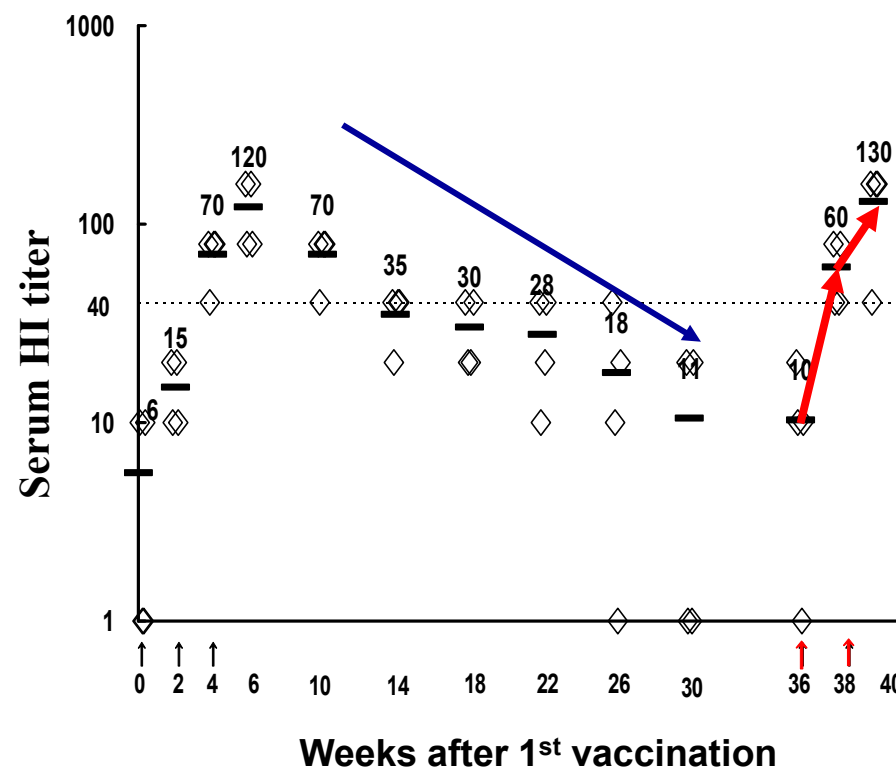
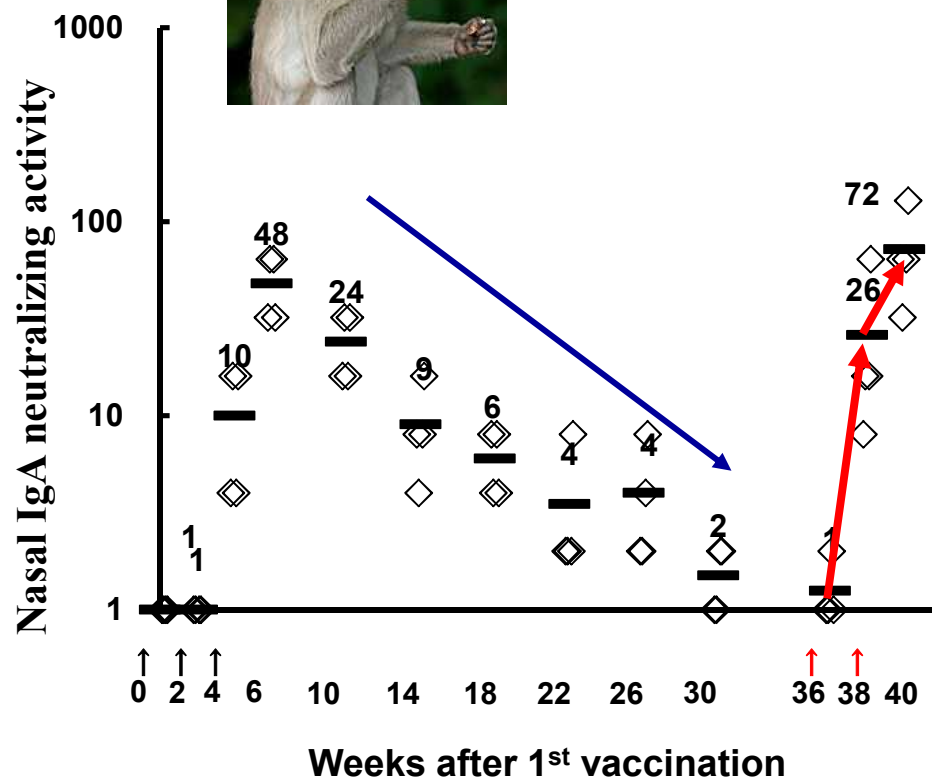
微粒子化HA+SF-11の各種臓器での:HA - specific SIgA 誘導



カニクイザルにおけるHA+SF-10 抗体誘導効果の持続性と 半年後の再ブースト効果の検討



研究室レベル（2011年当時）の製造
SF-10を使用したデータ



半年後のワクチン接種では、初回免疫だけでも十分な抗体誘導が確認された

SF-10粘膜アジュバントの安全性の検討

SF-10アジュバント: SSF (synthetic surfactant adjuvant)
+ carboxyvinyl polymer (CVP)

- SSF: GLP 試験実施で安全性を確認
- CVP: 増粘剤として点鼻薬、坐薬、化粧品添加物、食品添加物、衛生材料等に使されているポリマー
- 動物実験における安全性の検討: マウス、ミニブタ、
カニクイザルにおいて、鼻腔局所の炎症反応の無い事、
血液中の白血球の変化の無い事、サイトカインの有意な増加の無い事が確認されている。

まとめ

- ☆ ヒト肺サーファクタント組成に類似した人工合成粘膜アジュバントSF-10とその微粒子化SF-11アジュバントが完成し、大量生産が可能となった。(生産性)
- ☆ SF-10とSF-11アジュバントは、鼻汁と血液の両方で高いSIgA、IgG抗体の誘導がみられた。その効果は文献上、世界のトップレベルを示した。(Efficacy)
- ☆ 経鼻接種ルートは、体内の生体防御機能をフルに動員して、鼻汁以外に腸管分泌液と腔液に大量のSIgAを誘導した。(Efficacy)
- ☆ 感染実験: マウスとミニブタで経鼻接種インフルエンザワクチン投与後2W-4W後の感染実験で、ウイルス増殖が全く検出できないことが確認されている。ミニブタのSIgAで別のウイルス株との交叉免疫性を確認している。(Efficacy)
- ☆ SF-10、SF-11アジュバントの主要成分、人工合成肺サーファクタント成分SSFのGLP試験で安全性が確認されている。動物実験では、噴霧局所の炎症反応、血液中の白血球変動、サイトカインの有意な誘導は見られなかった(Safety)

自然ルート経鼻接種ワクチン医療応用の拡大

- ・ 気道感染症ワクチン開発から、**腸管感染症、腔感染症、食物アレルギーワクチン花粉症ワクチン**開発の道が開かれる。
- ・ ヒト以外の動物への応用