

サーバリックス

製造販売承認申請書添付資料

第2部（モジュール2） CTDの概要（サマリー）

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

- 2.6.1. 緒言
- 2.6.2. 薬理試験の概要文
- 2.6.3. 薬理試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

非臨床概要 薬理試験の目次

	項目 - 頁
2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表	2.6.1 - p. 1
2.6.1. 緒言	2.6.1 - p. 1
2.6.1.1. 参考文献	2.6.1 - p. 3
2.6.2. 薬理試験の概要文	2.6.2 - p. 1
2.6.2.1. まとめ	2.6.2 - p. 1
2.6.2.1.1. CERVARIX	2.6.2 - p. 1
2.6.2.1.2. MPL	2.6.2 - p. 2
2.6.2.2. 効力を裏付ける試験	2.6.2 - p. 3
2.6.2.2.1. CERVARIX	2.6.2 - p. 3
2.6.2.2.1.1. AS04アジュバントの免疫特性の評価	2.6.2 - p. 5
2.6.2.2.1.1.1. In vitro試験でのヒト単球におけるIL-6および TNF-alpha産生に対するAS04の影響	2.6.2 - p. 6
2.6.2.2.1.1.2. In vitro試験でのヒト単球系細胞株における TNF-alpha産生に対するAS04の影響	2.6.2 - p. 7
2.6.2.2.1.1.3. In vivo試験でのマウス樹状細胞における CD40発現に対するAS04の影響	2.6.2 - p. 7
2.6.2.2.1.2. BALB/cマウスにおける異なる用量のAl(OH) ₃ 、 MPLまたはHPV-16/18 L1 VLP抗原を含有する AS04添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンを用いた 免疫原性試験	2.6.2 - p. 7
2.6.2.2.1.2.1. BALB/cマウスにおけるMPL存在下での Al(OH) ₃ 添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンの Al(OH) ₃ 用量の検討	2.6.2 - p. 7
2.6.2.2.1.2.2. BALB/cマウスにおけるAl(OH) ₃ 存在下での MPL添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンのMPL 用量の検討	2.6.2 - p. 8
2.6.2.2.1.2.3. BALB/cマウスにおけるAS04添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンの用量範囲の検討	2.6.2 - p. 9
2.6.2.2.1.3. マウスおよびサルの免疫原性試験におけるAS04 添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンにより誘導される 液性および細胞性免疫応答の解析	2.6.2 - p. 11
2.6.2.2.1.3.1. AS04添加またはAl(OH) ₃ 添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンのBALB/cマウスにおける評価 ...	2.6.2 - p. 11
2.6.2.2.1.3.2. アジュバント非添加、Al(OH) ₃ 添加または AS04添加HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの BALB/cマウスにおける評価	2.6.2 - p. 12
2.6.2.2.1.3.3. アジュバント非添加、Al(OH) ₃ 添加または AS04添加HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに よるBALB/cマウスにおける免疫記憶B細胞 の誘導	2.6.2 - p. 13

2.6.2.2.1.3.4.	Al(OH) ₃ 添加またはAS04添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンの BALB/cマウスにおける作用持続性の評価	2.6.2 - p. 14
2.6.2.2.1.3.5.	Al(OH) ₃ 添加およびAS04添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンのアカゲザルにおける評価	2.6.2 - p. 16
2.6.2.2.2.	MPL	2.6.2 - p. 17
2.6.2.2.2.1.	In vitro試験でのマウス 骨髄由来樹状細胞における CD86発現に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 18
2.6.2.2.2.2.	In vitro試験でのマウス 骨髄由来樹状細胞における IL-6およびTNF-alpha 産生に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 18
2.6.2.2.2.3.	In vivo試験でのマウス樹状細胞におけるCD80、CD86およびCD40発現に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 18
2.6.2.2.2.4.	In vivo試験でのマウス血清中における炎症性サイトカイン産生に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 18
2.6.2.2.2.5.	In vitro試験でのヒト血液単球におけるCD80発現に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 19
2.6.2.2.2.6.	In vitro試験でのヒト全血細胞におけるサイトカインおよびケモカイン産生に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 19
2.6.2.2.2.7.	In vitro試験でのヒト単球におけるIL-6およびTNF-alpha産生に対するMPLの影響	2.6.2 - p. 19
2.6.2.2.2.8.	In vitro試験でのヒト単球におけるTNF-alpha産生に対する抗TLR4およびTLR2モノクローナル抗体の影響	2.6.2 - p. 19
2.6.2.3.	副次的薬理試験	2.6.2 - p. 19
2.6.2.4.	安全性薬理試験	2.6.2 - p. 20
2.6.2.4.1.	CERVARIX	2.6.2 - p. 20
2.6.2.4.1.1.	ラットの心血管系および呼吸系に及ぼすAS04 アジュバント添加HPV-16/18 L1 VLPワクチンの影響	2.6.2 - p. 20
2.6.2.4.2.	MPL	2.6.2 - p. 20
2.6.2.4.2.1.	麻酔イヌの心血管系および呼吸系に及ぼす静脈内投与による影響	2.6.2 - p. 20
2.6.2.5.	薬力学的薬物相互作用試験	2.6.2 - p. 20
2.6.2.6.	考察及び結論	2.6.2 - p. 21
2.6.2.7.	図表	2.6.2 - p. 23
2.6.2.8.	参考文献	2.6.2 - p. 23
2.6.3.	薬理試験概要表	2.6.3 - p. 1
2.6.3.1.	薬理試験：一覧表	2.6.3 - p. 1
2.6.3.2.	効力を裏付ける試験	2.6.3 - p. 3
2.6.3.3.	副次的薬理試験	2.6.3 - p. 3
2.6.3.4.	安全性薬理試験	2.6.3 - p. 3
2.6.3.5.	薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 - p. 4

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1. 緒言

CERVARIX

癌原性ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は浸潤性子宮頸癌とその前駆病変の原因である。年間約 493,000 例の新規子宮頸癌症例が診断されており (うち約 85%は発展途上国で発生)、毎年約 274,000 人が子宮頸癌のために死亡している (最近の世界的な推定値、[Parkin, 2005])。

HPV のおもな伝染経路は性的接触である [Franco, 1999]。処女の女性を対象とした研究により、伝染には感染したパートナーとの性的接触が必要であることが確認された [Kjaer, 2001]。感染率は年齢によって異なるが、癌原性 HPV 感染率のもっとも高い年齢は性行動開始直後の 15~25 歳である [Kjaer, 2001]。したがって、理想的には性行動開始前に癌原性 HPV 感染に対するワクチン接種を実施することが望ましい。25 歳以上の女性にも感染のリスクがあり、一部の国では 45~55 歳に感染率の 2 回目のピークが認められている [Vizcaino, 2000]。

少なくとも 15 種類の HPV が癌原性を有しており、子宮頸癌に関与すると考えられている。16 および 18 型の 2 種類の癌原性 HPV は、全世界の子宮頸癌症例全体の 70%以上の原因となっている [Munoz, 2003; Munoz, 2004]。

子宮頸癌の総罹患率に対する HPV-16/18 ワクチン接種の影響は、ワクチン接種率だけでなく、他の型の癌原性 HPV に対するワクチンの有効性によっても異なる。Goldie らによる数学モデルでのもっとも保守的な仮定に基づくと [Goldie, 2004]、有効な子宮頸癌のスクリーニング方法がない状況で、HPV-16/18 の持続感染を 98%予防するワクチンでは HPV-16/18 による癌の発生も同程度減少し、子宮頸癌発生の総数は 51%減少することとなる [Goldie, 2004; Goldie, 2003]。

GlaxoSmithKline Biologicals 社は、XXXXXXXXXX との提携の下、10 歳以上の女性においてもっとも一般的な癌原性 HPV (16 および 18 型) による子宮頸癌を予防するため、HPV 予防ワクチン (AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン) を開発した。AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、ウイルス様粒子 (VLP) の形態に会合した HPV-16 および 18 の主要カプシド蛋白 (L1) をそれぞれ 20 μ g を含有し、アジュバントとして AS04 が添加されている。AS04 アジュバントは水酸化アルミニウムと 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) の混合物であり、30,000 例を超える被験者への接種により、安全性および良好な忍容性が証明されている。MPL については詳細に後述する。

本ワクチンを CERVARIXTM と命名し、癌原性 HPV による一時的および持続的感染、意義不明異型扁平上皮細胞 (ASC-US)、子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) ならびに前癌病変 (CIN2+) を含む細胞学的異常を防御することによって、10 歳以上の女性に対する子宮頸癌の予防を適応症として開発した。本ワクチンの用法は 0、1 および 6 ヶ月後の 3 回筋肉内接種である。

本ワクチンおよび AS04 アジュバントの非臨床薬理、薬物動態および毒性試験は、EMA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95)、ヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMA/CHMP/VEG/134716/2004)、WHO ガイドライン (WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines) および EMA の生殖毒性試験法ガイドライン

(Note for Guidance on Reproductive Toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products, CPMP/ICH/386/95) に準拠して実施した。

効力を裏付ける試験では、AS04 アジュバントの生物活性および本ワクチンの免疫原性に関して評価し、安全性薬理試験では、Wistar ラットの心血管系および呼吸系に対する本ワクチンの影響を評価した。

毒性試験では、本ワクチンの単回または反復投与試験を実施して局所および全身毒性を評価し、出生前および出生後の発生に及ぼす影響についても評価した。また、AS04 アジュバントの毒性プロファイルについても評価した。

安全性薬理、薬物動態および毒性試験に使用した原薬の純度は、臨床試験で使用した原薬および市販予定の原薬と同程度であった。

非臨床試験により、本ワクチンは動物モデルにおいて安全性が確認され、強力かつ持続的な特異的免疫応答を誘導することが証明された。また、動物モデルにおいて AS04 アジュバントが自然免疫の活性化に重要な役割を果たし、安全であることが示された。

MPL

GSK Biologicals 社は、高く持続的な抗体価および細胞性免疫 (CMI) を誘導することで、より速やかでより強く、より長期間持続する防御効果を誘発させることを目的として、新たなアジュバントを開発してきた。AS04 は予防ワクチン向けに開発されたアジュバントであり、アルミニウム塩と免疫賦活剤の 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) からなる。AS04 を含有する最初のワクチンである Fendrix™ は 2005 年に欧州で承認された。

AS04 アジュバント中の MPL の臨床用量は 1 回接種あたり 50µg であり、被接種者 (体重 30~70kg) に対し、約 1.7~0.7µg/kg に相当する。AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの用法は、0、1 および 6 ヶ月後の 3 回筋肉内接種である。

MPL は旧 Ribi ImmunoChem Research Inc. (現 Corixa Corporation, GSK Biologicals North America、米国) で単離・開発された物質であり、グラム陰性菌 *Salmonella minnesota* R595 株の細胞壁から単離されたりポ多糖 (LPS) 由来の lipid A 解毒型誘導体である。MPL は解毒型ではあるが、免疫賦活剤として作用する天然 LPS 物質の能力を保持している。

MPL はそれぞれがきわめて近縁関係にある 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A 分子種 (同一の二糖類基本構造を有し、脂肪酸アシル基の種類と数 (3~6) が異なる同族体) の混合物である。図 2.6.1-1 に MPL および各種同族体を示す。MPL 中の各種アシル体の相対的割合と平均分子量から、平均分子量は 1500g/mol である。

MPL は灰白色の MPL トリエチルアミン塩の凍結乾燥品として供給され、有機溶媒可溶性と水分散性を有する。

現在、MPL は薬局方に記載されておらず、国際一般名称 (INN) は存在しない。

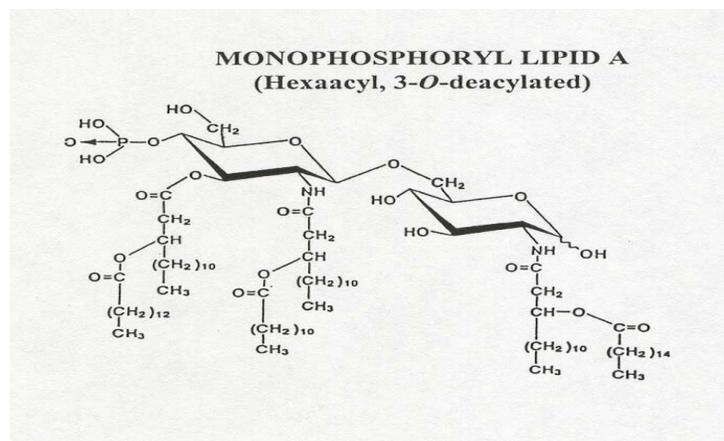


図 2.6.1-1 MPL ヘキサアシル同族体の構造

MPL は近縁関係にあるモノホスホリル lipid A (MLA) 分子種 (同族体) の混合物である。同族体はいずれも同じ基本構造 (4'位がリン酸化された 2-デオキシ-2-アミノグルコースの β -1', 6-結合二糖) を有するものの、2、2'および 3'位の脂肪酸置換が異なる。基本構造の 1、3、4 および 6'位は MPL 中のすべての MLA 分子種で置換されていない。2、2'および 3'は位置によってテトラデセン酸、3-(R)-ヒドロキシテトラデカン酸または 3-(R)-アシルオキシテトラデカン酸のいずれかで置換され、脂肪酸アシル基の総数は 3~6 となる。

MPL の非臨床薬理、薬物動態および毒性試験を EMEA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95)、ヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004)、WHO ガイドライン (WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines)、および EMEA の生殖毒性試験法ガイドライン (Note for Guidance on Reproductive Toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products, CPMP/ICH/386/95) に準拠して実施した。

効力を裏付ける試験により、MPL の作用機序に関する情報が得られた。安全性薬理試験では、ビーグル犬で心血管系および呼吸系に対する MPL の影響を評価した。MPL 関連物質の薬物動態、分布および消失試験についても実施した (2.3.A.3.2.12 参照)。また、毒性試験として、ラット単回投与毒性試験、ラットおよびイヌ反復投与毒性試験、*in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性試験ならびにラットおよびウサギの生殖発生毒性試験を実施した (2.3.A.3.2.13 参照)。記載した試験の一部は本ワクチン以外の医薬品開発中にも実施したため、より広い範囲での MPL 用量および投与経路について検討している。

安全性薬理、薬物動態および毒性試験で使用した MPL の純度は、臨床試験で使用したものおよび市販予定のものと同程度であった。

非臨床試験により MPL の作用機序に関する情報が得られ、MPL 関連物質は全身に分布したのちに体内から消失することが示され、使用目的における MPL の広い安全域が確認された。

2.6.1.1. 参考文献

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 1999;180:1415-23.

Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJC, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:101-6.

Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, et al. International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2000;86:429-35.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-27.

Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004;111:278-85.

Goldie SJ, Kohli M, Grima D, et al. Projected clinical benefits and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:604-15.

Goldie SJ, Grima D, Kohli M, et al. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. *Int J Cancer.* 2003;106:896-904.

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1. まとめ

2.6.2.1.1. CERVARIX

ヒトパピローマウイルス (HPV) の中でもっとも重要な発癌性遺伝子型である HPV-16 および HPV-18 に起因する子宮頸癌の発生を予防するために、新規の感染予防 HPV ワクチンを開発した。

本ワクチンの製剤形態は、感染を防御する抗 HPV L1 VLP 抗体を誘導するウイルス様粒子 (VLP) として会合した L1 蛋白および持続的に高水準の抗体を誘導して特異的な細胞性免疫を誘導する AS04 アジュバントの配合剤である。

効力を裏付ける試験として 2 系列の試験 (A および B) を実施した。

A :

Salmonella minnesota のリポ多糖 (LPS) 由来の誘導體である 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) および水酸化アルミニウム (Al(OH)₃) を含有する AS04 アジュバントの免疫賦活活性の検討を行った。

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) およびヒト単球細胞株 U937 を用いて実施した試験において、AS04 は、MPL と同様に、*in vitro* での単球からの炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- α) 分泌の強力な誘導物質であることが示された。マウスで実施した試験においては、CD40 の発現の促進作用による評価で、AS04 が *in vivo* での抗原提示細胞 (APC) の成熟の誘導活性に関して機能的に MPL と同等であることが示された。

以上の試験成績から、AS04 は、MPL と同様に、抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫を活性化することが示された。

B :

HPV の種特異性により、HPV-16/18 ワクチンの予防効果はいずれの動物モデルにおいても評価することができないため、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの免疫原性の評価を目的とした効力を裏付ける試験をマウスおよびアカゲザルを用いて実施した。

BALB/c マウスを用いた試験において、種々の用量の Al(OH)₃、MPL または HPV-16/18 L1 VLP 抗原を含有する異なる AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの免疫原性を比較した。抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の誘導活性ならびに HPV 感染の有効かつ持続的な防御に極めて重要な IFN- γ の産生誘導活性から、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの重量比 (抗原 : Al(OH)₃ : MPL) は 1 : 25 : 2.5 が適切であることが示された。

BALB/c マウスを用いた他の試験においては、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンにより誘導される液性および細胞性免疫応答の特性を、アジュバント非添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの免疫原性に対する免疫応答と比較することにより検討した。これらの試験により、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、アジュバント非添加または Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに比べて、HPV 予防ワクチンとしての優れた免疫原性プロファイルを示すことが立証された。実際に、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、アジュバント非添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも強力かつ持

続的に抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体を誘導し、IgG2a 抗体、抗ウイルス作用を有するサイトカインである IFN- γ および TNF- α 産生をより強く誘導した。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、抗体の保持に有用と考えられる免疫記憶 B 細胞の出現頻度を上昇させた。Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの免疫原性を、よりヒトに近縁であるアカゲザルを用いて比較したところ、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは中和抗体をより強力に誘導するなどの優れた免疫原性プロファイルを有することが確認された。

以上の試験成績から、AS04 による自然免疫系の活性化に伴って HPV-16/18 L1 VLP に対する獲得免疫応答が増強することが示された。

最後に、ラットの安全性薬理試験で、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの心血管系および呼吸系における安全性を評価したところ、血圧、心拍数、呼吸深度または呼吸数に対する明確なまたは一貫した影響は認められず、心電図の波形にも異常は認められなかった。

一連の薬理試験成績から、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは動物モデルにおいて強力かつ持続的な特異的免疫応答を誘導すること、ならびに心臓および呼吸機能に対して好ましくない薬理作用を誘発しないことが示され、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンにおける AS04 アジュバントの有用性が裏付けられた。

2.6.2.1.2. MPL

Salmonella minnesota LPS の誘導體である 3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) の作用機序を解明するために実施した効力を裏付ける試験および安全性薬理試験の成績を本項にまとめる。

グラム陰性菌由来のリポ多糖 (LPS) は、自然免疫の強力な誘導剤として知られている。LPS がその受容体複合体 (Toll 様受容体 4 (TLR4) など) に結合すると、活性化に関連する細胞内カスケードが起動され、IL-12 および IFN- γ などのサイトカイン、IL-6、TNF- α 、IL-1 β および IL-8 などの炎症性サイトカイン、MCP-1、MIP-1 α および MIP-1 β などのケモカインをコードする遺伝子を含む様々な遺伝子が発現される (図 2.6.2-1)。さらに、LPS シグナリングによって抗原提示細胞 (APC) の分化が誘導される。この分化プロセスは成熟と呼ばれ、抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な CD80、CD86 および CD40 などの共刺激分子の発現も促進される。そこで、MPL の共刺激分子の誘導活性 (APC の成熟) ならびに炎症性サイトカインおよびケモカインの誘導活性を検討した。

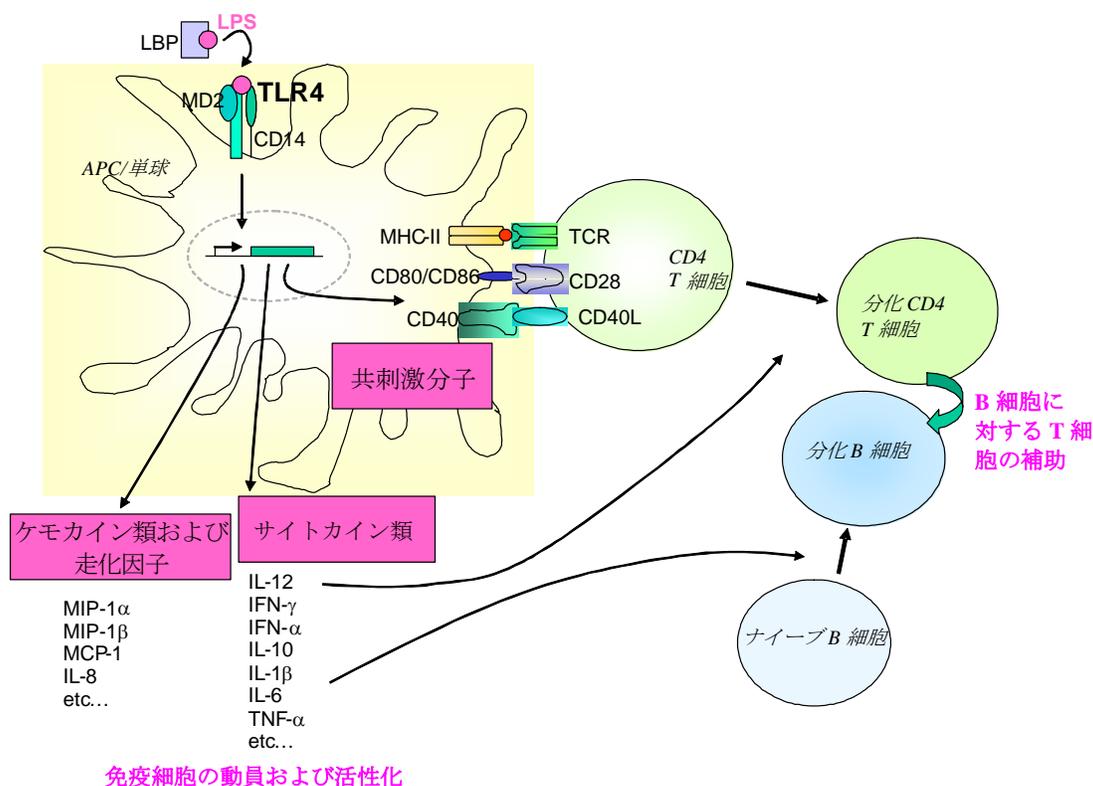


図 2.6.2-1 TLR4 を介する自然および獲得免疫応答の活性化

マウスまたはマウス細胞を用いた効力を裏付ける試験では、*in vitro* および *in vivo* のいずれの試験においても、MPL は共刺激分子である CD80、CD86 および CD40 の発現を促進し、*in vitro* 試験においては APC からの炎症性サイトカインの分泌を促進し、APC の成熟に重要な役割を果たすことが示された。これらの試験成績より、MPL は抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫の活性化において重要な役割を果たすことが示唆されている。

ヒト細胞における MPL の共刺激分子、炎症性サイトカインおよびケモカインの誘導作用は、末梢血単核細胞 (PBMC) または全血を用いた *in vitro* 試験においても確認されている。

また、ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験では、MPL がヒト TLR2 受容体ではなくヒト TLR4 受容体を介して、末梢血単球を活性化することも示された。

心血管系および呼吸系に対する安全性薬理試験はビーグル犬を用いて実施され、血圧、心拍数、呼吸深度または呼吸数に対して、統計的に有意なまたは生理的に意味のある影響は認められず、また心電図にも異常は認められなかった。

以上のことから、MPL は自然免疫の活性化に重要な働きを示し、呼吸・循環器系に対して好ましくない薬理作用を示さないと考えられた。

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1. CERVARIX

3 種類の動物モデルにおいて種特異的パピローマウイルス (イヌ口腔パピローマウイルス、ウサギパピローマウイルス、ウシパピローマウイルス) の感染により、ヒトと同様に扁平上

皮または粘膜上皮の乳頭腫の形成を誘発することから、これらの動物モデルはワクチン開発に有用である。これらの動物モデルにおいて、VLPとして会合したL1パピローマウイルス蛋白が、高い中和抗体価を誘導し、感染とそれに伴う病変形成に対して防御効果を有する強力な免疫原であることが示された。3種の動物モデルのすべてにおいて、それぞれの種特異的なL1 VLPワクチン接種によって、それと対応するパピローマウイルス感染およびその後の病変形成に対する短期防御免疫が誘導されることが確認されている[Breitbart, 1995; Jansen, 1995; Kirnbauer, 1996; Suzich, 1995]。また、イヌ口腔パピローマウイルスL1 VLPワクチンをイヌに皮内接種することにより、粘膜からのパピローマウイルス感染に対する防御効果が発現することが示されている[Suzich, 1995]。ワクチン接種後の感染防御を担う抗体の役割は、数種の動物モデルにおける受身伝達試験により示されている[Breitbart, 1995; Christensen, 1996; Kirnbauer, 1996; Suzich, 1995]。しかし、ウサギにおける遅発性の感染（ワクチン接種の6～12ヵ月後）に対しては、有意な感染防御が認められたものの完全な防御には至らなかったことから[Christensen, 1996]、B細胞による免疫記憶応答を含む液性免疫の十分なレベルでの持続性を向上させる必要があると考えられる。これらのことから、優れた液性免疫誘導作用を有するワクチンのみが、長期の防御効果を発現すると結論付けられる。

パピローマウイルスの自然免疫についての知識は、おもに疫学研究および自然史研究から得られたものであり、HPVの感染制御において獲得性の細胞性および液性免疫応答の両者が重要であることが強く示唆されている[Ho, 1998; Schiffman, 2003]。また、細胞性免疫がウイルス感染細胞の除去に不可欠であり、免疫記憶の成立に対しても重要であることも示唆されている。関与するエフェクターの詳細は不明であるものの、HPVによる病変の治癒においてCD4 Tリンパ球依存性反応の関与が示されている。これに対し、感染の除去または制御に効果的な細胞性免疫が誘導されないと、持続性感染に至り、発癌性を示すHPV型ではハイグレードの子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）または浸潤癌に進行するリスクが上昇することが示されている。これらの成績により、抗体を介した免疫も遊離ウイルスの除去および再感染の予防に重要な役割を果たすことが示された。しかし、一部の研究では、自然感染により誘導されるHPVカプシドに対する特異抗体が、以後の再感染に対して必ずしも防御効果があるとは限らないことも示されている。セロコンバージョン率が感染マーカーとなる多くのウイルス感染とは異なり、HPV感染女性のセロコンバージョン率はわずかに50%であり、血清抗体が陽性であることと、同じHPV型に対する再感染リスクが統計学的に有意に低下することとの間に関連性はない[Viscidi, 2005]。

非臨床の自然感染試験により、L1カプシド蛋白に対する高い抗体価、B細胞による免疫記憶応答およびT細胞応答を誘導する能力を有するワクチンが、HPV感染および関連臨床病変の予防に高い有効性を示す可能性が示唆されている。

L1 VLPを含有することは本ワクチンにとって必須であるが、効果的なB細胞およびT細胞の免疫記憶応答の誘導と同時に、持続的に高い抗体価を誘導して、迅速、強力かつ持続的な感染防御効果を促進させることを目的として、新規で独自のアジュバントを開発した。このようなアジュバントの1つであるAS04は、Al(OH)₃およびMPLを含有しており、ヘルパーT細胞および免疫記憶B細胞の誘導活性に基づいて選択され、本ワクチンに添加されている[Garçon, 2006]。

最終的に、感染を防御する抗 HPV L1 VLP 抗体を誘導させるために VLP として会合した L1 蛋白を添加し、持続的な高い抗体価および特異的細胞性免疫を誘導させるために AS04 アジュバントを添加したワクチンを選択した。

効力を裏付ける試験では、*Salmonella minnesota* LPS の誘導體である MPL および Al(OH)₃ を含有する AS04 アジュバントの免疫特性を評価した。グラム陰性菌由来の LPS は、自然免疫の強力な誘導物質として知られている。LPS が Toll 様受容体 4 (TLR4) などの受容体複合体に結合すると、活性化に関連する細胞内カスケードが起動され、IL-12 および IFN- γ などのサイトカイン、IL-6、TNF- α 、IL-1 β および IL-8 などの炎症性サイトカインまたは MCP-1、MIP-1 α および MIP-1 β などのケモカインを含む様々な遺伝子が発現する (図 2.6.2-2)。さらに、LPS シグナリングによって APC の分化が誘導される。この分化プロセスは成熟と呼ばれ、抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な CD80、CD86 または CD40 などの共刺激分子の発現も促進される。AS04 アジュバントは LPS 由来の MPL を含有することから、AS04 の免疫賦活活性を炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α または共刺激分子 CD40 の誘導を指標とした *in vitro* および *in vivo* 試験で検討した。

HPV は種特異的であり、非臨床での感染防御モデルにおける AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの評価は不可能であったため、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの薬力学的特性は、マウスおよびサルを用いた免疫原性試験で検討した。これらの試験の目的の 1 つは、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの各成分の最適な重量比を評価することであった。さらに、特異的な液性および細胞性免疫に対する AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの特性を、アジュバント非添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較した。

いずれの免疫原性試験においても、抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を主要な測定項目とした。なお、個々の試験で使用した測定基準および定量法は、HPV ワクチンの開発の過程で改良されており、試験間で異なることから、抗 HPV16 L1VLP 抗体および抗 HPV18 L1 VLP 抗体の抗体価の絶対値をこれらの免疫原性試験間で比較することはできない。

2.6.2.2.1.1. AS04 アジュバントの免疫特性の評価

MPL の免疫賦活活性は、おもに APC を活性化して、TNF- α 、IL-6、IL-1 β および IL-8 (図 2.6.2-2) などの炎症性サイトカインならびに獲得免疫の誘導に重要な役割を果たす IL-12 および IFN- γ の誘導作用に起因すると考えられる [Ulrich, 1995; Thompson, 1998; Tomai, 1989]。

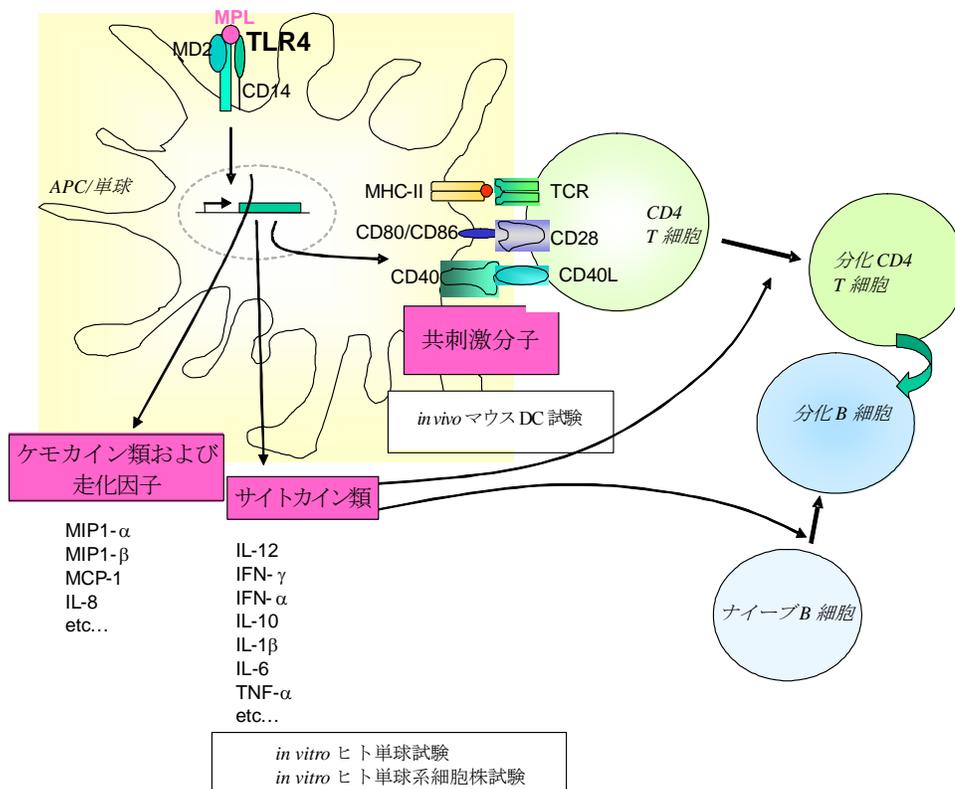


図 2.6.2-2 TLR4 を介する自然および獲得免疫応答の活性化

MPL により APC が活性化されると、マウスにおいては食食活性が増強され[Masihi, 1986]、ヒトおよびマウスにおいては CD80、CD86 および CD40 のような共刺激分子の発現が促進される[Moore, 1999; Ismaili, 2002]。さらに、マウスを用いた試験において、MPL を筋肉内または静脈内投与すると、APC および B 細胞が *in vivo* で活性化され、CD80、CD86 および CD40 の発現が顕著に促進される[De Becker, 2000]。

Salmonella minnesota LPS の免疫賦活活性には、膜貫通型受容体の TLR ファミリーに属する TLR4 への結合が関与することが知られている[Tapping, 2000; Netea, 2002]。他の共受容体の関与と合わせて、LPS の TLR4 への結合が細胞内情報伝達のカスケードを活性化し、多くの遺伝子の発現を促進する。

本項では、Al(OH)₃ に吸着させた MPL を含有する AS04 アジュバントの生物活性を示す。検討した生物活性は図 2.6.2-2 に図示した（ピンク色、長方形のボックス）。

2.6.2.2.1.1.1. In vitro 試験でのヒト単球における IL-6 および TNF-alpha 産生に対する AS04 の影響

4.2.1.1.1/ref

ヒト血液細胞の一種であり TLR4 を発現することが知られているヒト単球を、MPL (0.1、1 または 10 μ g/mL) または AS04 (Al(OH)₃ (1、10 または 100 μ g/mL) の表面に MPL 0.1、1 または 10 μ g/mL をそれぞれ吸着させたもの) で刺激することにより、炎症性サイトカインで

ある TNF- α および IL-6 が産生されるか否かを検討した。単球（CD14 陽性細胞）における炎症性サイトカインの産生は、フローサイトメトリーにより測定した。

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来の単球を、各濃度の MPL または AS04 の存在下で 6 時間インキュベートすると、TNF- α および IL-6 の産生が確認された。Al(OH)₃ 存在下でのサイトカイン濃度はバックグラウンドレベルであった。MPL と AS04 は、いずれも同程度の単球刺激作用を示した。

2.6.2.2.1.1.2. In vitro 試験でのヒト単球系細胞株における TNF-alpha 産生に対する AS04 の影響

4.2.1.1.1/ref

ヒトマクロファージ様細胞株 U937 を MPL（1、3 または 10 μ g/mL）または AS04（Al(OH)₃（10、30 または 100 μ g/mL）の表面に MPL 1、3 または 10 μ g/mL をそれぞれ吸着させたもの）の存在下で 4 時間インキュベートし、炎症性サイトカインである TNF- α 産生に及ぼす影響を検討した。TNF- α の産生は、ELISA により測定した。

各濃度の MPL または AS04 で U937 細胞を刺激すると、TNF- α 分泌が誘発され、類似の用量依存性が認められた。このことから、AS04 は MPL と同程度の TLR4 アゴニストとして作用することが示された。

2.6.2.2.1.1.3. In vivo 試験でのマウス樹状細胞における CD40 発現に対する AS04 の影響

4.2.1.1.1/ref

APC の成熟に対する AS04 の影響を *in vivo* 試験で評価した。C57Bl/6 マウスに各種用量の MPL（1.25、2.5 または 5 μ g/mL）または AS04（MPL（1.25、2.5 または 5 μ g/mL）+Al(OH)₃（8.75、17.5 または 35 μ g/mL））を筋肉内接種し、接種 24 時間後に流入領域リンパ節を採取した。流入領域リンパ節樹状細胞における共刺激分子 CD40 の発現を測定し、APC の成熟の指標とした。

MPL および AS04 は、検討したすべての用量で共刺激分子 CD40 の発現を同程度に上昇させた（Al(OH)₃ 単独投与の 2~4 倍）ことから、両アジュバントともに APC の成熟を誘導することが示された。

2.6.2.2.1.2. BALB/c マウスにおける異なる用量の Al(OH)3、MPL または HPV-16/18 L1 VLP 抗原を含有する AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを用いた免疫原性試験

2.6.2.2.1.2.1. BALB/c マウスにおける MPL 存在下での Al(OH)3 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの Al(OH)3 用量の検討

4.2.1.1.2

BALB/c マウスの免疫原性試験において、MPL 存在下で種々の用量の Al(OH)₃ を添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答を比較した。

BALB/c マウス (15 匹/群) に Al(OH)₃ (18、26 または 50 μ g)、MPL (5 μ g) および HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2 μ g) を含有するワクチン 50 μ L を試験 0 および 21 日に筋肉内接種した。2 回目接種後の 14 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体価および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。さらに、2 回目接種後 14 日にマウスの脾臓を採取し、サイトカイン (IFN- γ および IL-5) の産生量を測定した。

特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価は、MPL (5 μ g) + Al(OH)₃ (18 または 26 μ g) 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群に比べて、MPL (5 μ g) + Al(OH)₃ (50 μ g) 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群の方が ■~■ 倍高値を示した (p<0.05、表 2.6.2-1)。さらに、抗ウイルス活性を有するサイトカインである IFN- γ の産生促進作用も、MPL (5 μ g) + Al(OH)₃ (50 μ g) 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群の方が ■~■ 倍高かった。

以上の成績より、Al(OH)₃ の最適用量として 50 μ g を選択し、更なる検討をマウスで実施した。

表 2.6.2-1 MPL 存在下で種々の用量の Al(OH)₃ を添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価

4.2.1.1.2、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP/MPL ワクチンの Al(OH) ₃ 添加量(μ g)	2 回目接種後 14 日における幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限~上限)	
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
18	27XXX* (■~■)	71XXX* (■~■)
26	31XXX* (■~■)	83XXX* (■~■)
50	43XXX* (■~■)	12XXXX* (■~■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.1.2.2. BALB/c マウスにおける Al(OH)₃ 存在下での MPL 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの MPL 用量の検討

4.2.1.1.3

BALB/c マウスの免疫原性試験において、種々の用量の MPL を Al(OH)₃ に吸着させて添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答を比較した。

BALB/c マウス (10 匹/群) にそれぞれ MPL (1.25、2.5、5 または 10 μ g)、Al(OH)₃ (50 μ g) および HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2 μ g) を含有するワクチン 50 μ L を試験 0 および 21 日に筋肉内接種した。2 回目接種後 14 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、IgG のサブタイプ (IgG1、IgG2a および IgG2b) も検討した。さらに、2 回目接種後 14 日に各群のマウスの脾臓を採取し、サイトカイン (IFN- γ および IL-5) の産生能を測定した。

特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体の抗体価は、1.25 および 2.5 μ g の MPL を Al(OH)₃ に吸着させて添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群で用量反応性が認められ、MPL 2.5 μ g 群では 1.25 μ g 群の ■ 倍の抗体価 (p=0.0072) が認められた (表 2.6.2-2)。特異的抗 HPV-18 L1

VLP 抗体の抗体価ならびに抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の IgG サブタイプの割合に関しては、MPL 1.25~10 μ g の範囲で用量依存的な影響は認められなかった。さらに、2.5、5 および 10 μ g の MPL を Al(OH)₃ に吸着させて添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、MPL 1.25 μ g 群に比べて、HPV-16 および HPV-18 による特異的 IFN- γ 産生能が増加する傾向 (>■倍) が認められた。また、MPL 10 μ g 群では、HPV-16 および HPV-18 による特異的 IL-5 産生能が他の用量の MPL 群に比べて低下 (<■倍) した。

表 2.6.2-2 Al(OH)₃ 存在下で種々の用量の MPL を添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価

4.2.1.1.3、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP/Al(OH) ₃ ワクチンの MPL 添加量 (μ g)	2 回目接種後 14 日における幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限~上限)	
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
10	73XXXX* (■~■)	10XXXXX* (■~■)
5	82XXXX* (■~■)	93XXXX* (■~■)
2.5	93XXXX* (■~■)	12XXXXX* (■~■)
1.25	49XXXX* (■~■)	85XXXX* (■~■)
0	15XXXX* (■~■)	16XXXX* (■~■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

抗体価および IFN- γ 産生能が相対的に高く、IL-5 産生能が低い MPL 5 μ g を最適用量として選択し、更なる検討をマウスで実施した。これまでに得られたすべての結果を考慮すると、5 μ g の用量は最大反応を示す用量領域に入る。さらに、これらの試験成績で得られた Al(OH)₃ と MPL の比率 (10 : 1) は、MPL の用量範囲 (12.5、25、50 および 100 μ g) および Al(OH)₃ (500 μ g) との配合比を検討した FENDRIX[®] ワクチンの臨床成績から得られた最適配合比と一致した。

これらの成績から、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに MPL (1.25~10 μ g) を添加することにより、MPL 非添加 Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンに比べて特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価が ■~■ 倍に上昇する

(p<0.0001) ことも示された。さらに、Al(OH)₃ および MPL を添加した HPV-16/18 L1 VLP ワクチンでは、MPL 非添加ワクチンに比べて、抗 HPV-16 L1 VLP IgG2a 抗体の割合が高まるとともに (+■~■%、抗 HPV-18 L1 VLP IgG2a 抗体の割合は-■~■%とほぼ同じ)、IL-5 産生能は低下し (■~■)、抗ウイルス活性を有するサイトカインである IFN- γ の産生能が上昇する (■~■倍) ことも示された。

2.6.2.2.1.2.3. BALB/c マウスにおける AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの用量範囲の検討

4.2.1.1.4

BALB/c マウスの免疫原性試験において、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンまたは Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを接種することにより誘導される免疫応答を比較した。

BALB/c マウス (12 匹/群) に、Al(OH)₃ (50µg) または AS04 (Al(OH)₃ 50µg + MPL 5µg) ならびに、HPV-16 および HPV-18 L1 VLP (それぞれ 0.6、2 または 6µg) を含有するワクチンを試験 0 および 21 日に 50µL 筋肉内接種した。2 回目接種後 14 日に採血し、各個体血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、IgG のサブタイプ (IgG1、IgG2a および IgG2b) も検討した。2 回目接種後 14 日に各群のマウスの脾臓を採取し、サイトカイン (IFN-γ および IL-5) の産生能を測定した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの HPV-16/18 L1 VLP 蛋白量を増やすと、特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価が ■~■ 倍に上昇する (p=0.0012~0.0020) ことが示された (表 2.6.2-3)。これに対し、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンでは、HPV-16/18 L1 VLP 蛋白量の増加による抗体価の上昇は ■ 倍未満であった。抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の IgG サブタイプの割合に関しては、いずれのワクチンでも HPV-16/18 L1 VLP 蛋白量に関連した影響は認められなかった。HPV-16/18 L1 VLP 蛋白量が 6µg の AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、他の 2 用量群に比べて IFN-γ 産生能は低く (■~■ 倍)、IL-5 産生能は高い傾向 (■~■ 倍) が認められた。Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群においては、IFN-γ 産生能は HPV-16/18 L1 VLP 蛋白量に関連した影響はみられなかったが、IL-5 産生能は最低用量群で高い傾向が (■~■ 倍) 認められた。

以上の成績に基づき、HPV-16 および HPV-18 L1 VLP 抗原量を、抗体誘導活性および IFN-γ 産生能が高く、IL-5 産生能が低かった各 2µg の用量に設定し、さらにマウスの試験を実施した。

いずれの HPV-16/18 L1 VLP 抗原量においても、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群で誘導される特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価が Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群に比べて有意に高い (■~■ 倍、p<0.0001~0.0020) ことも示された (表 2.6.2-3)。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群に比べて、IgG2a 抗体の割合は高く (+■%)、IL-5 産生能はより低く (■~■ 倍)、IFN-γ 産生能は高い (■~■ 倍) ことが示された。

表 2.6.2-3 各種用量の HPV-16/18 L1 VLP 抗原を含む Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 VLP 抗体および抗 HPV-18 VLP 抗体の抗体価

4.2.1.1.4、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン		2 回目接種後 14 日における幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限～上限)	
アジュバント	HPV-16/18 L1 VLP の添加量(μg)	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
AS04 添加	0.6	20XXXX* (■■■■～■■■■)	42XXXX* (■■■■～■■■■)
	2	21XXXX* (■■■■～■■■■)	43XXXX* (■■■■～■■■■)
	6	43XXXX* (■■■■～■■■■)	89XXXX* (■■■■～■■■■)
Al(OH) ₃ 添加	0.6	61XXX* (■■■■～■■■■)	78XXX* (■■■■～■■■■)
	2	10XXXX* (■■■■～■■■■)	11XXXX* (■■■■～■■■■)
	6	11XXXX* (■■■■～■■■■)	12XXXX* (■■■■～■■■■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.1.3. マウスおよびサルの免疫原性試験における AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンにより誘導される液性および細胞性免疫応答の解析

2.6.2.2.1.3.1. AS04 添加または Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの BALB/c マウスにおける評価

4.2.1.1.5

BALB/c マウスの免疫原性試験において、臨床ロットである AS04 添加または Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答について比較検討した。

BALB/c マウス (9 匹/群) に、Al(OH)₃ (50μg) 添加または AS04 (Al(OH)₃ 50μg+MPL 5μg) 添加 HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2μg) ワクチンの 4 臨床ロットを試験 0 および 21 日に 50μL 筋肉内接種した。2 回目接種後 14 日に採血し、各個体血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、IgG のサブタイプ (IgG1、IgG2a および IgG2b) も検討した。2 回目接種後 14 日にマウスの脾臓を採取し、サイトカイン (IFN-γ および IL-5) の産生能を測定した。

AS04 (Al(OH)₃+MPL 5μg) 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群に比べて特異的抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価が ■■■～■■■ 倍上昇する (p≤0.0001) ことが示された。

AS04 添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンはいずれも、異なる臨床ロット間で有意な差は認められなかった (表 2.6.2-4)。

さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群に比べて、IgG2a 抗体の割合が高く (+■%)、IL-5 産生能は低下し (■~■倍)、IFN- γ 産生能は上昇した (■~■倍)。

表 2.6.2-4 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 VLP 抗体および抗 HPV-18 VLP 抗体の抗体価—臨床ロット間の比較

4.2.1.1.5、表 2 および 3 より作成

臨床ロット No. (HPV-16/18 L1 VLP ワクチン)	2 回目接種後 14 日における幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限~上限)	
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
DV■015A9 (AS04 添加ワクチン)	58XXXX* (■~■)	83XXXX* (■~■)
DV■014A9 (Al(OH) ₃ 添加ワクチン)	25XXXX* (■~■)	16XXXX* (■~■)
99■04A (AS04 添加ワクチン)	42XXXX* (■~■)	86XXXX* (■~■)
99■02A (Al(OH) ₃ 添加ワクチン)	14XXXX* (■~■)	14XXXX* (■~■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.1.3.2. アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの BALB/c マウスにおける評価

4.2.1.1.6

BALB/c マウスで免疫原性試験を実施し、アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答または TNF- α (抗ウイルス活性の指標) および IL-2 (T 細胞の免疫記憶応答の指標) の産生促進作用について比較検討した。

BALB/c マウス (12 匹/群) に、アジュバント非添加、Al(OH)₃ (50 μ g) 添加または AS04 (Al(OH)₃ 50 μ g+MPL 5 μ g) 添加 HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2 μ g) ワクチンを、50 μ L の容量で試験 0 および 21 日に筋肉内接種した。2 回目接種後 14 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、2 回目接種後 14 日に脾臓を採取し、サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 および IL-5) 産生能を測定した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の血清中抗体価を上昇させ、その作用強度は、アジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの ■~■倍 (p<0.0001) および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの ■~■倍 (p<0.0001) であった (表 2.6.2-5)。

抗ウイルス活性を有するサイトカインである IFN- γ および TNF- α の AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる産生促進作用は、アジュバント非添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンより強く、IFN- γ でそれぞれの ■~■ および ■~■ 倍、TNF- α でそれぞれ ■~■ および ■~■ 倍であった。AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる IL-5 産生促進作用は Al(OH)₃ 添加およびアジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも低く、それぞれの ■~■ 倍および ■~■ 倍であった。Al(OH)₃ 添加および AS04

添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの IL-2 の産生促進作用は、アジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも強く、それぞれ ■～■ 倍および ■～■ 倍であった。

表 2.6.2-5 アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価

4.2.1.1.6、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	2 回目接種後 14 日における幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限～上限)	
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
非添加	76XXX* (■～■)	30XXX* (■～■)
Al(OH) ₃ 添加	22XXXX* (■～■)	15XXXX* (■～■)
AS04 添加	80XXXX* (■～■)	82XXXX* (■～■)

*:新薬情報提供時に置き換え

2.6.2.2.1.3.3. アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる BALB/c マウスにおける免疫記憶 B 細胞の誘導

4.2.1.1.7

BALB/c マウスで免疫原性試験を実施し、アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答および免疫記憶 B 細胞の出現頻度を比較検討した。

BALB/c マウス (12 匹/群) に、アジュバント非添加、Al(OH)₃ (50μg) 添加または AS04 (Al(OH)₃ 50μg+MPL 5μg) 添加 HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2μg) ワクチンを、50μL の容量で試験 0 および 21 日に筋肉内接種した。2 回目接種後 14 および 37 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、2 回目接種後 37 日にマウス (6 匹/群) の脾臓を採取し、HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP に対して特異的な免疫記憶 B 細胞の出現頻度を測定した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の血清中抗体価を上昇させ、その作用強度は、アジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの ■～■ 倍 (p<0.05) および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの ■～■ 倍 (p<0.05) であった (表 2.6.2-6)。また、2 回目接種後 14 から 37 日の間における抗体価は、いずれのワクチン接種によっても安定していた。

表 2.6.2-6 アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体価

4.2.1.1.7、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限～上限)			
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体		抗 HPV-18 L1 VLP 抗体	
	2 回目接種後 14 日	2 回目接種後 37 日	2 回目接種後 14 日	2 回目接種後 37 日
非添加	38XXX* (■■■■～■■■■)	39XXX* (■■■■～■■■■)	12XXX* (■■■■～■■■■)	76XX* (■■■■～■■■■)
Al(OH) ₃ 添加	12XXXX* (■■■■～■■■■)	19XXXX* (■■■■～■■■■)	11XXXX* (■■■■～■■■■)	16XXXX* (■■■■～■■■■)
AS04 添加	63XXXX* (■■■■～■■■■)	53XXXX* (■■■■～■■■■)	98XXXX* (■■■■～■■■■)	57XXXX* (■■■■～■■■■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP に対して特異的な免疫記憶 B 細胞の出現頻度が、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群より高かった (■■～■■倍) (表 2.6.2-7)。アジュバント非添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP に対して特異的な免疫記憶 B 細胞の出現頻度は、定量限界付近であった。

表 2.6.2-7 アジュバント非添加、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の免疫記憶 B 細胞の出現頻度

4.2.1.1.7、表 4 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	HPV L1 VLP 特異的な免疫記憶 B 細胞の 幾何平均頻度 (%)	
	HPV-16 L1 VLP	HPV-18 L1 VLP
非添加	0.08	0.05
Al(OH) ₃ 添加	0.29	0.53
AS04 添加	1.51	2.03

2.6.2.2.1.3.4. Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの BALB/c マウスにおける作用持続性の評価

4.2.1.1.8

BALB/c マウスで免疫原性試験を実施し、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答の持続性を比較検討した。

BALB/c マウス (48 匹/群) に、Al(OH)₃ (50μg) 添加または AS04 (Al(OH)₃ 50μg+MPL 5μg) 添加 HPV-16/18 L1 VLP (各 L1 VLP 2μg) ワクチンを、50μL の容量で試験 0 および 21 日に筋肉内接種した。2 回目接種後 14 日、36 日および 91 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、2 回目接種後 91 日にマウス (12 匹/群) の脾臓を採取し、サイトカイン (IFN-γ および IL-5) 産生または HPV-16 L1 VLP および HPV-18 L1 VLP に対して特異的な免疫記憶 B 細胞の出現頻度を測定した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群での血清中抗体価は、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群と比較して、抗 HPV-16 L1 VLP 抗体に関しては2回目接種後 14 および 36 日において高く (■~■倍、p<0.05)、抗 HPV-18 L1 VLP 抗体に関しては2回目接種後 14、36 および 91 日において高かった (■~■倍、p<0.05) (表 2.6.2-8)。また、抗体価はいずれのワクチン接種においても、2回目接種後 14 から 36 日の間において安定していたが、2回目接種後 91 日には低下した (■~■)。

2回目接種後 91 日における AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる IL-5 産生促進作用は、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも弱かった (■~■倍)。一方、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによる抗ウイルス活性を有するサイトカインである IFN- γ の産生促進作用は、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも強かった (■~■倍)。

表 2.6.2-8 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体価および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体価

4.2.1.1.8、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限~上限)					
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体			抗 HPV-18 L1 VLP 抗体		
	D14	D36	D91	D14	D36	D91
Al(OH) ₃ 添加	21XXXX* (■~■)	21XXXX* (■~■)	14XXXX* (■~■)	11XXXX* (■~■)	18XXXX* (■~■)	82XXXX* (■~■)
AS04 添加	59XXXX* (■~■)	46XXXX* (■~■)	20XXXX* (■~■)	47XXXX* (■~■)	65XXXX* (■~■)	26XXXX* (■~■)

D14 : 2回目接種後 14 日、D36 : 2回目接種後 36 日、D91 : 2回目接種後 91 日

*.新薬承認情報提供時に置き換え

さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、HPV-18 L1 VLP に対して特異的な免疫記憶 B 細胞の出現頻度が、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群より高かった (■倍) (表 2.6.2-9)。

表 2.6.2-9 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の免疫記憶 B 細胞の出現頻度 (2 回目接種後 91 日)

4.2.1.1.8、表 4 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	2 回目接種後 91 日における HPV L1 VLP 特異的免疫記憶 B 細胞の幾何平均頻度 (%)	
	HPV-16 L1 VLP	HPV-18 L1 VLP
Al(OH) ₃ 添加	0.30	0.14
AS04 添加	0.48	0.82

2.6.2.2.1.3.5. Al(OH)₃ 添加および AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンのアカゲザルにおける評価

4.2.1.1.9

ヒトの近縁種であるアカゲザルで免疫原性試験を実施し、Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの接種により誘導される免疫応答を検討し、マウスでの成績と比較した。

アカゲザル（5匹/群）に、Al(OH)₃（500 μ g）添加または AS04（Al(OH)₃ 500 μ g+MPL 50 μ g）添加 HPV-16/18 L1 VLP（各 L1 VLP 20 μ g）ワクチンを、臨床用量に相当する 500 μ L の容量で試験 0、28 および 84 日に筋肉内接種した。各接種後 28 日に採血し、血清中の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価を測定した。また、主要な中和エピトープである HPV-16 L1 VLP（V5）および HPV-18 L1 VLP（J4）エピトープに対する抗体価も測定した。さらに、HPV-16 および HPV-18 擬似ウイルス粒子を用いた中和抗体価測定法[Pastrana, 2004]を用いて、3 回目接種後 28 日に採取した血清中の中和抗体価も測定した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群と比較して、抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価が高く（ \blacksquare ～ \blacksquare 倍、 $p=0.0130\sim 0.0572$ ）、HPV-16 L1 VLP（V5）および HPV-18 L1 VLP（J4）エピトープに対する抗体価も高かった（ \blacksquare ～ \blacksquare 倍、 $p=0.0200\sim 0.0501$ ）（2 および 3 回目接種後、表 2.6.2-10 および表 2.6.2-11）。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群では、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン群と比較して、中和抗体価も高かった（ \blacksquare ～ \blacksquare 倍、 $p<0.05$ ）（表 2.6.2-12）。

表 2.6.2-10 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の抗 HPV-16 L1 VLP 抗体価および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体価

4.2.1.1.9、表 2 および 3 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	幾何平均抗体価（EU/mL）（下限～上限）					
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体			抗 HPV-18 L1 VLP 抗体		
	接種 I	接種 II	接種 III	接種 I	接種 II	接種 III
Al(OH) ₃ 添加	19XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	66XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	13XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	24XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	59XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	10XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)
AS04 添加	35XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	16XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	34XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	40XX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	13XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)	40XXX* (\blacksquare ～ \blacksquare)

接種 I：1 回目接種後 28 日、接種 II：2 回目接種後 28 日、接種 III：3 回目接種後 28 日

*:新薬承認情報提供時に置き換え

**表 2.6.2-11 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の
抗 HPV-16 L1 VLP (V5)抗体価および抗 HPV-18 L1 VLP(J4)抗体価**

4.2.1.1.9、表 4 および 5 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	幾何平均抗体価 (EU/mL) (下限～上限)					
	抗 HPV-16 L1 VLP (V5) 抗体			抗 HPV-18 L1 VLP (J4) 抗体		
	接種 I	接種 II	接種 III	接種 I	接種 II	接種 III
Al(OH) ₃ 添加	23X* (■～■)	13XX* (■～■)	37XX* (■～■)	65X* (■～■)	15XX* (■～■)	24XX* (■～■)
AS04 添加	54X* (■～■)	39XX* (■～■)	13XXX* (■～■)	10XX* (■～■)	34XX* (■～■)	83XX* (■～■)

接種 I : 1 回目接種後 28 日、接種 II : 2 回目接種後 28 日、接種 III : 3 回目接種後 28 日

*:新薬承認情報提供時に置き換え

**表 2.6.2-12 Al(OH)₃ 添加または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの筋肉内接種後の
中和抗体価**

4.2.1.1.9、表 6 より作成

HPV-16/18 L1 VLP ワクチン	3 回目接種後 1 ヶ月における幾何平均中和抗体価 (EU/mL) (下限～上限)	
	抗 HPV-16 L1 VLP 抗体	抗 HPV-18 L1 VLP 抗体
Al(OH) ₃ 添加	18XXX* (■～■)	10XXX* (■～■)
AS04 添加	11XXXX* (■～■)	51XXX* (■～■)

*:新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.2. MPL

4.2.1.1.10/ref

MPL はおもに APC を活性化し、TNF- α 、IL-6、IL-1 β および IL-8 などの炎症性サイトカインならびに IL-12 および IFN- γ などの獲得免疫応答の誘導に重要なサイトカインの産生を促進することにより免疫賦活活性を示すと考えられる[Ulrich, 1995; Thompson, 1998; Moore, 1999; Ismaili, 2002; Tomai, 1989]。

MPL は APC を活性化することにより、マウスにおいては貪食活性を増強し[Masihi, 1986]、ヒトおよびマウスにおいては CD80、CD86 および CD40 などの共刺激分子の発現を促進する[Ismaili, 2002; Moore, 1999]。さらに、マウスでの *in vivo* 試験において、MPL は筋肉内または静脈内投与することにより CD80、CD86 および CD40 の発現を促進して APC を活性化し、B 細胞を活性化することが報告されている[De Becker, 2000]。

Salmonella minnesota LPS の免疫賦活活性には、膜貫通型受容体の TLR ファミリーに属する TLR4 への結合が関与することが知られている[Tapping, 2000; Netea, 2002]。他の共受容体の関与と合わせて、LPS の TLR4 への結合が、細胞内情報伝達のカスケードを活性化し、多くの遺伝子の発現を促進する。そこで、MPL の免疫賦活活性における TLR4 の関与を検討した。

文献から得られる成績を補完するために、MPL の作用機序に関する一連の試験を実施し、以下に要約した。

2.6.2.2.2.1. In vitro 試験でのマウス骨髄由来樹状細胞における CD86 発現に対する MPL の影響

C57Bl/6 マウスの APC の一つである骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) における CD86 発現に対する MPL の影響を検討するため、*in vitro* 試験を実施した。*In vitro* で樹立した BM-DC を、各濃度の MPL (0.1、1 および 10 μ g/mL) 存在下で 24 時間インキュベートし、CD86 の発現をフローサイトメトリーにより測定した。

BM-DC において、MPL は CD86 の発現を促進し、CD86 を発現する細胞の割合はいずれの MPL 処置群においても培地処置対照群の 2 倍に上昇した。

2.6.2.2.2.2. In vitro 試験でのマウス骨髄由来樹状細胞における IL-6 および TNF-alpha 産生に対する MPL の影響

炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α の産生に対する MPL の影響を、C57Bl/6 マウスの BM-DC を用いて検討した。*In vitro* で樹立した BM-DC を、各濃度の MPL (0.1、1 および 10 μ g/mL) 共存下で 4 時間インキュベートし、両サイトカインの発現をフローサイトメトリーにより測定した。

BM-DC において、MPL は IL-6 および TNF- α の発現を促進し、サイトカイン陽性細胞の割合は 1 μ g/mL 処置群で最大となり、培地処置対照群の 10 倍となった。

2.6.2.2.2.3. In vivo 試験でのマウス樹状細胞における CD80、CD86 および CD40 発現に対する MPL の影響

APC の成熟に対する MPL の影響を *in vivo* 試験で検討した。C57Bl/6 マウス (4~5 匹/群) に各用量の MPL (0.625~10 μ g) を卵白アルブミン 5 μ g とともに筋肉内投与し、24 時間後に所属リンパ節を採取した。所属リンパ節中の樹状細胞 (DC) (CD11b または CD11c 陽性細胞) における共刺激分子である CD80、CD86 および CD40 の発現を測定し、APC の成熟の指標とした。

MPL は 3 種すべての共刺激分子の発現を用量依存的に亢進し、卵白アルブミンは影響を示さなかった。

2.6.2.2.2.4. In vivo 試験でのマウス血清中における炎症性サイトカイン産生に対する MPL の影響

C57Bl/6 マウス (5 匹/群) に MPL 5 μ g または Al(OH)₃ 17.5 μ g を筋肉内投与し、炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響を *in vivo* 試験で検討した。投与 2 時間後に血清を採取し、サイトカインビーズアレイによってサイトカインおよびケモカイン量を測定した。

MPL を投与したマウスの血清中には、TNF- α 、IL-6 および MCP-1 が存在したが、Al(OH)₃ を投与したマウスの血清中には存在しなかった。

2.6.2.2.2.5. In vitro 試験でのヒト血液単球における CD80 発現に対する MPL の影響

ヒトにおける共刺激分子 CD80 の発現に対する MPL の影響を検討するため、健康成人の PBMC を、各濃度の MPL (0.05、0.5 および 5 μ g/mL) 共存下で 24 時間 *in vitro* で刺激した。CD80 の発現は、CD14 発現により同定される単球において測定した。

単球中の CD80 発現細胞の割合は、MPL 処置により増加し、いずれの濃度群においても約 3~4 倍増加した。

2.6.2.2.2.6. In vitro 試験でのヒト全血細胞におけるサイトカインおよびケモカイン産生に対する MPL の影響

In vitro 試験での MPL により活性化された全血細胞における各種サイトカインおよびケモカイン分泌を検討した。2 名の健康成人から採取した全血 1mL を MPL 20 μ g/mL で 24 時間刺激した。各種サイトカインおよびケモカインの濃度は、Luminex 法により測定した。

ヒト全血細胞を MPL で刺激すると、一連のサイトカイン (IL-12、IFN- γ 、IFN- α および IL-10)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-8、IL-6 および IL-1 β) およびケモカイン (MCP-1、MIP-1 α および MIP-1 β) が誘導された。

2.6.2.2.2.7. In vitro 試験でのヒト単球における IL-6 および TNF-alpha 産生に対する MPL の影響

血液細胞の中で TLR4 を発現する単球が、MPL 刺激により炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-6) を分泌するか否かを検討した。

ヒト PBMC 由来の単球 (CD-14 陽性細胞) を、各濃度の MPL 存在下で 6 時間インキュベートすると、単球中に TNF- α および IL-6 が産生された。MPL によって活性化された単球の数は、0.3 μ g/mL 未満の濃度では濃度依存的に増加した。

2.6.2.2.2.8. In vitro 試験でのヒト単球における TNF-alpha 産生に対する抗 TLR4 および TLR2 モノクローナル抗体の影響

Lipid A が TLR4 を活性化することが知られている。Lipid A 誘導体である MPL が TLR4 を介して作用を発現するか否かを明らかにするため、ヒト PBMC における MPL 誘発 TNF- α 産生に対する抗 TLR4 および TLR2 モノクローナル抗体の影響を検討した。PBMC を抗 TLR4 または TLR2 モノクローナル抗体の共存下で 30 分間インキュベートした後、MPL

(0.1 μ g/mL) またはホルボールエステル (TLR4 非依存性の多クローン性活性化物質) で 6 時間刺激し、PBMC 中での TNF- α 産生を検討した。

MPL による TNF- α 産生は、抗 TLR4 抗体の存在下で阻害されたが、抗 TLR2 抗体では阻害されなかった。ホルボールエステルによる TNF- α 産生はいずれの抗体でも阻害されなかった。

2.6.2.3. 副次的薬理試験

EMA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95) およびヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライ

ン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004) に従って、副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4. 安全性薬理試験

2.6.2.4.1. CERVARIX

2.6.2.4.1.1. ラットの心血管系および呼吸系に及ぼす AS04 アジュバント添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの影響

4.2.1.3.1

Wistar ラット (4 匹/群) にリン酸緩衝食塩液または AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを 0.1mL の容量 (臨床用量の 1/5 に相当) で筋肉内投与 (臨床投与経路) した。用量はラットの体重約 220g およびヒトの体重約 30~70kg を考慮し、予定臨床用量の 24~56 倍を超えるように設定した。心血管系パラメータ (血圧、心拍数および心電図) および呼吸系パラメータ (呼吸数、1 回換気量および分時換気量) を投与後 2 時間連続して記録した。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは 0.1mL/匹を筋肉内投与しても、血圧、心拍数および心電図 (第 II 誘導) ならびに 1 回換気量、分時換気量および呼吸数に投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.4.2. MPL

2.6.2.4.2.1. 麻酔イヌの心血管系および呼吸系に及ぼす静脈内投与による影響

4.2.1.3.2

成熟ビーグル犬 (雄雌各 2 匹) をプロポフォールで麻酔し、MPL を 1、10 および 100µg/kg の用量 (1~2mL/kg の容量) で、低用量から順番に 25 分以上の間隔で、左頸静脈内に投与した。雄雌各 2 匹の対照群の動物には、媒体 (リン酸緩衝生理食塩液) を薬物処置群と同じ投与スケジュールで 3 回投与した。

心血管系パラメータ (血圧、心拍数、左室圧、平均大腿動脈血流量および心電図) および呼吸系パラメータ (最大吸気流量、最大呼気流量、呼吸数、1 回換気量および分時換気量) を投与 2、10 および 20 分後に測定し、投与前の値と比較した。

MPL はいずれの用量においても、ほとんど影響を示さなかった。全試験期間にわたり、平均心拍数の軽度で漸増的な増加 (ベースライン時の 83 拍/分から実験終了時の 93 拍/分)、および平均 T 波高の低下 (4 匹中 2 匹に発現) が認められたが、対照群との統計的な有意差は認められなかった。また、MPL の最高用量を投与したのちに、平均呼吸数の軽度な増加 (ベースライン時 15 回/分から 18 回/分) も認められたが、生理学的に意味のある変化ではないと判断した。

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験

EMEA ガイダンス (Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95) およびヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004) に従って、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6. 考察及び結論

本ワクチンの効力を裏付ける試験は、AS04 アジュバントの免疫賦活活性を評価し、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの各成分の相対的割合を推定し、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの免疫原性プロファイルを明らかにすることを目的として実施した。

AS04 は *in vitro* 試験においてヒト単球およびマクロファージ様細胞による炎症性サイトカイン産生を誘導するとともに、マウスの *in vivo* 試験において APC における共刺激分子の発現を強力に誘導したことから、自然免疫の活性化において重要な役割を果たすことが示された。自然免疫の活性化は免疫応答の開始に不可欠であり、細胞性および液性の獲得免疫応答の増強につながると考えられる。

BALB/c マウスでの免疫原性試験において、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの重量比（抗原：Al(OH)₃：MPL）は 1：25：2.5 が適切であることが示された。

AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンの特性を検討した免疫原性試験では、アジュバント非添加および Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較した。

BALB/c マウスでの免疫原性試験では、AS04（Al(OH)₃ 50µg + MPL 5µg）添加 HPV-16/18 L1 VLP（各 L1 VLP 2µg）ワクチンが、Al(OH)₃（50µg）添加 HPV-16/18 L1 VLP（各 L1 VLP 2µg）ワクチンよりも高い抗 HPV-16 L1 VLP 抗体価および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体価を誘導し、その作用はワクチン接種後 3 ヶ月まで持続することが再現性よく示された。さらに、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは IFN-γ（IgG2a の上昇に関連）および TNF-α（抗ウイルス活性を有するサイトカイン）産生能を上昇させた。Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは、IL-5 産生能を再現性よく上昇させたが、抗ウイルス活性への関与は明確ではない。また、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは血清中の抗体価を上昇させたのみならず、抗体の保持に有用と考えられる免疫記憶 B 細胞の出現頻度を上昇させたことは特記すべきことである。

アカゲザルに AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチン（各 L1 VLP 20µg + Al(OH)₃ 500µg + MPL 50µg）を臨床用量に相当する 500µL の容量で接種すると、抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体が誘導された。AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンによって誘導される抗 HPV-16 L1 VLP 抗体および抗 HPV-18 L1 VLP 抗体の抗体価または中和抗体価は、Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンと比較して高かった。また、AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンは主要な中和エピトープである HPV-16 L1 VLP（V5）および HPV-18 L1 VLP（J4）エピトープに対する抗体価を上昇させ、その作用は Al(OH)₃ 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンよりも強かった。

安全性薬理試験においては、ラットに AS04 添加 HPV-16/18 L1 VLP ワクチンを臨床用量の 1/5 量（体重比として予定の臨床用量の約 24～56 倍量）で筋肉内投与しても、心血管系または呼吸系パラメータに対する影響は認められなかった。

以上をまとめると、VLP として会合した HPV-16 および HPV-18 L1 蛋白に AS04 アジュバントを添加したワクチンは、抗体を強力かつ持続的に産生するとともに、ワクチンの予防効果の促進に有用な免疫記憶 B 細胞および抗ウイルス活性を有するサイトカイン類の産生を誘導する。さらに、マウス、ラットおよびサルを用いた薬理試験成績より、AS04 添加 HPV-

16/18 LI VLP ワクチンが強力かつ持続的な特異的免疫応答を誘導し、呼吸・循環器系に対して好ましくない薬理作用を誘発しないことが示されている。

LPS が強力な自然免疫の誘導剤であるという知見に基づいて、*Salmonella minnesota* LPS の誘導体である MPL の自然免疫の種々なパラメータに対する影響を検討した。MPL による APC の成熟促進作用は、共刺激分子の誘導活性を測定することにより、また、MPL による自然免疫に関連する種々な構成因子（単球など）の活性化作用はサイトカイン・ケモカイン分泌活性を測定することにより評価した。実施した試験を図 2.6.2-3 に図式化して示した。

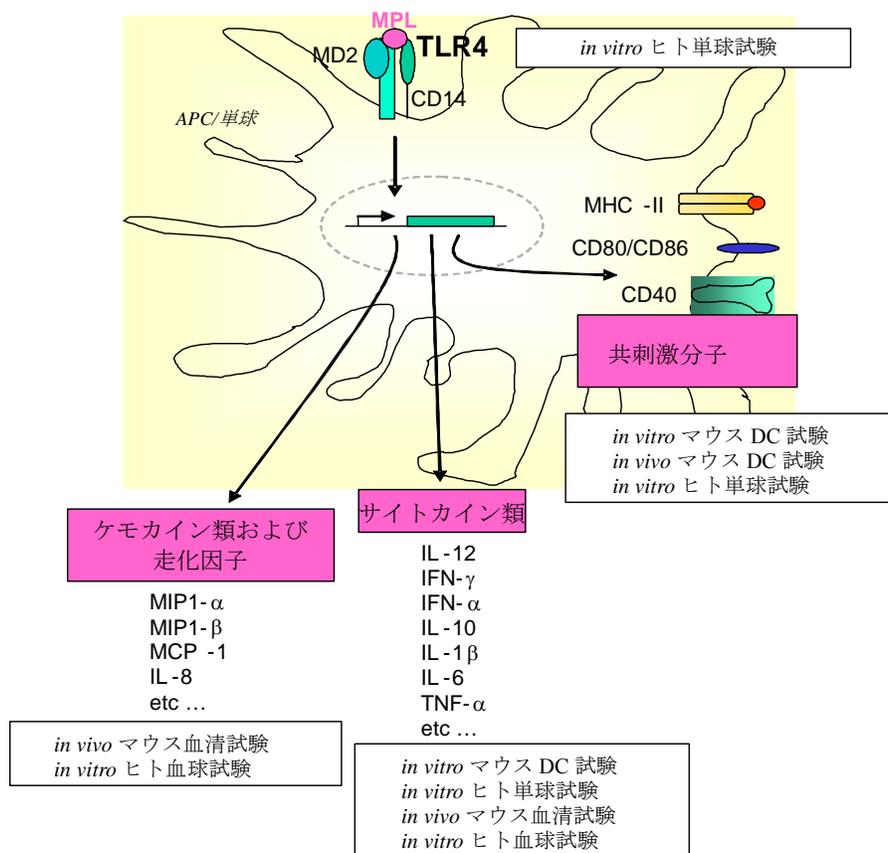


図 2.6.2-3 TLR4 を介する自然および獲得免疫の活性化

MPL はマウス DC を用いた *in vitro* および *in vivo* 試験ならびにヒト単球を用いた *in vitro* 試験において、共刺激分子である CD80、CD86 および CD40 の発現を亢進したことから、APC の成熟促進に重要な役割を果たしていると考えられた。

MPL はヒト単球、マウス DC およびヒト全血細胞を用いた *in vitro* 試験において炎症性サイトカイン分泌を促進した。また、MPL 投与直後のマウス血清中に、これらの炎症性サイトカインが認められたことから、これらの作用は *in vivo* 試験でも確認された。しかし、マウスに $Al(OH)_3$ を投与しても、炎症性サイトカインは認められなかった。このことから、抗原特異的な獲得免疫応答の誘導に不可欠な自然免疫の活性化に、MPL は重要な役割を果たしていると考えられた。

さらに、全血細胞を用いた *in vitro* 試験において、MPL 刺激後に検出されたサイトカインのプロファイルは、被験者に MPL を静脈内投与した際に、血清中に *in vivo* で検出されるサイトカインのプロファイル[Lacy, 2005]とよく相関していた。

ヒトおよびマウスでの *in vitro* および *in vivo* 試験における成績より、免疫応答の開始を強化して細胞性および液性の獲得免疫応答の誘導に関連する自然免疫の活性化に、MPL が重要な役割を果たすことが示された。

また、ヒト PBMC における MPL の認識には、TLR2 ではなく TLR4 が関与することが示された。マウスおよびヒトにおけるリポ多糖の認識および自然免疫応答の活性化に TLR4 が重要であること[Arbour, 2000; Poltorak, 1998]、*Salmonella minnesota* LPS の認識には TLR2 が関与しないこと[Tapping, 2000]、さらに、TLR4 欠損マウス由来の B 細胞が *in vitro* 試験において MPL 刺激に反応しないことはすでに報告されており[Persing, 2002]、本成績はこれらの報告と一致するものであった。

MPL の自然免疫賦活作用は、炎症性サイトカインおよび走化因子の産生促進作用とともに、DC 成熟および共刺激分子発現の促進作用によって発現すると考えられた。これらのことから、ワクチンへの MPL 添加により、ワクチン抗原に対する獲得免疫応答が増強すると考えられる。

ビーグル犬に MPL を 100 μ g/kg までの用量 (AS04 アジュバントに含まれる MPL の 100 倍超) で静脈内投与しても、心血管系および呼吸系に対する影響はほとんど認められなかった (心拍数、大腿動脈抵抗、血圧、左室圧、LV *dP/dt*、心電図、呼吸流量、1 回換気量、呼吸数および分時換気量により評価)。

以上より、MPL は自然免疫の賦活化に重要な役割を果たすことおよび呼吸・循環器系に対して好ましくない薬理作用を誘発しないことが示された。

2.6.2.7. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8. 参考文献

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000;25:187-91.

Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 1995;69:3959-63.

Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, et al. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol.* 1996;70:960-5.

De Becker G, Moulin V, Pajak B, et al. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol.* 2000;12:807-15.

Garçon N, Van Mechelen M, Wettendorff M. Chapter 10, Development and evaluation of AS04, a novel and improved adjuvant system containing MPL and aluminium salt. In: Schijns VEJC, O'Hagan DT, editor. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. London:Elsevier Academic Press, 2006:161-77.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338:423-8.

Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, et al. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol*. 2002;168:926-32.

Jansen KU, Rosolowsky M, Schultz LD, et al. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) virus-like particles protects rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine*. 1995;13:1509-14.

Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, et al. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*. 1996;219:37-44.

Lacy MJ. Review of Cytokines and Chemokines Induced by MPL®. *In house report (RIBI Immunochem Research, Inc)*. 2005;13-Oct:.

Masihi KN, Lange W, Johnson AG, et al. Enhancement of chemiluminescence and phagocytic activities by nontoxic and toxic forms of lipid A. *J Biol Response Mod*. 1986;5:462-9.

Moore A, McCarthy L, Mills KHG. The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1. *Vaccine*. 1999;17:2517-27.

Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, et al. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol*. 2002;23:135-9.

Pastrana DV, Buck CB, Pang Y-Y, et al. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*. 2004;321:205-16.

Persing DH, Coler RN, Lacy MJ, et al. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbil*. 2002;10(10 Suppl):S32-7.

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282:2085-8.

Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:14-9.

Suzich JA, Ghim S-J, Palmer-Hill FJ, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92:11553-7.

Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Immunol.* 2000;165:5780-7.

Thompson HSG, Davies ML, Watts MJ, et al. Enhanced immunogenicity of a recombinant genital warts vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A. *Vaccine.* 1998;16:1993-9.

Tomai MA, Johnson AG. T cell and interferon- γ involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin. *J Biol Response Mod.* 1989;8:625-43.

Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:495-524.

Viscidi RP, Snyder B, Cu-Uvin S, et al. Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:283-8.

2.6.3. 藥理試驗概要表

2.6.3.1. 藥理試驗：一覽表

Test Article: HPV-16/18 L1 VLP +/- Al(OH)₃ +/- AS04

Type of Study	Test System	No. Animals/ Group (Sex)	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
AS04 innate immune response	Human PBMC	N/A	<i>In vitro</i>	GSK Bio	-	4.2.1.1.1/ref
AS04 innate immune response	U937 cell line	N/A	<i>In vitro</i>	GSK Bio	-	4.2.1.1.1/ref
AS04 innate immune response	C57BI/6 mice DC	4 (F)	Intramuscular	GSK Bio	-	4.2.1.1.1/ref
Immunogenicity	BALB/c mice	15 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0134	4.2.1.1.2
Immunogenicity	BALB/c mice	10 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0755	4.2.1.1.3
Immunogenicity	BALB/c mice	12 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0028	4.2.1.1.4
Immunogenicity	BALB/c mice	9 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0026	4.2.1.1.5
Immunogenicity	BALB/c mice	12 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0365	4.2.1.1.6
Immunogenicity	BALB/c mice	12 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0422	4.2.1.1.7
Immunogenicity	BALB/c mice	48 (F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0183	4.2.1.1.8
Immunogenicity	Rhesus Monkeys	5 (3M/2F)	Intramuscular	GSK Bio	PIMS 20█0121	4.2.1.1.9
Secondary Pharmacodynamics	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Safety Pharmacology ⁽¹⁾						
Cardiovascular and respiratory function	Wistar rats	N/A	Intramuscular	█	BVR 371/033059	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic Drug Interactions	N/A	4 (F)	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = Not applicable

GSK Bio = GlaxoSmithKline Biologicals; █ = █, United Kingdom

(1) This study was performed with the same HPV-16/18 L1 VLP AS04 lot (EHPV002T) as the one used in the pre- and post-natal development toxicity study (BVR 249/013360) summarized in Cervarix™ 2.6.6. This material has comparable purity levels as the materials used for clinical studies and the materials proposed for marketing.

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1 参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

EMEA ガイダンス (Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological testing of vaccines、CPMP/465/95) およびヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン (the Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use、EMEA/CHMP/VEG/134716/2004) に従い、副次的薬理試験は実施しなかったため、該当する資料はない。

2.6.3.4. 安全性薬理試験

Test Article: HPV-16/18 L1 VLP AS04

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular, respiratory	Wistar rat	Saline: IM HPV-16/18 L1 VLP AS04: IM	0.1mL/rat* 0.1mL/rat**	Male 4 per group	None	Yes	BVR 371/033059

* 0.9% w/v solution

** 0.1mL of HPV-16/18 AS04 is one fifth of a human dose and represents on a bodyweight basis a 24-56 fold over dosage for the rat based on the intended human dose

a = Single dose unless specified otherwise

IM = Intramuscular

Test Article: 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL)

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Doses ^a (µg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular, respiratory function	Beagle Dog	Saline; Intravenous MPL; Intravenous	0 1, 10, 100	2M + 2F 2M + 2F	None	Yes	████ 1729/022

a = Single dose unless specified otherwise

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

EMEA ガイダンス（Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological testing of vaccines、CPMP/465/95）およびヒト用ワクチンのアジュバントに関するガイドライン（the Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use、EMEA/CHMP/VEG/134716/2004）に従い、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかったため、該当する資料はない。