

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4091026号

(P4091026)

(45) 発行日 平成20年5月28日(2008.5.28)

(24) 登録日 平成20年3月7日(2008.3.7)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/315 (2006.01)

C O 7 K 14/315 Z N A

A 6 1 K 39/385 (2006.01)

A 6 1 K 39/385

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/08 (2006.01)

A 6 1 K 39/08

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/145

請求項の数 24 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-233505 (P2004-233505)

(22) 出願日 平成16年8月10日(2004.8.10)

(62) 分割の表示 特願2000-532144 (P2000-532144)
の分割

原出願日 平成11年2月23日(1999.2.23)

(65) 公開番号 特開2004-346084 (P2004-346084A)

(43) 公開日 平成16年12月9日(2004.12.9)

審査請求日 平成18年2月22日(2006.2.22)

(31) 優先権主張番号 09/027, 956

(32) 優先日 平成10年2月23日(1998.2.23)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500096994

サノフィ パスツール リミテッド

S A N O F I P A S T E U R L I M I
T E Dカナダ国 エム2アール 3ティー4 オ
ンタリオ州 トロント スティールズ ア
ヴェニュー ウェスト 1 7 5 5

(74) 代理人 100123788

弁理士 宮崎 昭夫

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数種オリゴ糖の糖接合体型の細菌性髄膜炎ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つのT細胞エピトープを含むキャリア分子、および

各々がそのキャリア分子に結合していると共に、各々が特定の細菌の血清学的に異なる型に由来する、少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメント

を含んでなり、

前記少なくとも1つのT細胞エピトープを含むキャリア分子は、リシン残基を介して分岐状に相互に連結された、複数のキャリア・ペプチド・セグメントを有する、複数の抗原性を具えるペプチドを含んでなり、

前記複数のキャリア・ペプチド・セグメント中に、前記特定の細菌に由来する、少なくとも1つのT細胞エピトープを含有するペプチド断片が含まれ、

前記少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントの各々は、少なくとも1つの機能性B細胞エピトープを含んでおり、

該少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントの各々は、前記複数のキャリア・ペプチド・セグメント中の異なる一つに対して、部位特異的な糖結合によって連結されており、

前記キャリア分子が前記少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントに高められた免疫原性を付与する

ことを特徴とする多価免疫原性分子。

【請求項 2】

10

20

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Streptococcus pneumoniae*の血清学的に異なる型に由来する莢膜オリゴ糖フラグメントであることを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 3】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*S. pneumoniae*の血清型 1、4、5、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されている

ことを特徴とする請求項 2 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 4】

前記キャリア分子の複数のキャリア・ペプチド・セグメントの各々は、*S. pneumoniae*由来の T 細胞エпитープ含有蛋白質フラグメントを含んでいる

ことを特徴とする請求項 2 または 3 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 5】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Neisseria meningitidis*の血清学的に異なる型に由来する莢膜オリゴ糖フラグメントである

ことを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 6】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*N. meningitidis*の群 A、B、C、W - 135 および Y のうちの少なくとも 2 つの莢膜オリゴ糖から誘導されている

ことを特徴とする請求項 5 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 7】

前記キャリア分子複数のキャリア・ペプチド・セグメントの各々は、*N. meningitidis*由来の T 細胞エпитープ含有蛋白質フラグメントを含んでいる

ことを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 8】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、2 kDa ~ 5 kDa の大きさである

ことを特徴とする請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の多価免疫原性分子。

【請求項 9】

髄膜炎に対する保護のための免疫原性組成物であって、
 (1) 請求項 2、3 または 4 に記載の多種肺炎球菌糖接合体、
 (2) 請求項 5、6 または 7 に記載の多種髄膜炎菌糖接合体、および
 (3) 免疫原性合成 P R P ペプチド接合体
 を含んでなり、

該免疫原性合成 P R P ペプチド接合体は、*Haemophilus influenzae* 菌 b 型 (H i b) に対する免疫原性を有する

ことを特徴とする免疫原性組成物。

【請求項 10】

さらに、少なくとも 1 つのさらなる抗原を含む

ことを特徴とする請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

前記多種肺炎球菌糖接合体は、請求項 3 または 4 に記載の多種肺炎球菌糖接合体であり、

前記多種髄膜炎菌糖接合体は、請求項 6 または 7 に記載の多種髄膜炎菌糖接合体ある

ことを特徴とする請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

サンプル中における請求項 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の多価免疫原性分子に対する抗体の存在を検出する診断キットであって、
 (a) 前記多価免疫原性分子、
 (b) この多価免疫原性分子をサンプルに接触させて、この多価免疫原性分子および、

10

20

30

40

50

サンプル中に存在する、何れかの前記抗体を含んでなる複合体を形成する手段、および
(c) 複合体の形成を検出する手段
を含んでなる診断キット。

【請求項 13】

請求項 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の前記免疫原性接合体分子が、請求項 9 または 11
に記載の免疫原性組成物の形態として存在する
ことを特徴とする請求項 12に記載のキット。

【請求項 14】

サンプル中における多価免疫原性分子の存在を検出する診断キットであって、
(a) 請求項 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の多価免疫原性分子の細菌莢膜オリゴ糖フラ
グメントに特異的な抗体、
(b) この抗体をサンプルに接触させて、前記多価免疫原性分子の何れかおよびこの抗
体を含んでなる複合体を形成する手段、および
(c) 複合体の形成を検出する手段
を含んでなる診断キット。

【請求項 15】

前記抗体が、請求項 9に記載の免疫原性組成物の要素(1)または(2)に対する抗体
である
ことを特徴とする請求項 14に記載のキット。

【請求項 16】

請求項 1に記載の多価免疫原性分子を形成する方法であって、
前記少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントの各々を、前記複数のキャリ
ア・ペプチド・セグメント中の異なる一つに対して、部位特異的な糖結合によって連結す
る工程を具え、

前記部位特異的な糖結合の工程は、
前記特定の細菌の血清学的に異なる型に由来する、少なくとも二種類の細菌莢膜多糖類
を処理して、少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントを取得し、

異なる末端保護基を有する、少なくとも 2 つのキャリア・ペプチド・セグメントを含む
、前記複数のキャリア・ペプチド・セグメントを、リシン残基を介して分岐状に相互に連
結して、ポリマーアンカーに固定されている、複数の抗原性を具えるペプチドを形成し、

前記末端保護基の 1 つを選択的に除去し、二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントの
最初の 1 つを非保護キャリア・ペプチド・セグメントに結合させ、

前記末端保護基のもう 1 つを選択的に除去し、二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメン
トの次の 1 つを非保護キャリア・ペプチド・セグメントに結合させ、ならびに、

得られる分子をポリマーアンカーから分離することにより行われ、
前記複数のキャリア・ペプチド・セグメント中に、前記特定の細菌に由来する、少なく
とも 1 つの T 細胞エпитープを含有するペプチド断片が含まれ、

前記少なくとも二種類の細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントの各々は、少なくとも 1 つの
機能性 B 細胞エпитープを含んでいる

ことを特徴とする方法。

【請求項 17】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、2 kDa ~ 5 kDa の大き
さに選択される

ことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Streptococcus pneumoniae*
の血清学的に異なる型に由来する莢膜オリゴ糖フラグメントである

ことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*S. pneumoniae* の血清型 1

10

20

30

40

50

、4、5、6 B、9 V、14、18 C、19 Fおよび23 Fのうちの少なくとも2つの莢膜多糖類から誘導されている

ことを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記キャリア分子の複数のペプチド断片の各々は、*S. pneumoniae*由来のT細胞エピトープ含有蛋白質フラグメントを含む

ことを特徴とする請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Neisseria meningitidis*の血清学的に異なる型に由来する莢膜オリゴ糖フラグメントである

ことを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記少なくとも二種類の細菌莢膜オリゴ糖フラグメントが、*N. meningitidis*の群A、B、C、W-135およびYのうちの少なくとも2つの莢膜オリゴ糖から誘導されていることを特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記キャリア分子複数のペプチド断片の各々は、*N. meningitidis*由来のT細胞エピトープ含有蛋白質フラグメントを含む

ことを特徴とする請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

前記複数の抗原性を具えるペプチドは、少なくとも3つのキャリア・ペプチド・セグメントを有し、

該少なくとも3つのキャリア・ペプチド・セグメントは、それぞれ、異なるT細胞エピトープを含有するペプチド断片を含んでなる

ことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ワクチン分野に関するもので、特に多数オリゴ糖が同じキャリア蛋白質に共有結合した複合糖質の調製に使用することができる新規の糖質抱合技術の開発に関するものである。

【背景技術】

【0002】

Haemophilus influenzae 菌b型(Hib)、*Neisseria meningitidis* 菌および*Streptococcus pneumoniae* は、5歳未満の子供における細菌性髄膜炎の主要な病因である。これらの細菌は全て、多糖類の莢膜によって食菌作用から守られている。多くの場合、生物の莢膜多糖類(CP)に対して誘導された抗体が、保護作用をする。Hib CP、PRPを、ジフテリアトキソイド(PRP-D)、破傷風トキソイド(PRP-T)、CRM197(HbOC)および*N. meningitidis*の外膜蛋白質(PRP-OMP)などの異なるキャリアタンパク質に結合させた効果的なHib抱合ワクチンが開発された。現在4種のHib抱合ワクチンが市販されている。*N. meningitidis* および*S. pneumoniae* に対する新たな複合糖質ワクチンが、米国医師会によって強く勧められている。

【0003】

幼児、高齢者および免疫欠陥患者における全身性の非侵襲肺炎球菌疾患を予防する多価肺炎球菌ワクチンの開発の重要性が、この10年間で高まっている。肺炎球菌疾患、疫学、または多糖類ワクチンのより詳細な概説としては、数多くの概説文献が有用である(参

10

20

30

40

50

考文献 1、本発明に関係する技術状況をより完全に記述するために種々の参考文献は括弧内に引用する。それぞれに引用した文献の完全な情報は、明細書の最後でクレームの直前にある。これらの参考文献の開示は、本開示に参考として援用している。）

Streptococcus pneumoniae は莢膜を有しており、ヒト上気道の正常フローラに存在するグラム陰性細菌である。これは肺炎、髄膜炎、菌血症および非侵襲性の細菌性中耳炎の主因となることが多い。発病率は幼児および高齢者において最も高い。米国だけでも、全身性肺炎球菌感染症の全体発病率は、高齢者層では 50 / 100000 であり、2 歳未満の子供では 160 / 100000 である（参考文献、2、3）。死亡例は特に高齢者層で 40000 人 / 年もの多数に及ぶことがある。*S. pneumoniae* の多数の血清型は、従来の抗生物質治療に対して耐性になっている。子供の中耳炎の発病率は、5 歳まででは 90 % 近くあり、発病率のピークは 6 から 15 ヶ月である。中耳炎は毎年 120 万例以上が発病している。近年の肺炎球菌疾患の疫学的研究（参考文献 4）によって、既知の血清型 85 種のうち 5 種の血清型（6B、14、19F、23F および 18C）が幼児の肺炎球菌疾患の 70 から 80 % を占め、米国では、9V 型および 4 型が 6 番目および 7 番目に位置することが示された。欧州および開発途上国では、1 型および 5 型の方が 4 型および 9V 型よりもよく見られる。したがって、米国向けの肺炎球菌結合ワクチンは、75 から 85 % のカバー率を実現するためには、少なくとも 7 種の血清型（4、6B、9V、14、18C、19F、および 23F）を含むべきである。欧州およびその他の地域向けの結合ワクチン製剤には、1、5、6B、14、18C、19F および 23F の血清型を含むべきである。次に広域スペクトルの多価肺炎球菌結合ワクチンは、9 種の血清型、1、4、5、6B、9V、14、18C、19F、および 23F 由来の CP を含むべきである。

【0004】

N. meningitidis は、血清学的に A、B、C、29e、W135、X、Y および Z の群に分類されたグラム陰性細菌である。中国ではさらに（H、I および K の）群が単離され、L 群がカナダで単離された。グループ分けシステムは、生物の莢膜多糖類に基づいている。肺炎球菌ワクチンとは対照的に、髄膜炎菌多糖類ワクチンの組成物は、必要な多糖類が少数であるという事実から非常に簡単であった。実際に、髄膜炎菌性髄膜炎の例の約 90 % は A、B、および C 群が原因である。A 群および C 群の予防は、2 価の多糖類ワクチンで予防接種することによって実現することができる。この市販のワクチンは、この 10 年間成人に使用され、世界の多くの地域における髄膜炎の大流行の予防に成果を挙げてきた。しかし、髄膜炎菌性髄膜炎例のかなりの部分は A および C 以外の血清型によるので、このワクチンを改善する必要がある。B 群の *N. meningitidis* は特に疫学的に重要であるが、Y 群および W135 群も重要である。A、C、W135、および Y 群の多糖類を含む 4 価のワクチンが現行の髄膜炎菌性髄膜炎ワクチンであるが、ほとんどの莢膜多糖類に対する免疫応答が成熟するのは 2 歳前後なので、若年の幼児ではあまり効果的ではない。

【0005】

B 群の髄膜炎菌多糖類は、ヒトでは免疫原性が不十分である。この現象を説明するために 2 つの主な理由が考えられる。1 つには、 α - (2 → 8) - 結合シアル酸ホモポリマーがヒト組織ではノイラミニダーゼによって素早く単量体に分解するからである。もう一つには、B 群の莢膜多糖類は N - アセチルノイラミン酸 (α 2 → 8 NeuNAc) のポリマーであり、この α 2 → 8 NeuNAc 部分は、成人では数種の糖蛋白質およびガングリオシドで 2 量体および単量体として、ラット胎児および新生児の組織では少なくとも 8 個の繰り返しユニットのポリマーとして見られる。したがって、この構造はヒト免疫系では「自己」抗原として認識される。結果として、抗体の産生は抑制されるか、またはこの分子的類似のため、天然の B 群 CP をベースとしたワクチンは α 2 → 8 NeuNAc 部分に対する自己抗体を誘導する可能性があり、そのため自己免疫疾患の原因となる。

【0006】

B 群の髄膜炎菌 CP はヒトにおいて免疫原性がないので、その免疫原性を増大させるた

めの試みが追求されてきた。1つの試みは、B群および外側の膜タンパク質（OMP）の非共有結合的複合体の使用である。このような複合体は、OMPの疎水性領域とCPの還元末端のジアシルグリセロール基との間の疎水性相互作用によって形成される。ヒトボランティアに、この複合体を0週目および5週目に2種の用量で投与した。ほとんどの個体では、B群のCPに対する抗体の増加という応答があった。しかし、第2の用量では、少しまたは全く抗体力価の増加は得られず、その後14週間経る間に減少した。B群の多糖類に特異的な抗体は、IgM型に限定され、高分子量の多糖類のみに存在する決定因子に反応した。

【0007】

B群のCPの免疫原性を高めるために、Jennings（参考文献5）は、過ヨウ素酸酸化したCPを使用して、CPを破傷風トキソイド（TT）に共有結合させたB群髄膜炎菌-破傷風トキソイド抱合体（GBMP-TT）を調製した。しかし、この方法ではCPの免疫原性の顕著な増大は得られなかった。動物に誘導される抗体応答は、主にCPとこの蛋白質との間（GBMP-TT）の結合部分に対して反応することがわかった。B群のCPの免疫原性をさらに高めるためには、化学修飾が必要である。Jennings（参考文献6）は、B群のCPのN-アセチル基が高温で強塩基的作用によって選択的に除去されることを報告した。その後このアセチル基を無水プロピオン酸処理によってN-プロピオニル基で置き換え、N-プロピオニルノイラミン酸（ α -(2→8)NeuPro）ポリマーを生成する。このN-プロピオニル化CPを最初に過ヨウ素酸ナトリウムで過ヨウ素酸酸化し、次いでシアノボロヒドリドナトリウムの存在下でTTに結合して、化学的に修飾したGBMP-TT抱合体を得た。フロインド完全アジュバント（FCA）に調合したこの抱合体でマウスを免疫して、天然のB群CPに対して交差反応するIgG抗体を高濃度に産生させた。マウス抗血清は、B群全株に対する殺菌性が認められた。しかし、さらに研究を行ったところ、異なる特異性を有する2つの抗体群の存在が明らかになった。1つの群は、精製したB群のCPに反応したが、もう1つの群は反応しなかった。天然のB群CPと反応しない抗体は、殺菌活性を有することが明らかである。これらの抗体は、精製したCPには存在しない細胞関連CPによって発現するエピトープを認識することが可能である。ワクチンを含む免疫原性組成物として、キャリア蛋白質に抱合されたN.meningitidis B群CPの莢膜多糖類を含む別の抱合体、および診断薬としておよび診断薬の作成のためのそれらの使用は、Kandil等（本明細書の譲受人に譲渡され、その開示が本明細書に参考として援用された米国特許第5780606号、欧州特許第0747063号）に記載されている。特に、N.meningitidisの莢膜多糖類は、修飾して、キャリア分子に接着して使用することができる複数のシアル酸誘導体を含む。

【0008】

Hib CP-蛋白質抱合ワクチンを許可され使用している国々において、Haemophilus influenzae b型疾患の劇的な減少が観察されたことによって、CP-蛋白質抱合体によって全身性細菌性疾患を予防することができることが示唆された。髄膜炎菌および肺炎球菌のCP-蛋白質抱合体にも効果を期待することは道理にかなっている。中耳炎などの非侵襲性疾患を抱合体ワクチンによる全身性免疫で予防できる可能性については、研究する必要がある。高力価の血清型特異的抗体が、鼻咽頭定着および/または中耳炎のいずれかを十分予防するかどうかは、まだ未解決の問題である。中耳炎ワクチンの開発には、まだ若いうちに高力価の抗CP抗体を存在させるために、複数の肺炎球菌CP-蛋白質抱合体が必要である。

【0009】

全身性の非侵襲性疾患の予防のための多価肺炎球菌および髄膜炎菌CP-蛋白質抱合体ワクチンの開発には、炭水化物化学者、免疫学者、臨床医およびワクチン製造者にとって多くの課題が待ち受けている。炭水化物の量、キャリアの選択、ワクチン送達の方法、および免疫増強薬およびアジュバントの使用は、宿主の免疫応答に影響を及ぼすことが知られている。免疫原性複合多糖類は、条件を慎重に制御すれば、多機能化CPおよび蛋白質

10

20

30

40

50

の間で形成することができる。現在では抱合体のほとんどは、活性化したC Pまたはオリゴ糖のいずれかを還元末端を介して、リンカー基によってまたはなしで、蛋白質またはペプチドに結合することによって合成している。

【0010】

一般的な複合多糖生成法は、過ヨウ素酸処理によって莢膜多糖類または多糖類のフラグメントをランダムに活性化することを含む。この反応によって、炭水化物の隣接する水酸基の任意の酸化的切断が引き起こされ、反応性に富んだアルデヒド基が形成する。蛋白質キャリアへの結合は、リシル基への直接アミノ化による。アミノカプロン酸などのスペーサ基は、還元的アミノ化によってアルデヒド基と反応し、その後水溶性カルボジイミド縮合によって蛋白質リシル基に結合することができる(参考文献7)。Paradisoによって報告されたオリゴ糖-ペプチド抱合体(参考文献8)は、天然蛋白質の代わりにCRM₁₉₇のT細胞エпитープが存在しているペプチドを使用する以外は同様に調製された。Connaught Laboratories Inc.に譲渡されたGordonによる米国特許第4496538号で開示された他の抱合法、およびSchneerson等による抱手法(参考文献9)は、直接C Pをアジピン酸ジヒドラジド(ADH)で誘導体とし、次いでCNBr活性化して、次にカルボジイミド縮合によって誘導体にしたC Pを直接キャリア蛋白質(DまたはT)に抱合することを含んでいる。MarburgおよびTolman(欧州特許公開公報第534764A1)は、第1のC Pを蛋白質キャリアに結合して、次いで2機能性交差リンカーによって第2のC Pを第1のC Pに結合することによって、蛋白質-2量体C P抱合体免疫原を生成することができることを示した。

【0011】

疾患に対する免疫を誘導する方法は、常に改善されている。研究の焦点は、免疫原性の改善されたワクチンを作成し、アジュバントおよび送達系の開発を促進することができる抱合体とB細胞およびT細胞との相互反応の機構を発見することを期待して、炭水化物蛋白質抱合体の構造-機能の関係に絞られてきた。Chong等(米国特許第5679352号、本明細書の譲受人に譲渡され、その開示は本明細書に参考として援用した)は、数種の因子が炭水化物の免疫原性に影響を及ぼすことを示した。免疫原性糖蛋白質抱合体の合成に最小限必要なのは、C PのB細胞エпитープおよびキャリアのT細胞エпитープが共有結合後に機能しなければならないことである。抗C P抗体応答の強さは、T細胞エпитープに対するC Pの空間配置に著しく依存する。抗C P抗体応答は、複数抗原型ペプチド(MAP)をキャリアとして使用すると増強される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

1回投与多価ワクチンは、WHOワクチン開発プログラムで第1の優先事項として挙げられている。細菌性髄膜炎に対する1回投与多価C P-蛋白質抱合ワクチン(15種の異なるC P-蛋白質抱合体:1種のHib抱合体、5種のN.meningitidis抱合体および9種のS.pneumoniae抱合体)には、ジフテリアおよび破傷風トキソイドなどの典型的なキャリアタンパク質に対する過剰免疫の起こる潜在的危険性が存在する。Hib抱合ワクチンに対するエпитープ非特異的抗体応答は、キャリアタンパク質で予備免疫することによって抑制されることが報告されている(参考文献11)。したがって、このワクチン調合の問題を解決するためには、適切な方法が必要である。これらの問題の中には、Hib、N.meningitidisおよびS.pneumoniae由来の保存された、交差反応の起こらない、非莢膜抗原を取り入れることによって回避することができるものもある。数種の外膜蛋白質が、ワクチンの候補として考えられてきたが、いずれも試験で試験されたことはない。したがって複数のC P-キャリア抱合体送達系は、新規の一般的手法であり、複合糖質ワクチン開発に重要となろう。したがって、本発明は、同じキャリアタンパク質またはキャリアポリペプチドに共有結合した異なる細菌由来の複数のオリゴ糖を含むワクチンを調製するために使用することのできる新規の複合

糖質作成技術を目指している。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の一態様に従って、少なくとも1つの機能性T細胞エпитープを含むキャリア分子、およびそれぞれがキャリア分子に結合し、それぞれが少なくとも1つの機能性B細胞エпитープを含む複数の異なる炭水化物フラグメントを含む多価免疫原性分子が提供され、前記キャリア分子は前記炭水化物フラグメントの免疫原性を増強する。

【0014】

本発明の一形態では、この炭水化物フラグメントは細菌莢膜オリゴ糖フラグメントである。このような莢膜多糖類フラグメントは、*S. pneumoniae*血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23F由来の少なくとも2種の莢膜多糖類を含む*Streptococcus pneumoniae*のオリゴ糖フラグメントであることが可能である。キャリア分子は、T細胞エпитープを含む*S. pneumoniae*の蛋白質または蛋白質フラグメントであることが可能である。

【0015】

莢膜多糖類フラグメントは、*N. meningitidis*のA、B、C、W-135およびY群の少なくとも2種の莢膜多糖類由来のフラグメントを含む、*Neisseria meningitidis*のオリゴ糖フラグメントであることが可能である。キャリア分子は、T細胞エпитープを含む*N. meningitidis*の蛋白質または蛋白質フラグメントであることが可能である。

【0016】

本発明のこの態様において使用した莢膜多糖類は、約1から約5kDaの大きさのオリゴ糖フラグメントであることが可能である。このようなフラグメントは、それぞれの莢膜多糖類を酸加水分解することによって得ることが可能である。このオリゴ糖フラグメントは、キャリア分子に結合させるため化学的に修飾することが可能である。

【0017】

キャリア分子は、少なくとも1つの機能性T細胞エпитープを含むオリゴ糖、または破傷風トキソイドなどのキャリア蛋白質であることが可能である。

【0018】

本発明の他の実施形態では、炭水化物フラグメントは腫瘍抗原に基づく炭水化物のフラグメントである。このような腫瘍抗原に基づく炭水化物は、Globo H、Le^yまたはSTnであることが可能である。

【0019】

本発明の他の態様では、少なくとも2種の異なる炭水化物分子を処理してそれらの炭水化物フラグメントを得、それぞれの炭水化物フラグメントをキャリア分子に抱合することを含む、多価免疫原性分子の形成法が提供される。

【0020】

一実施形態では、炭水化物分子は細菌の莢膜多糖類であり、莢膜多糖類のオリゴ糖フラグメントは2から5kDaの大きさから選択される。このようなオリゴ糖フラグメントは、通常*S. pneumoniae*および、*N. meningitidis*を含む同一の細菌の少なくとも2種の異なる血清型から得られる。

【0021】

本発明のこの実施形態では、このような多価免疫原性分子は、3種以上の化学的活性化莢膜多糖類またはそれらの誘導体を同時に単一のキャリア分子に任意に抱合させて、複合糖質を形成することによって実現することが可能である。この操作を図1に例示する。

【0022】

本発明のこの実施形態では、合理的なリジン枝分かれペプチド系を考案して部位指向的複合糖質形成に使用することが可能である。ペプチド合成中にリジン残基およびシステイン残基用の異なった側鎖保護基を使用して、活性化したオリゴ糖をこのような残基を介して選択的かつ逐次的に同一のキャリア分子に結合することが可能である。この操作を図2

10

20

30

40

50

に例示する。

【 0 0 2 3 】

部位指向的抱合の方法には、キャリア分子として複数抗原ペプチドをまず形成して、少なくとも2種のキャリアペプチドセグメントが異なる末端保護基を有するポリマーアンカーに固定することを含むことができる。その後保護基の1つを選択的に除去して、第1の1つのオリゴ糖フラグメントを保護していないキャリアペプチド部分に結合させる。他の保護基を選択的に除去して、第2の1つのオリゴ糖フラグメントを保護していないキャリアペプチド部分に結合させる。結合が所望される提供された数のキャリアペプチドおよびオリゴ糖フラグメントについて、この操作を繰り返すことが可能である。得られた分子をポリマーアンカーから切断する。

10

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに他の態様に従って、(1)請求項3に記載の複数の肺炎球菌複合糖質、(2)請求項6に記載の複数の髄膜炎菌複合糖質、および(3)免疫原性を有する合成PRP-ペプチド抱合体を含む、髄膜炎の予防のための免疫原性組成物を提供する。

【 0 0 2 5 】

この複数の肺炎球菌複合糖質は、S.pneumoniaeの血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fの少なくとも2種の莢膜多糖類から得ることが可能である。複数の髄膜炎菌複合糖質はN.meningitidisのA、B、C、W-135、およびY群の少なくとも2種の莢膜多糖類から得ることが可能である。

【 0 0 2 6 】

このような全般的な髄膜炎免疫原性組成物は、DTP-ポリオなどの少なくとも1つの他の抗原と一緒にして、多価ワクチンを提供することが可能である。

20

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、免疫有効量の本発明の免疫原性組成物を宿主に投与して免疫応答を起こす方法を含む。本発明は、髄膜炎に対する薬剤として使用する時の本明細書でクレームした免疫原性組成物、ならびに髄膜炎に対する薬剤製造における免疫原性組成物の個々の成分の使用にまで及ぶ。

【 0 0 2 8 】

本発明はさらに、本明細書で提供した多価免疫原性分子を使用した診断操作および診断キットも含む。したがって、本発明の他の態様では、本明細書で提供した多価免疫原性分子と特異的に反応する抗体の存在の測定方法を提供し、この測定方法は

30

(a) 試料を前記多価免疫原性分子と接触させ、この分子および分子と特異的に反応する試料に存在する前記抗体を含む複合体を生成することと、

(b) 複合体の生成を測定することを含む。

【 0 0 2 9 】

本発明のさらに他の態様では、本明細書で提供した多価免疫原性分子の存在を測定するA診断用キットを提供し、このキットは

(a) 多価免疫原性分子と、

(b) 多価分子を試料と接触させて多価分子および試料中に存在する前記抗体を含む複合体を生成する手段と、

40

(c) 複合体の生成を測定する手段とを含む。

【 0 0 3 0 】

したがって、本発明は、抗肺炎球菌由来の蛋白質ならびにCP抗体、たとえば、抗CP1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fと抗肺炎球菌表面蛋白質A抗体、または抗髄膜炎菌由来の蛋白質ならびにCP抗体、たとえば抗CP A、B、C、YおよびW-135および抗髄膜炎菌OMP 1型抗体を検出するための診断イムノアッセイ操作またはキットへの肺炎球菌グリコペプチド抱合体の利用を可能とする。

【 0 0 3 1 】

本発明のさらに他の態様では、試料中の多価免疫原性分子の存在を測定する方法が提供され、この方法は、

50

(a) 対象体を本明細書中に提供される免疫原性抱合体分子で免疫して、炭水化物フラグメントに特異的な抗体を産生する段階と、

(b) 炭水化物フラグメントに特異的な抗体を単離する段階と、

(c) 試料を単離した抗体と接触させて試料中に存在する前記多価免疫原性分子および前記単離した炭水化物フラグメント特異的抗体を含む複合体を生成する段階と、

(d) この複合体の生成を測定する段階を含む。

【0032】

本発明のさらに他の態様では、試料中における、本明細書中に提供される多価免疫原性分子に対する抗体の存在を測定する診断キットを提供し、このキットは、

(a) 多価免疫原性分子と、

(b) 多価分子と試料とを接触させて、多価分子と試料中に存在する前記抗体を含む複合体を形成する手段と、

(c) この複合体の生成を測定する手段を含む。

【0033】

本発明のさらに他の態様では、試料中の多価免疫原性分子の存在を測定する診断キットを提供し、このキットは、

(a) 多価免疫原性分子の炭水化物フラグメントに特異的な抗体と、

(b) 抗体を試料と接触させて、多価免疫原性分子およびこの抗体を含む複合体を生成する手段と、

(c) 複合体の生成を測定する手段を含む。

【0034】

本発明は、血清試料などの生物的試料中の *H i b*、*S . p n e u m o n i a e* および *N . m e n i n g i t i d i s* の存在を検出する診断用イムノアッセイキットの成分として、抗 *P R P*、抗肺炎球菌 *C P* および抗髄膜炎菌 *C P* 抗体の混合物を使用することにも及ぶ。

なお、本願の原出願において、その請求の範囲には、下記の発明が記載されている。

(請求項1)

少なくとも1つの機能性T細胞エピトープを含むキャリア分子、および

各々がそのキャリア分子に結合していると共に、各々が少なくとも1つの機能性B細胞エピトープを含んでいる複数種の異種炭水化物フラグメントを含んでなり、

前記キャリア分子が前記複数種の炭水化物フラグメントに高められた免疫原性を付与することを特徴とする多価免疫原性分子。

(請求項2)

前記炭水化物フラグメントが細菌莢膜のオリゴ糖フラグメントであることを特徴とする請求項1に記載の多価免疫原性分子。

(請求項3)

前記莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Streptococcus pneumoniae*の莢膜オリゴ糖フラグメントであることを特徴とする請求項2に記載の多価免疫原性分子。

(請求項4)

前記莢膜オリゴ糖フラグメントが、*S. pneumoniae*の血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fのうちの少なくとも2つの莢膜多糖類から誘導されていることを特徴とする請求項3に記載の多価免疫原性分子。

(請求項5)

前記キャリア分子が、T細胞エピトープ含有蛋白質または*S. pneumoniae*の蛋白質フラグメントであることを特徴とする請求項4に記載の多価免疫原性分子。

(請求項6)

前記莢膜オリゴ糖フラグメントが、*Neisseria meningitidis*の莢膜オリゴ糖フラグメントであることを特徴とする請求項2に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 7)

前記オリゴ糖フラグメントが、N. meningitidisの群 A、B、C、W - 135 および Y のうちの少なくとも 2 つの莢膜オリゴ糖から誘導されていることを特徴とする請求項 6 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 8)

前記キャリア分子が、T 細胞エピトープ含有蛋白質または N. meningitidis の蛋白質フラグメントであることを特徴とする請求項 7 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 9)

前記オリゴ糖フラグメントが、約 2 kDa ~ 約 5 kDa の大きさであることを特徴とする請求項 2 に記載の多価免疫原性分子。

10

(請求項 10)

前記キャリア分子が、少なくとも 1 つの機能性 T 細胞エピトープを含むオリゴペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 11)

前記キャリア分子が、キャリア蛋白質であることを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 12)

前記キャリア蛋白質が、破傷風トキソイドであることを特徴とする請求項 11 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 13)

20

前記炭水化物フラグメントが、炭水化物系の腫瘍抗原のフラグメントであることを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 14)

腫瘍抗原が、G l o b o H、L e^Yまたは S T nであることを特徴とする請求項 13 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 15)

部位特異的な糖接合により作製されることを特徴とする請求項 1 に記載の多価免疫原性分子。

(請求項 16)

多価免疫原性分子を形成する方法であって、
少なくとも 2 つの異なる炭水化物分子を処理してその炭水化物フラグメントを取得し、
その炭水化物フラグメントの各々をキャリア分子に接合させる
ことを含んでなる方法。

30

(請求項 17)

前記炭水化物分子が、細菌の莢膜多糖類であり、前記莢膜多糖のオリゴ糖フラグメントが、約 2 kDa ~ 約 5 kDa の大きさに選択されることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

(請求項 18)

前記接合工程が、前記多糖フラグメントの前記キャリア分子へのランダム接合により行われることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

40

(請求項 19)

前記接合工程が、部位特異的な糖接合により行われることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

(請求項 20)

前記部位特異的な糖接合が、
まず、キャリア分子として、少なくとも 2 つのキャリア・ペプチド・セグメントが異なる末端保護基を有する、ポリマーアンカーに固定された複合抗原ペプチドを形成し、
保護基の 1 つを選択的に除去し、オリゴ糖フラグメントの最初の 1 つを非保護キャリア・ペプチド・セグメントに結合させ、
保護基のもう 1 つを選択的に除去し、オリゴ糖フラグメントの次の 1 つを非保護キャリ

50

アペプチドセグメントに結合させ、ならびに、

得られる分子をポリマーアンカーから分離することにより行われることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

(請求項 21)

髄膜炎に対して保護するための免疫原性組成物であって、

(1) 請求項 3 に記載の多種肺炎球菌糖接合体、

(2) 請求項 6 に記載の多種髄膜炎菌糖接合体、および

(3) 免疫原性合成 P R P ペプチド接合体

を含んでなる免疫原性組成物。

(請求項 22)

さらに、少なくとも 1 つのさらなる抗原を含むことを特徴とする請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

(請求項 23)

請求項 3 に記載の前記多種肺炎球菌糖接合体が、*S. pneumoniae* 血清型 1、4、5、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導され、請求項 6 に記載の前記多種髄膜炎菌糖接合体が、*Neisseria meningitidis* 血清型 A、B、C、Y および W - 135 のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されることを特徴とする請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

(請求項 24)

請求項 21 に記載の免疫原性組成物の免疫有効量を宿主に投与することを含んでなる、免疫応答を発生させる方法。

(請求項 25)

請求項 1 に記載の多価免疫原性分子に特異的な反応性を示す抗体の存在を検出する方法であって、

(a) サンプルを前記多価免疫原性分子に接触させて、その分子および、サンプル中に存在する、それに特異的な反応性を示す抗体を含んでなる複合体を形成し、

(b) その複合体の形成を検出する

ことを含んでなる方法。

(請求項 26)

前記多価免疫原性分子が、請求項 3 に記載の多種肺炎球菌糖接合体であることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

(請求項 27)

前記多種肺炎球菌糖接合体が、*S. pneumoniae* 血清型 1、4、5、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されていることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

(請求項 28)

前記多種肺炎球菌糖接合体が、請求項 6 に記載の髄膜炎菌糖接合体から誘導されることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

(請求項 29)

前記多種髄膜炎菌糖接合体が、*N. meningitidis* 血清型 A、B、C、Y および W - 135 のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されていることを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

(請求項 30)

サンプル中における請求項 1 に記載の多価免疫原性接合体分子の存在を検出する方法であって、

(a) 対象体を免疫原性接合体分子で免疫して、炭水化物フラグメントに特異的な抗体を産生する工程、

(b) 炭水化物フラグメントに特異的な抗体を単離する工程、

(c) サンプルを単離された抗体に接触させて、サンプル中に存在する前記多価免疫原性分子、および前記単離された炭水化物フラグメントに特異的な抗体を含んでなる複合体

10

20

30

40

50

を形成する工程、および

(d) 複合体の形成を検出する工程
を含んでなる方法。

(請求項 31)

前記多価免疫原性分子が、請求項 3 に記載の多種肺炎球菌糖接合体であることを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

(請求項 32)

前記多種肺炎球菌糖接合体が、*S. pneumoniae* 血清型 1、4、5、6B、9V、14、18C、19F および 23F のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されていることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

10

(請求項 33)

前記多種肺炎球菌糖接合体が、請求項 6 に記載の髄膜炎菌糖接合体から誘導されていることを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

(請求項 34)

前記多種髄膜炎菌糖接合体が、*N. meningitidis* 血清型 A、B、C、Y および W のうちの少なくとも 2 つの莢膜多糖類から誘導されていることを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

(請求項 35)

サンプル中における請求項 1 に記載の多価免疫原性分子に対する抗体の存在を検出する診断キットであって、

20

(a) 多価免疫原性分子、

(b) この多価分子をサンプルに接触させて、この多価分子および、サンプル中に存在する、何れかの前記抗体を含んでなる複合体を形成する手段、および

(c) 複合体の形成を検出する手段

を含んでなる診断キット。

(請求項 36)

請求項 1 に記載の前記免疫原性接合体分子が、請求項 21 に記載の免疫原性組成物の形態として存在することを特徴とする請求項 35 に記載のキット。

(請求項 37)

サンプル中における多価免疫原性分子の存在を検出する診断キットであって、

30

(a) 請求項 1 に記載の多価免疫原性分子の炭水化物フラグメントに特異的な抗体、

(b) この抗体をサンプルに接触させて、前記多価免疫原性分子の何れかおよびこの抗体を含んでなる複合体を形成する手段、および

(c) 複合体の形成を検出する手段

を含んでなる診断キット。

(請求項 38)

前記抗体が、請求項 21 に記載の免疫原性組成物の構成要素に対する抗体であることを特徴とする請求項 37 に記載のキット。

(請求項 39)

髄膜炎に対する薬剤としての用途を有することを特徴とする請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

40

(請求項 40)

髄膜炎に対する保護のための薬剤の製造における、請求項 21 に記載の免疫原性組成物の個々の構成要素の使用。

【発明の効果】

【0035】

本発明は、特定の新規多価免疫原性オリゴ糖、およびその調製における新規接合手順、ワクチンとしてのその用途、および診断用途のための抗体を提供する際におけるその利用を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【0036】

本発明は、添付した図面を参照して、以下の説明および特定の実施例によってさらに理解されるであろう。

【0037】

(発明の一般的な説明)

前述したように、本発明はH. influenzae、N. meningitidis、S. pneumoniae、E. coli、およびB群Streptococcusなどの細菌の複数のオリゴ糖、または炭水化物をベースとした腫瘍抗原のいずれかを同じキャリアタンパク質またはポリペプチドに共有結合するために使用することのできる、新規の糖抱合技術およびそれらによって生成した多価分子に関するものである。

10

【0038】

強力で長時間続く液性免疫を引き起こすためには、リンパ球の少なくとも2種の異なるサブセットによって異種抗原を認識する必要がある。Bリンパ球(B細胞、骨髄由来のリンパ球)は抗体形成細胞の前駆体であり、Tリンパ球(T細胞、胸腺由来のリンパ球)はB細胞の機能を調節する。

【0039】

ほとんどのCPはT細胞非依存性抗原であり、B細胞を直接刺激して抗体を産生させることができる。一般に、CPはB細胞を誘導して、最終的に抗体分泌細胞(形質細胞)に分化するが、抗体反応は短命で、応答するB細胞の数によって限定される。

【0040】

蛋白質およびペプチドは、T細胞依存抗原で、B細胞および引き金となるヘルパーT細胞上にペプチド:MHCクラスII複合体を形成することができるエピトープを含み、B細胞活性化およびクローンの拡大を助ける細胞結合性サイトカインおよび分泌性サイトカイン(エフェクター分子)の両者を合成する。

20

【0041】

CPはキャリア蛋白質またはT細胞エピトープに結合することによってT依存性抗原に変換することができる(参考文献9、米国特許第4496538号)。CP-蛋白質抱合体で繰り返し免疫することによって、ワクチン接種を受けた人のB細胞集団は抗体産生をするだけでなく、複製し成熟する。結果的に、抗CP抗体を生成するB細胞が多くなり、ブースターに応答して抗体力価が高くなる。

30

オリゴ糖を抗原として使用する理論的根拠

免疫原性のある糖タンパク質抱合体を作製する最低限の必要条件是、CPのB細胞エピトープとキャリアのT細胞エピトープが共有結合した後も機能的であるということである。2つ以上のCPを同一のキャリアタンパク質又はT細胞エピトープに無作為に接合させるためには、炭水化物のサイズを約2kDa~約5kDaに減らして、立体障害効果が起きないようにする。少なくとも2つの異なったアプローチを用いて複数のオリゴ糖をキャリアタンパク質に共有結合することができる。第1のアプローチは、同一の化学反応を用いてオリゴ糖を活性化又は誘導してそのキャリアへの接合を同時に達成することである(図1)。第2のアプローチでは、部位特定の糖共役のためにリジンが分枝したペプチドシステムを使用する。ペプチド合成の間、リジン残基とシステイン残基に対して別々の側鎖保護基を用いて、このような残基を介して活性化されたオリゴ糖を選択的に順次、同一のキャリアタンパク質に結合することができる(図2)。

40

【0042】

オリゴ糖の調製

以下の実施例に詳細を説明するように、様々な血清型の肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)莢膜多糖類(>50kDa)の酸性加水分解を行って、分子量が約2~約5kDaの範囲のオリゴ糖を形成してもよい。この工程には3つのステップ:(1)アルゴン又はその他の適当な不活性ガスのもとでの密閉したバイアル内におけるCPの酸加水分解、(2)凍結乾燥及び(3)ゲル濾過クロマトグラフィーによるオリゴ糖の精製、を含

50

んでもよい。肺炎連鎖球菌の血清型 1、4、5、9 V 及び 14 由来の CP の酸加水分解の条件はすでに最適化されている。

【0043】

典型的には、0.5 M のトリフルオロ酢酸 (TFA) 中で、約 50 ~ 約 95 にて約 5 ~ 約 10 時間 CP (2 mg / mL) をインキュベートする。血清型 6 B 及び 19 F 由来の CP は不安定なホスホジエステル結合を含んでいるので、加水分解は、穏やかな酸性条件 (約 10 ~ 約 50 mM の酢酸) で約 50 ~ 約 100 にて約 30 ~ 約 48 時間行う。血清型 23 F の CP は、約 0.1 ~ 約 0.5 M のトリフルオロ酢酸 (TFA) 中で約 70 にて約 2 ~ 約 4 時間、又は約 1 ~ 約 50 mM の酢酸中で約 80 ~ 約 110 にて約 40 ~ 約 60 時間インキュベートすることによって部分的に加水分解することができる。

10

【0044】

各加水分解終了時に反応溶液を水で 5 倍に希釈し、次いで凍結乾燥する。未精製のオリゴ糖の精製は、Sephadex (登録商標) G-100 ゲル濾過クロマトグラフィー (約 2 × 約 210 cm のカラム) 又はその他の適するゲル濾過カラムを用いて行う。クロマトグラフィーの典型的な結果を図 3 に例示する。レゾルシノール / 硫酸アッセイ (参考文献 12) を用いて、炭水化物の存在について各分画を調べる。溶出パターンをプロットし、平均分子量約 2 ~ 約 5 kDa のクロマトグラフィーで精製されたオリゴ糖をプールする。カラムの校正に用いた分子量マーカーは、デキストラン標品 (39, 100 及び 8, 800 Da)、合成 PRP ヘキサマー (2, 340 Da)、スクロース (342 Da) 及びグルコース (180 Da) である。約 2 ~ 約 5 kDa のサイズにしたオリゴ糖は、一般に約 4 ~ 約 8 の反復単位を含有しており、少なくとも 1 つの B 細胞エпитープを含有することが予想される。そのようなオリゴ糖の収率は約 70 ~ 約 90 % である。このようにクロマトグラフィーで精製したオリゴ糖は、肺炎連鎖球菌由来のタンパク質中の T 細胞エпитープを含有する複数抗原ペプチドシステム (MAP)、あるいはキャリアタンパク質に共有結合させた複数のオリゴ糖から成る糖抱合体を調製するために利用される。

20

【0045】

以下の実施例で詳細に説明するように、種々の血清型の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 荚膜多糖類 (>10kDa) の酸加水分解を行って平均分子量約 2 ~ 約 5 kDa のオリゴ糖を形成してもよい。肺炎球菌の CP 酸加水分解には共通して、工程には、凍結乾燥及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いた精製が含まれる。

30

【0046】

髄膜炎菌の群 C、W-135 と Y 由来の CP の酸加水分解の条件は、最適化されている。典型的には、アルゴン又はその他の適する不活性ガスのもとで密閉したバイアル中で、約 65 ~ 約 100 にて、約 8 ~ 約 12 時間、pH 約 4.5 ~ 5.5、約 20 ~ 80 mM の酢酸ナトリウムと CP (10 mg / mL) を混合する。B 群の CP は酸性条件下では分子内エステル化を受ける可能性があるので、C 群 CP の加水分解で用いた条件を採用するが、インキュベートする時間は約 1 時間に制限され、反応の pH は約 0.1 M の NaOH により直ちに pH 7 に調整し、エステル化工程を反転させる。A 群の CP は不安定ホスホジエステル結合を含有するので、穏やかな酸性条件 (たとえば約 10 ~ 約 20 mM の酢酸) のもとで加水分解し、約 50 ~ 約 100 にて約 30 ~ 約 48 時間インキュベートする。各加水分解終了時に、5 倍の水で反応溶液を希釈し、凍結乾燥する。未精製のオリゴ糖は Sephadex (登録商標) G-100 ゲル濾過クロマトグラフィー (約 2 × 約 210 cm のカラム、上を参照) により分画する。典型的なクロマトグラフィーの結果を図 4 に例示する。

40

【0047】

レゾルシノール / 硫酸アッセイ (参考文献 12) を用いて、シアル酸の存在について分画を調べる。溶出パターンをプロットし、クロマトグラフィーで精製された約 2 ~ 約 5 kDa のオリゴ糖をプールする。約 2 ~ 約 5 kDa のサイズのオリゴ糖は、典型的には約 6 ~ 約 15 の反復単位を含有しており、少なくとも 1 つの B 細胞エпитープを含有すると予想される。そのようなオリゴ糖の収率は約 40 ~ 約 80 % である。このようにクロマトグ

50

ラフィーで精製したオリゴ糖は、髄膜炎菌由来のタンパク質のT細胞エピトープを含有する複数抗原ペプチドシステム(MAP)またはキャリアタンパク質に共有結合された複数のオリゴ糖から成る糖抱合体を調製するために利用される。

【0048】

その他の細菌の莢膜多糖類についても、同様の方法を用いてもよい。

【0049】

キャリアの選択

たとえば、ニューモリシン(参考文献13)、肺炎球菌由来表面タンパク質A(PspA)(参考文献14)、肺炎連鎖球菌37kDaタンパク質(SP37)(参考文献15)、髄膜炎菌由来トランスフェリン結合タンパク2(Tbp2)(参考文献16)、髄膜炎菌由来ピリン(参考文献17)、及びクラス1タンパク質(参考文献18)のような肺炎球菌及び髄膜炎菌由来の膜タンパク質が、有力な防御抗原として同定されているが、今のところ、その何れも臨床試験で検証されていない。このようなタンパク質は、従来のアルゴリズムを用いて同定された有望なT細胞エピトープを含有している。従って、ここでの多価の免疫原性分子を形成するため、髄膜炎菌及び肺炎球菌由来のオリゴ糖との接合に対して、有望なペプチド・キャリアの一団を選択してもよい。

【0050】

本発明では、オリゴ糖と結合すべきペプチド(表1; SEQ ID NOS: 1~8)は、そのヘルパーT細胞の潜在的な刺激能、又は潜在的な防御能力、又はT細胞のメモリを呼び覚ますのに重要な配列の保存のいずれかに基づいて選択される。NMTBP2(SEQ ID NO: 1)は、髄膜炎菌Tbp2タンパク質のペプチド断片であり、機能的なT細胞エピトープ及びTbp2特異的MAbにより認識される株特異的防御B細胞エピトープの両方を含有することが以前同定されている(この文書の譲受人に譲渡され、その開示は本明細書に参考として組み入れられる米国特許第5,708,149号; WO95/13370)。ペプチドNMC-1及び-2(SEQ ID NOS: 2及び3)は髄膜炎菌クラス1タンパク質(参考文献19)の免疫優性ヒトT細胞エピトープを含有することが同定された。NMPi-1(SEQ ID NO: 4)は髄膜炎菌ピリントタンパク質に由来し、接着に関与する配列を含有することが示された(参考文献17)。ペプチドPN(123~140; SEQ ID NO: 5)及びPN(263~281; SEQ ID NO: 6)は肺炎球菌ニューモリシンに由来し、両者は機能的T細胞エピトープを含有している(参考文献20)。SP37(SEQ ID NO: 7)は、肺炎連鎖球菌37kDaタンパク質のN末端断片であり、ウサギにおける免疫原性試験において高い免疫原性を示している。PSP-AA(SEQ ID NO: 8)は、肺炎連鎖球菌PspAタンパク質のN末端断片であり、マウスにおける肺炎球菌の生菌チャレンジに対して防御免疫反応を引き出す能力があることが示されている(参考文献14)。

【0051】

動物モデルにおける多種オリゴ糖-キャリア抱合体の免疫原性

A. 無作為共役法(図1)

本発明では、細菌の莢膜多糖類を加水分解して低分子量のオリゴ糖にするのに酸が用いられている。オリゴ糖は精製することができ、アンモニア又はジアミノエタンと反応させてその還元末端で遊離の末端アミノ基を作製することができる。次いでアミノ基を過剰のアジピン酸のスクシニミジルエステルと反応させ、活性のあるスクシニミジルエステル基をオリゴ糖に導入する。活性化されたオリゴ糖は次いでキャリアタンパク質又はペプチドのアミノ基と反応させて共有アミド結合を形成する。糖抱合体はタンパク質/ペプチド分子当たり少なくとも2つの結合したオリゴ糖を含む。

【0052】

抗リンカー抗体反応を回避するために、Jennings及びLugowsky(参考文献6)により記載された還元アミノ化法を用いてオリゴ糖をキャリアに直接結合することができる。この後者の方法の有利な点は、リンカー分子が不必要なので、新抗原基形成の可能性が除外され、極めて安定な第二級アミン、又は場合によっては第三級アミン結合

10

20

30

40

50

がオリゴ糖とタンパク質との間に形成されることである。さらに、酸化は分枝側鎖又は主鎖の環状糖残基上で起きるので、過ヨウ素酸塩によるほとんどの髄膜炎菌及び肺炎球菌の莢膜多糖類の処理では、多糖類又は断片の分子量の減少は起きない。どちらの場合も、主鎖は切断されず、分子量は元のままである。

【 0 0 5 3 】

本発明の多価分子を利用する可能性を評価するために、肺炎連鎖球菌血清型 6 B、1 4、1 9 F 及び 2 3 F 由来のオリゴ糖を図 1 に示すように無作為に T T に共有結合させた。出来上がった多抗原性糖抱合体 (M A G) をゲル濾過クロマトグラフィーで精製した (図 5)。タンパク質と炭水化物の分析は、炭水化物対タンパク質のモル比が 7 . 1 : 1 であることを示した。比較試験のために同じ方法によって 4 つの各血清型の断片からそれぞれ 4 つの抱合体 (6 - T T、1 4 - T T、1 9 R - T T 及び 2 3 F - T T) を調製した。複数の抗原を持つ糖抱合体 (M A G) をフロインド完全アジュバント (F C A) 又はアルムのどちらかで処方した。ウサギ及びマウス (B A L B / c) における免疫原性試験の結果は以下のものであった：

- a . F C A をアジュバントとして用いた場合、4 つの血清型 C P すべてに対する強い抗体反応がウサギで観察された (図 6)。力価は個々の抱合体で得られたものについて同等であった。
- b . ウサギにおいてアルムをアジュバントとして用いた場合、抗 - 1 4、- 1 9 F 及び - 2 3 F 抗体反応は認められたが、抗 - 6 B 反応は見られなかった (図 7)。
- c . B A L B / c マウスでは、抗 - 1 4 及び抗 - 1 9 F 抗体だけが導き出された (図 8)。

【 0 0 5 4 】

抗 - 肺炎球菌抗体の生物活性は 2 つの異なった方法によって測定することができる： *i n v i t r o* では、オプソニン貪食アッセイを用い、*i n v i v o* では能動免疫又は受動免疫を用いた動物防御試験による。以前の研究 (参考文献 2 1 及び 2 2) で抗 - 肺炎連鎖球菌 C P 抗体は生物活性を持ち、防御能を持つことが示されている。E L I S A の全 I g 抗体力価とオプソニン作用の力価との間には直接的な相関があった。従って、動物モデルにおいて抗 - 肺炎連鎖球菌 C P 抗体反応を引き出すことができる肺炎球菌 M A G のワクチンの候補は、ヒトの免疫に有用であろう。

【 0 0 5 5 】

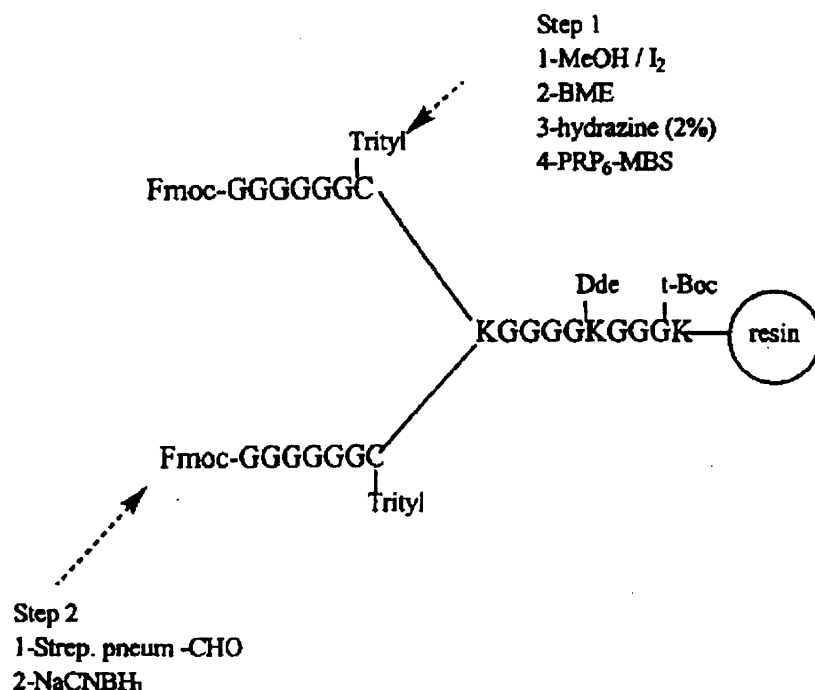
図 1 に概略的に示した方法に従い、上で説明したように C、W および Y 群オリゴ糖を含有する髄膜炎菌由来の糖抱合体を調製した。複数の抗原性を持つ糖抱合体をゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。炭水化物対タンパク質のモル比は 6 . 6 : 1 であった。ウサギにおける免疫原性試験では、髄膜炎菌 M A G は、炭水化物特異的な E L I S A において 3 つの多糖類 (C、W 及び Y 群) 全てに対して抗体反応を引き出すことができ (図 9)、抗血清は陰性対照として用いた肺炎球菌 6 B の P C に反応性を持たないことが示された。W 及び C 群に対する抗体の反応性は似ていた (相乗平均力価 (G M T) は約 3 0 0 0)。この多価糖抱合体では C 群の免疫原性は弱く、G M T は約 5 0 0 であった。

B . 複数の抗原性を持つペプチド (M A P) による方法 (図 2)

本発明で我々は、いくつかの異なったオリゴ糖が選択的に、順次結合することができる、異なったヘルパー T 細胞エпитープを含有する、新規のリジン分枝ペプチド (複数の抗原性を持つペプチド、M A P) を設計し、合成する方法を提供する。この概念を試すために、以下に示すように樹脂に結合した M A P を合成し、性状分析を行った。

【 0 0 5 6 】

【化 1】



10

20

【 0 0 5 7 】

置換レベルが $180 \mu\text{mol/g}$ の Fmoc-Lys(t-Boc)-TGA (500 mg 、BACHEMより購入)を用いてMAPを調製した。標準Fmoc化学反応結合プロトコルを用いた(4倍過剰のFmoc保護アミノ酸、O-ベンゾトリアゾイル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸(HBTU)及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)/ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)で1時間(実施例6))。オリゴ糖の共役を促進するために、最初のFmoc-Gly残基が結合すると置換レベルを $50 \mu\text{mol/g}$ に落した。合成が完了すると、MAP-樹脂のごく一部をエタンジチオール(EDT)及びチオアニソールの存在下にて95%トリフルオロ酢酸で切断した。アミノ酸分析は、切断されたMAPが正しいアミノ酸組成を有することを示した。

30

【 0 0 5 8 】

ジメチルホルムアミド(DMF)中のジチオアニソール(DTT)でMAP(150 mg)を処理し、たとえばm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミド(MBS)のようなSHに向けられた官能基で誘導された、オリゴ糖に共役すべきシステイン残基からトリチル基を除いた。還元後、次いでアミノ基及びスルフヒドリル基について出来上がったMAP樹脂を調べた。エラム(Elam's)のアッセイ法から、SHの置換レベルはMAP樹脂のグラム当たり $64 \mu\text{mol}$ であることが判明し、アミノ基の置換の程度は、ニンヒドリン反応より $71 \mu\text{mol/g}$ であることが判明した。このような結果は、トリチル及びFmoc保護基を量的に除くことができることを示した。

40

【 0 0 5 9 】

MBS(参考文献23)で誘導された3-β-D-リボース-(1-1)-D-リビトール-5-リン酸の合成ヘキサマーから調製された(PR_P)₆-MBSをDMF/OBS溶液に溶解し、次いで、脱ガス条件下で完全に保護を外し、還元したMAPに結合した。結合後、スルフヒドリル基を測定するためにMAP-(PR_P)₆-をエルマン(Elman's)試験にかけた。SH置換のレベルは、樹脂のグラム当たり 6.85 mmol に低下した。PR_Pの結合は、リボース反応で独立に確認し、樹脂のmg当たり $18 \mu\text{g}$ の(PR_P)₆であることが判明した。

【 0 0 6 0 】

50

出来上がったMAP - (PRP)₆を、NaCNBH₃の存在下38℃にて6日間、メタノール/リン酸緩衝液(pH7.8)中で、過ヨウ素酸で酸化した肺炎連鎖球菌の血清型19F(1eq.)と混合した。結合後、ニンヒドリン反応によって測定されたアミノ基の置換は、樹脂のグラム当たり16μmolであることが判った。糖の総含量は再び樹脂のグラム当たり16.1mgであることが判明した。エタンジチオール(EDT)とチオアニソールの存在下、ごくわずかな19F - (PRP)₆ - MAP糖抱合体 - 樹脂を95%のTFAで切断した。精査の後、MAP - 糖抱合体は正しいアミノ酸組成と炭水化物含有量を有していることが判明した。このような結果は、異なったオリゴ糖を選択的に順次MAP樹脂に結合することができることを強く示唆している。

【0061】

異なったT細胞エピトープを含有するMAP樹脂を合成する前に、肺炎連鎖球菌膜タンパク質、ニューモリシンに由来するT細胞エピトープである、PN(123~140)(SEQ ID NO:5)又はPN(263~281)(SEQ ID NO:6)のどちらかに相当する樹脂結合線状ペプチドへの結合効率について、過ヨウ素酸で酸化した、血清型6B、14及び23Fの肺炎球菌由来のオリゴ糖を調べた。還元アミノ化を用いて、線状糖ペプチド、6B - PN(123~140)、14 - PN(263~281)及び23F - PN(123~140)を調製した。ニンヒドリン反応を用いて遊離アミノ基を測定することにより判定すると、オリゴ糖の樹脂結合ペプチドへの結合効率は10%~30%であることが判明した。95%TFAを用いて糖ペプチドを樹脂から切断し、次いでRP - HPLCによって半精製した。ウサギにおける免疫原性試験は、FCA/IFA中で処方したこのような線状糖ペプチドの「等モル」混合物を用いて行った。結果は、糖ペプチド抱合体は免疫原性があり、抗 - 6B、抗 - 14、及び抗 - 23F多糖類抗体反応を引き出す(図10)ことを示した。さらに、ペプチド特異的ELISAで判定されるように、ウサギの抗血清はペプチドと反応した(表2)。

【0062】

図2に示すように、50μmol/gの置換レベルを持ったFmoc - Gly - Lys - TGA樹脂を用いて、異なった肺炎連鎖球菌の膜タンパク質に由来する3つのT細胞エピトープを含有するMAP樹脂を合成した。上で説明した最適化されたFmoc化学反応結合プロトコルを用いて、合成全体は手動で行った。反応が完了した時点で、ごくわずかのMAP - 樹脂をEDTとチオアニソールの存在下にて95%のTFAで切断し、切断されたMAPはアミノ酸分析により正しいアミノ酸組成を有することが判明した。DTTによりMAP樹脂を還元し、システイン残基からt - ブチルチオ保護基を除いた。過剰に洗浄した後、MAP樹脂をDMF/PBS溶液に再浮遊し、4倍過剰の肺炎連鎖球菌血清型14(Os14)由来のスルホスクシニミジル(4 - ヨードアセチルアミノ安息香酸(スルホSIB)活性化オリゴ糖と混合した。室温にて一晩混合した後、濾過によりMAP樹脂を回収し、PBS、DMF、次いでメタノールにて洗浄した。

【0063】

MAP - Os14をエルマン試験にかけ、スルフヒドリル基を測定した。SH置換のレベルは出発値の半分であることが判明した。再結合はMAP樹脂に結合するOs14の量を増やさなかった。Os14に見い出される炭水化物である、N - アセチルガラクトサミン(GlcNAc)の存在は、独立に炭水化物分析によって確認した。

【0064】

MAP - Os14をまず1%のTFAで処理し、Mtt - リジン残基からMtt(リジン保護基)を除き、次いで、弱塩基、1%のジイソプロピルエチルアミン(DIEA)/DMFで中和した。遊離アミノ基の存在は、ニンヒドリン試験により測定し、90%以上のMtt基が除かれたことが示された。

【0065】

PBSにMAP - Os14樹脂を再浮遊し、次いでNaCNBH₃の存在下38℃にて6日間、DMF/リン酸緩衝液(pH7.8)中で過ヨウ素酸で酸化した肺炎連鎖球菌血清型6Bオリゴ糖(Os6B)の4つの同等物と混合した。ニンヒドリン反応で測定した

10

20

30

40

50

アミノ基の置換は、最初の値の80～90%であることが判明した。2回目及び3回目の結合は、Os 6 BのMAP - Os 1 4樹脂への結合を改善しなかった。結合効率は乏しかったが(約15%)Os 6 Bに見い出される炭水化物であるリビトールの存在は、炭水化物分析で確認した。

【0066】

MAP - Os 1 4 - Os 6 B抱合体をDMF中20%のピペリジンで処理して、Fmoc - リジン残基からFmoc保護基を取り除いた。洗浄した後、MAP - Os 1 4 - Os 6 B樹脂を、次いでNaCNBH₃の存在下38℃にて6日間、DMF/リン酸緩衝液(pH7.8)中で、4倍過剰の、過ヨウ素酸で酸化した肺炎連鎖球菌血清型19Fオリゴ糖(Os 1 9 F)と混合した。結合後、ニンヒドリン反応により測定したアミノ基の置換の程度は、約90%であることが判明した。結合反応を繰り返して、その効率は約15%であった。しかしながら、Os 1 9 Fに見い出される糖である、N - アセチルマンノースの存在は、炭水化物分析で検出された。EDTとチオアニソールの存在下でごく少量のMAP糖抱合体樹脂を95%TFAで切断した。精査の後、アミノ酸組成及び炭水化物含有量についてMAP - 糖抱合体を測定し、正しいアミノ酸組成及び炭水化物含有量を有することが判明した。

【0067】

全体的な収率は極めて低い、にもかかわらず、このような結果は、異なったオリゴ糖を選択的に順次MAP樹脂に結合できることを明らかにしている。さらにその上、ウサギにおける免疫原性試験によって、このMAP糖抱合体は免疫原性があり、多糖類19F及び14に対して強い抗体反応を(GMTは約3000)引出し、しかし抗6B IgG反応は極めて弱いことが示された(図11)。19F及び14多糖類に対する抗体価は、TTに結合した多価オリゴ糖をウサギに免疫して得られる抗体価よりも有意に低かったが(図7)、我々は依然として肺炎球菌の多価MAP抱合体の候補ワクチンはヒトの免疫に有用であると期待している。さらに、ペプチド特異的ELISAにおいてウサギの抗血清は、T細胞ペプチドと強く反応した(表3)。

【0068】

合成グリコペプチド接合技術の利用

本発明の好適な態様において、複合糖質技術は一般に病原被胞性細菌に対する接合体ワクチンの調製に利用することができる。このように、本発明の複合糖質技術は予防接種に応用して、潜在的な保護多糖抗原を発現する細菌、例えば、ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenza)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、サルモネラ・ティフィ(*Salmonella typhi*)、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、および緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)などの感染に対し防御力を付与する。

【0069】

特定の態様においては、合成複合糖質技術を応用し、グロボ(Globo)H、Le^yおよびSTnなど炭水化物ベース腫瘍抗原のフラグメントを含むタンパク質およびオリゴ糖に対する抗体を引き出すワクチンを製造することができる。かかるワクチンは、例えば、腫瘍細胞に対する免疫の誘導、または化学療法剤もしくは生物活性剤に接合し得る抗腫瘍抗体の産生に使用することができる。

【0070】

本発明の範囲内には上記特異ペプチドのいずれかの変異体または機能的に等価の変異体をも含むことが理解される。上記使用の用語「変異体」または「機能的に等価の変異体」は、もし該ペプチドが1以上のアミノ酸残基の付加、欠失または誘導化によっていずれかの点で修飾されているものであり、かつ、本明細書記載の特異ペプチドと同様の様式で作用するならば、本発明の範囲内に包含される。これらのペプチド(表1)および同様ペプチドの配列が判明すれば、これらは市販のペプチド合成機、例えば、アブライド・バイオ

システムズ・モデル 430A などにより容易に合成されるか、または組換え DNA 技術により生産し得る。

【0071】

当業者には明瞭なことであるが、本発明の多様な態様は、感染のワクチン、診断と治療の分野、および免疫学的試薬の生成において多くの応用性を有する。さらなる非制限的なかかる用途の検討が以下にさらに提示される。

ワクチンの調製および用途

上に述べたように、本発明はその一態様において、例えば、ワクチンとして使用するのに適した免疫原性組成物製剤用の多価免疫原性接合体を提供する。該免疫原性組成物はそれを投与した宿主による免疫応答、例えば、宿主による抗体の産生を引き出す。

10

【0072】

該免疫原性組成物は注射剤として、または溶液もしくはエマルジョンとして調製し得る。抗原および免疫原性組成物はそれと両立し得る生理学的に許容し得るキャリアと混合してもよい。これらは水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびその併用を包含する。該ワクチンはさらにその有効性を高めるために、湿潤剤または乳化剤または pH 緩衝剤などの補助物質をさらに含んでもよい。ワクチンは皮下または筋肉内注射により投与することができる。

【0073】

別法として、本発明により形成される免疫原性組成物は、粘膜表面に免疫応答を引き出すように製剤化し、送達する。かくして、免疫原性組成物は、例えば、鼻腔または経口（胃内）経路により粘膜表面に投与することができる。別法として、他の投与形態、例えば、坐剤が望ましい。坐剤用の結合剤および担体としては、例えば、ポリアルキレングリコールおよびトリグリセリドを包含する。経口製剤は通常使用される賦形剤、例えば、医薬基準のサッカリン、セルロースおよび炭酸マグネシウムなどを含んでもよい。

20

【0074】

これらの組成物は溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、持続放出製剤または粉末の形状をとることが可能であり、本発明の免疫原性組成物を 1 ないし 95 % 含有する。

【0075】

該免疫原性組成物は投与用量製剤と両立し得る様式で、かつ、治療的に有効で、防御的および免疫原的となる量で投与する。投与すべき量は免疫すべき被験者、例えば、抗体を合成し、要すれば、細胞介在免疫応答を生じる被験者の免疫系許容能力に依存する。投与すべき抗原および免疫原性組成物の正確な量は医師の判断による。しかし、適切な容量範囲は当業者が容易に決定し得るものであり、マイクログラムからミリグラムの次数である。適切な最初の投与およびブースター用量の処方の変動可能であるが、最初の投与とそれに引続く投与からなる。ワクチンの投与量も投与経路に依存し、宿主の大きさによって変化する。

30

【0076】

本発明による免疫原組成物中の抗原濃度は一般に約 1 ~ 95 % である。病原 1 種のみの抗原性物質を含むワクチンは単価ワクチンである。数種の病原抗原性物質を含むワクチンは混合ワクチンであり、やはり本発明に属する。かかる混合ワクチンは、例えば、種々の病原からの、または同じ病原の種々の株からの物質、または種々病原の組み合わせからの物質を含む。

40

【0077】

免疫原性は、もし抗原をアジュバントとともに同時に投与するならば有意に改善されるが、アジュバントは一般にリン酸バッファー塩溶液中 0.005 ないし 0.5 % 溶液として使用される。アジュバントは抗原の免疫原性を上げるが、必ずしもそれ自体が免疫原性ではない。アジュバントは投与部位の近くに局所的に抗原を維持するように作用し、貯蔵効果を生じて免疫系の細胞にゆっくりと持続的に抗原を放出するのを容易にする。アジュバントはまた免疫系の細胞を抗原貯蔵部位に引き寄せ、かかる細胞を刺激して免疫応答を引き出す。

50

【 0 0 7 8 】

免疫刺激剤またはアジュバントは、例えば、ワクチンに対する宿主の免疫応答を改善するために何年もの間使用されてきた。内的アジュバント、例えば、リポ多糖類は、通常、ワクチンとして使用される死菌または弱毒化細菌の成分である。外因性アジュバントは一般に抗原に非共有結合的に連鎖した免疫修飾物質であり、宿主の免疫応答を高めるように製剤化される。このようにアジュバントは非経口的に送達された抗原に対し免疫応答を高めることで確認される。しかし、これらアジュバントの一部は毒性であり、望ましくない副作用の原因となっており、ヒトおよび多くの動物において使用することを不適とする。実際に、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム（まとめて一般にはアルムという）のみがヒトと家畜のワクチンにおけるアジュバントとして常套的に使用される。ジフテリアおよび破傷風毒素への抗体応答を増強する上でのミョウバンの有効性は十分に確立されており、極く最近ではH B s A g ワクチンがアルムをアジュバントとしている。アルムの有用性は幾つかの応用について十分に確立されているが、制限もある。例えば、アルムはインフルエンザの予防接種には無効であり、矛盾することではあるが細胞介在免疫応答を引き出す。アルムアジュバントの抗原により引き出された抗体は、マウスにおいては主にI g G 1 のイソタイプであるが、ある種ワクチン剤による防御にとっては最適ではない。

10

【 0 0 7 9 】

広範な外因性アジュバントは抗原に対し強い免疫応答を刺激する。これらは膜タンパク質抗原に複合体形成したサポニン（免疫刺激複合体）、鉍油とのブルロニックポリマー、鉍油中の死菌マイコバクテリウム、フロインド完全アジュバント、細菌産物、例えば、ムラミルジペプチド（M D P）およびリポ多糖（L P S）、並びに脂質A、およびリポソームなどを包含する。

20

【 0 0 8 0 】

液性免疫応答（M I R）と細胞介在免疫（C M I）を効率的に誘導するために、多くの場合、免疫原をアジュバントに乳化する。多くのアジュバントは毒性であり、肉芽、急性および慢性の炎症（フロインド完全アジュバント、F C A）、細胞溶解反応（サポニンおよびブルロニックポリマー）および発熱原性、関節炎と前部ブドウ膜炎（L P SおよびM D P）を誘発する。F C Aはすぐれたアジュバントであり、広く研究に使用されているが、その毒性の故に、ヒトおよび家畜用ワクチンに使用することは許可されていない。

30

【 0 0 8 1 】

理想的なアジュバントの望ましい特性は以下のとおりである：

- （ 1 ） 毒性のないこと；
- （ 2 ） 長期間持続する免疫応答を刺激する能力；
- （ 3 ） 製造が簡単であることと長期間の貯蔵に安定であること；
- （ 4 ） 様々な経路で投与された抗原に対しC M IとH I R両方を引き出す能力；
- （ 5 ） 他のアジュバントとの相乗性；
- （ 6 ） 抗原提示細胞（A P C）の個々集団と選択的に相互作用する許容能力；
- （ 7 ） 適切なT_H1またはT_H2細胞特異免疫応答を特異的に引き出す能力；および
- （ 8 ） 抗原に対し適切なイソタイプレベル（例えば、I g A）を選択的に増加させる能力。

40

【 0 0 8 2 】

ロックホフ（Lockhoff）らに1989年8月8日付与された米国特許第4,855,283号（参照により本明細書に取込む）は免疫モジュレーターまたはアジュバントとしての糖脂質類似体、例えば、N-グリコシルアミド、N-グリコシル尿素およびN-グリコシルカルバミン酸エステルを開示し、そのそれぞれの糖残基がアミノ酸により置換されていることを教示している。このように、ロックホフ（Lockhoff）ら（米国特許第4,855,283号および文献29）は、天年産糖脂質、例えば、グリコスフィンゴリピドおよびグリコグリセロリピドなどに構造的類似性を示すN-糖脂質が、単純ヘルペスウイルスワクチンおよび仮性狂犬病ウイルス両方に強い免疫応答を引き出し得ることを報告した。ある種の糖脂質は長鎖アルキルアミンと脂肪酸から合成されており、その脂肪酸がアノマ

50

ー炭素原子を介して糖と直接連鎖して天年産脂質残基の機能を模している。

【 0 0 8 3 】

モロニー (Moloney) に付与され、その譲受人に譲渡された米国特許 4, 2 5 8, 0 2 9 (参照により本明細書に取込む) は、オクタデシルチロシン塩酸塩 (O T H) が破傷風毒素とホルマリン不活化 I、II および III 型ポリオウイルスワクチンと複合体形成したとき、アジュバントとして機能することを教示している。また、ニクソン - ジョージ (Nixon-George) ら (文献 3 0) は、組換え B 型肝炎表面抗原と複合体形成した芳香族アミノ酸のオクタデシルエステルが、B 型肝炎ウイルスに対する宿主免疫応答性を上昇させると報告した。

イムノアッセイ

一態様において、本発明の接合体は、診断態様によるイムノアッセイにおいて抗原の特異的同定に有用な抗原特異抗体の生成に使用し得る免疫原性組成物の生産に有用である。かかるイムノアッセイは酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (E L I S A)、R I A、およびその他の非酵素結合抗体結合アッセイまたは技術上既知の手法を包含する。E L I S A アッセイにおいては、抗原特異抗体を選択した表面に固定化する；例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルなどである。不完全に吸着した抗体を除去するために洗浄した後、試験サンプルに関し抗原的に中性であることの知られているウシ血清アルブミン (B S A) またはカゼイン溶液など非特異タンパク質を選択した表面に結合させるとよい。これは固相表面上の非特異吸着部位の阻止を可能とし、かくして、抗原の表面への非特異的結合に起因するバックグラウンドを低下させる。次いで、固相化表面をサンプル、例えば、臨床材料または生物材料などと接触させ、免疫複合体 (抗原 / 抗体) 形成に導く方法で試験する。この方法はサンプルを希釈剤、例えば、B S A、ウシガンマグロブリン (B G G) および / またはリン酸緩衝塩溶液 (P B S) / トウイーンなどにより希釈することを含む。次いで、サンプルは約 2 5 ないし 3 7 程度の温度で、約 2 ないし 4 時間培養させる。培養に続いて、サンプル接触表面を洗浄し、非免疫複合体形成物質を除去する。洗浄手法は溶液での洗浄、例えば、P B S / トウイーンまたはホウ酸緩衝液などでの洗浄を包含する。

【 0 0 8 4 】

試験サンプル中の抗原と、結合した抗原特異抗体との間の特異免疫複合体形成およびその後の洗浄に続いて、免疫複合体形成の存在およびその量さえも、抗原に特異性を有する第二抗体に免疫複合体を接触させることにより確定することができる。検出手段を備えるためには、第二抗体が酵素活性などと会合した活性、例えば、適切な色原体基質との培養により発色する活性を有してもよい。定量は発色の度合いを、例えば、可視スペクトル分光光度計を用い、測定することにより実施し得る。さらなる態様において、本発明は診断用キットを包含し、該キットは、本発明により製造した免疫原組成物で宿主を免疫し、それによって生成した抗原特異抗体を含んでなる。

【 0 0 8 5 】

本発明の方法論を応用することは、当業者の能力範囲内にあることが理解される。本発明の産物とその調製および使用方法の例を以下の実施例に開示する。

【 実施例 】

【 0 0 8 6 】

実施例

上記の開示内容は、本発明を概説したものであり、より詳細については、以下の具体的な実施例を参照することで理解することができる。これらの実施例は、専ら説明を目的として記載されているものであり、本発明の範囲を限定するものではない。状況により臨機応変な措置が示唆または示される場合には、形態の変更や等価物の置き換えが想到される。本明細書では具体的な用語を用いているが、そのような用語は説明のためのものであって、本発明を制限するものではない。本開示内容では、免疫学的方法が明瞭に記載されていない場合があるが、それは当業者であれば理解の及ぶ範囲の内容である。

【 0 0 8 7 】

実施例 1

本実施例は、酸加水分解 B 群髄膜炎菌 (G B M) オリゴ糖類の製造を示すものである。

【 0 0 8 8 】

本実施例では、市販の G B M 多糖類 (分子量 > 1 0 k D a) から G B M オリゴ糖類 (分子量 3 0 0 0 ~ 4 5 0 0 D a) を製造する方法について説明する。

【 0 0 8 9 】

必要な試薬は、

- 1 - G B M 多糖類 (Sigma、カタログ番号 : C - 5 7 6 2)、
- 2 - 0 . 5 M 酢酸ナトリウム 1 容量部と 0 . 2 3 M 酢酸 1 容量部とを混合することで製造された酢酸ナトリウム (5 0 m M) 緩衝液 (p H 5 . 0 0)、
- 3 - 反応管および磁気攪拌子、
- 4 - セファデックス (Sephadex) G - 2 5 ゲルカラム、
- 5 - 重炭酸アンモニウム (2 0 m M)

である。

【 0 0 9 0 】

手順 :

G B M 多糖類 (2 0 0 m g) を、 p H 5 . 0 の脱気 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 1 5 m L に溶かし、混合物を 8 0 で 1 時間攪拌した。反応混合物を氷で冷却し、 0 . 1 M N a O H を滴下することで中和して p H 7 . 0 とした。次に、全混合物を凍結乾燥して、粗生成物を得た (4 6 0 m g、酢酸ナトリウムを含む)。酸処理 G B M 1 0 0 m g を最初

に 2 0 m M 重炭酸アンモニウム 3 m L に溶かし、次に、カラム : (1 0 × 1 0 0 0 m m)、デキストラン 8 8 0 0、β - シクロデキストランおよびショ糖の標準品で校正したもの、

流量 : 0 . 6 m L / 分、

緩衝液 : 2 0 m M 重炭酸アンモニウム、

分画回収 : 4 . 5 分 / 試験管

という条件を用いて 2 0 m M 重炭酸アンモニウム溶液で平衡としたセファデックス G - 2 5 ゲルカラムに負荷した。

【 0 0 9 1 】

得られた分画について、レゾルシン / 硫酸アッセイ (参考文献 1 2) を用いて、シアル酸の有無を分析した。次に、溶離プロファイルをプロットし、平均分子量 4 k D a でシアル酸を含有する分画を集め、凍結乾燥した。酸加水分解 G B M の最終生成物を得た。

【 0 0 9 2 】

実施例 2

本実施例は、酸加水分解 G B M オリゴ糖類の化学修飾を示すものである。

【 0 0 9 3 】

ジェニングスらの報告に記載された方法 (Jennings et al ; 参考文献 6) にいくつか変更を加えた方法に従って、N - プロピオニル化酸加水分解 G B M オリゴ糖類を製造した。N - プロピオニル化 G B M オリゴ糖類を最終的に、以下に記載の方法に従って、他のオリゴ糖を有する M A P 骨格に結合させて、多価の複合炭水化物ワクチンを製造した。

【 0 0 9 4 】

必要な試薬は、

- 1 - 酸加水分解 G B M オリゴ糖、
- 2 - 水酸化ナトリウム (2 M 溶液)、
- 3 - 無水プロピオン酸 (Aldrich)、
- 4 - 重炭酸アンモニウム (1 0 m M)、
- 5 - シュウ酸水溶液 (5 0 %)、
- 6 - 水素化ホウ素ナトリウム (Sigma) であった。

【 0 0 9 5 】

手順 :

以下の3点の変更を加え、ジェニングら記載の方法に従って、N - 脱アセチル化酸加水分解B群髄膜炎菌多糖類を製造した。

【0096】

- 1 - 反応を約110～120 で実施；
- 2 - 透析を分子多孔膜（カットオフ分子量1000）を用いて実施；
- 3 - 水酸化ナトリウムの中和を、冷却下に50%シュウ酸水溶液を用いて行い、1時間にわたって継続。

【0097】

前記多糖（100mg）を、水素化ホウ素ナトリウム（10mg）を含む脱気2M水酸化ナトリウム5mLに溶かした。得られた混合物を約100～120 で6～8時間加熱し、50%シュウ酸を用いる氷浴でのpH中和とそれに続く透析（10mM重炭酸アンモニウムを4回交換、4 ）および凍結乾燥を組み合わせることで生成物を単離して、生成物を得た（65.2mg）。この脱アセチル化によって、¹H NMRスペクトラムにおけるアセチルのシグナルが完全に消失することで確認される通り、100%脱アセチル化が達成された。

10

【0098】

前段階で調製されたN - 脱アセチル化GBMオリゴ糖（55mg）を飽和重炭酸ナトリウム（12mL）に溶かし、無水プロピオン酸（0.250mL）を30分間かけて3回に分けて加えた。混合物全体を室温で終夜撹拌した。ニンヒドリン試験を行ったところ、陰性であることが認められ、遊離アミノ基のプロピオンアミド基への完全な変換がなされたことが示された。次に、混合物を蒸留水で透析し（4リットルで3回）、凍結乾燥して、酸加水分解プロピオニル化GBMオリゴ糖（43.2mg）を得た。

20

【0099】

実施例3

本実施例は、肺炎連鎖球菌由来のオリゴ糖類の調製を示すものである。

【0100】

本実施例は、肺炎連鎖球菌の莢膜多糖類（CP）（分子量約50kDa）の酸加水分解を用いて、2.5～5.0kDaの範囲の分子量を有するオリゴ糖類を製造する一般法について記述する。得られるオリゴ糖類については、キャリア蛋白または多重抗原ペプチド系（MAP）に共有結合的に連結した複数のオリゴ糖類を含む糖複合体を調製するため、新規な糖複合体化（glycoconjugation）法を施すことができる。

30

【0101】

必要な試薬は、

- 1 - 血清型6B、14、19Fおよび23F由来のCP各種（ATTC）、
- 2 - 酢酸、
- 3 - トリフルオロ酢酸、
- 4 - ゲル・クロマトグラフィー・カラム（セファデックスG - 100、10×1000mm）、
- 5 - 丸底フラスコ（250mL）、
- 6 - 磁気撹拌子、
- 7 - 油浴

40

であった。

【0102】

手順：

丸底フラスコで、CP（以下の表4参照）を脱気済温水（62.5mL）に溶かし、次に必要量の脱気済酸（以下の表4参照）を加えた。混合物全体をさらに10分間脱気してから、油浴を用いて必要な期間加熱した（以下の表4参照）。加水分解期間終了後、混合物全体を水で5倍に希釈し、凍結乾燥して、粗生成物を得た。

【0103】

分子量標準として、次のデキストラン標品（分子量8800、39100、73500

50

、503000)、グルコース(180)、ショ糖(342)および合成PRP6量体(2340)を用いて、ゲル透過カラム(10×1000mm、セファデックス(登録商標)-G100)の較正を行った。セファデックス(登録商標)G-100ゲルカラムを用いてオリゴ糖の精製を行い、オリゴ糖を流量0.9mL/分でミリキュー(Milli-Q)水で溶出した。3分ごとに分画を回収し、フェノール/硫酸を用いて、炭水化物の有無を調べた。分子量2.5~5kDaのオリゴ糖を含む分画を集め、凍結乾燥した。

【0104】

実施例4

本実施例は、N. meningitidisのオリゴ糖製造を説明するものである。

【0105】

肺炎球菌CPの酸加水分解の場合と同様に、N. meningitidisに適用される方法では、酸加水分解、凍結乾燥およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いる精製を行う。N. meningitidisのC、W-135およびY群由来のCPの酸加水分解条件も至適化した。

【0106】

代表的には、アルゴン下、65~100の温度で8~12時間にわたり、封入管中でCP(10mg/mL)を20~80mMの酢酸ナトリウム(pH4.5~5.5)と混合する。B群のCPは酸性条件下では分子内エステル化を起こすことがあることから、加水分解はC群のCP加水分解で用いられる条件下で行ったが、インキュベーション時間は1時間に制限し、反応のpHを0.1M NaOHを用いてただちにpH7に調節して、エステル化プロセスを逆転させた(詳細については、実施例1参照)。A群のCPには不安定なホスホジエステル結合があることから、それは温和な酸性条件下(10~20mM酢酸など)で加水分解し、50~100で30~48時間インキュベートした。各加水分解終了後、反応溶液を水で5倍に希釈し、凍結乾燥した。粗オリゴ糖をセファデックス(登録商標)G-100ゲル濾過クロマトグラフィー(2×210cm、上記参照)によって分別した。代表的なクロマトグラフィー結果を図4に示してある。得られた分画について、レゾルシン/硫酸アッセイ(参考文献12)を用いて、シアル酸の有無を分析した。溶離プロファイルをプロットし、2~5kDaのクロマトグラフィー精製オリゴ糖を集めた。サイズ分離オリゴ糖は代表的には6~15個の反復単位を有していた。収率は40~80%であった。

【0107】

実施例5

本実施例は、キャリア蛋白にランダムに接合した多価オリゴ糖の製造について説明するものである。

【0108】

本発明の可能な用途を示すため、肺炎連鎖球菌の血清型6B、14、19Fおよび23Fのオリゴ糖を、図1に示したように、ランダムかつ共有結合的にTTに連結させた。TT溶液(8mg/PBS 1.2mL)に、4モル過剰の過ヨウ素酸酸化6B(0.5mg/PBS 0.1mL)、14(1.4mg/0.2mL)、19F(0.65mg/0.12mL)および23F(1mg/0.2mL)オリゴ糖を加えた。0.1M NaOH数滴で混合物のpHを7.4に調節し、反応液を37で4日間攪拌した。5日目に、10倍過剰(100μL)のNaCNBH₃(5mg/mL)を混合物に加え、37でさらに3日間攪拌した。次に、反応混合物を過剰のPBSで透析して、4で3日間にわたって、未反応のオリゴ糖とNaCN・BH₃を除去した。得られた糖複合体を、セファデックスG100カラム(1.6×100cm)でのゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。溶離プロファイルを図5に示してある。糖複合体を回収した。蛋白および炭水化物の分析を行ったところ、炭水化物の蛋白に対するモル比が7.1:1であることが認められた。多重抗原糖複合体(MAG)を、完全フロイントアジュバントまたはアルム(アルミニウム塩類)と製剤した免疫原として用いた。ウサギおよびマウスの免疫原性試験を行った。結果については後述する。

【0109】

実施例 6

本実施例は、ペプチド合成について説明する。

【0110】

ペプチド(表1)を、ABI 430Aペプチド合成装置を用いて合成し、製造業者の説明に従ってt-Boc化学を至適化し、フッ酸(HF)によって樹脂から開裂させた。得られたペプチドを、流量2mL/分で40分間かけて15%から55%アセトニトリルの0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液で勾配溶離するVydac C4半分取カラム(1×30cm)での逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって精製した。生化学試験および免疫試験で使用した合成ペプチドはいずれも、分析HPLCで>95%の純度のものと判定されたものであった。ウォーターズ(Waters)Pico-Ta

10

【0111】

タム(Tam)報告の方法(参考文献24)の変法に従ってFmoc固相ペプチド合成化学を用いて、合成MAPを手動で製造した。通常は、置換レベル180μmol/gのFmoc-Lys(t-Boc)-TGA樹脂(500mg、BACHEMから購入)を用いてMAPを得た。一般的カップリングプロトコールとして、等量のHBTUおよびHOBT/DIEAで1時間にわたって活性化した4倍過剰のFmoc保護アミノ酸を用いた。第1のFmoc-Gly残基をカップリングさせる際には、オリゴ糖との接合を促進するため、MAPの置換レベルを約50μmol/gまで低下させた。図2に従って合成を行った場合には、エタンジチオール(EDT)およびチオアニソール存在下に95%TFAによ

20

【0112】

実施例 7

本実施例は、架橋二官能基を有するオリゴ糖の製造について説明するものである。

【0113】

過ヨウ素酸化オリゴ糖溶液(3mg/PBS1mL)に、20モル過剰の1,4-ジアミノブタン(10.5mg)を加えた。混合物のpHを7.4に調節し、反応液を37で4日間攪拌した。5日目に、過剰の(500μL)NaCNBH₃(20mg/mL)を混合物に加え、それを37でさらに3日間攪拌した。官能アミノ基で誘導体化したオリゴ糖について、セファデックス(登録商標)G-50カラム(1.6×100cm)でのゲル濾過クロマトグラフィー精製を行った。

30

【0114】

アミノ誘導体化オリゴ糖(4.3mmol)の0.1Mリン酸緩衝液(1mL)(pH7.5)溶液に、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシコハク酸イミド(MBS、Pierde)(20mg、63.6mmol)のテトラヒドロフラン(1mL)溶液を加えた。反応混合物をアルゴン下に室温で30分間攪拌し、エーテルで抽出して(5mLで4回)、過剰のMBSを除去した。得られた水層を、20mM重炭酸アンモニウム緩衝液(pH7.2)で平衡としたセファデックスG-25カラム(20×300mm)に負荷し、同じ緩衝液で溶出した。溶離を280nmでの吸光度によってモニタリングし、溶出ピークのあるものを集め、凍結乾燥して、所望のMBS活性化オリゴ糖を得た。活性化オリゴ糖-MBSに過剰の2-メルカプトエタノールを加え、エルマン法(参考文献25)の変法を用いて過剰量を逆滴定することで、オリゴマーに組み込まれたマレイミド基の数を測定した。

40

【0115】

実施例 8

本実施例は、直鎖糖蛋白複合体の製造について説明するものである。

【0116】

置換レベル50μmol/gのFmoc-Gly-Lys(t-Boc)-TGA樹脂(500mg)を用いて、表1に示した肺炎連鎖球菌およびN.meningiditis蛋白から誘導

50

したT細胞エピトープを有する直鎖ペプチドを得た。標準的なFmoc化学カップリング・プロトコルを用いた(実施例6参照)。合成が完了したら、EDTおよびチオアニソール存在下に95%TFAによって少量のペプチド-樹脂を開裂させて、合成の信頼性を明らかにした。ペプチド-樹脂の残りの部分について、最初にピペリジンを用いてN-末端で脱保護し、次に塩化メチレン、メタノール、水およびPBSで洗浄した。PN(123-140)ペプチド-樹脂を、NaCNBH₃存在下、メタノール/リン酸緩衝液(pH7.8)中で、過ヨウ素酸酸化肺炎連鎖球菌血清型14オリゴ糖(1当量)と38で6日間混合した。接合後、アミノ基置換の程度をニンヒドリンアッセイによって測定し、総糖含有量をオルシノール試験を用いて定量した。EDTおよびチオアニソール存在下に95%TFAで直鎖糖ペプチド-樹脂を開裂させた。後処理後、得られた糖ペプチドについて、アミノ酸組成および炭水化物含有量についてのアッセイを行った。

10

【0117】

実施例9

本実施例は、多価MAP糖ペプチド複合体の製造について説明するものである。

【0118】

肺炎連鎖球菌膜蛋白から誘導した3種類の異なるT細胞エピトープ[PN(123-140)、PN(263-281)およびSP37、表1]を含むMAP樹脂を、図2に示した置換レベル50mmol/gのFmoc-Gly-Lys-TGA樹脂を用いて合成した。合成は全て、前述の(実施例6)至適Fmoc化学カップリング・プロトコルを用いて手動で行った。合成が完了した時点で、少量のMAP-樹脂を、EDTおよびチオアニソール存在下に、95%TFAで開裂させた。開裂MAPは、アミノ酸分析によって、正しいアミノ酸組成を有することが認められた。MAP樹脂をDTTによって還元して、システイン残基からt-ブチルチオ保護基を脱離させた。

20

【0119】

過剰に洗浄を行った後、MAP樹脂をDMF/PBS溶液に再懸濁させ、4倍過剰の肺炎連鎖球菌血清型14(Os14)からのスルホ-SIAB活性化オリゴ糖と混合した。室温で終夜混合した後、MAP樹脂を濾取し、PBS、DMFおよび次にメタノールによって洗浄した。MAP-Os14樹脂について、エルマン試験とスルフヒドリル基測定を行った。SH置換のレベルは、開始時値の1/2であることが認められた。再度のカップリングによっても、MAP樹脂に接合したOs14の量は増加しなかった。Os14で認められる炭水化物である、糖-MAP樹脂におけるN-アセチルガラクトサミン(GlcNAc)の存在を、炭水化物分析によって独立に確認した。

30

【0120】

最初にMAP-Os14を1%TFAで処理して、Mtt-リジン樹脂からMtt(リジン保護基)を除去し、温和な塩基である1%ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)/DMFで中和した。ニンヒドリン試験によって遊離アミノ基の存在を定量したところ、Mtt基の>90%が除去されていることが明らかになった。MAP-Os14樹脂をPBSに再懸濁させ、NaCNBH₃存在下に、DMF/リン酸緩衝液(pH7.8)中、4当量の過ヨウ素酸酸化肺炎連鎖球菌血清型6Bオリゴ糖(Os6B)と38で6日間混合した。

40

【0121】

接合後、アミノ基の置換をニンヒドリン・アッセイによって測定したところ、元の値の80~90%であることが認められた。やはり、2回・3回のカップリングによって、Os6BのMAP-Os14樹脂への接合は改善されなかった。カップリング効率は低かったが(約15%)、Os6Bで認められる炭水化物であるMAP複合体中のリビトールの存在が、炭水化物分析によって確認された。

【0122】

MAP-Os14-Os6B複合体を20%ピペリジンのDMF溶液で処理して、Fmoc-リジン残基からFmoc保護基を除去した。洗浄後、MAP-Os14-Os6B樹脂を、NaCNBH₃存在下、DMF/リン酸緩衝液(pH7.8)中で、4倍過剰の

50

過ヨウ素酸酸化肺炎連鎖球菌血清型19Fオリゴ糖(Os19F)と38で6日間混合した。接合後、アミノ基置換の程度をニンヒドリンアッセイによって測定したところ、約90%であることが認められた。そのカップリング反応を繰り返し、その効率を求めたところ、約15%であった。しかし、Os19Fで認められる糖であるN-アセチルマンノース(MannAc)の存在が、炭水化物分析によって検出された。

【0123】

EDTおよびチオアニソール存在下に、95%TFAで少量のMAP糖複合体-樹脂を開裂させた。後処理後、MAP-糖複合体について、アミノ酸組成と炭水化物含有量を定量し、正しいアミノ酸組成と正しい炭水化物含有量を有することが認められた。全体の収率は非常に低いものではあったが(約5%)、以上の結果は、各種オリゴ糖類を選択的かつ順次にMAP樹脂に接合させることができることを示している。

10

【0124】

実施例10

この実施例は、天然多糖-ポリリシン接合体の調製を説明する。

【0125】

過ヨウ素酸ナトリウム水溶液で処理した天然S.pneumoniaeまたはN.meningitidis多糖類から調製された過ヨウ素酸塩酸化多糖類(0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液1mL中に25mg、pH6.0)0.5mLを、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)2mL中のポリリシン(5mg)に添加し、続いて、シアノホウ水素化ナトリウム(ポリリシンに10当量)を添加した。37で5日間インキュベーションした後、反応混合物を、0.1Mリン酸塩緩衝液(pH7.5)(4×1L)で透析し、得られた溶液を、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)で平衡させた分析用Superose12カラム(15×300mm、Pharmacia製)に適用し、同じ緩衝液で溶離した。230nmでの吸収についてフラクションをモニターした。主用ピークを記録した。蛋白質の量を、BioRad蛋白質アッセイを用いて決めた。多糖類の存在を、オルシノール試験で確認した。

20

【0126】

実施例11

この実施例は、多価オリゴ糖-TT接合体のマウス免疫原性研究を説明する。

【0127】

5匹のマウス(BALB/c)を、フロイント完全アジュバント(FCA)中で乳化させた多価オリゴ糖-TT接合体(オリゴ糖20μg)で筋肉内(im)免疫し、続いて、2週間間隔で2回追加投与(不完全フロイントアジュバント中に半分量の同じ免疫原)した。抗血清を集め、56で不活性化し、次に、-20で貯蔵した。結果を図8に示す。

30

【0128】

実施例12

この実施例は、アルム中で調合した多価オリゴ糖-TT接合体のウサギ免疫原性研究を説明する。

【0129】

1mL当たり3mgのAlPO₄と混合した多価オリゴ糖-TT接合体0.5mL(オリゴ糖当量20μg)で、ウサギを筋肉内免疫し、続いて、2週間間隔で2回追加投与(半分量の同じ免疫原)した。最初の注射から2週間毎に抗血清を集め、56で30分間不活性化し、-20で貯蔵した。

40

【0130】

実施例13

この実施例は、FCA中に調合した多価オリゴ糖-キャリア接合体のウサギ免疫原性研究を説明する。

【0131】

多価オリゴ糖-TTまたはオリゴ糖-MAP接合体(FCA1mLと混合したオリゴ糖

50

当量 $12 \mu\text{g}$ を含む接合体) 0.5 mL で、ウサギを筋肉内免疫し、続いて、2週間間隔で2回追加投与(フロイント不完全アジュバント(IFA)を用いて調合した同じ免疫原の半分量)した。最初の注射から2週間毎に抗血清を集め、56 で30分間、熱不活性化し、 -20 で貯蔵した。

【0132】

実施例14

この実施例は、ペプチド特異的ELISAを説明する。

【0133】

マイクロタイター・プレートウエル(Nunc-Immunoplate、ヌンク、デンマーク)に、被覆緩衝液($15 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ 、 35 mM NaHCO_3 、 $\text{pH } 9.6$) $50 \mu\text{L}$ 中の個々のペプチド 500 ng で、室温にて16時間被覆した。次に、プレートを、リン酸塩緩衝塩水(PBS)中の 0.1% (w/v) BSAで、室温にて30分間ブロックした。系列的に希釈した抗血清をウエルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。抗血清の除去後、プレートを、 0.1% (w/v) Tween-20と 0.1% (w/v) BSAを含むPBSで5回洗った。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(Jackson ImmunoResearch Labs Inc., ペンシルベニア州)に接合されたヤギ抗-ウサギIgG抗体からの F(ab')_2 を、洗浄緩衝液で希釈($1/8000$)し、微量滴定プレートに加えた。室温で1時間インキュベーションした後、プレートを、洗浄緩衝液で5回洗った。次に、プレートを、基質としての H_2O_2 中テトラメチルベンジジン(TMB)(ADI、トロント)を用いて現像した。反応を、 $1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ で停止し、光学濃度を、Titretrek Multiskan II(Flow Labs、バージニア州)を用いて 450 nm で測定した。2つの無関係な百日咳毒素ペプチドNAD-S1(残基19)およびS3(123~154)(残基32)を、ペプチド特異的ELISA中に陰性対照として含めた。アッセイを3回繰返し、抗血清の反応力価を、免疫前血清を用いて得られたものの2倍の吸収値増加を一貫して示す希釈率により定めた。

【0134】

実施例15

この実施例は、抗-多糖抗体測定を説明する。

【0135】

マイクロタイター・プレートウエル(Nunc-Immunoplate、ヌンク、デンマーク)に、被覆緩衝液($15 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ 、 35 mM NaHCO_3 、 $\text{pH } 9.6$) $200 \mu\text{L}$ 中のS. pneumoniaeまたはN. meningitidis多糖-ポリリシン接合体 200 ng で、室温にて16時間被覆した。次に、プレートを、リン酸塩緩衝塩水(PBS)中の 0.1% (w/v) BSAで、室温にて30分間ブロックした。PRP-キャリア接合体に対して誘起された系列的に希釈した抗血清をウエルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。抗血清の除去後、プレートを、 0.1% (w/v) Tween-20と 0.1% (w/v) BSAを含むPBSで5回洗った。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(Jackson ImmunoResearch Labs Inc., ペンシルベニア州)に接合されたヤギ抗-ウサギIgGまたは抗-ウサギIgG抗体からの F(ab')_2 を、洗浄緩衝液で希釈($1/8000$)し、マイクロタイター・プレートに加えた。室温で1時間インキュベーションした後、プレートを、洗浄緩衝液で5回洗った。次に、プレートを、 H_2O_2 中の基質テトラメチルベンジジン(TMB)(ADI、トロント)を用いて現像し、反応を、 $1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ で停止し、光学濃度を、Titretrek Multiskan II(Flow Labs、バージニア州)を用いて 450 nm で測定した。アッセイを3回繰返し、抗血清の反応力価は、免疫前血清を用いて得られたものの2倍の光学濃度値増加を一貫して示す希釈率として定めた。

【0136】

実施例16

この実施例は、合成 T 細胞エピトープについての増殖アッセイを説明する。

【0137】

個々のキャリア蛋白質 5 μ g で BALB/c マウスに初回抗原刺激を与えることにより T 細胞エピトープマッピングを行った。3 週間後、脾臓を取り出し、10% 熱不活性化ウシ胎児血清 (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Flow lab)、100 U/mL ペニシリン (Flow Lab)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (Flow Lab)、10 単位/mL rIL-2 および 50 μ M 2-メルカプトエタノール (Sigma) を加えた RPMI 1640 (Flow Lab) 中で脾臓細胞を培養した。一団のペプチドに対する、初回抗原刺激を受けた脾臓細胞の増殖応答を、標準的な生体外アッセイによった検出した (ref. 26)。簡単に説明すると、96 ウエルマイクロタイター・プレートにおいて、 10^6 個の脾臓細胞を、モル濃度を増加させつつ (IL-2 無しの培地中に溶解したペプチド 0.03 ~ 3 μ M)、抗原発現細胞 (APC) の供給源としての照射 (1700 Rad) 新鮮同系脾臓細胞 5×10^5 個と共培養した。培地を、37 °C に維持された加湿した 5% CO₂ / 空気インキュベーターにおいて 40 時間維持した。培養の最初の 16 時間中、各ウエルに、0.5 μ Ci の [³H]-Tdr (5 Ci/mmol、NEN) を添加した。次に、細胞を、ガラス繊維フィルター上に捕獲し、細胞 DNA への ³H チミジンの取り込みを、シンチレーション β カウンター (Beckman) において測定した。結果を、各ペプチド濃度において行った 3 回の測定の平均として表す。標準偏差は、常に 15% 未満であった。³H チミジンの取り込みが、無関係なペプチドまたは培地を用いて得られたものより 3 倍高い場合に増殖応答は陽性で見なした。

【0138】

10

20

髄膜炎菌(N. meningitidis)由来の、ならびに、肺炎連鎖球菌(S. pneumoniae)由来の蛋白質に起因する有力な T-細胞 抗原基

【 表 1 】

ペプチド種	配列	概要	SEQ ID NO:
NMTBP2	PFTISDSLEGGFYGPKEELAGKFLSNNDKVAAVFG	Bactericidal Epitope	1
NMC1-1	KAKSRIRTKISDFGSFIGFGSGEDLGEGLKA	Human T-cell epitope	2
NMC1-2	VPAQNSKSAVKPAYTKDTNNNTLVPAVVGK	Human T-cell epitope	3
NMP1-1	AEQKSAVTEYYLNHGEWPGNNTSAGVASSSTIKGKYVKEV	Adhesion Epitopes	4
PN (123-140)	GVRGAVNDLLAKWHQDYGG	Pneumolysin (123-40)	5
PN-(263-281)	GFEALIKGVKVPQTEWKQIG	Pneumolysin (263-81)	6
SP37	GIIYAKNIAKQIAKDPKPKDFYKNG	37kDa Protein (1-30)	7
PSP-AA	IKEIDESESEDYAKEGFRAPLQSKIDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEI AKLEDQIKDAEENNNVEOYFKEG(C)	Protective Epitope of PspA (193-261)	8

【表 2】

複合鎖状糖ペプチド結合体 (6B-PN (123-140) + 14-PN (263-281) + 23F-PN (123-140)) により免疫されたウサギにおける抗ペプチド抗体応答

抗ペプチド抗体の力価 ^a		
評価ペプチド ^b	免疫前	単純平均
PN(123-140)	<100	12,800
PN(263-281)	<100	3,200

a) 抗ペプチド抗体応答の総量は、ペプチド特異的ELISA法により定量した。

b) 抗血清は、免疫済ウサギより採取した。

【 0 1 4 0 】

【表 3】

MAP 型糖ペプチド結合体により免疫されたウサギにおける抗ペプチド抗体応答

抗ペプチド抗体の力価 ^a		
評価ペプチド ^b	免疫前	単純平均
PN (123-140)	<100	633,400
PN (263-281)	<100	12,800
SP37	<100	51,200

a) 抗ペプチド抗体応答の総量は、ペプチド特異的 E L I S A 法により定量した。

b) 抗血清は、MAP 型糖ペプチド結合体により三回感作済ウサギより採取した。

【 0 1 4 1 】

【表 4】

莢膜多糖類 (CP)	6 B	1 4	1 9 F	2 3 F
CP 含量	250mg 水溶液 (62.5mL)	250mg 水溶液 (62.5mL)	250mg 水溶液 (62.5mL)	230mg 水溶液 (62.5mL)
緩衝液 (mL)	0.02M 酢酸 (62.5mL , pH3.22)	1M TFA (62.5mL)	0.02M 酢酸 (62.5mL)	0.5M TFA (62.5mL)
時間	30h	7h	48h	3h
温度 (°C)	100	70	50	70
粗産物 (mg)	200mg	260mg	200mg	250mg
精製産物 (mg)	160mg	230mg	180mg	188mg
産物の分子量	2330	5200	2930	4640

【 0 1 4 2 】

参照文献

【 0 1 4 3 】

【表 5】

1. MMWR, (1994) 43:23-26
2. MMWR (1989) 38:64-76
3. Austrian R. (1981) *Rev. Infect. Dis.* 3 (Suppl):S1-S17
4. Dagan et al., (1992) *J. Am. Med. Assoc.* 268:3328-3332)
5. H. Jennings et al, (1986), *J. Immun.* 127, 1011 10
6. H. Jennings et al. (*J. Immunol.*, 1986, 137, 1708
7. Peeters et al., (1991) *Infect. Immun.* 59:3504-3510
8. Paradiso et al., (1993) *Vaccine Res.* 4:239-248
9. Schneerson et al. (1980) *J. expt. Med.* 152: 361
10. Barington et al. 1993, *Infect. Immun.* 61:432-438
12. Svennerholm, 1957, *Biochem. Biophys. Acta.* 604:24
13. Walker et al. (1987), *Infect. Immun.* 58:1184-1189
14. Yother and Briles (1992), *J. Bacteriol.* 174:601-609 20
15. Sampson et al., *Infect. Immun.* 62:319-324
16. Rokbi et al., (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 132: 277-283
17. Stimson et al., (1995), *Mol. Microbiol.* 17:1201-1214
18. McGuinness et al., (1990), *J. Exp. Med.* 171:1871-1882
19. Wiertz et al., In Rivier, J and Marshall, G.R. (Ed.) *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, (Proceedings of the 11th American Peptide Symposium), ESCOM, Leiden, 1990, p.371-372 30
20. De Velasco et al., *Infect. Immun.* 63:961-968
21. McQueen et al., (1991) *Pediatr. Res.* 31 (part 2): Abstract 1056;
22. Eby et al., (1994) In *Vaccine 94:Modern Approaches to Vaccines* pp. 119-124. Edited by E. Norry, F. Brown, R.M. Chanock and Ginsberg, H.S. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Press
23. Kandil et al., (1997) *Glycoconjugate J.* 14:13-17 40
24. Tam (1996, *J. Immun. Meth.* 196:1732)
25. Riddles et al., (1983) *Methods Enzymol.* 91: 49-60).
26. Sia et al, *Scan. J. Immunol.* 26: 683-690

【産業上の利用可能性】

【0144】

開示の要約

本開示の要約として、本発明は、特定の新規多価免疫原性オリゴ糖、およびその調製に 50

おける新規接合手順、ワクチンとしてのその用途、および診断用途のための抗体を提供する際におけるその利用を提供する。本発明の技術範囲内において、修正は可能である。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】TTなどのキャリア蛋白質に任意に抱合した数種の肺炎球菌CPおよび使用した操作の概略図である。

【図2A】化学的に活性化した肺炎球菌のオリゴ糖を肺炎球菌蛋白質からの数種の機能的T細胞エпитープを含むリジン枝分かれペプチドに順次架橋結合する概略図である。

【図2B】化学的に活性化した肺炎球菌のオリゴ糖を肺炎球菌蛋白質からの数種の機能的T細胞エпитープを含むリジン枝分かれペプチドに順次架橋結合する概略図である。

10

【図3】Sephadex（登録商標）-G100カラムでゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、S.pneumoniae 14の酸加水分解オリゴ糖を精製する間に得られた溶出図である。

【図4】Sephadex（登録商標）-G100カラムでゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、N.meningitidis B群の酸加水分解オリゴ糖を精製する間に得られた溶出図である。

【図5】多価S.pneumoniaeオリゴ糖-TT抱合体の精製の間に得られた溶出図である。

【図6】FCA中に調合した多価S.pneumoniaeオリゴ糖-TT抱合体に対するウサギの抗体応答を示す図である。

20

【図7】明礬中に調合した多価S.pneumoniaeオリゴ糖-TT抱合体に対するウサギの抗体応答を示す図である。

【図8】FCA中に調合した多価S.pneumoniaeオリゴ糖-TT抱合体に対するマウスの抗体応答を示す図である。

【図9】FCA中に調合した多価N.meningitidisオリゴ糖-TT抱合体に対するウサギの抗体応答を示す図である。

【図10】FCA中に調合した多価S.pneumoniaeグリコペプチド抱合体に対するウサギの抗体応答を示す図である。

【図11】FCA中に調合した多価S.pneumoniaeオリゴ糖-MAP抱合体に対するウサギの抗体応答を示す図である。

30

【図 1】

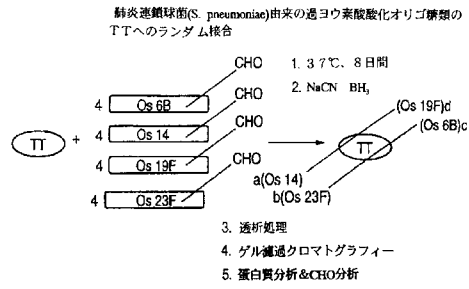


FIG.1

【図 2 A】

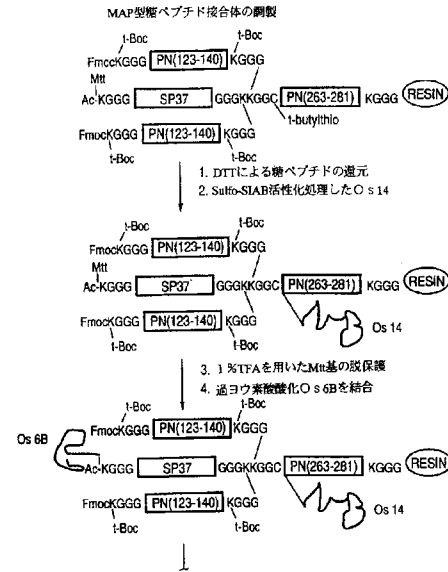


FIG.2A

【図 2 B】

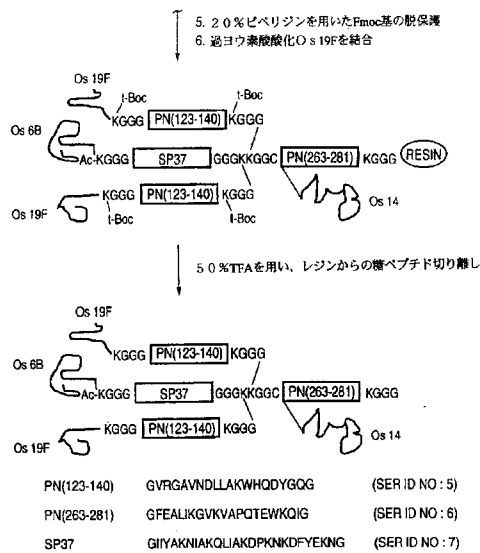


FIG.2B

【図 3】

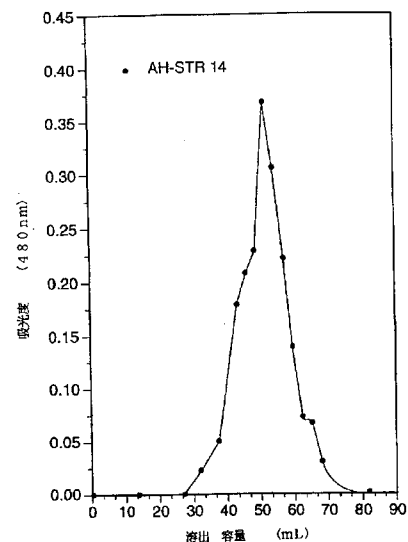


図3は、セファデックスG-100 ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*) 14 型由来の糖加水分解オリゴ糖類の精製を示す。

FIG.3

【図 4】

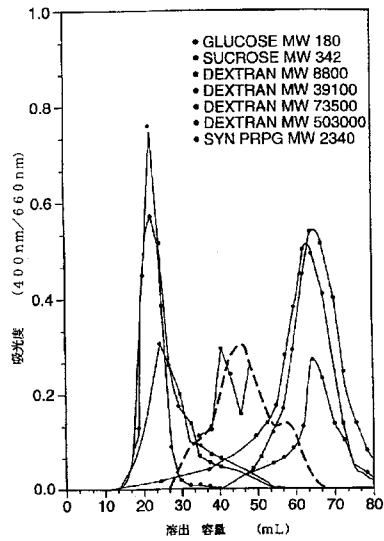


図4は、セファデックスG-100 ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた髄膜炎菌(*N. meningitidis*) B群由来の加水分解オリゴ糖類の精製を示す。

FIG.4

【図 5】

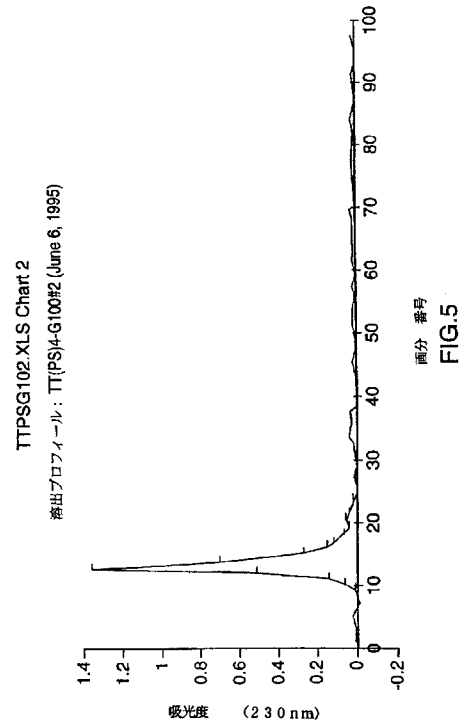


FIG.5

【図 6】

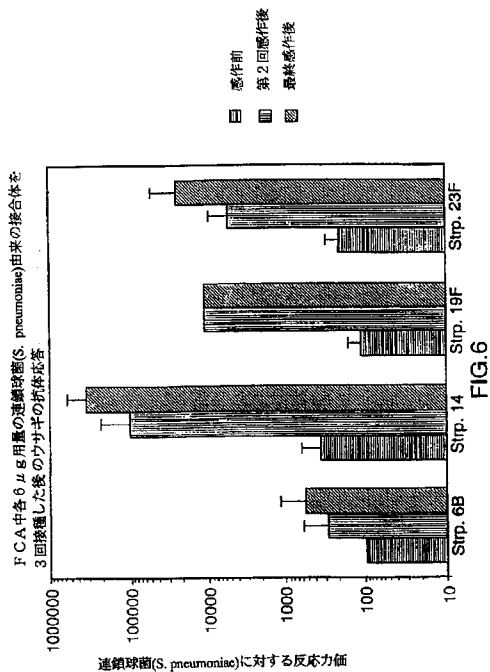


FIG.6

【図 7】

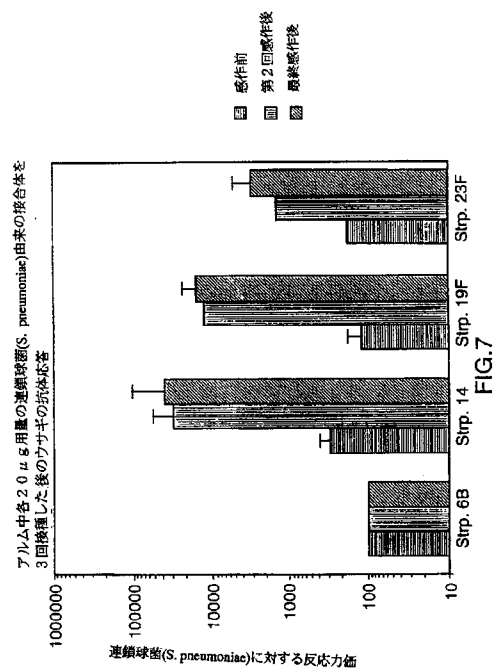
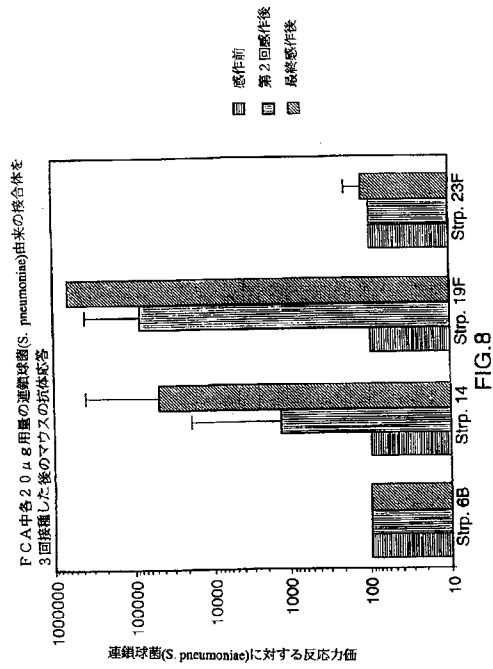
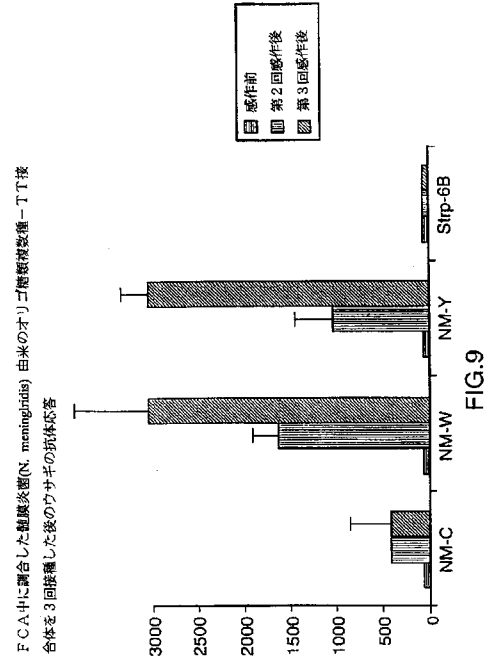


FIG.7

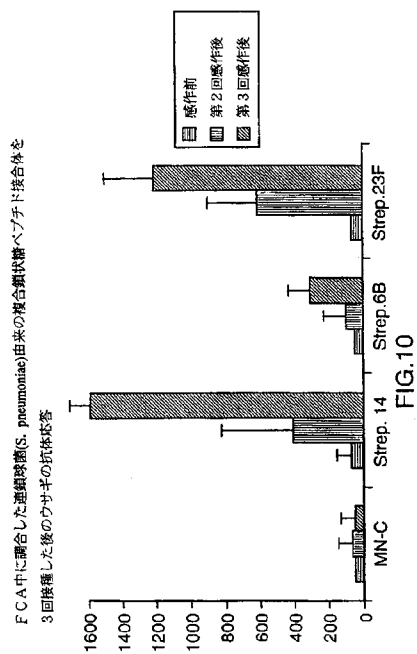
【図 8】



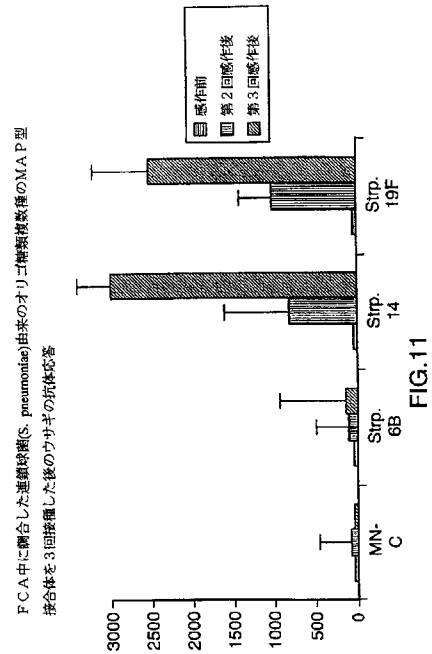
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0004091026000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
C 0 7 K	1/06	(2006.01)	C 0 7 K 1/06
C 0 7 K	14/22	(2006.01)	C 0 7 K 14/22
C 0 7 K	14/285	(2006.01)	C 0 7 K 14/285
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 N

(72)発明者 ペレ チョング
 カナダ国 エル４シー ０ピー６ オンタリオ州 リッチモンド ヒル エストリル ストリート
 ３ ２

(72)発明者 アルフ ランドベルジュ
 フランス国 エフ - ６ ９ ０ ０ ２ リヨン ケ サン アントワヌ ３ ３

(72)発明者 マイケル エイチ . クライン
 カナダ国 エム２ピー １ピー９ オンタリオ州 ウィロウデイル マンロウ プールヴァード
 １ ６

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 4 0 2 2 5 (W O , A 1)
 特表平 0 7 - 5 0 5 5 2 2 (J P , A)
 特表 2 0 0 2 - 5 0 3 7 0 5 (J P , A)
 THE PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL , 第 1 3 巻、第 5 号 , p. 3 6 8 - 3 7 2
 Journal of Peptide Research , 第 4 9 巻、第 6 号 , p. 6 2 0 - 6 2 5
 DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION , 第 8 7 号 , p. 2 6 9 - 2 7 5

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K	1 4 / 3 1 5
A 6 1 K	3 9 / 0 0
A 6 1 K	3 9 / 0 8
A 6 1 K	3 9 / 1 4 5
A 6 1 K	3 9 / 3 8 5
A 6 1 P	3 7 / 0 0
C 0 7 K	1 / 0 6
C 0 7 K	1 4 / 2 2
C 0 7 K	1 4 / 2 8 5
G 0 1 N	3 3 / 5 3

专利名称(译)	糖缀合物型多种寡糖的细菌性脑膜炎疫苗		
公开(公告)号	JP4091026B2	公开(公告)日	2008-05-28
申请号	JP2004233505	申请日	2004-08-10
申请(专利权)人(译)	Aventis Pasteur公司有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛诺菲巴斯德 - 乐有限公司		
[标]发明人	ペレチヨング アルフランドベルジュ マイケルエイチクライン		
发明人	ペレ チヨング アルフ ランドベルジュ マイケル エイチ. クライン		
IPC分类号	C07K14/315 A61K39/385 A61K39/00 A61K39/08 A61K39/145 A61P37/00 C07K1/06 C07K14/22 C07K14/285 G01N33/53 A61K39/09 A61K39/095 A61K39/116 A61P19/00 A61P29/00 A61P31/04 C07K14/33 C07K14/725 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/092 A61K39/095 A61K39/385 A61K47/646 A61K2039/6037 A61K2039/645 A61P19/00 A61P29/00 G01N33/56944 Y02A50/466 Y02A50/484 Y02A50/59 Y10S530/807 Y10S530/81		
FI分类号	C07K14/315.ZNA A61K39/385 A61K39/00.H A61K39/08 A61K39/145 A61P37/00 C07K1/06 C07K14 /22 C07K14/285 G01N33/53.N A61P19/00 A61P29/00		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA14 4C085/BA16 4C085/BA38 4C085/BA41 4C085/BB12 4C085/CC07 4C085 /FF14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA34		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
审查员(译)	菅直人岩下		
优先权	09/027956 1998-02-23 US		
其他公开文献	JP2004346084A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供可用于制备复合碳水化合物化合物的新的糖类缀合技术，所述复合碳水化合物化合物包含与相同载体蛋白共价键合的多个寡糖。解决方案：多价免疫原性分子包含含有至少一个功能性T细胞表位的载体分子和多个不同的碳水化合物片段，每个碳水化合物片段与载体分子连接并且各自含有至少一个功能性B细胞表位。载体分子赋予多种碳水化合物片段增强的免疫原性。多价分子可以通过碳水化合物片段与载体分子的随机缀合或定点缀合来产生。多价分子可用于疫苗或用于诊断应用的抗体的产生。Z

