

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4097691号
(P4097691)

(45) 発行日 平成20年6月11日(2008.6.11)

(24) 登録日 平成20年3月21日(2008.3.21)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	A 6 1 K 39/095
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04

請求項の数 10 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平6-507372	(73) 特許権者	507279510
(86) (22) 出願日	平成5年8月30日(1993.8.30)		バクスター、ヘルスケア、ソシエテ、アノ ニム
(65) 公表番号	特表平8-500607		BAXTER HEALTHCARE S . A.
(43) 公表日	平成8年1月23日(1996.1.23)		スイス国チューリッヒ、カントン、パリゼ レン、ヘルティシュトラーセ、2
(86) 国際出願番号	PCT/US1993/008155	(74) 代理人	100107984
(87) 国際公開番号	W01994/005325		弁理士 廣田 雅紀
(87) 国際公開日	平成6年3月17日(1994.3.17)	(74) 代理人	100075812
審査請求日	平成12年8月11日(2000.8.11)		弁理士 吉武 賢次
審査番号	不服2007-22873(P2007-22873/J1)	(74) 代理人	100091487
審査請求日	平成19年8月20日(2007.8.20)		弁理士 中村 行孝
(31) 優先権主張番号	07/938, 367	(74) 代理人	100094640
(32) 優先日	平成4年8月31日(1992.8.31)		弁理士 紺野 昭男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/064, 501		
(32) 優先日	平成5年5月19日(1993.5.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C群髄膜炎菌に対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 i) - iv) の工程を含んでなる髄膜炎菌感染に対するワクチンの調製用免疫原性複合体の製造方法：

i) O - アセチル基を含む髄膜炎菌 C 群多糖を用意し、

ii) 前記髄膜炎菌 C 群多糖を断片化及び O - 脱アセチル化し、

前記断片化及び O - 脱アセチル化において、

前記断片化及び O - 脱アセチル化は順不同で行い、

前記断片化により、分子量 5 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 の髄膜炎菌 C 群多糖の断片が作出され、
並びに

前記 O - 脱アセチル化により O - アセチル基の 8 0 ~ 1 0 0 % が除去され、

iii) カップリングのために前記 O - 脱アセチル化多糖の断片を活性化し、

iv) 前記 O - 脱アセチル化多糖をキャリア分子とカップリングさせる。

【請求項 2】

1 0 0 % の O - アセチル基が O - 脱アセチル化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

O - 脱アセチル化が水性媒体中塩基性条件下で行われる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

O - 脱アセチル化が 0 . 0 1 ~ 0 . 5 N 水酸化アンモニウム又は水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム中 0 ~ 5 0 の温度で行われる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

O - 脱アセチル化が 0 . 1 N NaOH 中で 1 ~ 2 5 時間行われる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

髄膜炎菌感染に対するワクチンの製造のための C 群髄膜炎菌多糖の使用であって、前記 C 群髄膜炎菌多糖は、カプセル多糖中に O - アセチル基を有する髄膜炎菌株から得られ、

前記 C 群髄膜炎菌多糖を断片化反応及び O - 脱アセチル化反応で処理し、前記断片化反応及び O - 脱アセチル化反応は順不同で行い、前記 O - 脱アセチル化反応により O - アセチル基の 80 ~ 100 % が除去され、前記断片化反応により分子量 5000 ~ 20000 ダルトンの C 群髄膜炎菌多糖の断片が得られる、

10

前記使用。

【請求項 7】

O - 脱アセチル化度が 100 % である、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

ワクチンを非経口投与することからなる、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

ワクチンが体重 kg 当たり 1 ~ 25 µg の投与量で投与される、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 10】

カップリングが還元アミノ化反応により得られる、請求項 1 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

発明の分野

この出願は 1992 年 8 月 31 日付で出願された米国出願第 07 / 938 , 367 号の一部継続である。

本発明は C 群髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) に対して有用なワクチンの製造に関し、これらのワクチンは修正 C 群莢膜多糖の複合体を含んでいる。

発明の背景

C 群髄膜炎菌は世界中における細菌性髄膜炎の大部分の原因である。この病気を予防する現行手段は、精製された C 群莢膜多糖から構成されるワクチンからなる。これらのワクチンは成人に有効であるが、子供では免疫原性に乏しい。幼児で乏しいという結果が非常に望ましくないのは、人口のこのセクションがこれら感染の最高罹患率を有しているからである。

30

C 群髄膜炎菌多糖 (GCMPS) は弱い免疫原であり、このためこれら多糖の免疫原性を高めてワクチンとしてそれらの有効性を拡大させようという努力があった。この目標を達成する 1 つの可能な方法は、少し見込みがあったが、これらの多糖とタンパク質のようなキャリアとの接合によるものである。

様々な研究者が完全な莢膜多糖を単離及び精製して、それらをキャリアタンパク質に共有結合させた。これらの複合体はその多糖単独よりも免疫原性である。多くの例がこれら複合体抗原の成功について示す文献で見られる。1 つのこのような例、米国特許第 4 , 673 , 574 号明細書は、免疫原性化合物を形成するために、キャリアタンパク質に接合された細菌莢膜多糖の使用について記載している。もう 1 つの例、米国特許第 4 , 356 , 170 号明細書は、キャリアタンパク質にカップリングされた特異的多糖、A 群髄膜炎菌多糖 (GAMPS) からなる複合体の免疫原性について記載している。これらの複合体は有効レベルの抗原を宿主に送達する上で改善された方法を提供する。これら特許双方の開示は参考のためすべて本明細書に組み込まれる。

40

免疫原性を増加させるもう 1 つの方法は、米国特許第 4 , 727 , 136 号明細書で見られるように、B 群髄膜炎菌多糖 (GBMPS) 抗原で見込みがあった。この方法では多糖のシアリル部分の N - アセチル基を N - プロペニル基で置き換え、その後修正された多糖をキャリアタンパク質に接合させている。これらの複合体は良い免疫原であって、天然 GBMPS と効果的に交差反応する。この発見は、多糖抗原への置換基の付加が抗体による認識用

50

に追加の免疫原性部位又はエピトープを形成できることを証明している。

O-アセチル陽性C群髄膜炎菌から現在製造されているワクチンは、免疫原性に乏しいことが知られている。O-アセチル陰性変異体に由来するワクチンは免疫原性であるという報告があった。Glodeら, The Journal of Infectious Disease, Vol.139, No.1, Jan.1979, pp.52-59; Steinkoffら, Infection and Immunity, Oct.1981, pp.144-145; Arakereら, Infection and Immunity, Dec.1991, pp.4349-4356 参照。

ほとんどのC群髄膜炎菌株は、O-アセチル基がシアル酸残基のC-7とC-8との間にもっぱら分布するO-アセチル陽性(OAc+)多糖を生産する。既知OAc-陰性(OAc-)株の中には髄膜炎菌C群MC19細菌がある。

本発明の目的は、キャリアに接合された修正C群髄膜炎菌多糖を含んだ高度免疫原性ワクチンを提供すること、更にOAc陰性変異体に由来する修正多糖とキャリアとの複合体を含有した高度免疫原性ワクチンを提供することである。

発明の要旨

本発明は、OAc+株に由来する髄膜炎菌C群多糖(GCMP)のO-脱アセチル化による化学的修正と、高免疫原性物質を得るためキャリアへの脱アセチル化多糖の接合に関する。

本発明は、これら多糖の有効サイズを減少させるために、OAc+株からの脱アセチル化多糖を断片化し、しかもOAc-株からの多糖を断片化する方法に更に関する。

本発明は、高免疫原性を有するもっと低分子量の断片を得るために、天然のままか又は脱アセチル化されたC群多糖の解重合に更に関する。

本発明は、キャリア物質に直接又はキャリア物質に結合分子を介してカップリングさせるための反応部位を与える残基をOAc+株からの脱アセチル化多糖内に形成する方法にも関する。

加えて、本発明は、O-脱アセチル化髄膜炎菌C群多糖、OAc-株からの多糖をキャリア物質にカップリングさせて作られた免疫原性複合体、又は多糖とキャリアが共有結合された断片化髄膜炎菌C群多糖に関する。

本発明では、キャリア物質と髄膜炎菌のO-脱アセチル化C群多糖、OAc-株からの多糖、これら多糖の断片又は非脱アセチル化多糖の断片とを共有結合させることからなる免疫原性複合体の製造方法が開示されている。

本発明は、細菌性髄膜炎にかかりやすい哺乳動物で強力な殺菌性ワクチンとしての、O-脱アセチル化C群多糖又はOAc-多糖の複合体の用途に更に関する。ワクチンは水酸化アルミニウム又はステアリルチロシンのようなアジュバントを含有していてもよい。

発明の具体的な説明

C群髄膜炎菌多糖(GCMP)の免疫原性を高めるために、修正GCMPが作られ、キャリア分子に共有結合される。更に、単離されたままか又は修正形いずれかのOAc-株からの多糖がキャリア分子に共有結合される。多糖複合体は様々な化学的、物理的又は酵素的カップリング反応から形成することができる。用いられるカップリング技術は、用いられる結合剤と、キャリア物質又は分子上の反応基に依存している。様々なカップリング操作が当業者に知られており、容易に使用できる。

キャリア物質又は分子とは、多糖分子にカップリングされうる基を有したあらゆる物質又は分子として本発明では定義される。ポリマーキャリアは天然又は合成物質であり、水溶性でも又は非水溶性であってもよい。キャリア物質又は分子は、最も一般的には種類上タンパク質である。タンパク質キャリアの場合に、タンパク質はカップリングに使える反応基を有した生理学上許容されるタンパク質であれば何でもよい。一級又は二級アミノ基を含んだいかなるタイプのキャリアも使用できる。反応性遊離アミノ基は、ヒドロキシル、アルデヒド、カルボン酸等のような部分を介して多糖にうまくカップリングさせることができる。適切なタンパク質には天然ペプチド及びタンパク質、例えば牛血清アルブミン、合成修正により細菌毒素から誘導される細菌トキソイド、例えばジフテリアトキソイド、破傷風菌トキソイド、百日咳毒素又は百日咳トキソイド、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)組換えエキソプロテインA及びウェルチ菌(Clostridium perfringens)外毒素がある。

10

20

30

40

50

細菌に由来する他のタンパク質も用いてよい。細菌源は、例えばインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、髄膜炎菌、肺炎双球菌、 α -溶血連鎖球菌及び大腸菌(*E. coli*)であってもよい。合成ポリリジンのようなリジン残基を含む他のタンパク質も有用である。他のタンパク質キャリアと他の非タンパク質キャリア分子も当業者によく知られており、本発明でキャリア分子として使用できる。非水溶性キャリアの例はアミノアルキル-セファロース、例えばアミノプロピル又はアミノヘキシルセファロースと、アミノプロピル-ガラスである。化学的に結合されたアミノ基を含むように修正された他のキャリアも用いてよい。このようなキャリアは、アミノアルキル基が共有結合鎖を介して結合された多糖から誘導してもよい。

本発明の一面によれば、OAc+株からのC群多糖におけるシアリル基の7及び/又は8位のO-アセチル基は、適切な試薬との処理で髄膜炎菌C群多糖から様々な程度で選択的に除去される。多くの脱アセチル化試薬が当業者に知られている。好ましくは、脱アセチル化は水性媒体中マイルドな塩基性条件下で、例えば約0.01~0.5N水酸化ナトリウム、好ましくは0.1N水酸化ナトリウム中約0~50分、好ましくは25分で行われる。水酸化カリウム、水酸化アンモニウム等のような他の塩基性溶液もこの反応に使用できる。その反応で用いられる脱アセチル化反応温度及び塩基濃度は、マイルドな条件が維持されることだけに注意すれば、変えることができる。反応条件は、C群多糖の脱アセチル化だけが望ましい程度に達するように制御されることが好ましい。O-脱アセチル化は、望ましい脱アセチル化度に達するまで、即ち0.1N NaOH中で約1~25時間、好ましくは約16時間かけて行われる。

マイルドな条件を用いる脱アセチル化反応からのO-脱アセチル化多糖の収率は、典型的には80%を超える。O-脱アセチル化度は、用いられる条件に応じて、約30~100%である。典型的には、温度及び反応時間を変えれば、多糖のO-脱アセチル化度を変えることができる。好ましくは80%以上の範囲のO-脱アセチル化、最も好ましくは100%の脱アセチル化が行われる。

キャリア分子への接合前に(脱アセチル化の前又は後で)多糖鎖を断片化又は解重合させることも望ましい。多糖は多くの試薬に感受性であり、酢酸のような弱酸で加水分解されるか又はメタ過ヨウ素酸塩のような試薬で酸化される。本発明の好ましい態様において、非脱アセチル化多糖、脱アセチル化多糖又はOAc-株からの多糖はメタ過ヨウ素酸塩酸化による接合のために断片化及び活性化される。当業者であれば、このステップの反応を行うため他の方法についてもわかるであろう。

本発明の免疫原性複合体は、O-脱アセチル化GCMF又はOAc-株からの多糖の断片上に還元性末端基を最初に形成し、その後還元性末端基を還元アミノ化でキャリア物質又は分子のアミノ基と反応させることにより製造される。還元性末端基はいずれか適切な方法で、例えば選択的加水分解、即ち酸又は酵素によるか、あるいは酸化開裂、即ちメタ過ヨウ素酸塩により形成される。接合は水素化シアノホウ素アニオンのような還元剤を含有した水性溶液中で還元アミノ化により行われることが好ましい。多糖をキャリア分子にカップリングさせる他の方法は当業者に知られている。

好ましいカップリング方法では2ステップ反応を要する。多糖はアルデヒド部分を形成するためにメタ過ヨウ素酸塩酸化され、その後キャリア分子上に遊離アミノ基の存在下及び適切な還元剤の存在下で反応させる。適切な還元剤には、典型的には、重要な還元性末端を還元しないばかりかキャリア分子又は物質に悪影響を与えない、水素化シアノホウ素、水素化ホウ素ナトリウム又は他の還元剤がある。還元剤は、加水分解されたGCMF断片のカルボニル基とキャリア分子又は物質のアミノ基との間で形成されるシッフ塩基中間体のマイルドな選択的還元剤として作用する。このタイプの接合に関して典型的な反応条件はJenningsらの米国特許第4,356,170号明細書で示されており、これは参考のためすべて組み込まれる。

しかしながら、本発明の複合体ワクチンは還元アミノ化で生産されたものに限定されないことが理解されるべきである。このため、ワクチンはSchneerson, R.ら, Preparation, Characterization and Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Polysaccharide

10

20

30

40

50

-Protein Conjugates (B型インフルエンザ菌多糖-タンパク質複合体の製造、特徴及び免疫原性), J. Exp. Med., 1952, 361-476 (1980) 及び Lance K. Gordon の米国特許第 4, 644, 059 号明細書で記載されるように、アジピンジヒドラジドスパーサーを用いて多糖をキャリアタンパク質と接合させることにより製造してもよい。一方、Marburg, S. R., "Bio-molecular Chemistry of Macromolecules: Synthesis of Bacterial Polysaccharide Conjugates with Neisseria meningitidis Membrane Protein" (高分子の生体分子化学: 髄膜炎菌膜タンパク質との細菌多糖複合体の合成), J. Am. Chem. Soc., 108, 5282-5287 (1986) に記載されたような二元スパーサー技術、又は可能であれば Anderson の米国特許第 4, 673, 574 号明細書で言及されるような還元性末端法を用いてよい。これら引用文献の開示は参考のためすべて本明細書に組み込まれる。

10

本発明の免疫原性複合体は、1種以上の製薬上許容される賦形剤及び場合により他の成分と共に処方してもよい。製薬上許容される賦形剤は、処方物の他成分と適合して、そのレシピエントに有害でないという意味で“許容”されねばならない。処方物は便宜上単位剤形で供与され、製薬業界で周知のいずれかの方法で製造される。

活性成分として多糖複合体を含有したワクチンの製法は当業界でよく知られている。典型的には、このようなワクチンは液体溶液又は懸濁液いずれかの注射剤として製造される；注射前に液体中への溶解又は懸濁に適した固体形態も製造してよい。製剤は乳化させてもよい。活性な免疫原性成分は、製薬上許容されて活性成分と適合する賦形剤とよく混合される。適切な賦形剤は、例えば水、塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等及びそれらの組合せである。加えて、所望であれば、ワクチンは湿潤又は乳化剤、pH 緩衝剤又はワクチンの有効性を高めるアジュバントのような補助物質を少量で含有してもよい。当業者に知られるいかなる適切なアジュバントも使用できる。適切なアジュバントには、特にステアリルチロシン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム及び硫酸アルミニウムがある。水酸化アルミニウムアジュバントで作られたワクチンは特に有効であることがわかった。ワクチンは通常非経口で注射により、例えば皮下又は筋肉内いずれかに投与される。他の投与様式に適した追加処方には坐剤と、一部の場合には経口処方がある。坐剤の場合、伝統的な結合剤及びキャリアには例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドがある；このような坐剤は活性成分を 0.5 ~ 10%、好ましくは 1 ~ 2% の範囲で含有した混合物から形成される。経口処方は、例えば製薬グレードのマニトール、セルロース、炭酸マグネシウム等のような常用賦形剤を含有している。これらの組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性処方又は粉末の形態をとり、10 ~ 95%、好ましくは 25 ~ 70% の活性成分を含有している。

20

30

ワクチンは投薬処方と適合したやり方で、治療上有効かつ免疫原性であるような量で投与される。投与される量は被治療体、抗体を合成する被治療体免疫系の能力と、望まれる保護の程度に依存している。投与が要求される活性成分の正確な量は担当者の判断に依存し、各個体毎に異なる。しかしながら、適切な投与量範囲は個体当たり活性成分が数百マイクログラム程度である。初回投与及びブースターショットに適した方法も様々であり、これは初回投与の後 1 又は 2 週間隔の注射又は他の投与で代表される。

本発明のワクチンは哺乳動物で抗 G C M P 抗体を有効レベルで誘導させる。このワクチンはどの年齢の哺乳動物に注射投与してもよく、病気にかかりやすい哺乳動物に免疫原性量の複合体を投与することで髄膜炎菌に起因する全身感染に対して活性な免疫を誘導するために利用される。

40

通常、約 5 ~ 約 100 μ g、好ましくは約 10 ~ 50 μ g を含有したワクチンが、若い哺乳動物で G C M P に対する抗体を有効レベルで誘導させるために適している。正確な投与量は実験で決定される。少ない用量を数回かけて連続的に与えることが、1回の注射として同量の複合体を与えるよりも優れていると予想される。

更にもう 1 つの面において、本発明は C 群髄膜炎菌に起因する髄膜炎から保護できる - グロブリン分画を提供する。その分画は本発明のワクチンで哺乳動物を免疫することにより生産される。次いでその分画は上記生物に起因する進行性感染から保護するか又はそれを治療するために個体に投与される。このことから、本発明の免疫原性ワクチン複合体が

50

それらの好ましい免疫原性からみて治療抗血清源となることは明らかであろう。本発明の複合体はモノクローナル抗体及び可能であれば抗イディオタイプ抗体を作る上でも有用である。

髄膜炎菌C群多糖のO-脱アセチル化は、約0～50、好ましくは25で約1～25時間、好ましくは約16時間にわたる0.01～0.5N NaOH、好ましくは0.1N NaOHのようなマイルドな塩基での処理により行える。7及び/又は8位からアセチル基の除去はNMRスペクトル測定で確認される。

後のステップで、多糖はスーパーデックス(Superdex)200プレップグレードでのようなゲル濾過により精製される。過ヨウ素酸ナトリウムを用いる還元部分解重合は、最大免疫応答を示す上で最適のサイズを有した活性化多糖を得るために、OAc+株からの非脱アセチル化多糖、脱アセチル化多糖と、OAc-株からの多糖で行われる。多糖はゲル濾過により精製され、塩を除去するために透析され、凍結乾燥される。次いでそれは還元アミノ化反応により破傷風菌トキソイドのような適切なタンパク質キャリアにカップリングされる。得られた複合体はゲル濾過により精製し、チャールズ・リバーズ(Charles Rivers)から購入したFRW異型交配スイス・ウェブスター(Swiss Webster)マウスで免疫原性について分析する。

【図面の簡単な説明】

図1 血清ELISA力価に関するGCMP-TT複合体中の多糖O-アセチル化の効果。

ELISAプレートはO-アセチル陰性GCMP-HSA複合体でコートした。

図2 血清ELISA力価に関するGCMP-TT複合体中の多糖O-アセチル化の効果。

ELISAプレートはO-アセチル陽性GCMP-BSA複合体でコートした。

図3 補体依存性殺菌活性に関するGCMP-TT複合体中の多糖O-アセチル化の効果。

殺菌活性は髄膜炎菌C群株C11、O-アセチル陽性株に対して調べた。

図4 血清ELISA力価に関するGCMP-TT複合体中の多糖サイズの効果。ELISA

プレートはO-アセチル陰性GCMP-HSA複合体でコートした。

図5 血清ELISA力価に関するGCMP-TT複合体中の多糖サイズの効果。ELISA

プレートはO-アセチル陽性GCMP-BSA複合体でコートした。

図6 補体依存性殺菌活性に関するGCMP-TT複合体中の多糖サイズの効果。殺菌活

性は髄膜炎菌C群株C11、O-アセチル陽性株に対して調べた。

例1

C群髄膜炎菌多糖(GCMP)のO-脱アセチル化

天然髄膜炎菌C群多糖(188mg)を0.1N水酸化ナトリウム溶液(30ml)に溶解した。混合液を25で16時間攪拌した。次いでそれを4で水に対して透析し、凍結乾燥した。白色綿毛状固体物として得た多糖(144mg、77%)は、¹H-NMRスペクトル測定(500MHz)によると、O-脱アセチル化されていることを示した。

例2

O-脱アセチル化C群多糖(GCMP)-(-)の精製

O-脱アセチル化多糖(141mg)をダルベッコのPBS(10ml)に溶解し、スーパーデックス200プレップグレード(2.6×100cm)カラムでゲル濾過により精製した。カラムを100ml/hrで溶出させ、

5.0ml分画を集めた。溶出液を示差屈折計及びUV(280nm)検出器でモニターした。示差屈折計で検出される第一の主ピークを含有して、UV吸収物質を実質上含有しない分画を合わせた。水に対する透析と凍結乾燥後に、精製GCMP-(-)(108mg、77%)を白色綿毛状固体物として得た。その固体物質はブラッドフォード(Bradford)法によりタンパク質について及び260nmでUV吸光度により核酸について分析した。表1で示したように、これらの汚染物質はこの精製ステップで実質上減少している。加えて、スペロース(Superose)12ゲル濾過カラム〔ファルマシア(Pharmacia)〕を用いたHPLCによるGCMP-(-)の分析では、それが出発天然多糖(GCMP)でも観察されるシャープなボイド容量ピークとして溶出することを示しており、精製された多糖が高分子量形で存在することを示唆している。

10

20

30

40

50

例 3

精製 G C M P - (-) の酸化及びサイズ分け

メタ過ヨウ素酸ナトリウムによる多糖の酸化は、後におけるタンパク質とのカップリングのために多糖を活性化して、しかも最良の免疫応答を発揮することが既に示されたもっと小さな断片に多糖を開裂するという二重目的に役立つ。異なるロットの多糖は最良の多糖鎖長にする上で異なるヨウ素酸塩酸化条件を要することも既に示されているため、これらの条件は小規模反応 (5 mg) で最初に決めて、その後大規模反応を行う。典型的には、反応時間及び温度を各々 2 時間及び 25 で一定に保ち、メタ過ヨウ素酸ナトリウムの濃度を脱イオン水中 3 ~ 1 2 ミリモルで変える。小及び大規模反応時における多糖の濃度も 6 ~ 1 0 mg/ml で一定に保つ。2 時間経過後、過剰 (~ 1 0 倍) の 1 . 0 M エチレングリコ

10

ール溶液を、未反応メタ過ヨウ素酸ナトリウムを破壊するために反応溶液に加える。少くとも 3 0 分間の反応後に、溶液は酸化された多糖の平均分子量を決定するために目盛付きスペロース 1 2 カラムを用いて H P L C により分析する。1 2 0 0 0 ~ 1 6 0 0 0 ドルトンの分子量の平均を有する多糖を与える反応条件を、下記反応で示されるような大規模反応で用いる。

精製 G C M P - (-) (6 3 mg) を脱イオン水 (4 . 8 1 ml) に溶解した。この溶液に 2 1 mmol メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (4 . 8 1 ml) を加えて、多糖を 6 . 5 5 mg/ml 及び NaIO_4 を 1 0 . 5 mmol で有する脱イオン水中の反応混合液を得た。反応を暗所中 2 5 で 2 時間進行させ、その後 1 M エチレングリコール (0 . 9 6 ml) で 3 0 分間処理した。この物質は 1 2 8 0 0 ドルトンの平均分子量を有する広域ピークとしてスペロース 1 2 カ

20

ラムから溶出する。溶液の容量を凍結乾燥機で約 5 ml に減少させ、物質を溶出緩衝液としてダルベッコの P B S を用いるスーパーデックス 2 0 0 プレップグレードカラム (2 . 6 × 1 0 0 cm) でゲル濾過により精製し、5 ml 分画を集めた。1 0 0 0 0 ~ 1 8 0 0 0 の平均分子量を有する物質を含有した分画を合わせる。脱イオン水に対する透析と凍結乾燥の後に、酸化及びサイズ分けされた多糖 [o] - G C M P - (-) (1 6 . 0 mg、2 3 %) を白色綿毛状固体物として得たが、これはスペロース 1 2 での F P L C により 1 4 5 0 0 ドルトンの平均分子量を有することが示された。

表 1

C 群髄膜炎菌多糖調製物の

30

タンパク質及び核酸含有率

<u>多糖</u>	<u>タンパク質 %</u>	<u>核酸 %</u>
G C M P	8.3	2.7
精製 G C M P - (-)	0.61	0.12
[o] - G C M P - (-)	0.06	0.31

40

例 4

[o] - G C M P - (+) の製造

天然 G C M P (3 5 0 mg) を 0 . 0 2 N NaOH (3 6 ml) に溶解し、2 5 で 3 時間インキュベートした。次いでこの溶液に 0 . 1 M NaIO_4 (3 6 ml) を加え、内容物を 2 5 で更に 5 0 分間インキュベートした。次いで反応液を 5 0 % エチレングリコール (5 . 3 ml) で 2 0 分間処理し、混合液を 5 0 0 0 rpm で 1 0 分間かけて遠心により清澄化した。上澄を脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥して、固体物 3 0 0 mg を得た。その物質をバイオ-ゲル (Bio-Gel) A - 0 . 5 m カラムでサイズ分けして、1 1 5 0 0 ドルトンの分子量を有する酸化及びサイズ分けされた多糖 ([o] - G C M P - (+)) を得た。

例 5

50

破傷風菌トキソイドタンパク質モノマー (TT) の精製

[2 . 1 mg/ml のタンパク質を含有している (標準としてヒト I g G を用いるブラッドフ
ォードタンパク質アッセイ)] 静かに攪拌された破傷風菌トキソイド溶液 [スタテンス・
セルミンズチツ (Statens Seruminstitu)] (7 5 ml) 中に硫酸アンモニウム (4 2 . 1 g
) を少量ずつ 4 5 分間かけて加え、 8 0 % 飽和溶液を得た。混濁溶液を 4 で一夜おいて
、タンパク質の沈降を完了させた。沈殿物を 1 5 0 0 0 rpm (2 3 0 0 0 g) で 2 0 分間
の遠心により集め、原タンパク質 1 0 % 以下を含有した上澄を捨てた。ペレットをダルベ
ッコの P B S 緩衝液 (1 0 ml) に再溶解し、バイオ-ゲル A - 0 . 5 m カラムでゲル濾過に
より分別した。破傷風菌トキソイドモノマーに相当する主ピークをプールし、脱イオン水
に対して透析し、凍結乾燥して、白色綿毛状固体物として T T を得た (6 5 . 4 mg、 4 1
 %) 。

10

例 6

破傷風菌トキソイド (TT) への O-脱アセチル化 C 群髄膜炎菌多糖 ([o] - G C M P - (-)) のカップリング

p H 7 . 5 の 0 . 2 0 M リン酸緩衝液 (0 . 2 2 2 ml) 中に [o] - G C M P - (-) (1 0 m
g)、 T T (3 . 3 mg) 及び水素化シアノホウ素ナトリウム (6 . 8 mg) を含有した溶液
を 3 7 で数日保つ。反応溶液を P B S 緩衝液 (0 . 5 ml) で希釈し、不溶性物質をエッ
ペンドルフ遠心機で 1 0 0 0 0 rpm で 2 分間の遠心により除去した。

上澄を 1 . 6 x 1 0 0 cm バイオ-ゲル A - 0 . 5 m カラム上にいれて、 0 . 1 5 M Na C
l + 0 . 0 2 % チメロサルにより 2 0 ml / hr で溶出させた。ポイド容量で溶出するピー
クに相当する分画をプールして、 O-脱アセチル化 C 群髄膜炎菌多糖-破傷風菌トキソイド
複合体 [G C M P - (-) - T T] を得た。プールした溶液をブラッドフォード法によりタン
パク質に関して分析したところ、タンパク質 2 . 8 6 mg (収率 8 7 %) を含有しているこ
とを示した。その複合体中の多糖含有率をシアル酸の含有率から見積り、これをシアル酸
に関してレゾルシノールアッセイにより決定したところ、 0 . 9 9 7 mg の多糖を含有して
いることが示された (収率 1 0 %) 。複合体の特徴は表 2 にまとめた。

20

例 7

破傷風菌トキソイドへの O-アセチル化 C 群髄膜炎菌多糖 ([o] - G C M P - (+)) のカッ
プリング

p H 7 . 5 の 0 . 2 0 M リン酸緩衝液 (0 . 2 0 ml) 中に [o] - G C M P - (+) (1 0 .
2 mg)、 T T (2 . 9 mg) 及び水素化シアノホウ素ナトリウム (5 . 2 mg) を含有した溶
液を 3 7 で 5 日間保つ。複合体をゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、例 6 で記
載されたように分析した。この複合体溶液はタンパク質 2 . 7 mg (収率 9 3 %) 及び多糖
1 . 0 6 mg (収率 1 0 . 4 %) を含有している。この複合体の特徴は表 2 にまとめた。

30

表 2

G C M P - (-) - T T 及び G C M P - (+) - T T 複合体 の特徴				
複合体	多 糖		タンパク質 対 P S	複合体中 の多糖%
	アセチル化	平均 分子量		
G C M P - (-) - T T	O - 脱アセチル化	12, 500	2. 9 : 1	26
G C M P - (+) - T T	O - アセチル化	11, 500	2. 6 : 1	28

40

例 7 A

50

(-) - G C M P - T T ワクチンの製造

(-) - G C M P - T T ワクチンを前記例の G C M P - (-) - T T ワクチンと同様のやり方で製造するが、但し多糖は髄膜炎菌 C 群株 M C 1 9 細菌から得る。この細菌は O - アセチル部分を欠いた G C M P を生産する。

例 8

複合体ワクチン溶液の製造及び生物学的研究

例 6 及び 7 で記載された複合体溶液を、全ワクチン中の多糖濃度が 1 0 μg/ml であるように、塩水 (0 . 1 5 M NaCl + 0 . 0 2 % チメロサル) で希釈した。これらワクチンの半分は 1 . 0 mg/ml の濃度で水酸化アルミニウムアジュバントも含有していた。

これらワクチンの免疫原性は 4 ~ 6 週齢異型交配スイス・ウエブスター F R W 雌性マウスで調べた。動物を 0、1 4 及び 2 8 日目にワクチン 0 . 2 ml で皮下注射し、抗体アッセイ用の血清を 3 8 日目に集めた。

10

例 9

髄膜炎菌 C 群多糖に対するマウス抗体に関する酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A)

E L I S A は、微量滴定プレートに適切な多糖 [G C M P - (-) 又は G C M P - (+)] ヒト血清アルブミン (H S A) 複合体でコートし、その後 B S A 阻止緩衝液で処理して行った。次いで P B S - ツイーン緩衝液による血清の希釈を行った。プレートを室温で 1 時間インキュベートし、洗浄し、室温で 3 0 分間にわたり第二抗体 [ヤギ抗マウス I g G (H + L) - ペルオキシダーゼ] で処理した。この後に P B S - ツイーンで十分に洗浄し、Kirkegaard & Perry () で記載されたように調製されたばかりの T M B ペルオキシダーゼ基質で処理した。1 5 分間後に、酵素反応を各ウェルに加えられた 1 M リン酸で停止させ、吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて分析した。E L I S A 力価は表 3 にまとめた。

20

例 1 0

髄膜炎菌 C 血清群に関する殺菌アッセイ

殺菌活性は、適切な希釈倍率の試験血清及びベビーウサギ血清 (補体源) の存在下 3 7 で 1 時間にわたり髄膜炎菌 C 群 (株 C 1 1) をインキュベートすることにより調べた。第一の場合は試験血清を欠き、第二の場合は熱不活化補体を含有している 2 種の陰性コントロールも同様にインキュベートした。次いでこれら溶液の一部 (5 0 μ l) をチョコレート寒天プレート上に重複して適用し、生存菌について調べるため 5 % C O ₂ 中 3 5 ~ 3 7 で一夜インキュベートした。翌朝、コロニーの数を各プレート上でカウントし、平均を重複したものについて計算する。血清殺菌力価は 5 0 % 生存率を示す血清希釈倍率として報告する。異なるワクチンに関する殺菌活性は表 3 にまとめた。

30

表 3

ワクチン	ELISA 力価	殺菌力価
G C M P - (+) 塩水中	230	応答なし
G C M P - (+) - T T 塩水中	12, 293	応答なし
G C M P - (+) - T T 塩水及びアルミ中	27, 866	2, 800
G C M P - (-) - T T 塩水中	13, 127	2, 700
G C M P - (-) - T T 塩水及びアルミ中	25, 537	21, 000
(-) - G C M P - T T 塩水中	10, 867	2, 700
(-) - G C M P - T T アルミ中	27, 327	> 40K

50

2タイプの複合体で免疫されたマウスの各群から得られた血清のE L I S Aによる分析では、双方の群のマウスでI g G抗体の高力価の存在を示した。更に修正株に対する殺菌アッセイを用いた血清の分析でも意外な結果を示した。双方のワクチン群から得られた血清に関するE L I S A力価は同様であったが、修正複合体で免疫されたマウスから得られる血清は、天然複合体ワクチンをうけたマウスからの血清と比較したとき、優れたレベルの殺菌性抗体を有していた。この研究の結果は、本複合体ワクチンが強い殺菌活性を有したクラスの抗体を誘導させることを示唆している。

C群髄膜炎菌多糖-破傷風菌トキソイド複合体(G C M P - T T)の合成

O-アセチル陽性株から単離したC群髄膜炎菌多糖を精製し、希塩基で部分的に又は完全にO-脱アセチル化した。そのO-脱アセチル化多糖と塩基で処理されていない精製多糖ロットを部分的に解重合し、活性化し、精製した。精製及び活性化多糖ロットにおけるO-アセチル化の程度及び位置は高分解能核磁気共鳴(N M R)スペクトル分析(600MHz)により調べ、平均分子量はゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより調べた。このデータのまとめに関しては表4参照。破傷風菌トキソイドタンパク質へのこれら活性化多糖のカップリング(4)から、表5に示されたG C M P - T T複合体を得たが、ここではG C M P - T T複合体の多糖含有率%についてもまとめている。

ワクチン溶液の製造及び生物学的研究

G C M P - T T複合体溶液を0.01%チメロサル含有塩水で希釈し、免疫マウスに直接用いるか(塩水)、あるいは水酸化アルミニウム(A1アジュバント)又はステアリルチロシン(S tアジュバント)に吸着させた。各最終ワクチン溶液又は混合液は、複合体多糖含有量に関して10µg/mlで複合体を含有していた。すべてのワクチン処方、破傷風菌トキソイド及び多糖コントロールと一緒に、0、14及び28日目にワクチン溶液又は混合液0.2mlの皮下注射により雌性マウス(4~6週齢)10匹の群で試験した。血清を38日目に集め、それをE L I S A又は殺菌アッセイにより分析するまで凍結貯蔵した。

血清学的研究

複合体ワクチン中のC群髄膜炎菌多糖に対する免疫応答はそれらのE L I S A力価で表示する。各々の血清を2つの方法で分析した。第一にコーティング抗原(G C M P-ヒト血清アルブミン複合体)はO-アセチル陰性多糖を含有し、第二にコーティング抗原(G C M P-牛血清アルブミン複合体)はO-アセチル陽性多糖を含有していた。E L I S Aデータは図1、2、4及び5で示されている。遊離破傷風菌トキソイドタンパク質、O-アセチル陽性多糖及びO-アセチル陰性多糖を含有したコントロールからの血清は、分析された最低希釈倍率時(1/1000)に検出しうるE L I S A力価を何も示さなかった。すべての血清は、髄膜炎菌C群株C11、O-アセチル陽性株に対する補体依存性殺菌活性についても分析した。図3及び6で示された殺菌力価は50%生存率を示す血清希釈倍率である。コントロールからのすべての血清は、分析された最低希釈倍率時(1/1000)に殺菌活性を示さなかった。

結果及び考察

この研究で製造された複合体のすべてに対する免疫応答は、E L I S A及び補体依存性殺菌アッセイの双方を用いて、3種の異なるワクチン処方で評価した。その処方には、複合体の塩水溶液、あるいは水酸化アルミニウム又はステアリルチロシンに吸着された混合物がある。すべての複合体からの血清に関するE L I S Aは、複合体が水酸化アルミニウム上に吸着されたときに実質上最高で、それらがそれらの塩水溶液として注射されたときに最低の免疫応答を示す(図1、2、4及び5参照)。ステアリルチロシンで複合化された複合体はすべてのケースで塩水溶液よりも高い免疫応答を示したが、その免疫応答はすべてのケースで水酸化アルミニウム吸着複合体の場合よりも数倍低かった。殺菌アッセイでは3種のワクチン処方で同様の傾向を示した(図3及び6参照)。

複合体多糖の平均分子量が類似しているG C M P - T T複合体(12000~14800、表1参照)に関するE L I S A力価は図1及び2で示されている。図1において、E L I S A力価をO-アセチル陰性多糖含有のコーティング抗原(G C M P - H S A)で得た。

この抗原については、最高力価が最小O-アセチル化多糖で得られたというような、複合体多糖のELISA力価とO-アセチル化の程度との間に逆の関係がある。完全に異なるパターンが図2で観察され、そこではO-アセチル陽性多糖含有のコーティング抗原(GCMP-BSA)で得られた力価が示されている。この場合において、ELISA力価はO-アセチル含有率が増加していくと増加するが、しかしながら最少量のO-アセチル化と最大量を含んだ複合体との間にある力価の差異は、O-アセチル陰性コーティング抗原を用いて観察されたときほど大きくはない(図1参照)。O-アセチル化の程度と髄膜炎菌C群株C11(O-アセチル陽性株)に対する補体依存性殺菌活性との間の関係は図3で示されている。O-アセチル化の程度が増加すると、殺菌活性に著しい減少がある。このように、殺菌活性はO-アセチル陰性コーティング抗原で得られたELISA力価と密接に相関している(図1参照)。水酸化アルミニウム上に吸着された複合体の場合、ELISA及び殺菌アッセイの双方に関して、O-アセチル化の程度が5%から70%に増加するときに力価で約3倍の減少が観察される。図1~3で示されるように、ワクチンの3種の処方(3アッセイ)の各々で同様の傾向を示す。図1~3で示された関係は、血清の反復分析でも観察された。

10

O-アセチル化の程度及び処方のタイプに加えて、複合体ワクチン中における多糖のサイズは免疫応答に大きな影響を有する。これは多糖が61~65%O-アセチル化されたGCMP-TT複合体に関して図4~6で示されている。同様の傾向は2つのELISAで観察される(図4及び5)。最高ELISA力価は、多糖が12000ドルトンの平均分子量を有する、水酸化アルミニウム及びステアリルチロシン処方中の複合体ワクチンで観察されるが、差異は水酸化アルミニウム吸着複合体の場合に特に大きい。2つのELISAとは対照的に、水酸化アルミニウム及びステアリルチロシン処方に関する殺菌力価は6600ドルトン多糖のとき最高であり、多糖のサイズが増加すると減少する(図6参照)。

20

表 4

精製及び活性化多糖サンプルにおける平均分子量
(Av. Mol. Wt.) 及びO-アセチル化の性質

多糖 サンプル No.	Av. Mol. Wt. ドルトン	O-アセチル化%		
		7-OAc	8-OAc	(7+8)-OAc
1	6,600	40	23	63
2	12,000	34	27	61
3	12,800	31	4	35
4	13,000	41	27	68
5	14,000	-	-	6
6	14,800	40	26	66
7	40,000	36	29	65

30

40

O-アセチル化%は、シアル酸残基の7及び8位におけるメチンプロトンの積分値を3位におけるプロトンの場合と比較することにより、高分解能NMRスペクトル分析で調べる。

。

表 5

G C M P - T T 複合体中における多糖含有率%のまとめ

複合体 No.	多糖サンプル No.	複合体中多糖%
1	1	35
2	2	34
3	3	41
4	4	48
5	5	38
6	6	40
7	7	30

10

本明細書に記載された例及び態様は説明目的のためのみであって、それからみて様々な修正又は変更が本出願の精神及び範囲と添付された請求の範囲の中に含まれることを当業者に示唆していることが理解される。

20

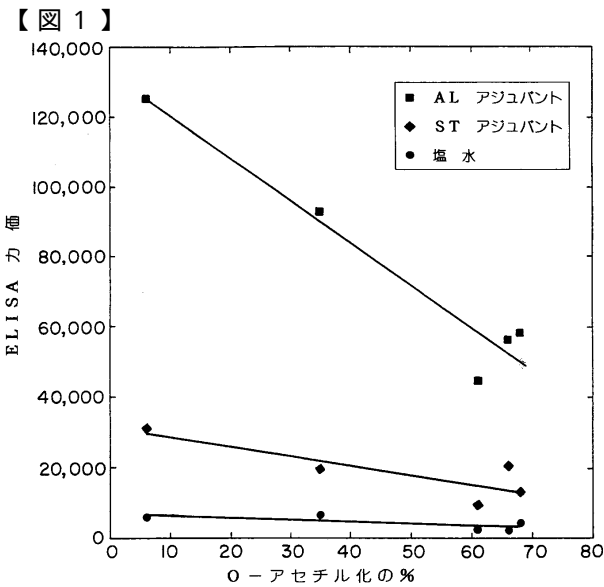


FIG. 1

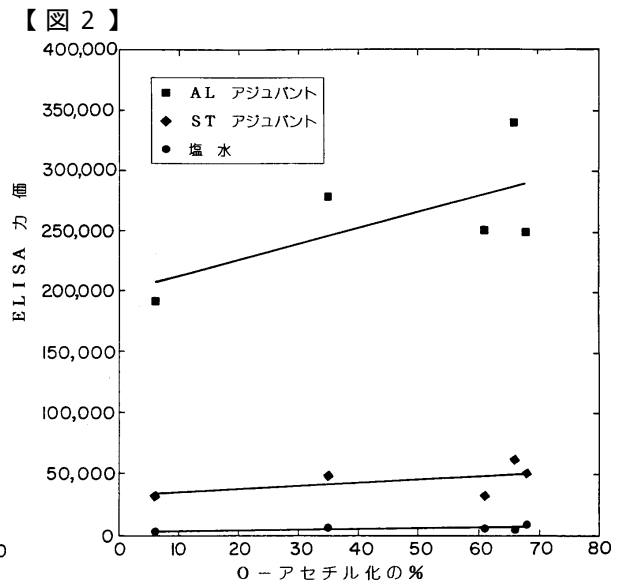
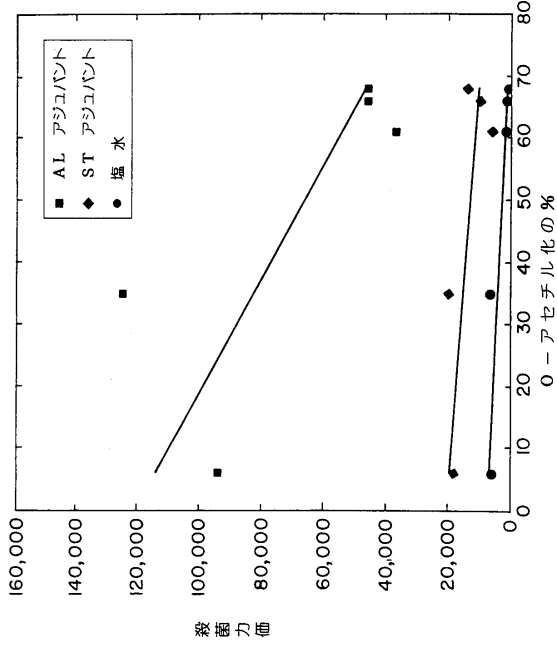


FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 】

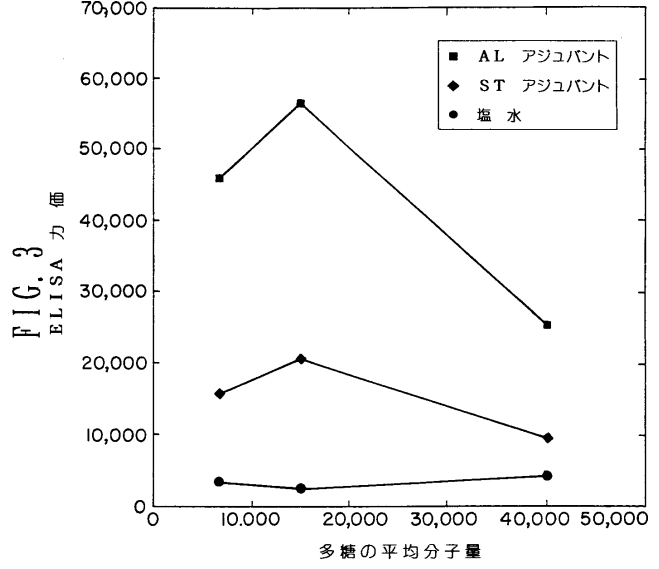


FIG. 4

【 図 5 】

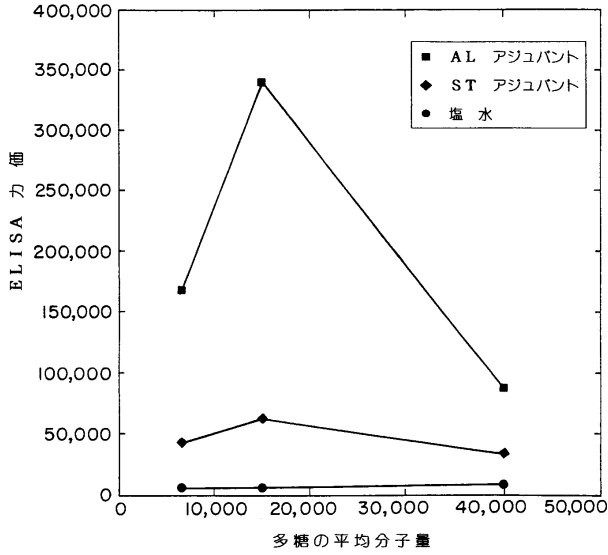


FIG. 5

【 図 6 】

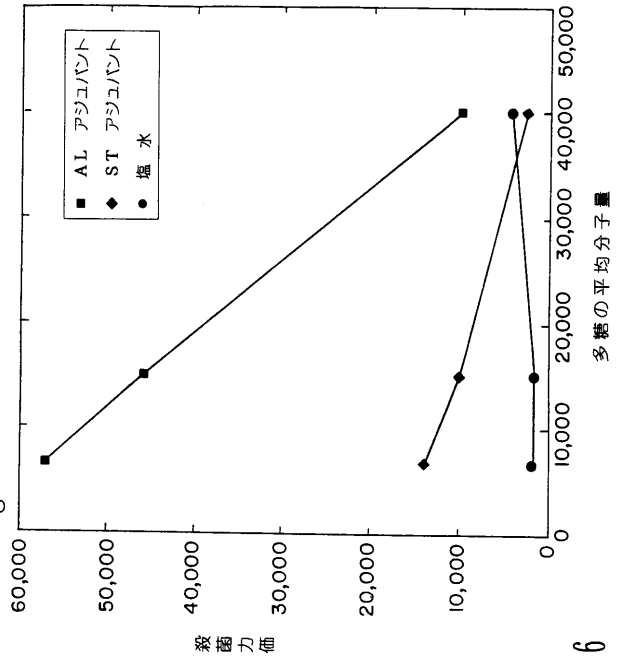


FIG. 6

フロントページの続き

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72)発明者 ターイー, ジョウゼフ ワイ.

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、フォート、ワシントン、シナモン、ドライブ、1370

(72)発明者 ロノウスキー, ルーチャーン ジェイ. ジェイ.

アメリカ合衆国メリーランド州、ロウレル、ヒッチング、ポスト、レイン、9160エフ

(72)発明者 メイツ, シャロン

アメリカ合衆国メリーランド州、チェビイ、チェイス、ノース、パーク、アベニュー、4615

合議体

審判長 星野 紹英

審判官 穴吹 智子

審判官 塚中 哲雄

(56)参考文献 BEUVERY et al, Develop. Biol. Standard, 1985, Vol. 65, pp197-204

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K39/00-395

CA(STN)REGISTRY(STN)