

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520317

(P2004-520317A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/35	C07K 14/35 ZNA	2G045
A61K 39/00	A61K 39/00 H	4C085
A61K 39/04	A61K 39/04	4H045
A61K 39/39	A61K 39/39	
A61P 31/04	A61P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 95 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-552001 (P2002-552001)	(71) 出願人	501474748
(86) (22) 出願日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		インスティテュー・パスツール
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月10日 (2003.6.10)		INSTITUT PASTEUR
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/004100		フランス、エフ-75724 パリ セデ
(87) 国際公開番号	W02002/050108		ックス 15、リュ デュ ドクトール
(87) 国際公開日	平成14年6月27日 (2002.6.27)		ル 28
(31) 優先権主張番号	00/16808		28, rue du Docteur R
(32) 優先日	平成12年12月21日 (2000.12.21)		oux, F-75724 Paris C
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		edex 15 FRANCE
		(74) 代理人	100065248
			弁理士 野河 信太郎
		(72) 発明者	マーシャル, ジル
			フランス、エフ-94200 イヴリー-
			サー-セイヌ、リュ フランシスコ
			ラー 4
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫原性グリコペプチド、スクリーニング、製造及び使用

(57) 【要約】

この発明は、病原性微生物（細菌又は真菌）によって引き起こされる感染の予防接種及び診断に有用な、病原性微生物由来免疫原性グリコペプチド、その選択方法及び調製方法に関する。グリコペプチドは、a 1) 14 ~ 25 アミノ酸からなるグリコシル化 T エピトープから本質的になるグリコペプチド、そのうち少なくとも1つの中性アミノ酸は二糖又は三糖に結合し（グリコシド結合）、少なくとも15%のアミノ酸はプロリンで、プロリンの1つは中性アミノ酸の位置に対して - 1 ~ - 4 位に位置し、クラス II MHC 分子で示され、由来する天然のグリコペプチドでの免疫化で誘導される CD4 + T リンパ球によって特異的に同定されるが、同一の配列を有する非グリコシル化ペプチドでの免疫化で誘導される CD4 + T リンパ球によっては同定されず、かつそれらが同定される CD4 + T リンパ球の増殖と該リンパ球によるサイトカインの分泌を誘導できるグリコペプチド、及び b 1) 配列 SEQ ID NO: 11 のグリコペプチドを除く、a 1) に定義されるグリコペプチドの配列を含む 15 ~ 39 アミノ酸の配列を有するグリコペプチドからなる群で選択される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a₁) 少なくとも1つの中性アミノ酸は二糖又は三糖に結合し(グリコシド結合)、アミノ酸の少なくとも15%はプロリンで、プロリンの1つは中性アミノ酸の位置に対して-1~-4位に位置する、病原性微生物由来で、14~25アミノ酸からなるグリコシル化Tエピトープから本質的になり、

- クラスII MHC分子で提示され、

- 由来する天然のグリコタンパク質での免疫化で誘導されるCD4+ Tリンパ球によって特異的に認識されるが、同一の配列を有する非グリコシル化ペプチドでの免疫化で誘導されるCD4+ Tリンパ球によっては認識されず、かつ

- それらを認識するCD4+ Tリンパ球の増殖と該リンパ球によるサイトカインの分泌を誘導できる

グリコペプチド、及び

b₁) 配列SEQ ID NO: 11のグリコペプチドを除く、a₁)に定義されるグリコペプチドの配列を含む15~39アミノ酸の配列を有するグリコペプチドからなる群から選択される免疫原性グリコペプチド。

【請求項 2】

中性アミノ酸が、セリンとトレオニンからなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の免疫原性グリコペプチド。

【請求項 3】

二糖又は三糖に結合した1~7個のトレオニン残基を含むことを特徴とする請求項1又は請求項2に記載のグリコペプチド。

【請求項 4】

二糖又は三糖が、ヘキソースの二量体又は三量体であることを特徴とする請求項1~3のいずれか1つに記載のグリコペプチド。

【請求項 5】

ヘキソースがマンノースであることを特徴とする請求項4に記載のグリコペプチド。

【請求項 6】

グリコシド結合が、-(1,2)-結合であることを特徴とする請求項1~5のいずれか1つに記載のグリコペプチド。

【請求項 7】

病原性微生物が、タンパク質をO-グリコシル化できることを特徴とする請求項1~6のいずれか1つに記載のグリコペプチド。

【請求項 8】

病原性微生物が、マイコバクテリウム・ツベルクローシス又はカンジダ・アルビカンスであることを特徴とする請求項7に記載のグリコペプチド。

【請求項 9】

エム・ツベルクローシス(Genbank 番号X80268)のApaタンパク質由来、又はエム・ツベルクローシス株H37Rvのゲノム配列の注釈に関し、Rv 1796遺伝子によってエンコードされるRv 1796タンパク質由来であることを特徴とする、請求項1~8のいずれか1つに記載のグリコペプチド。

【請求項 10】

- 配列(SEQ ID NO: 1)が、Apaタンパク質の配列の1~39位から伸長する配列であり、SEQ ID NO: 1の10、18及び27位のトレオニン残基の少なくとも1つがグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する、39アミノ酸のグリコペプチド、

- 配列(SEQ ID NO: 2)が、Apaタンパク質の配列(C-末端配列)の261~286位から伸長する配列であり、SEQ ID NO: 2の17位のトレオニン残基がグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する26アミノ酸のグリコペプチド、及び

- 配列(SEQ ID NO: 3)がRv 1796タンパク質の配列の169~203

10

20

30

40

50

位から伸長する配列であり、SEQ ID NO: 3の4、5、7、13、15、23及び25位のトレオニン残基の少なくとも1つがグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する35アミノ酸のグリコペプチド

からなる群から選択されることを特徴とする請求項9に記載のグリコペプチド。

【請求項11】

- グリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合したグリコシル化中性アミノ酸を溶液中に調製し、

- グリコペプチドのペプチド配列を産生するのに必要なアミノ酸及び上記で得た中性アミノ酸を用いて、固体支持体上でグリコペプチドを合成し、かつ

- 固体支持体からグリコペプチドを切断する

10

工程からなることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1つに記載のグリコペプチドの合成方法。

【請求項12】

中性アミノ酸が、セリン及びトレオニンからなる群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】

グリコペプチドが、配列(Tは、2又は3個のグリコシド残基で官能化されたO-グリコシル化トレオニンを示し、かつAcはアセテート官能基を示す)：

SEQ ID NO: 1:

H₂N - DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAAPPAPATPVAPPPPAANT - CONH₂ 20

SEQ ID NO: 2:

AcNH - PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA - COOH

SEQ ID NO: 3:

AcNH - TIPTTETPPPPQTVTLSPPPPQTVTVIPAPPPEEG - CONH₂

を有する際、

i) 2又は3個のグリコシド残基で官能化されたO-グリコシル化トレオニンを溶液中に調製し、

ii) これらの配列を製造するために必要なアミノ酸及び工程i)で得たO-グリコシル化トレオニンを用いて、固体支持体上で、上記の配列SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及びSEQ ID NO: 3に相当するペプチドを合成し、 30

iii) 固体支持体からペプチドを切断し、かつ

iv) 化学合成により、ペプチドSEQ ID NO: 1及びSEQ ID NO: 3のC-末端にアミド官能性を、またペプチドSEQ ID NO: 2及びSEQ ID NO: 3のN-末端にアセテート官能性を導入する

工程からなることを特徴とする、請求項12に記載の製造方法。

【請求項14】

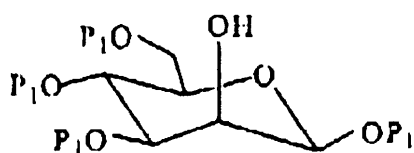
トレオニンによって担持されるグリコシド残基が、ヘキソース、好ましくはマンノースであることを特徴とする請求項13に記載の方法。 40

【請求項15】

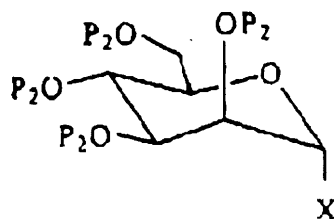
マンノース残基で官能化されるトレオニンが、

a₂) 式(I)及び(II)

【化 1】



(I)



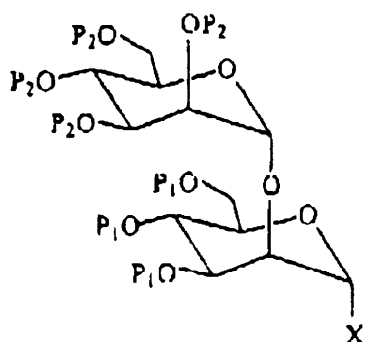
(II)

[式中、 P_1 及び P_2 は、同一又は異なってもよく、ヒドロキシル官能性を保護する基を示し、かつ X は、臭素原子のような活性化官能性を示す] のマンノース誘導体の製造

10

b₂) 2つのマンノース残基からなり、式(III) :

【化 2】



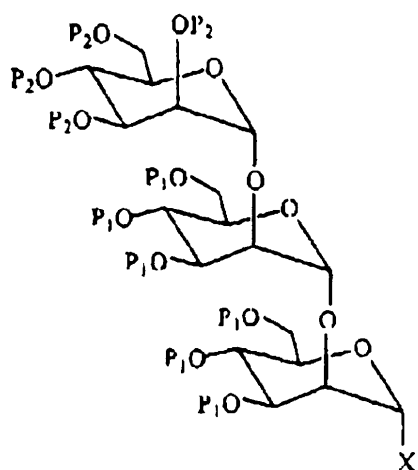
(III)

20

[式中、 P_1 、 P_2 及び X は、式 (I) 及び (II) に関して定義されるとおり] に相当する活性化誘導体の生産をもたらす、式 (I) の誘導体と式 (II) の誘導体との反応、次いで得られた化合物の活性化、

c₂) 任意に、3つのマンノース残基からなり、式(IV) :

【化 3】



(IV)

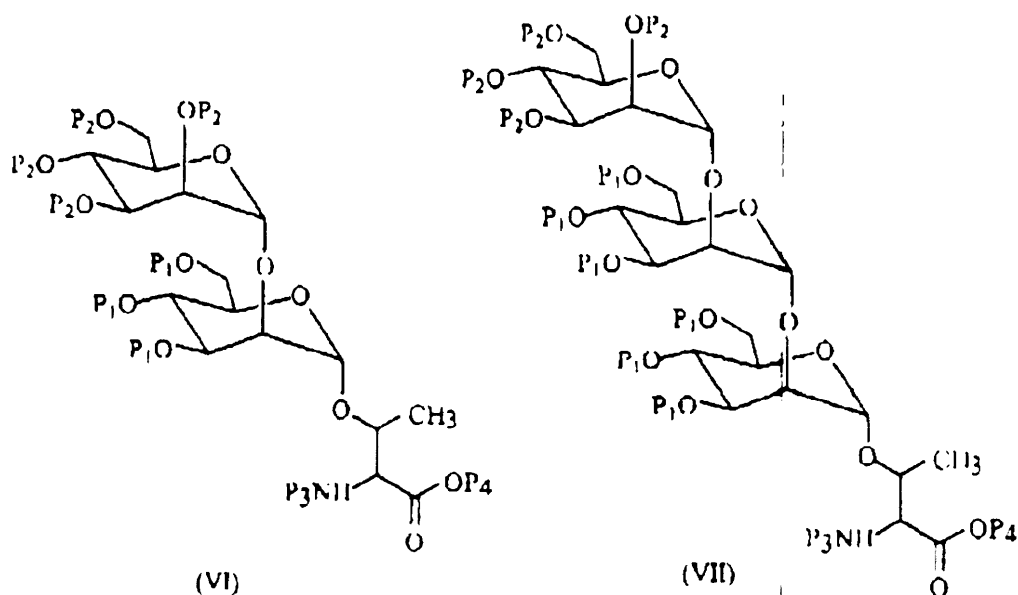
30

40

[式中、 P_1 、 P_2 及び X は、式 (I) 及び (II) に関して定義されるとおり] に相当する活性化誘導体の生産をもたらす、a₂) に定義される式 (I) のマンノース誘導体での式 (III) の化合物の反応、次いで得られた化合物の活性化、及び

d₂) それぞれ式 (VI) 又は (VII) :

【化4】



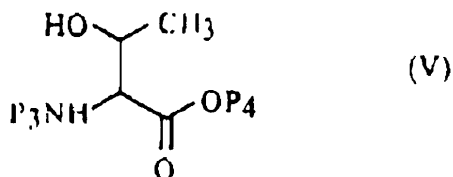
10

20

[式中、 P_1 、 P_2 、 P_3 及び P_4 は上記のとおり]

のグリコシル化トレオニンの生産をもたらす、式 (I I I) の化合物又は式 (I V) の化合物の、式 (V) :

【化5】



30

[式中、 P_3 は、第一級アミン官能性を保護する基を示し、かつ P_4 はヒドロキシル官能性を保護する基を示す]

の適当に保護されたトレオニンとの縮合

工程を用いて調製されることを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

少なくとも

a₃) 二糖又は三糖に結合した少なくとも1つの中性アミノ酸及びプロリンの1つが中性アミノ酸の位置に対して - 1 ~ - 4 位に位置する少なくとも15%のプロリンを含む少なくとも1つの14 ~ 25アミノ酸配列を、タンパク質のペプチド配列において、またそれから、検索し、選択し、

40

b₃) 請求項 1 1 ~ 1 5 に記載の方法にしたがって、工程 a₃) で選択されるグリコペプチドを調製し、かつ

c₃) 抗原活性が、同一配列を有する対照のペプチドよりも少なくとも10倍、好ましくは少なくとも30倍大きいグリコペプチドを選択する

工程からなることを特徴とする、病原性微生物のタンパク質のペプチド配列を用いて免疫原性グリコペプチドを選択し、スクリーニングするための方法。

【請求項 1 7】

工程 a₃) に先立って、少なくとも1つの抗原性グリコタンパク質を予備選択する工程を含むことを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

50

【請求項 18】

中性アミノ酸が、セリンとトレオニンからなる群から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 19】

工程 c₃) で、グリコペプチドの抗原活性が、弱毒化病原性微生物又は病原性微生物の抗原画分で免疫化された動物の CD4 + Tリンパ球の活性を測定して評価されることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 11 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の方法を用いて得られることを特徴とするグリコペプチド。

10

【請求項 21】

免疫原性組成物もしくは免疫化組成物又は診断試薬の製造のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 20 のいずれか 1 つに記載のグリコペプチド又は配列 SEQ ID NO: 11 のグリコペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 つのグリコペプチドの使用。

【請求項 22】

少なくとも 1 つの医薬的に許容される賦形剤と組み合わさった、請求項 1 ~ 10 もしくは 20 のいずれか 1 つに記載の少なくとも 1 つのグリコペプチドを含むことを特徴とする、体液性及び / 又は細胞性免疫を誘導できる免疫原性組成物。

【請求項 23】

少なくとも 1 つの医薬的に許容される賦形剤及び任意に少なくとも 1 つのアジュバントと組み合わさった、請求項 1 ~ 10 又は 20 のいずれか 1 つに記載の少なくとも 1 つのグリコペプチドからなることを特徴とする、体液性及び / 又は細胞性免疫を誘発し得る免疫化組成物。

20

【請求項 24】

グリコペプチドが、少なくとも 1 つの B エピトープ、CD4 + 型の 1 つの T エピトープ又は CD8 + 型の 1 つの T エピトープからなるタンパク質又はタンパク質フラグメントと組み合わさっていることを特徴とする、請求項 22 又は請求項 23 に記載の免疫原性組成物又は免疫化組成物。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 10 又は 20 のいずれか 1 つに記載の 1 以上のグリコペプチドに対することを特徴とする抗体。

30

【請求項 26】

請求項 1 ~ 10 もしくは 20 のいずれか 1 つに記載するグリコペプチド又は請求項 25 に記載の抗体からなることを特徴とする診断試薬。

【請求項 27】

病原性微生物に感染している恐れのある患者由来の生物学的試料を請求項 26 に記載の診断試薬と接触させ、生物学的試料複合体中に存在する抗体 / 微生物又は試料複合体に存在するグリコペプチド / 抗体の形成を検出することからなることを特徴とする、病原性微生物での感染の検出方法。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

この発明は、病原性微生物のようなもの（細菌又は真菌）による免疫化及び感染診断に使用できる、病原性微生物由来の免疫原性グリコペプチド及びその選択ならびに製造方法に関する。

【0002】

これらの感染を予防し、治療するために実行されている手段は、まず、感染をモニターし、治療できるスクリーニングと、次いで免疫化からなる。

ヒト医学で最も深刻な感染の一例としてエム・ツベルクローシスでの感染を挙げて、これらの手段を以降に例示する。具体的には、正常な免疫反応を有するエム・ツベルクローシスに感染した個体の 5 ~ 10 % が、深刻な疾患（結核）に進行する；この頻度は、免疫反

50

応を欠いている個体（HIV感染、免疫抑制剤での治療など）ではさらに高い。

【0003】

診 断

現在利用可能な種々の技術には、以下が挙げられる：

- 結核を正確に診断するのに最も厳密な手段であるエム・ツベルクローシスの純粋培養物の生産。それは、肺結核症例の2/3を診断できる穏やかな高感度技術である。結果は、最低3～4週間後にのみ、時には2ヶ月培養した後にのみ利用できる。標識した前駆体を用いる培養技術の使用はこれらの遅れを短縮できるが、にもかかわらず依然として相当な期間である。培養によるエム・ツベルクローシスのこの検出は、肺結核のためにすら時には入手しにくく、症例の約1/3が生物学的追認を受けない細菌含有試料を要する。時折り、この検査は、肺外形態の疾患に対する特殊な医学的介入（脳脊髄液の腰椎穿刺又はリンパ節バイオプシー）を要する。

10

【0004】

- 分子遺伝学に基づく微生物学的技術（PCR）は、細菌含有試料を得るという同一の要件に直面している。さらに、試料中にPCR反応阻害剤が存在するために、その由来を調節できず、時にこれらの技術を使用できない。技術は、一般的な実施には有効ではない。

- 現在、診断用途に適合した感度と特異性を有する血清学的診断法はない。

【0005】

- ツベルクリンに対する反応は、個体が感作され、エム・ツベルクローシスに感染しているか、又はBCGで免疫化されていることを示す。ツベルクリンは、実際エム・ツベルクローシス抗原の混合物であり、したがって、エム・ツベルクローシスでの感染とBCGでの免疫化とを識別することができない。というのは、ワクチン抗原とエム・ツベルクローシスとで交差反応が極めて多いからである。さらに、ツベルクリンに対するこの反応は、進行中の疾患である結核をエム・ツベルクローシスでの感染と識別することができない。

20

【0006】

ワクチン

BCGでの免疫化は、一次感染（エム・ツベルクローシスの初期増殖）、特にこれらの細菌の二次転移を制御することができる。それは、おそらく現在利用できる有効な治療がない潜伏期の感染の発症を減じるのに寄与している。BCGは、特に副作用なく、結核に対して30億人以上の個体を免疫化するために使用されている。BCGでの免疫化中、毒性が弱毒化されたこれらの細菌の局所増殖がある。細胞性免疫が、誘発される。それは、マイコバクテリアのタンパク質又は抗原に対する遅延型過敏症（HSR）（ツベルクリンに対する反応）を引き起こし、エム・ツベルクローシスでの感染に対する耐性を増した。これらの2つの免疫反応（HSR-型感作及び耐性増加）は、マイコバクテリア抗原と反応するTリンパ球によって支持される。

30

【0007】

BCGは、急性型感染（例えば子供の結核性脳膜炎）に対しても保護する。その有効性は、大人では多岐にわたる。BCGとツベルクローシス複合体に属さない他のマイコバクテリアとの交差反応性の存在、及びマイコバクテリウム・ツベルクローシスのある免疫原性抗原のBCGゲノムでの不在、又は感染中のこれらの抗原に対する異なる発現プロファイルは、多岐にわたるBCGの有効性を説明し得る。

40

さらに、BCGは、毒性が弱毒化された生株である。したがって、それは、免疫抑制された個体、特にヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染したことが確認された個体での使用を妨げる残留病原力を有している。

【0008】

これらの感染により効果的に對抗するために、これらの感染の原因である病原性微生物に対して保護する抗原に基づいて、診断上の手段とワクチン、特に危険性のない「サブユニット」ワクチンを有することが賢明であろう。

50

強力な保護免疫反応を誘導できるこれらの病原性微生物の分子を見出すために、この意味において幾つかの研究が行われている。つまり、J. Hessら (C. R. Acad. Sci. Paris, 1999, 322: 953-958) は、結核に対するワクチンとして使用できる抗原が有すべき性質を概説している。その概説では、単一抗原よりむしろ予備選択した抗原の組み合わせを用いることが重要視されている。特に、種々の株に高度に保存される領域の存在、毒性株と弱毒性株の遺伝子発現プロファイルの相違、免疫反応のエフェクター細胞 (B、CD4+ T、CD8+ T リンパ球) に関する反応性又は主要組織適合性複合体 (MHC) の大多数のHLA分子へのこれらの抗原の結合能力などの基準に基づくこれらの抗原の選択が推奨されている。

【0009】

10

これらの抗原の幾つかは、シー・アルピカンス (C. albicans) のマンノタンパク質のような表面抗原形態 (Buurmanら、PNAS, 1998, 95, 7670-7675)、又はエム・ツベルクローシスでの分泌抗原形態: MPT59 (30 kDa)、85A (32 kDa)、MPT64 (23 kDa)、hsp71 (71 kDa)、MPT51 (24 kDa)、MPT63 (16 kDa) 及びESAT-6 (6 kDa) (Andersen, Infect. Immun., 1994, 62, 2536-2544; Horwitzら、PNAS, 1995, 92, 1530-1534) のいずれかで存在する。これらのエム・ツベルクローシス抗原は、CD4+ Tリンパ球によって優先的に認識されるので、免疫化組成物の潜在的な候補物としてすでに提案されている (Andersenら、上記; Horwitzら、上記)。

20

【0010】

また、MHCクラスII分子によって提示され、かつ特異的CD4+ Tリンパ球によって認識されるエピトープを含むペプチドをエム・ツベルクローシス抗原から単離することが提案されている; このようなエピトープは、特に2つのタンパク質について報告されている: ESAT-6 (Olsenら、Eur. J. Immunol., 2000, 30, 1724-1732) 及びMPT-39 (Mustafaら、Inf. Immunol., 2000, 68, 3933-3940)。

【0011】

幾つかの観察が、発明者によって以前になされている (Romainら、Inf. Immun., 1993, 61, 742-750; Romainら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 5322-5326):

30

- 生細菌のみが保護免疫を誘導でき、死菌細菌も保護なしに免疫反応を誘導する;
- 培養培地では、細菌の成長中に細菌によって放出され、生細菌で免疫化された動物の免疫系によって認識されるタンパク質は、これらが死菌細菌での免疫化後にあまり認識されないか、又は全く認識されないもので、存在する。

【0012】

選択についてこの二重の基準を用いて、2つの新たなタンパク質を精製した。Apa、又はMPT-32 あるいは45/47 kDa 抗原複合体と命名されるエム・ツベルクローシスによって分泌されるタンパク質は、Rv 1860 遺伝子産物である (Laqueyrieら、Infect. Immun., 1995, 63: 4003-4010)。

40

第二分子は、Rv 1796 遺伝子によってエンコードされる推定上のセリンプロテアーゼの内部ペプチドである。抗原として天然のApaタンパク質を用い、発明者らは、培養物にツベルクローシス群の細菌 (エム・ツベルクローシス、エム・ボビス及びBCG) によって分泌されるタンパク質のわずか2%を示すこのタンパク質が、エム・ツベルクローシスに感染しているか、又はBCGで免疫化された動物を由来とする特異的なCD4+ Tリンパ球によって極めて有効に認識される免疫優勢抗原であることを以前に示している (Romainら、Inf. Immun., 1999, 67, 5567-5572; Hornら、J. Biol. Chem., 1999, 274, 32023-32030)。

【0013】

50

これらの同一の研究において、発明者らは、A p aのマンノシル化が、このタンパク質の抗原活性に必須であることも示した：

- マンノシダーゼ又はトリフルオロメタンスルホン酸 (T F M S) で天然の A p a を処理することによって、又はグリコシル化できない細菌 (イー . コリ) で A p a を発現することによって得られる A p a の脱マンノシル化は、100 倍の抗原性損失を伴う。
- エム . ツベルクローシスによって産生される A p a とわずかに異なるマンノース組成を全体に有するマイコバクテリウム . スメグマティス (M y c o b a c t e r i u m s m e g m a t i s) によって産生されるグリコシル化 A p a は、約 10 / 1 に低下する抗原活性を有する。

【 0 0 1 4 】

さらに、このエム . ツベルクローシスの A p a 分子は、ジマンノース (T₁₀ 及び T₁₈)、マンノース (T₂₇)、マンノース、ジマンノース又はトリマンノース (T₂₇₇) で、(1 , 2) 型のグリコシド結合を介して 4 個のトレオニン残基 (T₁₀、T₁₈、T₂₇ 及び T₂₇₇) に結合した 6 ~ 9 個のマンノース残基を含むことが報告されている (D o b o s ら、J . B a c t e r i o l . , 1 9 9 6 , 1 7 8 , 2 4 9 8 - 2 5 0 6)。モノ -、ジ - 又はトリ - マンノースを含むこの糖類の構造は、酵母、特にカンジダ . アルビカンス (C a n d i d a a l b i c a n s) 由来のマンノタンパク質の構造に似ており、長いオリゴマンノース鎖を有するエフ . メニゴセプティカム (F . m e n i n g o s e p t i c u m) 由来タンパク質の構造と異なることに留意すべきである。

【 0 0 1 5 】

脱マンノシル化後にみられる A p a 抗原性の損失は、この抗原の食作用とプロセッシング、あるいは C D 4 + T リンパ球による後者の認識の低下に起因している可能性がある。具体的には、ヘキソースに特異的に結合するマクロファージ及び樹状細胞、特にシー . アルビカンス由来マンノタンパク質及びマイコバクテリア由来のリポアラビノマンナンのようなマンノリピドのマンノースレセプターは、ペプチド / クラス I I M H C 分子複合体形態のこれらの細胞表面に存在する抗原の食作用とプロセッシングで役割を果たしている (S t a h l ら、C u r r e n t O p i n i o n i n I m m u n o l o g y , 1 9 9 8 , 1 0 , 5 0 - 5 5)。また、(N - 末端位のリジン残基についてマンノシル化された) マンノシル化ペプチドは、同一の配列を持つ非グリコシル化ペプチドよりも有効に樹状細胞によって食菌され、処理されることも分かっている (T a n ら、E u r . J . I m m u n o l . , 1 9 9 7 , 2 7 , 2 4 2 6 - 2 4 3 5)。

【 0 0 1 6 】

ニフトリのリソチームモデルでは、この抗原の T エピトープを構成するペプチドのグリコシル化類似体であるペプチドが、このグリコシル化エピトープを特異的に認識する C D 4 + T リンパ球を誘導できることが示されている (D e c k ら、J . I m m u n o l . , 1 9 9 5 , 1 5 5 , 1 0 7 4 - 1 0 7 8)。しかし、C D 4 + T リンパ球によって特異的に認識されるグリコシル化 T エピトープは病原性微生物 (細菌 / 真菌) 由来の天然抗原で同定されないので、C D 4 + T リンパ球によるこれらの病原性微生物由来抗原の認識におけるグリコシル化の重要性は依然として立証されべきものである。

さらに、これは、抗原のグリコシル化に関するエム . ツベルクローシス A p a と一般的な知見に関するデータであるにもかかわらず、免疫原性組成物又は免疫化組成物及び / 又は診断試験において有効に使用できる、これらの病原性微生物の O - グリコシル化タンパク質由来抗原を製造する可能性は、現在のところない。

【 0 0 1 7 】

本質的に：

- これらの微生物によって産生されるタンパク質のごく少量の % を示す活性タンパク質は、これらの病原性剤を大量に扱うため危険な方法を用いて、極めて低い収率で精製される、
- 異種発現系 (グリコシル化できない真核細胞又は細菌) で産生されるタンパク質は、低い抗原活性を有する、

10

20

30

40

50

- エム・スメグマティスのような同種の発現系で産生されるタンパク質は、許容される抗原活性を有するが、それらは複雑な方法を用いては不十分な量で産生される。

【0018】

この結果、発明者らは、単独で又は他の剤と組み合わせて投与する際に、一方で免疫抑制された個体（生ワクチンの使用に関連した危険性の消失）を含む全ての個体に使用できるワクチンを構成でき、他方で診断目的で使用できる、保護体液性及び/又は細胞性免疫反応を誘導できる免疫優勢抗原を製造することを目的とした。

脱グリコシル化された天然タンパク質又はイー・コリで産生される組換えタンパク質に少なくとも等しく、さもなければ、より大きい抗原活性を示すグリコタンパク質を合成する病原性微生物（特にマイコバクテリア）由来のあるグリコペプチドが見出された。

また、これらのグリコペプチドを大量に製造するための実施しやすい手段を開発することが、本発明の目的である。

【0019】

本発明の対象は、

a₁) 少なくとも1つの中性アミノ酸は二糖又は三糖に結合し（グリコシド結合）、アミノ酸の少なくとも15%はプロリンで、プロリンの1つは中性アミノ酸の位置に対して-1~-4位に位置する、病原性微生物由来で、14~25アミノ酸からなるグリコシル化Tエピトープから本質的になり、

- クラスII MHC分子で提示され、

- 由来する天然のグリコタンパク質での免疫化で誘導されるCD4+ Tリンパ球によって特異的に認識されるが、同一の配列を有する非グリコシル化ペプチドでの免疫化で誘導されるCD4+ Tリンパ球によっては認識されず、かつ

- それらを認識するCD4+ Tリンパ球の増殖と該リンパ球によるサイトカインの分泌を誘導できる

グリコペプチド、及び

b₁) Dobosら(J. Bacteriol., 1996, 178, 2498-2506)によって記載されるApa由来の、配列SEQ ID NO: 11のグリコペプチドを除く、a₁)に定義されるグリコペプチドの配列を含む15~39アミノ酸の配列を有するグリコペプチド

からなる群から選択される免疫原性グリコペプチドである。

【0020】

グリコシル化Tエピトープから本質的になるこれらのグリコペプチドは、このグリコシル化Tエピトープを介してCD4+ Tリンパ球によって認識される。具体的には、ツベルクローシス群の生細菌での免疫化後、同一配列を有する非グリコシル化ペプチドに特異的なTリンパ球よりもこれらのグリコペプチドに特異的なTリンパ球がかなり多い。

有利には、グリコペプチドは、同一配列を有する対照のペプチドよりも少なくとも10倍、好ましくは少なくとも30倍大きい抗原活性を有する。

【0021】

このグリコペプチドは、以下の利点を有する：

- 保護細胞型免疫反応、あるいは体液性反応の誘導、及び免疫抑制個体における抗原としての潜在的な使用、

- 病原性微生物に特異的な多数のTリンパ球によって認識されるための、従来の抗原（弱毒化生微生物の培養物、該培養物から調製される抗原混合物又は非グリコシル化ペプチド）に少なくとも等しく、さもなければより大きい抗原活性、

- 他の微生物、特に他の異型性マイコバクテリアとの交差反応性の問題を除き、免疫化と病原性微生物の診断の有効性を増すことができる、極めて狭い特異性；特に、より具体的には、病原性微生物に排他的に存在するそのオリゴ糖残基は、CD4+ Tリンパ球によって認識されるTエピトープの定義に必須な方法で寄与する；つまり、それらは、そのタンパク質の幾つかをO-グリコシル化できる病原性微生物（ツベルクローシス複合体細菌、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム(Flavobacterium m

10

20

30

40

50

e n i n g o s e p t i c u m)、カンジダ・アルビカンスなど)での免疫化及び感染を診断するのに特異的な抗原を構成する、

【0022】

- 全体に非病原性 (a p a t h o g e n i c) であるための免疫抑制個体での使用、
- 大量での潜在的な生産、
- 進行中の用量とワクチンの有効性についてのより良い標準化、
- 貯蔵と使用の容易化。

グリコペプチドの有利な具体例によれば、中性アミノ酸は、セリンとトレオニンからなる群から選択される。

グリコペプチドのこの具体例の有利なアレンジによれば、それらは、二糖又は三糖に結合した1~7個のトレオニン残基を含む。 10

グリコペプチドの別の有利な具体例によれば、二糖又は三糖は、ヘキソース、好ましくはマンノースの二量体又は三量体である。

【0023】

グリコペプチドのさらに別の有利な具体例によれば、グリコシド結合は - (1 , 2) 結合である。

さらに別の有利な具体例によれば、グリコペプチドは、タンパク質をO-グリコシル化できる病原性微生物、好ましくはマイコバクテリウム・ツベルクローシス又はカンジダ・アルビカンス由来である。

この発明によれば、グリコペプチドは、好ましくは 20

- エム・ツベルクローシス (G e n b a n k 番号 X 8 0 2 6 8) の A p a タンパク質、又は
- エム・ツベルクローシス株 H 3 7 R v (S a n g e r b a n k) のゲノム配列の注釈に関し、R v 1 7 9 6 遺伝子によってエンコードされる R v 1 7 9 6 タンパク質に由来する。

【0024】

好ましくは、グリコペプチドは、

- 配列 (S E Q I D N O : 1) が、A p a タンパク質の配列の1~39位から伸長する配列であり、S E Q I D N O : 1 の10、18及び27位のトレオニン残基の少なくとも1つがグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する、39アミノ酸のグリコペプチド、 30

- 配列 (S E Q I D N O : 2) が、A p a タンパク質の配列 (C - 末端配列) の261~286位から伸長する配列であり、S E Q I D N O : 2 の17位のトレオニン残基がグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する26アミノ酸のグリコペプチド、及び

- 配列 (S E Q I D N O : 3) が R v 1 7 9 6 タンパク質の配列の169~203位から伸長する配列であり、S E Q I D N O : 3 の4、5、7、13、15、23及び25位のトレオニン残基の少なくとも1つがグリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合する35アミノ酸のグリコペプチド

からなる群から選択される。

【0025】

本発明の対象は、 40

- グリコシド結合を介して二糖又は三糖に結合したグリコシル化中性アミノ酸を溶液中に調製し、
- グリコペプチドのペプチド配列を産生するのに必要なアミノ酸及び上記で得たグリコシル化中性アミノ酸を用いて、固体支持体上でグリコペプチドを合成し、かつ
- 固体支持体からグリコペプチドを切断する

工程からなることを特徴とする、上記のグリコペプチドの合成方法でもある。

【0026】

この方法の有利な具体例によれば、中性アミノ酸は、セリン及びトレオニンからなる群から選択される。 50

この具体例の有利なアレンジによれば、グリコペプチドが、配列（Tは、2又は3個のグリコシド残基で官能化されたO-グリコシル化トレオニンを示し、かつAcはアセテート官能基を示す）：

SEQ ID NO : 1 :

H₂N - DPEPAPPVPTTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPAA
ANT - CONH₂

SEQ ID NO : 2 :

AcNH - PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA - COOH

SEQ ID NO : 3 :

AcNH - TIPTTETPPPPQTVTLSVPPQTVTVIPAPPPEEG 10
- CONH₂

を有する際、

【0027】

その方法は、

i) 2又は3個のグリコシド残基で官能化されたO-グリコシル化トレオニンを溶液中に調製し、

ii) これらの配列を製造するために必要なアミノ酸及び工程i)で得たO-グリコシル化トレオニンを用いて、固体支持体上で、上記の配列SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2及びSEQ ID NO : 3に相当するペプチドを合成し、

iii) 固体支持体からペプチドを切断し、かつ 20

iv) 化学合成により、ペプチドSEQ ID NO : 1及びSEQ ID NO : 3のC-末端にアミド官能性を、またペプチドSEQ ID NO : 2及びSEQ ID NO : 3のN-末端にアセテート官能性を導入する

工程からなる。

【0028】

したがって、ペプチドSEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2及びSEQ ID NO : 3の合成は、そのあいだにグリコシル化アミノ酸が導入される従来の固相ペプチド合成に相当する。固相ペプチド合成の分野で知られているように、使用されるアミノ酸は適当に保護され、必要であれば、ペプチド配列に他のものが導入される前に活性化される。同様に、トレオニンによって担持されるグリコシド残基に存在するヒドロキシルは、ペプチド合成のあいだに適切に保護される必要がある。 30

いったんペプチド合成が行われると、ペプチドは、固体支持体から分離され、脱保護される。それらは、逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製することができる。

【0029】

この具体例の有利なアレンジによれば、工程i)で製造されるO-グリコシル化トレオニンによって担持されるグリコシド結合はヘキソース、好ましくはマンノースであり、マンノース残基は、有利には - (1, 2) 結合を介して互いに結合される。

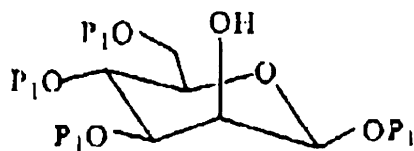
【0030】

このアレンジの有利な態様によれば、マンノース残基で官能化されるトレオニンは、以下のように製造される：

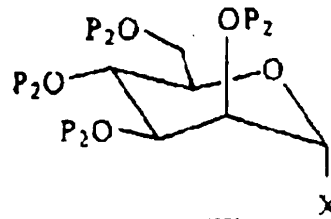
a₂) 式(I)及び(II)

【0031】

【化6】



(I)



(II)

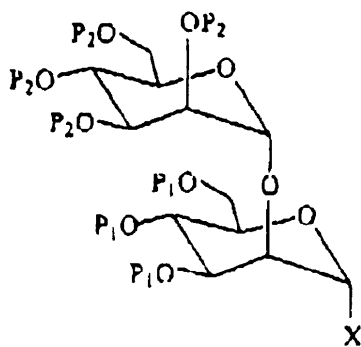
[式中、 P_1 及び P_2 は、同一又は異なってもよく、ヒドロキシル官能性を保護する基を示し、かつ X は、臭素原子のような活性化官能性を示す] のマンノース誘導体の製造

10

b₂) 2つのマンノース残基からなり、式(III) :

【0032】

【化7】



(III)

20

[式中、 P_1 、 P_2 及び X は、式(I)及び(II)に関して定義されるとおり] に相当する活性化誘導体の生産をもたらす、式(I)の誘導体と式(II)の誘導体との反応、次いで得られた化合物の活性化、

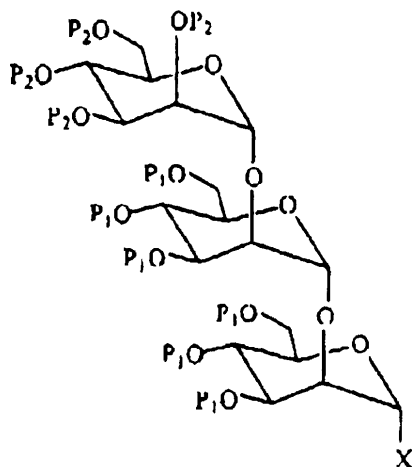
【0033】

c₂) 任意に、3つのマンノース残基からなり、式(IV) :

30

【0034】

【化8】



(IV)

40

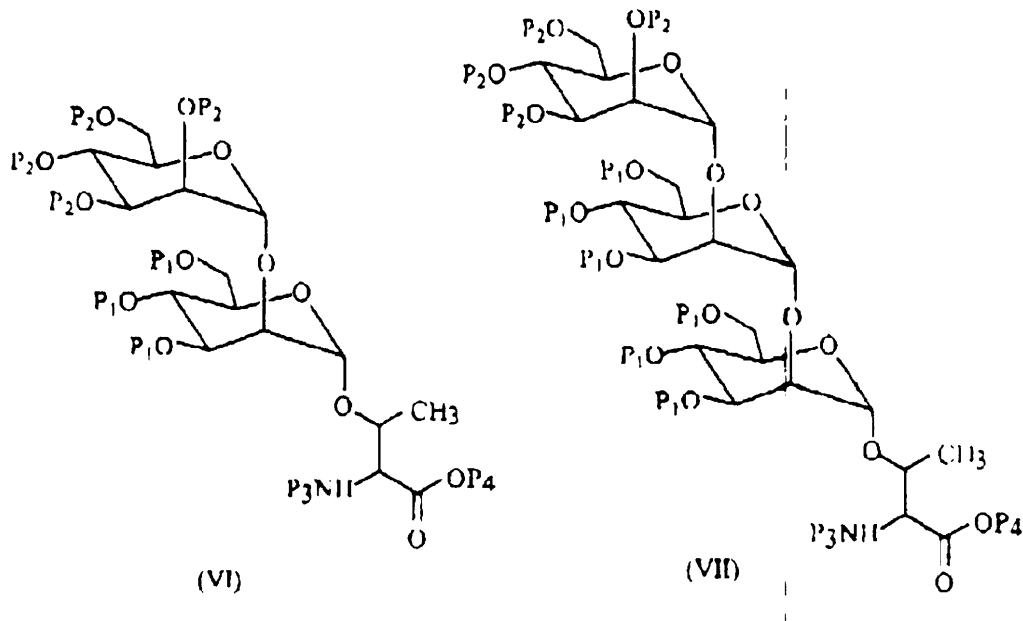
[式中、 P_1 、 P_2 及び X は、式(I)及び(II)に関して定義されるとおり] に相当する活性化誘導体の生産をもたらす、a₂)に定義される式(I)のマンノース誘導体での式(III)の化合物の反応、次いで得られた化合物の活性化、及び

50

d₂) それぞれ式(VI)又は(VII):

【0035】

【化9】



10

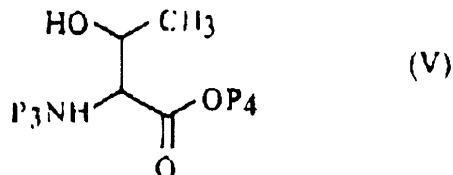
20

[式中、P₁、P₂、P₃及びP₄は上記のとおり]

のグリコシル化トレオニンの生産をもたらす、式(III)の化合物又は式(IV)の化合物の、式(V):

【0036】

【化10】



30

[式中、P₃は、第一級アミン官能性を保護する基を示し、かつP₄はヒドロキシル官能性を保護する基を示す]

の適当に保護されたトレオニンとの縮合。

【0037】

保護基P₁、P₂、P₃及びP₄は、研究Protective Groups in Organic Synthesis (T. W. GREENE 及びP. G. M. WUTS、第2版1991年、J. WILEY and Sons)に記載される基から選択してもよい。例として、また非制限に、P₁とP₂はアセチル又はベンゾイル基を示してもよく、P₃はFmoc (9-フルオレニルメトキシカルボニル)基を示してもよく、かつP₄はペンタフルオロフェニル基を示してもよい。

40

【0038】

この発明の対象は、上記のように、本発明によるグリコペプチドを合成する方法に付随して有利に行ってもよい、病原性微生物のタンパク質のペプチド配列を用いて免疫原性グリコペプチドを選択し、スクリーニングするための方法であって、方法は、少なくとも

a₃) 二糖又は三糖に結合した少なくとも1つの中性アミノ酸及びプロリンの1つが中性アミノ酸の位置に対して-1~-4位に位置する少なくとも15%のプロリンを含む少

50

なくとも1つの14～25アミノ酸配列を、タンパク質のペプチド配列において、またそれから、検索し、選択し、

b₃) 上記の合成法にしたがって、工程a₃)で選択されるグリコペプチドを調製し、かつ

c₃) 抗原活性が、同一配列を有する対照のペプチドよりも少なくとも10倍、好ましくは少なくとも30倍大きいグリコペプチドを選択する

工程からなることを特徴とする。

【0039】

このスクリーニング方法の有利な具体例によれば、工程a₃)に先立って、少なくとも1つの抗原性グリコタンパク質を予備選択する工程が含まれる。

このスクリーニング方法の別の有利な具体例によれば、工程c₃)では、グリコペプチドの抗原活性は、弱毒化病原性微生物又は病原性微生物の抗原画分で免疫化された動物のCD4+ Tリンパ球の活性を測定して評価される。

【0040】

Tリンパ球の活性化は、Current protocols in Immunology (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)に記載されるような従来の免疫技術を用いて立証することができる。例として、リンパ球増殖アッセイ、活性化CD4+ Tリンパ球によって合成されるサイトカイン(タンパク質又はmRNA)のためのアッセイ(イムノアッセイ(ELISA)又はRT-PCR型の重合鎖反応)、又はエム・ツベルクローシスの場合には、遅延型過敏症アッセイが挙げられる。

また、この発明は、上記のような選択及びスクリーニング方法を用いて得られるグリコペプチドを包含する。

【0041】

また、この発明の対象は、免疫原性組成物もしくは免疫化組成物又は診断試薬の製造のための、本発明による少なくとも1つのグリコペプチド又は配列SEQ ID NO: 11のグリコペプチドの使用である。

病原性微生物、特にエム・ツベルクローシスでの感染によって誘導される細胞性及び/又は体液性免疫を極めて特異的に検出する本発明によるグリコペプチドは、当業者にそれ自体知られており、細胞性免疫を検出できるいずれかの技術によって結核の診断に有利に用いることができる。例として、T-リンパ球増殖アッセイ及びCD4+ Tリンパ球、特にIFNに特異的なサイトカインのための免疫酵素アッセイが挙げられる。

【0042】

また、本発明の対象は、少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤と組み合わせさせた、上記の少なくとも1つのグリコペプチドからなることを特徴とする、体液性及び/又は細胞性免疫を誘導できる免疫原性組成物である。

体液性又は細胞性免疫反応の設定でのCD4+ Tリンパ球とCD8+ Tリンパ球つまりBリンパ球との協同作用のために、本発明のグリコペプチドは、抗原に対する免疫化の有効性を増すために、いずれかの他の抗原用の輸送タンパク質(担体)として有利に用いることができる。この抗原/担体の組み合わせは、免疫化抗原に特異的なB及びTリンパ球の選択と増幅を有利に容易にすることができる。

【0043】

本発明の対象は、少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤及び任意に少なくとも1つのアジュバントと組み合わせさせた、上記の少なくとも1つのグリコペプチドからなることを特徴とする、体液性及び/又は細胞性免疫を誘発し得る免疫化組成物である。

免疫原性組成物又は免疫化組成物の有利な具体例によれば、グリコペプチドは、少なくとも1つのBエピトープ、CD4+型の1つのTエピトープ又はCD8+型の1つのTエピトープからなるタンパク質又はタンパク質フラグメントと組み合わせされている。

【0044】

本発明の目的のため、タンパク質の配列に対して、用語「Bエピトープ」、「CD4+

10

20

30

40

50

型 T エピトープ」及び「CD8 + 型 T エピトープ」は、それぞれ抗体、CD4 + リンパ球 T レセプター及び CD8 + リンパ球 T レセプターに結合し得るこの配列のフラグメントを意味することを意図する。

本発明の目的のため、表現「タンパク質とグリコペプチドの組み合わせ」は、いずれかの物理的手段又は化学的手段、例えばグリコペプチドの配列とタンパク質又はタンパク質フラグメントの配列との融合物の発現による混合と結合の双方を意味することを意図する。用いられるアジュバントは、従来使用されるアジュバントである；有利には、それらは水酸化アルミニウムとスクアレンからなる群から選択される。

【0045】

グリコペプチドは、ペプチドの免疫原性を増すことのできる、当業者にはそれ自体公知のいずれかの他の手段と任意に組み合わせてもよい。例として、Wilkinsonら、1999, Eur. J. Immunol., 29, 2788-2796により記載されるような分枝状多量体ペプチドを生産できる担体ペプチドへの結合が挙げられる。本発明の対象は、本発明によるグリコペプチドの1以上に対することを特徴とする抗体でもある。

抗体の有利な具体例によれば、それらは、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体から選択される。

【0046】

本発明の対象は、本発明によるグリコペプチドと抗体からなる群から選択されることを特徴とする診断試薬でもある。

また、本発明の対象は、病原性微生物に感染している恐れのある患者由来の生物学的試料を上記の診断試薬（場合によって抗体又はグリコペプチド）と接触させ、生物学的試料複合体中に存在する抗体/微生物又は試料複合体中存在するグリコペプチド/抗体の形成を検出することからなることを特徴とする、病原性微生物での感染の検出方法である。

【0047】

上記のアレンジに加えて、この発明は、この発明の具体例ならびに添付の図面に言及する以下の記載から明らかになるであろう多くのアレンジをさらに含む：

- 図1は、遅延型過敏症アッセイを用いる、エム・ツベルクローシスから精製した天然のApaの抗原活性測定を、- マンノシダーゼによるApaタンパク質の消化動態の関数として示す。結果は、時間の関数としてタンパク質mg当たりのツベルクリン単位で示す。

- 図2は、- マンノシダーゼでのApaタンパク質の消化動態の関数として、Apa分子のマンノース組成の質量分析を示す。Apaタンパク質の各ピークに相当するマンノース残基数を示し、Apa消化産物の全体的な抗原活性を研究した種々の時間で示す。

【0048】

- 図3は、遅延型過敏症アッセイを用いる、Rv 1796タンパク質由来のLipと命名されるグリコペプチド(SEQ ID NO: 3)の抗原活性測定を示す。エム・ツベルクローシス(PPD)由来の標準的な精製タンパク質を0.1ml中0.25µg用量で正の対照として用いる。Lipペプチドを0.1ml中0.02µg用量で用いる。

- マンノシダーゼ又はサブチリシンで処理したLipペプチドは、同一用量ではネガティブである。結果を紅斑反応直径により示す。

- 図4は、インビトロのリンパ球増殖アッセイを用いるLipペプチドの抗原活性を示す。Tリンパ球によるグリコシル化Lipペプチド(天然Lip)の認識を、脱グリコシル化ペプチド(Lip + - マンノシダーゼ)又は抗-T-リンパ球CD4 + レセプター抗体と組み合わせさせたLipペプチド(Lip + 抗Cd4)の認識と比較する。

【0049】

- 図5は、遅延型過敏症アッセイを用いる、エム・ツベルクローシスから精製した天然のApa(天然Apa)又はイー・コリで産生される脱グリコシル化組換えApa(イー・コリrApa)の抗原活性測定を、モルモットの免疫化の関数として示す。後者を、

10

20

30

40

50

皮内注射される生BCG又はサイトメガロウイルス初期プロモーターのコントロール下に位置するApaのコード配列を含むプラスミドpAG831もしくはpAG832で予め免疫化した。プラスミドでのモルモットの免疫化は、遅延型過敏症反応によって発現され得る感作を生ずる。この反応を生ずるには2つの型の抗原は等価であるが、BCGでの免疫化後には、グリコシル化された天然のApaのみが抗原性である。

【0050】

- 図6は、 α -(1,2)結合を介して結合する2又は3個のマンノース残基からなる単位の調製を示す、かつ
- 図7(7a及び7b)は、2又は3個のマンノース単位で官能化されたトレオニンの調製を示す。

10

【0051】

実施例1: Apaタンパク質の抗原性におけるオリゴサッカライド残基数の重要性

1. 材料と方法

a) α -マンノシダーゼでの消化によるApaの制限された脱グリコシル化

上記のHornらによって記載されるプロトコルにしたがって、エム・ツベルクローシスの培養上清から精製した450 μ gのApaタンパク質を、450 μ l量の緩衝液A(100mM CH₃COO⁻Na⁺、2mM ZnCl₂)に希釈する。

最初の時点で、75 μ lのApaタンパク質溶液を除き、25 μ lの緩衝液Aに希釈し、対照として凍結する。1mg/ml(3IU/ml, Oxford Glycosciences)の α -マンノシダーゼ125 μ lを375 μ lのApa溶液に加え、500 μ lの反応容量を37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。30分、1時間、4時間、16時間及び24時間後、100 μ lの反応物を除き、-20 $^{\circ}$ Cで凍結する。

20

【0052】

b) 消化産物の精製

100 μ lの試料を90 $^{\circ}$ Cで2分加熱し、次いで急冷し、真空下で乾燥させ、水中0.1%のトリフルオロ酢酸300 μ l(溶液B)に再懸濁する。

Apa消化産物を、90分で溶液B中の0~90%アセトニトリル勾配を用いて逆相クロマトグラフィーカラム(Resource RPC, Pharmacia)で α -マンノシダーゼから分離する。Apaを、51.5% \pm 0.5%のアセトニトリルに相当する時間t_r=68分でカラムから溶出する。Apaに相当する画分を回収し、凍結乾燥し、水中5%のブタノール溶液(溶液C)に再懸濁し、次いで真空下で乾燥させる。精製した試料を次いで溶液C 100 μ lに再懸濁する。

30

【0053】

c) Apa消化産物の生化学分析

各試料のオリゴサッカライド組成を、上記のHornらに記載される条件下で質量分析により分析する。

各試料中に存在するタンパク質の相対量を評価するために、210nmでの吸光度を測定する。

次いで、試料を乾燥し、その濃度を滴定緩衝液(緩衝液D: PBS、0.9% NaCl、0.05% Tween 80)中で1mg/mlに調整する。

40

【0054】

d) 遅延型過敏症アッセイにおける、 α -マンノシダーゼでのApaの制限された消化産物の抗原活性の生物学的滴定

2回の注射点で生BCG 2mgを皮内注射することによりあらかじめ3ヶ月免疫化したモルモットでの遅延型過敏症アッセイを用いて、抗原活性を測定する。

各試料を緩衝液Dで2 μ g/mlの濃度に希釈し、この希釈液100 μ l(0.2 μ g)を2頭のあらかじめ免疫化したモルモットのバッチに皮内注射する。

【0055】

動物の種々のバッチは以下のとおりである:

・バッチ1: 緩衝液D 100 μ lを投与した負の対照

50

- ・ バッチ 2 : A p a t = 0
 - ・ バッチ 3 : A p a t = 3 0 分
 - ・ バッチ 4 : A p a t = 1 時間
 - ・ バッチ 5 : A p a t = 4 時間
 - ・ バッチ 6 : A p a t = 1 6 時間
 - ・ バッチ 7 : A p a t = 2 4 時間
 - ・ バッチ 8 : 正の対照 (1 0 ツベルクリン単位 (T U) に相当するマイコバクテリウム・ツベルクローシス (P P D) 由来の標準的な精製タンパク質 0 . 2 5 μ g)
- 注射から 2 4 時間後、紅斑反応直径の平均を、種々の動物バッチについて測定し、試料のツベルクリン力価を P P D 標準に対して測定する。

10

【 0 0 5 6 】

2 . 結果

結果を図 1 と 2 に示す。

- マンノシダーゼでの消化動態の関数として A p a の抗原活性分析 (図 1) は、A p a の抗原活性が、- マンノシダーゼでの消化中に徐々に失われることを示している：1 時間で 6 6 %、4 時間で 8 6 % 及び長い消化には 9 7 ~ 9 9 %。

種々の消化時間で得た生成物のマンノース組成の分析 (図 2) は、

- ・ 天然の A p a 分子が、6 ~ 8 マンノース残基を有し、かつ
- ・ 3 ~ 6 マンノース残基が依然としてある A p a 分子は、その抗原活性の 8 6 % を失うことを示している。

20

【 0 0 5 7 】

A p a のオリゴマンノース組成は、ジマンノース (T₁₀ 及び T₁₈)、マンノース (T₂₇)、マンノース、ジマンノース又はトリマンノース (T₂₇₇)、上記の D o b o s らのとおりであることが分かっている。さらに、- マンノシダーゼは、エキソマンノシダーゼである。

その結果、結果は、

- ・ A p a の 4 オリゴマンノース鎖の 1 又は 2 個の末端マンノースの損失は、抗原活性の劇的な損失をもたらし、かつ
- ・ A p a の抗原性は、グリコシル化トレオニン残基の 1 以上に対するジマンノース又はトリマンノースの存在に関連している

30

ことを示している。

【 0 0 5 8 】

実施例 2 : エム・ツベルクローシスの L i p グリコペプチドの立証

材料と方法

a) グリコペプチドの精製

a 1) 粗物質の調製

マイコバクテリウム・ツベルクローシス (H 3 7 R v) 株の細菌を、S a u t o n 合成培地 (c u l t u r e m e d i u m , H . C a s s a g n e , 1 9 6 1 , I n s t i t u t P a s t e u r 編集、2 巻、2 4 2 頁) で 2 0 日間培養する。1 0 , 0 0 0 D a より大きい分子量分子のみを保持するように、培地に分泌された分子を限外ろ過膜 (P M 1 0 , A M I C O N) で濃縮し、次いで凍結乾燥する。約 1 0 g の凍結乾燥物が、培養培地 6 0 L について得られる。

40

【 0 0 5 9 】

a 2) 分子ろ過 (工程 1)

調製用カラムを、S u p 7 5 プレップグレードマトリクス (P h a r m a c i a) で充填する。この 5 0 x 7 5 0 m m のカラムを、1 m l / m i n の流速でリン酸緩衝液 (5 0 m M N a₂ / K P O₄ , p H 7 . 1 ; 1 0 0 m M N a C l ; 4 % ブタノール) で平衡化する。上記の粗物質を、1 0 0 m l 当たり 1 0 g の最終濃度で平衡化緩衝液に溶解し、4 時間 4 3 , 0 0 0 g で遠心分離し、次いで 0 . 2 2 μ m のろ紙で濾過して清澄にする。1 3 m l を注入し、2 8 0 n m での吸光度を介して検出される種々の画分を

50

PM10膜上で濃縮し、次いで凍結乾燥する。

溶出画分700~800 mlは極めて抗原性である；遅延型過敏症は、生BCGで免疫化したモルモットで認められる；この画分は、他方、熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは比較的不活性である。

【0060】

a3) イオン交換(工程2)

24 x 250 mmのPharmacia Source 15Q調製用カラム(15 μm)を、8 barの最大圧を用いて流速5 ml/minで20 mM tris/HCl、pH 8.4% ブタノール緩衝液で平衡化する。当初の緩衝液10 mlに溶解した上記の画分500 mgを注入した後、同一緩衝液で0~150 mMの直線状のNaCl勾配を適用する。溶出した画分を280 nmの吸光度で検出し、PM10膜で濃縮し、次いで凍結乾燥する。 10

40~75 mM NaClで溶出された画分は、極めて抗原性である；遅延型過敏症が生BCGで免疫化されたモルモットで認められる；この画分は、他方、熱不活化BCGで免疫化したモルモットで比較的の不活性である。

【0061】

a4) C8カラムでの逆相(工程3)

4.6 x 100 mmのPharmacia RPCカラム(逆相カラム) Resource 15RPCを、流速1 ml/minで20 mM CH₃COO⁻NH₄⁺ 緩衝液、pH 6.5を用いて平衡化する。0~90%の非直線状アセトニトリル勾配を、緩衝液2 ml中の上記画分10 mgをカラムに注入した後に適用する。溶出した画分を280 nmで検出し、次いで凍結乾燥前に40 で真空下に濃縮する。 20

アセトニトリル濃度18~22%の溶出画分は、生BCGワクチンで免疫化したモルモットでの遅延型過敏症を顕在化する点で極めて抗原性であり、熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは比較的の不活性である。

【0062】

a5) C18カラムでの逆相(工程4)

C18逆相マイクロポア(microbore)カラム(Browleclab, 1 x 250 mm)を、20 mM CH₃COO⁻NH₄⁺ 緩衝液、pH 6.5を用いて1 ml/minの流速で平衡化する。0~90%の非直線アセトニトリル勾配を、カラムに上記の画分を注入した後、適用する。 30

220 nmでのみ検出された画分を約11%濃度のアセトニトリルで溶出する。この画分(3 mg)は、生細菌で免疫化したモルモットでの遅延型過敏症反応の顕在化に極めて活性で、熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは比較的の不活性である。

【0063】

b) 精製グリコペプチドの生化学的分析

最終精製工程で得た画分を、製造者の指示に従って改変エドマン技術(Applied Biosystems 473A)を用いてシーケンスした。

各試料の組成を、上記のHornらによって記載される条件下で質量分析(MALDI-TOF 分光計)により分析する。 40

c) -マンノシダーゼでのグリコペプチドの消化

上記の精製グリコペプチド9 μgを65 μgの100 mM CH₃COO⁻Na⁺ 緩衝液、pH 5に溶解し、次いで、3 μlの1 mg/ml -マンノシダーゼ溶液(Oxford Glyco System)、つまり90 mUの -マンノシダーゼを加える。全てを消化するように反応を24時間37 でインキュベートし、次いで得られた生成物を真空下で乾燥する。

【0064】

d) ペプチドのサブチリジンでの消化

上記の精製グリコペプチド690 ngを、5 μlの100 mM炭酸アンモニウム緩衝液pH 8に溶解し、次いで1 μlの100 μg/ml サブチリジン溶液、つまり約100 50

ngを加える。反応を24時間37℃でインキュベートし、次いで反応生成物を真空下で乾燥させ、滴定緩衝液（緩衝液D）に溶解する。

e) 遅延型過敏症アッセイを用いるグリコペプチドの抗原活性の生物学的滴定

未消化又は - マンノシダーゼもしくはサブチリジンで消化した上記の精製グリコペプチド0.02 μgを、実施例1に記載のプロトコルにしたがってあらかじめ免疫化したモルモットのパッチに注射する。結果を、紅斑反応直径の値で示す。対照は、10 TUに相当する0.25 μgのPPDからなる。

f) インビトロのリンパ球増殖アッセイを用いるグリコペプチドの抗原活性測定アッセイの条件は、上記のHornらの記載する条件である。

【0065】

2. 結果

a) Lip グリコペプチドの精製及び生化学的分析

精製グリコペプチドについて行った質量測定は、測定が162質量単位値異なると、マンノースでおそらくグリコシル化される複雑な分子の存在を示す。 - マンノシダーゼで処理したペプチドの質量に相当する6951 Daの質量は、これらの分子の最少質量としてみなされる。

精製グリコペプチドのN-末端配列は、主要配列 T I P T T . . . と少数配列 I P T T E . . . の存在を示している。

これらの結果は、配列 (S E Q I D N O : 3) がエム・ツベルクローシスの R v 1 7 9 6 遺伝子によってエンコードされるタンパク質由来ペプチドのN-末端フラグメントの配列であり、Sanger bankのエム・ツベルクローシス株H37Rvのゲノム配列の注釈に関し、該タンパク質の169~239位に伸長している、Lipと称されるマンノシル化グリコペプチドに適合している。

【0066】

b) 遅延型過敏症アッセイを用いるLipグリコペプチドの抗原活性測定

グリコペプチドは、生細菌で免疫化したモルモットの遅延型過敏症反応の顕在化に極めて活性であり、他方、熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは比較的不活性である。

グリコペプチドの抗原活性は、精製工程中に増す：

- 工程1： 得られた画分は、生BCGで免疫化したモルモットで180,000 TU/mg及び熱不活化BCGで免疫化したモルモットで10,000 TU/mgの活性を有する。

- 工程2： 得られた画分は、生BCGで免疫化したモルモットでは900,000 TU/mg及び熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは30,000 TU/mgの活性を有する。

- 工程3： 精製画分は、生BCGで免疫化したモルモットでは1,000,000 TU/mgより大きく、熱不活化BCGで免疫化したモルモットでは30,000 TU/mg未満の活性を有する。

【0067】

図3に示す結果は、

- 37℃で24時間の - マンノシダーゼの作用は、95%より高い抗原活性の損失を引き起こす： 脱グリコシル化後、画分は、1,000,000 TU/mgの活性から30,000 TU/mg未満の活性に低下した、

- サブチリジンの作用は、抗原活性を廃する、及び

- 等量のタンパク質で、Lipグリコペプチドは、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(PPD)由来の標準的な精製タンパク質より少なくとも10倍活性が高い、ことを示している。

【0068】

c) インビトロのリンパ球増殖アッセイを用いるLipグリコペプチドの抗原活性測定

図4に示す結果は、T-リンパ球増殖がペプチド濃度に依存していることを示している。この増殖は、Tリンパ球がCD4分子に対する抗体で処理される際、又はグリコペプチド

10

20

30

40

50

が - マンノースで処理される際、重要ではない。

【0069】

実施例3： A p a タンパク質をエンコードする裸のDNAでの免疫化による、Tエピトープの定義におけるA p aのオリゴヌクレオチド残基の役割の立証

1. 材料と方法

a) A p a タンパク質をエンコードする配列を含むプラスミドの構築

サイトメガロウイルス初期プロモーター配列を含むプラスミド p S 6 5 T (C l o n t e c h) を、制限酵素 N h e I と B s p E I で切断し、クレノウ酵素で修復し、次いで連結してプラスミド p A G 8 0 0 を得る。

プラスミド p A G 8 0 0 を酵素 A p a I で切断して、それ自体にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 1 2 M 4 8 (5 ' C A A C G T T G G G C C 3 ' ; S E Q I D N O : 4) と連結し、プラスミド p A G 8 0 2 を得る。

【0070】

シグナル配列を欠く A p a のコード配列を含む 8 7 5 塩基対のフラグメントを、オリゴヌクレオチド 2 2 M 4 2 (5 ' T C C C A A G C T T T T G G T A G C C G 3 ' ; S E Q I D N O : 5) と 3 3 M 4 4 (5 ' C T A G G A T C C A C C A T G C C G G A G C C A G C G C C C C C G 3 ' ; S E Q I D N O : 6) を用いて、プラスミド p L A 3 4 - 2 (L a q u e y r e r i e , 1 9 9 5 , I n f e c t . I m m u n . , 6 3 , 4 0 0 3 - 4 0 1 0) からポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により増幅する。

オリゴヌクレオチド 3 3 M 4 4 を、コザック型のコンセンサス翻訳開始部位を含むように合成した (N u c l . A c i d s R e s . , 1 9 8 7 , 1 5 , 8 1 2 5 - 8 1 4 8) 。 P C R で得たフラグメントを B a m H I と E c o R V で切断し、 B g I I I と S m a I で切断したプラスミド p A G 8 0 2 に挿入し、プラスミド p A G 8 0 3 を得る。これらの操作中、オリゴヌクレオチド配列 5 ' C A A C G T T G G G C C 3 ' が失われる； P s p 1 0 4 6 I S S と称されるこの配列は、配列 I L - 1 2 p 4 0 I S S と同様に、免疫反応を増す免疫刺激配列であると考えられる (L i p f o r d G B ら、 1 9 9 7 , E u r . J . I m m u n o l . , 2 7 , 3 4 2 0 - 3 4 2 6) 。

【0071】

P s p 1 0 4 6 I S S 配列を、オリゴヌクレオチド 2 5 M 4 6 (5 ' G A T C C C C C C C C A A C G T T C C C C C C C G 3 ' ; S E Q I D N O : 8) とハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 2 5 M 4 5 (5 ' G A T C C G G G G G G G A A C G T T G G G G G G 3 ' ; S E Q I D N O : 7) をクローニングすることによってプラスミド p A G 8 0 3 の B a m H I 部位に挿入し、プラスミド p A G 8 3 1 を得る。

I L - 1 2 p 4 0 I S S 配列を、オリゴヌクレオチド 2 4 M 6 4 (5 ' G G G C C C T T G G A A C G T C A T A G C G C T 3 ' ; S E Q I D N O : 1 0) とハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 2 4 M 6 3 (5 ' A G C G C T A T G A C G T T C C A A G G G C C C 3 ' ; S E Q I D N O : 9) をクローニングすることによって、プラスミド p A G 8 0 3 の B a m H I 部位に挿入し、プラスミド p A G 8 3 2 を得る。

【0072】

エシェリキア・コリ株 X L 1 B l u e を形質転換後、上記のプラスミドを、カナマイシン 2 5 μ g / m l を含む L B 培養培地 (S a m b r o o k ら、 M o l e c u l a r c l o n i n g : A l a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 8 9) で増幅する。細菌溶解物を T r i t o n X - 1 1 4 (1 %) で処理することによりエンドトキシンを除く先の工程の後、プラスミドDNAを製造者の指示に従って M a x i P r e p Q I A フィルターカラム (Q I A G E N) で精製する。

【0073】

b) プラスミド p A G 8 3 1 と p A G 8 3 2 でのモルモットの免疫化

わき腹に 2 回皮内注射することにより、上記のように調製し、精製したプラスミド p A G 8 3 1 又は p A G 8 3 2 の DNA 5 0 μ g で体重 3 0 0 ~ 4 0 0 g のモルモット (H a 5 0

r t l e y) を免疫化する。

対照は、実施例 1 又は実施例 2 に記載される条件下で生 B C G で免疫化したモルモットの群からなる。

【 0 0 7 4 】

c) 遅延型過敏症アッセイを用いる、裸の D N A で免疫化したモルモットにおける真核細胞により産生される A p a タンパク質の抗原活性測定

免疫化から 1 ~ 2 ヶ月後に、遅延型過敏症反応を、天然の A p a タンパク質又はエシェリキア・コリの形質転換株で産生される組換え A p a タンパク質に対して測定し、タンパク質を上記の H o r n らに記載されるプロトコルにしたがって精製する。

天然の A p a 及び組換え A p a を、滴定緩衝液 (緩衝液 D) 1 0 0 μ l 中 0 . 2 μ g 用量で皮内注射する。抗原活性を、実施例 2 に記載されるように測定する。 10

【 0 0 7 5 】

2 . 結果

図 5 に示す結果は以下のとおりである：

- ・ 真核プロモーターの制御下で A p a のコード配列を含むプラスミド p A G 8 3 1 又は p A G 8 3 2 で免疫化したモルモットは、天然の A p a タンパク質に対する免疫反応 (抗原とまとめられる際には、遅延型過敏症アッセイ又はインビトロ T - リンパ球増殖アッセイを用いて測定できる抗体及び C D 4 + 型の T - 反応) を多くの場合に生ずる。天然の A p a 抗原に相当する動物では、酵素経路を介して脱グリコシル化される抗原又はイー・コリ由来の非グリコシル化組換え抗原に対する C D 4 + T リンパ球の反応は、グリコシル化天然抗原で見られる反応と同一の強度である。 20

- ・ 他方、生 B C G で免疫化したモルモットは、天然の A p a に対してのみ遅延型過敏症反応を示す。これらの動物は、上記のようにイー・コリで産生される非グリコシル化組換え A p a に対し、反応を生じないか、又はかなり低下した反応を生ずる。

【 0 0 7 6 】

これらの結果は、以下のことを示している：

1) A p a をエンコードする裸の D N A で免疫化した動物で認められる結果は、マクロファージ又は樹状細胞による A p a タンパク質の食菌及び提示能力が、天然又は組換えの (非グリコシル化) A p a タンパク質と同一であることを示している、

2) 生 B C G で免疫化した動物で認められる結果と上記の結果の組み合わせは、脱グリコシル化 A p a タンパク質に対する反応の不在は、マクロファージ又は樹状細胞によるその提示能力の低下ではなく、C D 4 + T リンパ球による認識不在に起因していることを示している。その結果、エム・ツベルクローシス又は生 B C G によって産生されるような、天然型の A p a 又は L i p タンパク質の側鎖のオリゴマンノース残基は、C D 4 + T リンパ球によって認識される T エピトープの構成で役割を果たしている。 30

【 0 0 7 7 】

実施例 4 : グリコシル化ペプチド S E Q I D N O : 1 , S E Q I D N O : 2 及び S E Q I D N O : 3 の調製

1) グリコシル化シントン 1 5 , 1 6 及び 1 9 の調製

ペプチド合成の前に、グリコシル化シントン、つまり 2 又は 3 個のマンノース残基で官能化したトレオニンを調製する。 40

- ・ 化合物 5 及び 8 の調製 (図 6)

化合物 5 及び 8 の調製は、それぞれ H . F R A N Z Y K ら (J . C h e m . S o c . P e r k i n T r a n s . 1 , 1 9 9 5 , 2 8 8 3 - 2 8 9 8) 及び R . K . N E S S ら (J . A m . C h e m . S o c . P e r k i n , 1 9 5 0 , 7 2 , 2 2 0 0 - 2 2 0 5) に記載されている。

市販の過アセチル化マンノース 1 (つまり、1 , 2 , 3 , 4 , 5 - ペンタ - O - アセチル - D - マンノピラノース) を、A . L E V E N E ら (J . B i o l . C h e m . , 1 9 3 1 , 9 0 , 8 9 - 9 8) によって記載されるように、酢酸中の臭化水素の作用によりアノマー位で臭素化する。活性化中間体 2 を、2 , 6 - ジメチルピリジンノメ 50

タノール混合物でオルソエステル 3 に環化する。10% 水性トリフルオロ酢酸ノアセトニトリル混合物中で 0 での酸加水分解によるオルソエステルの位置選択的な開環は、1, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - D - マンノピラノース (5) を生じる。位置異性体 4 も単離される。

【0078】

市販のマンノース 6 は、ピリジン中の塩化ベンゾイルの作用により 7 に過ベンゾイル化される。後者は、酢酸中の臭化水素の作用により 8 に活性化される。しかし、このプロトコルと以下の方法では、臭化水素の作用による以外の活性化方法、例えば当業者に公知の方法を用いてもよい。

・ 二糖 10 及び 12 の調製 (図 7 a)

化合物 10 及び 12 の調製は、それぞれ A. JANSOON ら (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1992, 1699 - 1707) 及び H. FRANZYK ら (同節) に記載されている。化合物 2 及び 5 は、ジクロロメタン中でトリフルオロメタンスルホネート銀 (又はいずれかの他の縮合反応プロモーター) の存在下で縮合され、過アセチル化二糖 9 を生じ、次いで酢酸中の臭化水素の作用により臭素化前駆体に活性化する。同一のプロトコルによれば、化合物 5 及び 8 は、縮合されて化合物 11 を生じ、それ自体 12 に活性化される。

【0079】

・ 三糖 18 の調製 (図 7 a)

活性化二糖 12 を、ジクロロメタン中のトリフルオロメタンスルホネート銀の存在下で単糖アクセプター 5 に縮合し、過アセチル化三糖 17 を生じ、次いでこれを酢酸中の臭化水素の作用により臭素化前駆体 18 に活性化する。

・ 2 つのマンノース単位を有するシント 15 ならびに 16、及び 3 つのマンノース単位を有するシント 19 の調製 (図 7 b)

I. SCHON ら (Synthesis, 1986, 303 - 305) に記載されるように、第一級アミン官能基が Fmoc 基で保護されている市販のトレオニン 13 の酸官能性を、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCI) の存在下でペンタフルオロフェノール (pfp) の作用によりエステルの形態で阻害し、アクセプター前駆体 14 を生じる。

【0080】

シント 15 及び 16 の調製は、それぞれ A. JANSOON ら (同節) 及び H. FRANZYK ら (同節) により記載されている。ジクロロメタン中のトリフルオロメタンスルホネート銀の存在下で行なわれる活性化二糖 10 及び 12 との化合物 14 の縮合は、それぞれシント 15 及び 16 を生じる。同じプロトコルによれば、化合物 14 と活性三糖 18 との縮合は、シント 19 を生じる。

【0081】

2) グリコシル化ペプチド SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 及び SEQ ID NO: 3 の調製

ペプチドは、Fmoc 化学を用いて固相で合成される。ペプチド合成は、所望の配列を生産する一方、ペンタフルオロフェノールの活性化エステルの形態のグリコシル化シント (シント 15、16 及び 19) を挿入するために必要なアミノ酸を用いて自動合成機行われる。

使用されるシントに応じて、2 つのマンノース残基で官能化 (ペプチド合成中のシント 15 及び / 又は 16 の挿入) されるトレオニンからなるペプチド又は 3 つのマンノース残基で官能化 (ペプチド合成中のシント 19 の挿入) されるトレオニンからなるペプチド又は 2 つのマンノースで官能化されるトレオニンと 3 つのマンノース残基で官能化 (ペプチド合成中のシント 19 及び 15 及び / 又は 16 の挿入) されるトレオニンの双方を含むペプチドのいずれかが得られる。

【0082】

合成の最後に、トリフルオロ酢酸を用いて固体支持体からペプチドを切断し、種々のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸及びマンノースのヒドロキシル官能性を脱保護した後、ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製する。その構造を、当業者に公知の技術、例えば質量分析及びアミノ酸分析を用いて制御する。

次に、当業者に公知の有機化学技術を用いる化学合成により、アミド官能性（ペプチドSEQ ID NO: 1及びSEQ ID NO: 3のC-末端位）ならびにアセテート官能性（ペプチドSEQ ID NO: 2及びSEQ ID NO: 3のN-末端位）を導入する。

【0083】

実施例 5： イー・コリで産生されるApaペプチドでの免疫化による、Tエpiteープの定義におけるApaのオリゴサッカライド残基の役割の立証

1) 材料と方法

当業者に周知のイー・コリにおける組換えタンパク質のクローニング、発現及び精製の従来技術（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc, Library of Congress, USA)に記載されるプロトコル参照)にしたがって、Apaの250~280位に相当するペプチドをボルデテラ・ペルツシス(Bordetella pertussis)のサイクラーゼのフラグメントとの融合体の形態でイー・コリで産生した。

体重300~400gの5頭のHartleyモルモットの3群を、アジュバント溶液0.1ml中のこの精製Apaペプチド20µgを用いて、1ヶ月空けて2回皮内注射し、免疫化した。

【0084】

実施例1に記載される条件下で生BCGで予め4ヶ月間免疫化した4頭のモルモット3群を、対照として用いる。

免疫化から1~2ヶ月後、遅延過敏症反応を、天然のApaタンパク質、イー・コリで産生される組換えApaタンパク質及び実施例1に記載されるようにして調製された脱グリコシル化Apaタンパク質に関して、実施例3に定義する条件下で測定した。

【0085】

2) 結果

Apa融合ペプチド又は生BCGで免疫化したモルモットの遅延過敏症反応を、天然のApaタンパク質、イー・コリで産生される組換えApaタンパク質及び脱グリコシル化Apaタンパク質に関して測定した。紅斑反応の直径(mm)で表された結果を、以下の表1に示す：

【0086】

【表1】

表1: イー・コリで発現されるApa融合ペプチドの抗原活性

抗原	生BCG	融合ペプチド
天然 Apa	17-15-11-13	5-12-13-5-5
イー・コリ組換え Apa	0000	13-14-15-5-15
脱グリコシル化 Apa	0000	NT*

* NT: 試験せず

【0087】

上記の表1に示すように、生BCGで免疫化したモルモットで見られる遅延過敏症反応は、天然のApa分子の注射後に著しい。反応は、化学的に脱グリコシル化した分子又はイー・コリで産生される分子の注射後に極めて弱いか、あるいはない。他方、ボルデテラ・ペルツシスのサイクラーゼフラグメントとApa分子の内部フラグメントとの融合に相当

する組換え分子で免疫化したモルモットについては、感作は、天然分子又は脱グリコシル化分子に対して同一である。

【0088】

これらの結果は、A p a分子のグリコシル化Tエピトープが、生細菌で免疫化されたモルモットによって選択的に認識されることを示している。また、結果は、モルモットによる脱グリコシル化分子の認識の不在又は低下は、これらの分子の低下した固有の抗原性に伴わないことを示している。

上記から明らかであるように、この発明は、より具体的に記載したにすぎないその実施方法、調製及び適用にいかなる方法でも制限されない；逆に、本発明は、本発明の概要又は範囲を逸脱しない限り当業者に起こりうる全ての变形を包含する。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、遅延型過敏症アッセイを用いる、エム・ツベルクローシスから精製した天然のA p aの抗原活性測定を、 α -マンノシダーゼによるA p aタンパク質の消化動態の関数として示す。結果は、時間の関数としてタンパク質mg当たりのツベルクリン単位で示す。

【図2】

図2は、 α -マンノシダーゼでのA p aタンパク質の消化動態の関数として、A p a分子のマンノース組成の質量分析を示す。A p aタンパク質の各ピークに相当するマンノース残基数を示し、A p a消化産物の全体的な抗原活性を研究した種々の時間で示す。

【図3】

図3は、遅延型過敏症アッセイを用いる、R v 1796タンパク質由来のL i pと命名されるグリコペプチド(SEQ ID NO: 3)の抗原活性測定を示す。エム・ツベルクローシス(P P D)由来の標準的な精製タンパク質を0.1ml中0.25 μ g用量で正の対照として用いる。L i pペプチドを0.1ml中0.02 μ g用量で用いる。 α -マンノシダーゼ又はサブチリシンで処理したL i pペプチドは、同一用量ではネガティブである。結果を紅斑反応直径により示す。

20

【図4】

図4は、インビトロのリンパ球増殖アッセイを用いるL i pペプチドの抗原活性を示す。Tリンパ球によるグリコシル化L i pペプチド(天然L i p)の認識を、脱グリコシル化ペプチド(L i p + α -マンノシダーゼ)又は抗-T-リンパ球CD4+レセプター抗体と組み合わせたL i pペプチド(L i p + 抗Cd4)の認識と比較する。

30

【図5】

図5は、遅延型過敏症アッセイを用いる、エム・ツベルクローシスから精製した天然のA p a(天然A p a)又はイー・コリで産生される脱グリコシル化組換えA p a(イー・コリr A p a)の抗原活性測定を、モルモットの免疫化の関数として示す。後者を、皮内注射される生BCG又はサイトメガロウイルス初期プロモーターのコントロール下に位置するA p aのコード配列を含むプラスミドp A G 8 3 1もしくはp A G 8 3 2で予め免疫化した。プラスミドでのモルモットの免疫化は、遅延型過敏症反応によって発現され得る感作を生ずる。この反応を生ずるには2つの型の抗原は等価であるが、BCGでの免疫化後には、グリコシル化された天然のA p aのみが抗原性である。

40

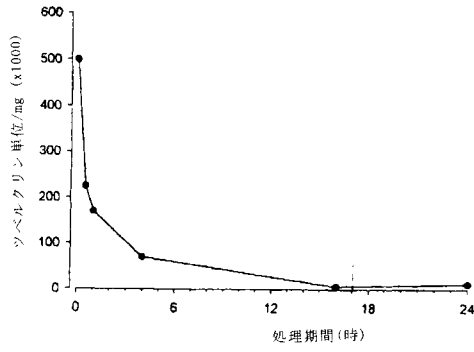
【図6】

図6は、 α -(1, 2)結合を介して結合する2又は3個のマンノース残基からなる単位の調製を示す。

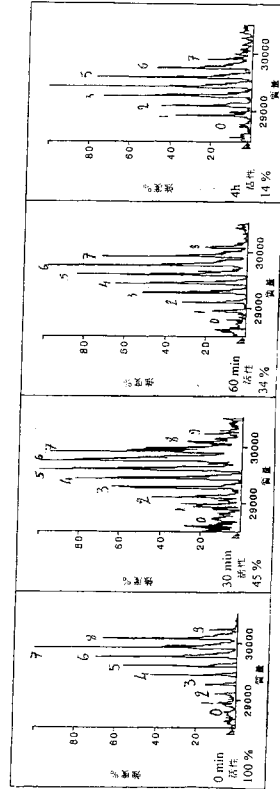
【図7】

図7(7a及び7b)は、2又は3個のマンノース単位で官能化されたトレオニンの調製を示す。

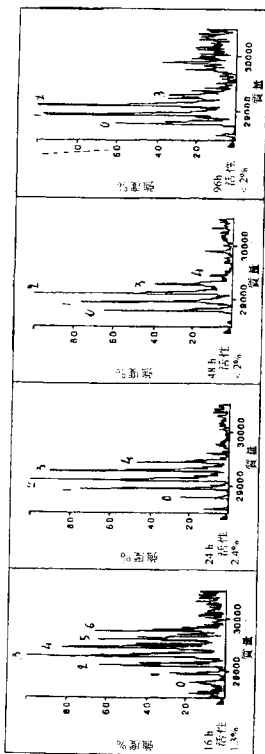
【 図 1 】



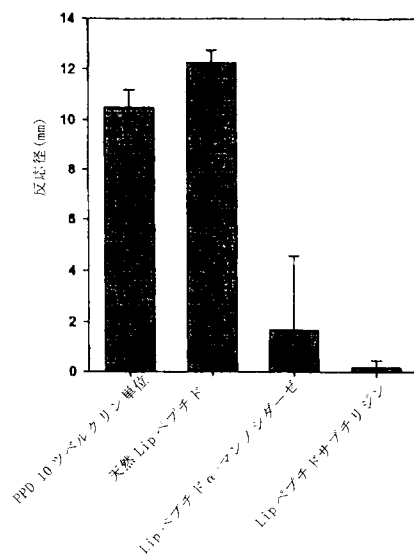
【 図 2 . 1 】



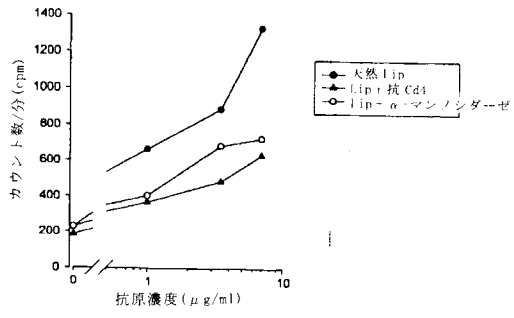
【 図 2 . 2 】



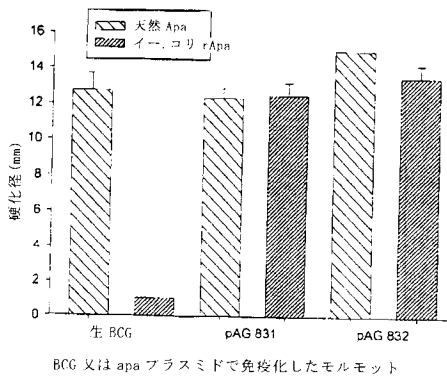
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



BCG 又は apa フラスミドで免疫化したモルモット

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
27 juin 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/50108 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K 14/35, 9/00, C07H 5/02, A61K 39/04 (FR). PESCHER, Pascale [FR/FR]; 124 rue Damrémont, F-75018 PARIS (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/04100 (74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES, 6 avenue de Messine, F-75008 PARIS (FR).
- (22) Date de dépôt international : 20 décembre 2001 (20.12.2001) (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Langue de dépôt : français (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/16898 21 décembre 2000 (21.12.2000) FR
- (71) Déposant : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS (FR).
- (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-CHAL, Gilles [FR/FR]; 4 rue Francisco Ferrer, F-94200 IVRY-SUR-SEINE (FR). ROMAIN, Félix [FR/FR]; 49 bis rue Dreyfus, F-91640 FONTENAY-LES-BRIS
- Publiée : sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

[Suite sur la page suivante]

(54) Titre: IMMUNOGENIC GLYCOPEPTIDES, SCREENING, PREPARATION AND USES

(54) Titre : GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PRÉPARATION ET APPLICATIONS.

(57) Abstract: The invention concerns immunogenic glycopeptides derived from pathogenic micro-organisms, useful for vaccination and diagnosis of infections caused by said pathogenic micro-organisms (bacteria or fungi), and methods for selecting them and preparing them. Said glycopeptides are selected in the group consisting of: a) glycopeptides essentially consisting of a glycosylated T epitope, comprising 14 to 25 amino acids, among which at least a neutral amino acid is bound to a di- or to a trisaccharide (glycoside linkage) and at least 15 % among said amino acids are proline, one of the proline being located in position -1 to -4, relative to the position of said neutral amino acid, which glycopeptides are: exhibited by a class II MHC molecule, specifically identified by T CD+4 lymphocytes induced by immunisation with the native glycopeptide from which they are derived, but are not identified by the T CD+4 lymphocytes induced by immunisation with a non-glycosylated peptide of same sequence and capable of inducing a proliferation of said T CD+4 lymphocytes by which they are identified and the secretion of cytokines by said lymphocytes and b) glycopeptides having a sequence of 15 to 39 amino acids including the sequence of the glycopeptide as defined in a), excluding the glycopeptide of sequence SEQ ID NO:11.

(57) Abrégé : Glycopeptides immunogènes issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi que leurs procédés de sélection et de préparation. Lesdits glycopeptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par: a) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides sont: présentés par une molécule de classe II du CMH, reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et b) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.

WO 02/50108 A2

WO 02/50108 A2



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PRÉPARATION ET
APPLICATIONS

La présente invention est relative à des glycopeptides immunogènes
issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic
5 d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi
qu'à leurs procédés de sélection et de préparation.

Les moyens mis en oeuvre pour prévenir et traiter ces infections
comprennent d'une part le dépistage permettant le suivi et le traitement de l'infection et
d'autre part la vaccination.

10 Ces moyens sont illustrés ci-après en prenant comme exemple l'une des
plus graves infections en médecine humaine : l'infection par *M. tuberculosis*. En effet,
5 à 10 % des personnes infectées par *M. tuberculosis* ayant une réponse immunitaire
normale développent une maladie grave (tuberculose) ; cette fréquence est encore plus
élevée chez les personnes ayant un déficit de leur réponse immunitaire (infection par le
15 VIH, traitement par des immunodépresseurs, etc...).

Diagnostic

Parmi les différentes techniques actuellement disponibles, on peut citer :

- l'obtention de cultures pures de *M. tuberculosis*, qui est le moyen le
plus rigoureux de faire le diagnostic de certitude de la tuberculose. C'est une technique
20 moyennement sensible qui permet le diagnostic pour les 2/3 des cas de tuberculose
pulmonaire. Les résultats ne sont disponibles qu'après un délai minimum de
3-4 semaines, quelquefois seulement après 2 mois de culture. L'utilisation de techniques
de culture employant des précurseurs marqués permet de raccourcir ces délais qui restent
cependant importants. Cette mise en évidence de *M. tuberculosis* par culture nécessite un
25 prélèvement contenant des bacilles, parfois difficile à obtenir même pour la tuberculose
pulmonaire où environ 1/3 des cas ne reçoit pas de confirmation biologique. Quelquefois
cet examen nécessite une intervention médicale spécialisée (ponction lombaire du liquide

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

2

céphalo-rachidien ou biopsie ganglionnaire) pour des formes extra-pulmonaires de la maladie.

- les techniques microbiologiques basées sur la génétique moléculaire (PCR) se heurtent à la même nécessité d'obtenir un prélèvement contenant des bactéries.
- 5 Par ailleurs, du fait de la présence dans le prélèvement d'inhibiteurs de la réaction PCR dont l'origine est impossible à contrôler, ces techniques sont parfois inutilisables. Leur validation en pratique courante n'a pas été obtenue.
- il n'existe pas à l'heure actuelle de sérodiagnostic qui possède une sensibilité et une spécificité compatibles avec un usage diagnostique.
- 10 - la réaction à la tuberculine montre qu'un sujet est sensibilisé, a été infecté par *M. tuberculosis* ou a été vacciné par le BCG. La tuberculine est en effet un mélange d'antigènes de *M. tuberculosis* et est donc incapable de faire la différence entre une infection par *M. tuberculosis* et la vaccination par le BCG, du fait de réactions croisées très nombreuses entre les antigènes du vaccin et *M. tuberculosis*. D'autre part,
- 15 cette réaction à la tuberculine ne permet pas de distinguer une tuberculose, maladie active, d'une infection par *M. tuberculosis*.

Vaccin

- La vaccination par le BCG permet de contrôler l'infection primaire (multiplication initiale de *M. tuberculosis*) mais surtout la dissémination secondaire de ces bacilles. Elle contribue vraisemblablement à diminuer l'incidence des infections latentes contre lesquelles aucun traitement efficace n'est disponible actuellement. Le BCG a été utilisé pour vacciner plus de 3 milliards d'individus contre la tuberculose, sans effets secondaires particuliers. Lors de la vaccination par le BCG il y a une multiplication locale de ces bacilles de virulence atténuée. Une immunité cellulaire est induite. Elle se traduit par une hypersensibilité de type retardé (HSR) dirigée contre les protéines ou anti-
- 25 gènes de mycobactéries (réaction à la tuberculine) et par une résistance accrue à l'infection par *M. tuberculosis*. Ces deux réponses immunitaires (sensibilisation de type

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

3

HSR et résistance accrue) ont pour supports des lymphocytes T réagissant avec des antigènes de mycobactéries.

Le BCG protège bien contre les formes aiguës de l'infection (méningite tuberculeuse de l'enfant, par exemple). Son efficacité est plus variable chez l'adulte.

- 5 L'existence d'une réactivité croisée entre le BCG et d'autres mycobactéries n'appartenant pas au complexe *tuberculosis* ainsi que l'absence, dans le génome de BCG, de certains antigènes immunogènes de *Mycobacterium tuberculosis* ou un profil d'expression différent de ces antigènes au cours de l'infection pourraient expliquer l'efficacité variable du BCG.

- 10 En outre, le BCG est une souche vivante de virulence atténuée. Celle-ci possède donc un pouvoir pathogène résiduel qui en interdit l'utilisation chez les individus immunodéprimés, notamment chez les sujets reconnus pour être infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

- 15 Pour lutter plus efficacement contre ces infections, il serait judicieux de disposer d'outils diagnostiques et de vaccins, notamment d'un vaccin "sous-unité", et donc sans danger, à base d'antigènes protecteurs des microorganismes pathogènes responsables de ces infections.

- 20 Un certain nombre d'études ont été faites dans ce sens afin de trouver la ou les molécules de ces microorganismes pathogènes, susceptible(s) d'induire une forte réponse immunitaire protectrice. Ainsi, J. Hess *et al.* (C.R. Acad. Sci. Paris, 1999, 322 : 953-958) ont fait le point sur les propriétés que devraient avoir des antigènes aptes à être utilisés comme vaccin contre la tuberculose. Dans cette revue, ils soulignent l'importance d'utiliser une combinaison d'antigènes préalablement sélectionnés plutôt qu'un antigène unique. Ils recommandent notamment de sélectionner ces antigènes sur la
- 25 base de critères tels que la présence de zones hautement conservées parmi les différentes souches, les différences dans le profil d'expression des gènes des souches virulentes et des souches atténuées, la réactivité vis-à-vis des cellules effectrices de la réponse

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

4

immunitaire (lymphocytes B, T CD4⁺, T CD8⁺), la capacité de ces antigènes à se lier à une majorité de molécules HLA du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Certains de ces antigènes sont présents soit sous forme d'antigènes de surface, comme les mannoprotéines de *C. albicans* (Buurman et al., *PNAS*, 1998, 95,7670-7675), soit sous forme d'antigènes sécrétés, chez *M. tuberculosis* : MPT59 (30 kDa), 85A (32 kDa), MPT64 (23 kDa), hsp71 (71 kDa), MPT51 (24 kDa), MPT63 (16 kDa) et ESAT-6 (6 kDa), (Andersen, *Infect. Immun.*, 1994, 62, 2536-2544 ; Horwitz et al., *PNAS*, 1995, 92, 1530-1534). Ces antigènes de *M. tuberculosis* ont déjà été proposés comme des candidats potentiels d'une composition vaccinale car reconnus préférentiellement par des lymphocytes T CD4⁺ (Andersen, et al., précité; Horwitz et al., précité).

Il a également été proposé d'isoler, à partir des antigènes de *M. tuberculosis*, des peptides contenant des épitopes capables d'être présentés par une molécule de classe II du CMH et d'être reconnus par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques ; de tels épitopes ont notamment été rapportés pour deux protéines : ESAT-6 (Olsen et al., *Eur. J. Immunol.*, 2000, 30, 1724-1732) et MPT-39 (Mustafa et al., *Inf. Immuno.*, 2000, 68, 3933-3940).

Plusieurs observations ont été précédemment faites par les Inventeurs (Romain et al., *Inf. Immun.*, 1993, 61, 742-750 ; Romain et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 5322-5326) :

- seules les bactéries vivantes sont susceptibles d'induire une immunité protectrice, les bactéries tuées induisant aussi une réponse immunitaire, mais sans protection ;
- il existe dans le milieu de culture, des protéines libérées par les bactéries, au cours de leur croissance et susceptibles d'être reconnues par le système immunitaire d'animaux vaccinés avec des bactéries vivantes, protéines qui ne sont pas ou très peu reconnues après immunisation par des bactéries tuées.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

5

Grâce à ce double critère de sélection, deux protéines nouvelles ont été purifiées. Une protéine sécrétée par *M. tuberculosis*, dénommée Apa, ou MPT-32 ou complexe antigénique de 45/47 kDa, est le produit du gène Rv1860 (Laqueyrie et al. Infect. Immun. 1995, 63: 4003-4010). La seconde molécule est un peptide interne d'une sérine protéase putative codée par le gène Rv1796.

En utilisant la protéine Apa native comme antigène, les Inventeurs ont précédemment montré que cette protéine, qui ne représente que 2 % des protéines sécrétées par les bacilles du groupe de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et BCG) en culture, est un antigène immunodominant, reconnu de façon très efficace par les lymphocytes T CD4+ spécifiques provenant d'animaux infectés par *M. tuberculosis* ou vaccinés par le BCG (Romain et al., *Inf Immun.*, 1999, 67, 5567-5572 ; Horn et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 32023-32030).

Dans ces mêmes travaux, les Inventeurs ont également montré que la mannosylation de l'Apa était essentielle pour l'activité antigénique de cette protéine :

15 - la démannosylation de l'Apa obtenue par traitement de l'Apa native par l' α -mannosidase ou par l'acide trifluorométhane sulfonique (TFMS) ou bien par expression de l'Apa chez une bactérie incapable de glycosyler (*E. coli*) s'accompagne d'une perte d'antigénicité d'un facteur 100,

20 - l'Apa glycosylée, produite par *Mycobacterium smegmatis* qui a une composition globale en mannose légèrement différente de celle de l'Apa produite par *M. tuberculosis* a une activité antigénique diminuée d'environ un facteur 10.

Par ailleurs, il a été rapporté que cette molécule Apa de *M. tuberculosis* contient 6 à 9 résidus mannoses liés par une liaison glycosidique de type α -(1,2) à 4 résidus thréonine (T₁₀, T₁₈, T₂₇ et T₂₇₇) de la façon suivante : un di-mannose (T₁₀ et T₁₈), un mannose (T₂₇), un mannose, un di-mannose ou un tri-mannose (T₂₇₇). (Dobos et al., *J. Bacteriol.*, 1996, 178, 2498-2506). Il faut noter que cette structure osidique qui contient des mono-, di- ou tri-mannoses ressemble à celle des mannoprotéines de levure, en

particulier de *Candida albicans*, et est différente de celle des protéines de *F. meningosepticum* qui possèdent des chaînes oligomannosiques plus longues.

La perte de l'antigénicité de l'Apa, observée après démannosylation, pourrait être due à une diminution de la phagocytose et de l'apprêtement de cet antigène ou bien de la reconnaissance de celui-ci par les lymphocytes T CD4+. En effet, le récepteur au mannose des macrophages et des cellules dendritiques qui se lie spécifiquement aux hexoses, notamment des mannoprotéines de *C. albicans*, et des mannolipides comme le lipoarabinomannane des mycobactéries, joue un rôle dans la phagocytose et l'apprêtement des antigènes qui sont présentés à la surface de ces cellules sous forme d'un complexe peptide-molécule de classe II du CMH. (Stahl et al., *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10, 50-55). Il a aussi été montré qu'un peptide mannosylé (au niveau de résidus lysine en position N-terminale) était phagocyté et apprêté par les cellules dendritiques, de façon beaucoup plus efficace qu'un peptide non-glycosylé de même séquence (Tan et al., *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2426-2435).

Dans le modèle du lysozyme de la poule, il a été montré que des peptides analogues glycosylés d'un peptide constituant un épitope T de cet antigène étaient capables d'induire des lymphocytes T CD4+ reconnaissant spécifiquement cet épitope glycosylé (Deck et al., *J. Immunol.*, 1995, 155, 1074-1078). Toutefois, dans la mesure où de tels épitopes T glycosylés reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ n'ont pas été identifiés dans des antigènes natifs issus de microorganismes pathogènes (bactérie-champignon), l'importance de la glycosylation dans la reconnaissance des antigènes de ces microorganismes pathogènes par les lymphocytes T CD4+ reste à démontrer.

En outre, et ce malgré les données relatives à l'Apa de *M. tuberculosis* et les connaissances générales sur la glycosylation des antigènes, il n'a pas été possible jusqu'à présent de préparer des antigènes issus des protéines O-glycosylées de ces microorganismes pathogènes, aptes à être effectivement utilisables dans une composition immunogène ou vaccinale et/ou dans un test de diagnostic.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

7

En effet :

- les protéines actives qui ne représentent qu'un faible pourcentage des protéines produites par ces microorganismes sont purifiées avec des rendements très faibles, par des procédés qui sont dangereux, du fait de la manipulation de grandes quantités de ces agents pathogènes,
- les protéines, produites dans des systèmes d'expression hétérologues (cellules eucaryotes ou bactéries incapables de glycosyler), ont une activité antigénique faible,
- les protéines produites dans des systèmes d'expression homologue comme *M. smegmatis* ont une activité antigénique acceptable mais elles sont produites en quantités insuffisantes par des procédés complexes.

En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but de préparer des antigènes immunodominants, aptes à induire une réponse immunitaire protectrice humorale et/ou cellulaire, qui, d'une part, administrés seuls ou en combinaison avec d'autres antigènes, pourraient constituer un vaccin utilisable chez tous les individus, y compris les sujets immunodéprimés (disparition du risque lié à l'utilisation d'un vaccin vivant) et d'autre part pourraient être utilisés à des fins diagnostiques.

Ils ont trouvé que certains glycopeptides issus de microorganismes pathogènes synthétisant des glycoprotéines (et notamment les mycobactéries) présentent une activité antigénique au moins égale sinon supérieure à celle de la protéine native déglycosylée ou de la protéine recombinante produite dans *E. coli*.

C'est également un but de l'invention de développer des moyens simples à mettre en œuvre pour la production de ces glycopeptides en grandes quantités.

La présente invention a pour objet des glycopeptides immunogènes sélectionnés dans le groupe constitué par :

- a,) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 %

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

8

d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides, issus d'un microorganisme pathogène sont :

- présentés par une molécule de classe II du CMH,
- 5 - reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et

- capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par
10 lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et

b,) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, issu de l'Apa qui est décrit par Dobos et al. (*J. Bacteriol.*, 1996, 178, 2498-2506).

- 15 Ces glycopeptides constitués essentiellement par un épitope T glycosylé sont reconnus par des lymphocytes T CD4+ par l'intermédiaire de cet épitope T glycosylé. En effet, après immunisation avec des bacilles vivants du groupe de la tuberculose, les lymphocytes T spécifiques de ces glycopeptides sont beaucoup plus nombreux que les lymphocytes T spécifiques des peptides non glycosylés de même
20 séquence.

De manière avantageuse, lesdits glycopeptides ont une activité antigénique au moins 10 fois supérieure, de préférence au moins 30 fois supérieure, à celle d'un peptide témoin de même séquence.

Lesdits glycopeptides présentent les avantages suivants :

- 25 - induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire protectrice et éventuellement d'une réponse humorale, et utilisation possible comme antigènes chez les sujets immunodéprimés.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

9

- activité antigénique au moins égale sinon supérieure aux antigènes classiques (culture desdits microorganismes vivants atténués, mélanges d'antigènes préparés à partir desdites cultures ou peptides non glycosylés) car ils sont reconnus par un nombre plus important de lymphocytes T spécifiques du microorganisme pathogène,
- 5 - spécificité très étroite, qui permet à la fois d'éliminer les problèmes de réactivités croisées avec d'autres microorganismes, notamment avec d'autres mycobactéries atypiques, et d'augmenter l'efficacité de la vaccination et du diagnostic des microorganismes pathogènes ; en effet, ils sont plus spécifiques étant donné que leurs résidus oligosaccharidiques, présents exclusivement dans lesdits microorganismes
- 10 pathogènes, participent de façon cruciale à la définition de l'épitope T reconnu par les lymphocytes T CD4⁺ ; ils constituent ainsi des antigènes spécifiques pour la vaccination et le diagnostic des infections par des organismes pathogènes aptes à O-glycosyler certaines de leurs protéines (bacilles du complexe de la tuberculose, *Flavobacterium meningosepticum*, *Candida albicans*...),
- 15 - utilisation chez les sujets immunodéprimés car ils sont totalement apathogènes,
- production possible en grandes quantités,
 - meilleure standardisation des doses actives et de l'efficacité du vaccin,
 - facilités de stockage et d'utilisation,
- 20 Selon un mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, lesdits acides aminés neutres sont sélectionnés dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.
- Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits glycopeptides contiennent de 1 à 7 résidus thréonine, liés à un di- ou à un trisaccharide.
- 25 Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, ledit di- ou tri-saccharide est un dimère ou un trimère d'hexose, de préférence un mannose.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

10

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, ladite liaison glycosidique est une liaison α -(1,2).

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux, lesdits glycopeptides sont issus d'un microorganisme pathogène apte à O-glycosyler des protéines, de préférence *Mycobacterium tuberculosis* ou *Candida albicans*.

Conformément à l'invention, lesdits glycopeptides sont, de préférence, issus :

- de la protéine Apa de *M. tuberculosis* (Genbank numéro X80268) ou
- de la protéine Rv1796 codée par le gène *Rv 1796*, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv (Banque Sanger).

De préférence, ledit glycopeptide est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un glycopeptide de 39 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:1) est celle qui s'étend des positions 1 à 39 de la séquence de la protéine Apa et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 10, 18 et 27 de la SEQ ID NO:1 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique,

- un glycopeptide de 26 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:2) est celle qui s'étend des positions 261 à 286 de la séquence de la protéine Apa (séquence C-terminale) et dans laquelle le résidu thréonine en position 17 de la SEQ ID NO:2 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique, et

- un glycopeptide de 35 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:3) est celle qui s'étend des positions 169 à 203 de la séquence de la protéine Rv 1796 et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 4, 5, 7, 13, 15, 23 et 25 de la SEQ ID NO:3 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique.

L'invention a également pour objet un procédé de synthèse d'un glycopeptide tel que défini précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

11

- préparation, en solution, d'acides aminés neutres glycosylés, liés à un di- ou à un trisaccharide par une liaison glycosidique,
 - synthèse, sur support solide, du glycopeptide à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de la séquence peptidique dudit glycopeptide et des
- 5 acides aminés neutres glycosylés, obtenus précédemment, et
- coupure du glycopeptide du support solide.
- Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.
- Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre,
- 10 lorsque lesdits glycopeptides présentent les séquences suivantes (T représente une thréonine O-glycosylée, fonctionnalisée par 2 ou 3 résidus glycosidiques et Ac représente une fonction acétate) :
- SEQ ID NO:1 :
- H_2N -DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPAAAANT-CONH₂
- 15 SEQ ID NO:2 :
- AcNH-PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA-COOH
- SEQ ID NO:3 :
- AcNH-TIPTTETPPPPQTVTLSPVPPQTVTVIPAPPPEEG-CONH₂,
- 20 ledit procédé comprend les étapes suivantes :
- i) préparation, en solution, de thréonines O-glycosylées fonctionnalisées par 2 ou 3 résidus glycosidiques,
 - ii) synthèse, sur support solide, des peptides correspondant aux séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 sus-mentionnées, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de ces séquences et des thréonines O-glycosylées
- 25 obtenues lors de l'étape i),
- iii) coupure des peptides du support solide, et

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

12

iv) introduction, par synthèse chimique, d'une fonction amide au niveau de l'extrémité C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3, et d'une fonction acétate au niveau de l'extrémité N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

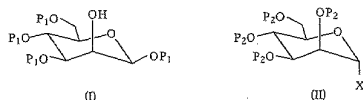
La synthèse des peptides SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 correspond donc à une synthèse peptidique classique en phase solide, au cours de laquelle sont introduits des acides aminés glycosylés. Comme connu dans le domaine de la synthèse peptidique en phase solide, les acides aminés utilisés sont convenablement protégés et, si nécessaire, activés avant d'être incorporés l'un après l'autre dans la séquence peptidique. De même, les hydroxyles présents au niveau des résidus glycosidiques portés par les thréonines doivent être convenablement protégés au cours de la synthèse peptidique.

Une fois la synthèse peptidique effectuée, les peptides sont séparés du support solide et déprotégés. Ils peuvent être purifiés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les résidus glycosidiques portés par les thréonines O-glycosylées préparées lors de l'étape i) sont des hexoses, de préférence des mannoses, les résidus mannose étant avantageusement reliés entre eux par des liaisons α -(1,2).

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, les thréonines fonctionnalisées par des résidus mannose sont préparées comme suit :

a₂) préparation de dérivés du mannose de formules (I) et (II) :



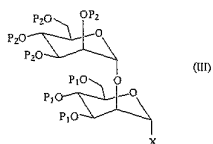
WO 02/50108

PCT/FR01/04100

13

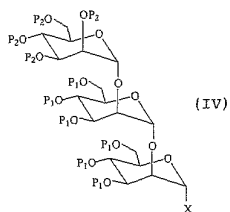
dans lesquelles P_1 et P_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent des groupes protecteurs d'une fonction hydroxyle, et X représente une fonction activée, telle qu'un atome de brome,

- b.) réaction du dérivé de formule (I) avec le dérivé de formule (II), puis
 5 activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant deux résidus mannose et répondant à la formule (III) :



- 10 dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II),

- c.) éventuellement, réaction du composé de formule (III) avec un dérivé du mannose de formule (I) telle que définie en a₂), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant trois résidus mannose et répondant
 15 à la formule (IV) :



WO 02/50108

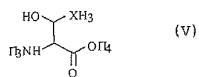
PCT/FR01/04100

14

dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II), et

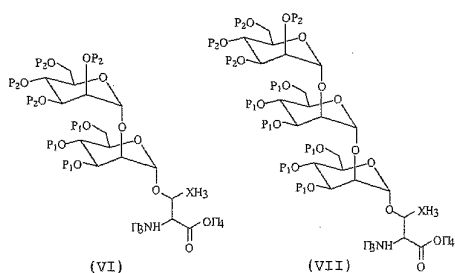
d₂) condensation du composé de formule (III) ou du composé de formule (IV) avec une thréonine convenablement protégée de formule (V) :

5



dans laquelle P_3 représente un groupe protecteur d'une fonction amine primaire et P_4 représente un groupe protecteur d'une fonction hydroxyle,

10 conduisant respectivement à l'obtention d'une thréonine glycosylée de formule (VI) ou (VII) :



15

dans lesquelles P_1 , P_2 , P_3 et P_4 sont tels que définis précédemment.

Les groupes protecteurs P_1 , P_2 , P_3 et P_4 peuvent être choisis parmi ceux décrits dans l'ouvrage *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. GREENE et P.G.M. WUTS, Seconde Edition, 1991, J. WILEY and Sons. A titre d'exemples et de façon

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

15

non-limitative, P₁ et P₂ peuvent représenter des groupes acétyle ou benzoyle, P₃ peut représenter un groupe Fmoc (fluorène-9-yl-méthoxycarbonyle) et P₄ peut représenter un groupe pentafluorophényle.

5 La présente invention a également pour objet un procédé de sélection et de criblage de glycopeptides immunogènes à partir de la séquence peptidique des protéines d'un microorganisme pathogène, qui peut avantageusement être mis en œuvre de façon concomitante au procédé de synthèse des glycopeptides conformes à l'invention, tel que défini ci-dessus, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

10 a.) recherche et sélection dans la séquence peptidique des dites protéines d'au moins une séquence de 14 à 25 acides aminés, contenant au moins un acide aminé neutre lié à un di- ou un trisaccharide et au moins 15% de proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre,

15 b.) préparation du/des glycopeptide(s) sélectionné(s) à l'étape a.), conformément au procédé de synthèse défini ci-dessus, et

c.) sélection des glycopeptides dont l'activité antigénique est au moins 10 fois supérieure, de préférence au moins 30 fois supérieure à celle d'un peptide témoin de même séquence.

20 Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé de criblage, préalablement à l'étape a.), il comprend une étape de présélection d'au moins une glycoprotéine antigénique.

25 Selon encore un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé de criblage, à l'étape c.), l'activité antigénique dudit glycopeptide est évaluée par mesure de l'activation des lymphocytes T CD4+ d'animaux immunisés par ledit microorganisme pathogène atténué ou par une fraction antigénique dudit microorganisme pathogène.

L'activation des lymphocytes T peut-être mise en évidence par des techniques classiques d'immunologie telle que celles décrites dans *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). A

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

16

titre d'exemple on peut citer les tests de prolifération lymphocytaire, les dosages des cytokines (protéine ou ARNm) synthétisées par des lymphocytes T CD4+ activés (immunoessai (ELISA) ou réaction de polymérisation en chaîne de type RT-PCR) ou, dans le cas de *M. tuberculosis*, les tests d'hypersensibilité de type retardé.

5 La présente invention englobe également les glycopeptides susceptibles d'être obtenus par le procédé de sélection et de criblage tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un glycopeptide conforme à l'invention ou d'un glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale ou d'un réactif de
10 diagnostic.

Les glycopeptides selon l'invention qui détectent de façon très spécifique l'immunité cellulaire et/ou humorale induite par l'infection par un microorganisme pathogène, en particulier *M. tuberculosis*, peuvent avantageusement être utilisés pour le diagnostic de la tuberculose par toute technique permettant la détection de
15 l'immunité cellulaire, cette technique étant en elle-même connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut citer les tests de prolifération de lymphocytes T et les dosages immunoenzymatiques de cytokines spécifiques des lymphocytes T CD4+, notamment l'INF- γ .

La présente invention a également pour objet une composition
20 immunogène apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide tel que défini ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Du fait de la coopération entre les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ ou les lymphocytes B dans la mise en place d'une réponse
25 immunitaire humorale ou cellulaire, les glycopeptides de l'invention peuvent avantageusement être utilisés comme protéine de transport (« *carrier* ») de tout autre antigène vaccinal pour augmenter l'efficacité de l'immunisation contre ledit antigène.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

17

Cette association antigène-carrier permet avantageusement de faciliter la sélection et l'amplification des lymphocytes B et T spécifiques de l'antigène vaccinal.

La présente invention a également pour objet une composition vaccinale apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide tel que défini ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et éventuellement à au moins un adjuvant.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites compositions immunogène ou vaccinale, ledit glycopeptide est associé à une protéine ou un fragment de protéine comprenant au moins un épitope B, un épitope T de type CD4+ ou un épitope T de type CD8+.

Au sens de la présente invention, on entend par épitope B, épitope T de type CD4+ et épitope T de type CD8+ relativement à la séquence d'une protéine ; le fragment de cette séquence qui est capable de se lier respectivement à un anticorps, à un récepteur T de lymphocytes CD4+ et à un récepteur T de lymphocytes CD8+.

Au sens de la présente invention on entend par association du glycopeptide à une protéine aussi bien le mélange que le couplage par tout moyen physique ou chimique, par exemple l'expression d'une fusion entre la séquence du glycopeptide et celle de la protéine ou du fragment de protéine.

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés ; avantageusement, ils sont choisis dans le groupe constitué par l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

Ledit glycopeptide peut éventuellement être associé à tout autre moyen, en lui-même connu de l'homme du métier, permettant d'augmenter l'immunogénicité d'un peptide. A titre d'exemple on peut citer le couplage à un peptide porteur qui permet l'obtention d'un peptide multimérisé ramifié, tel que celui décrit par Wilkinson et al., 1999, *Eur. J. Immunol.*, 29, 2788-2796.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

18

La présente invention a également pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre l'un ou plusieurs des glycopeptides selon la présente invention.

5 Selon un mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont sélectionnés parmi les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux.

La présente invention a en outre pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les glycopeptides et les anticorps selon l'invention.

10 La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'une infection par un microorganisme pathogène, caractérisé en qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon biologique d'un patient susceptible d'être infecté par ledit microorganisme pathogène, avec un réactif de diagnostic tel que défini ci-dessus (anticorps ou glycopeptides, selon le cas) et la détection de la formation d'un complexe anticorps et microorganisme présent dans l'échantillon biologique ou glycopeptide(s) et anticorps présents dans l'échantillon.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, laquelle se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

20 - la figure 1 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé, de l'activité antigénique de l'Apa native purifiée de *M. tuberculosis*, en fonction de la cinétique de digestion de la protéine Apa par l' α -mannosidase. Les résultats sont exprimés en unités de tuberculine par mg de protéine en fonction du temps en heures,

25 - la figure 2 illustre l'analyse par spectrométrie de masse de la composition en mannose des molécules d'Apa, en fonction de la cinétique de digestion de la protéine Apa par l' α -mannosidase. Le nombre de résidus mannose correspondant à chaque pic de la protéine Apa est indiqué et l'activité antigénique globale du produit de la digestion de l'Apa est indiquée aux différents temps étudiés,

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

19

- la figure 3 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé, de l'activité antigénique d'un glycopeptide, dénommé Lip, issu de la protéine Rv 1796 (SEQ ID NO:3). Les protéines standard purifiées de *M. tuberculosis* (PPD) sont utilisées comme témoin positif à la dose de 0,25 µg dans 0,1 ml. Le peptide Lip est utilisé à la dose de 0,02 µg dans 0,1 ml. Les peptides Lip traités par l' α -mannosidase ou la subtilisine sont négatifs aux mêmes doses. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la réaction d'érythème,

- la figure 4 illustre l'activité antigénique du peptide Lip par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire. La reconnaissance par les lymphocytes T du peptide Lip glycosylé (Lip natif) est comparée à celle du peptide déglycosylé (Lip + α -mannosidase) ou du peptide Lip associé à un anticorps anti-récepteur CD4+ des lymphocytes T (Lip + anti Cd4),

- la figure 5 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé de l'activité antigénique de l'Apa native purifiée de *M. tuberculosis* (Apa native) ou de l'Apa recombinante déglycosylée produite dans *E. coli* (rApa *E. coli*), en fonction de l'immunisation des cobayes. Ceux-ci ont été immunisés au préalable par le BCG vivant injecté en intradermique ou par les plasmides pAG831 ou pAG832, contenant la séquence codante de l'Apa, placée sous le contrôle du promoteur précoce du cytomégalovirus. L'immunisation des cobayes par les plasmides conduit à une sensibilisation pouvant être révélée par une réaction d'hypersensibilité de type retardé. Les deux types d'antigènes sont équivalents pour engendrer cette réaction, alors qu'après une immunisation par le BCG, seule l'Apa native glycosylée est antigénique.

- la figure 6 représente la préparation d'unités comportant deux ou trois résidus mannose reliés par des liaisons α -(1,2), et

- la figure 7 (7a et 7b) représente la préparation de thréonines fonctionnalisées par deux ou trois unités de mannose.

EXEMPLE 1: Importance du nombre de résidus oligosaccharidiques dans l'antigénicité de la protéine Apa.

1. Matériels et méthodes

a) Déglycosylation ménagée de l'Apa par digestion à l' α -mannosidase

5 450 μ g de protéine Apa purifiée à partir du surnageant de culture de *M. tuberculosis*, selon le protocole décrit par Horn et al., précité sont dilués dans un volume de 450 μ l de tampon A (100 mM $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$, 2 mM ZnCl_2).

Au temps initial, 75 μ l de la solution de protéine Apa sont prélevés, dilués dans 25 μ l de tampon A et congelés comme témoin. 125 μ l d' α -mannosidase à 10 1 mg/ml (3 UI/ml, Oxford Glycosciences) sont ensuite ajoutés au 375 μ l de la solution d'Apa et le volume réactionnel de 500 μ l est incubé à 37°C. Après 30 min, 1 h, 4 h, 16 h et 24 h, 100 μ l de la réaction sont prélevés et congelés à -20°C.

b) Purification des produits de digestion

15 Les échantillons de 100 μ l sont chauffés 2 min à 90°C puis ils sont refroidis brusquement, séchés par le vide et remis en suspension dans 300 μ l d'acide tri-fluoro-acétique à 0,1% dans l'eau (solution B).

Les produits de digestion de l'Apa sont séparés de l' α -mannosidase sur une colonne de chromatographie en phase réverse (Ressource RPC, Pharmacia), par un gradient de 0 à 90 % d'acétonitrile dans la solution B, en 90 min. L'Apa est éluée de la 20 colonne au temps $t = 68$ min, correspondant à $51,5\% \pm 0,5\%$ d'acétonitrile. Les fractions correspondant à l'Apa sont collectées, lyophilisées, remises en suspension dans une solution de butanol à 5% dans l'eau (solution C), puis séchées sous vide. Les échantillons purifiés sont alors remis en suspension dans 100 μ l de solution C.

c) Analyse biochimique des produits de digestion de l'Apa

25 La composition oligosaccharidique de chaque échantillon est analysée par spectrométrie de masse, dans les conditions décrites dans Horn et al., précité.

Une mesure de l'absorption à 210 nm est effectuée afin d'évaluer la quantité relative de protéine présente dans chaque échantillon.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

21

Ensuite, les échantillons sont séchés et leur concentration est ajustée à 1 mg/ml dans un tampon de titrage (tampon D : PBS, 0,9% NaCl, 0,05% Tween 80).

d) Titration biologique de l'activité antigénique des produits de digestion ménagée de l'Apa par l' α -mannosidase dans un test d'hypersensibilité de type retardé

5 L'activité antigénique est mesurée par un test d'hypersensibilité de type retardé sur des cobayes immunisés 3 mois auparavant par une injection intradermique de 2 mg de BCG vivant en 2 points d'injection.

10 Chaque échantillon est dilué à une concentration de 2 μ g/ml dans le tampon D et 100 μ l de cette dilution (0,2 μ g) sont injectés par voie intradermique à des lots de 2 cobayes préalablement immunisés.

Les différents lots d'animaux sont les suivants :

- lot 1 : témoin négatif ayant reçu 100 μ l de tampon D
- lot 2 : Apa t=0
- lot 3 : Apa t=30 min
- 15 • lot 4 : Apa t=1h
- lot 5 : Apa t= 4h
- lot 6 Apa t= 16 h
- lot 7 Apa t= 24h
- lot 8 : témoin positif (0,25 μ g de protéines standard purifiées de

20 *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) correspondant à 10 unités de tuberculine (UT).

24 h après l'injection, la moyenne du diamètre de la réaction d'érythème est mesurée pour les différents lots d'animaux et le titre en tuberculine des échantillons est déterminé par rapport au standard PPD.

2. Résultats

25 Les résultats sont illustrés par les figures 1 et 2.

L'analyse de l'activité antigénique de l'Apa en fonction de la cinétique de digestion par l' α -mannosidase (figure 1) montre que l'activité antigénique de l'Apa est

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

22

progressivement perdue au cours de la digestion par l' α -mannosidase : 66% en 1 h, 86% en 4 h et 97 à 99% pour les digestions plus longues.

L'analyse de la composition en mannose des produits obtenus aux différents temps de digestion (figure 2) montre que :

- 5
- les molécules d'Apa natives possèdent 6 à 8 résidus mannose, et
 - les molécules d'Apa sur lesquelles persistent 3 à 6 résidus mannose perdent 86 % de leur activité antigénique.

Il a été montré que la composition en oligomannose de l'Apa est la suivante : un di-mannose (T_{10} et T_{12}), un mannose (T_{27}), un mannose, un di-mannose ou un tri-mannose (T_{27}), Dobos et al., précité. En outre, l' α -mannosidase est une exomannosidase.

Par conséquent, les résultats indiquent que :

- 15
- la perte de 1 ou 2 des mannoses terminaux des 4 chaînes oligomannose de l'Apa entraîne une perte drastique de l'activité antigénique, et
 - l'antigénicité de l'Apa est liée à la présence d'un di- ou d'un tri-mannose sur un ou plusieurs des résidus thréonine glycosylés.

EXEMPLE 2 : Mise en évidence du glycopeptide Lip de *M. tuberculosis*.

1. Matériels et méthodes

a) Purification du glycopeptide

20 a.1) Préparation du matériel brut

Des bactéries de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) sont cultivées durant 20 jours sur un milieu synthétique de Sauton (Milieux de culture, H. Cassagne, 1961, Ed. Institut Pasteur, Tome 2, page 242). Les molécules sécrétées dans le milieu sont concentrées sur une membrane d'ultrafiltration (PM10, AMICON) de façon
25 à ne retenir que les molécules de masse moléculaire supérieure à 10 000 Da, puis elles sont lyophilisées. Il est obtenu environ 10 g de lyophilisat pour 60 litres de milieu de culture.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

23

a2) Filtration moléculaire (étape 1)

Une colonne préparative est chargée avec la matrice Sup75 pregrade Pharmacia. Cette colonne de 50x750 mm est équilibrée avec un tampon phosphate (50 mM $\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$, pH 7,1 ; 100 mM NaCl ; 4 % butanol) à un débit de 1 ml/min. Le matériel brut précédent est repris dans le tampon d'équilibre à une concentration finale de 10 g pour 100 ml, clarifié par centrifugation à 43 000 g, durant 4h puis par filtration sur filtre 0,22 μm . Des injections de 13 ml sont effectuées et les différentes fractions détectées par leur absorbance à 280 nm sont concentrées sur membrane PM10 puis lyophilisées.

La fraction éluée entre 700 et 800 ml est très antigénique : on observe une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant ; cette fraction est par contre peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a3) Echange d'ions (étape 2)

Une colonne préparative Source 15Q Pharmacia (15 μm) de 24x250 mm est équilibrée avec un tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8, 4 % butanol, à un débit de 5 ml/min avec une pression maximale de 8 bars. Un gradient linéaire de NaCl de 0 à 150 mM dans le même tampon est appliqué après injection de 500 mg de la fraction précédente dissoute dans 10 ml du tampon initial. Les fractions éluées sont détectées par absorption à 280 nm, concentrées sur membrane PM10 puis lyophilisées.

La fraction éluée, entre 40 et 75 mM de NaCl est très antigénique : on observe une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant ; cette fraction est par contre peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a4) Phase inverse sur colonne C8 (étape 3)

Une colonne RPC (Reversed Phase Column) Resource 15RPC de 4,6x100 mm Pharmacia est équilibrée par un tampon 20 mM $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$, pH 6,5, à un débit de 1 ml/min. Un gradient non linéaire d'acétonitrile, compris entre 0 et 90 %, est appliqué après l'injection sur la colonne de 10 mg dans 2 ml de tampon de la fraction

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

24

précédente. Les fractions éluées sont détectées à 280 nm puis concentrées sous vide à 40°C avant d'être lyophilisées.

La fraction éluée entre les concentrations 18 et 22 % d'acétonitrile est très antigénique pour révéler une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a5) Phase inverse sur colonne C18 (étape 4)

Une colonne microbore phase inverse C18 (Browlec lab. 1x250 mm) est équilibrée par un tampon 20 mM CH₃COONH₄⁺, pH 6,5, à un débit de 1 ml/min. Un gradient non linéaire d'acétonitrile de 0 à 90 % est appliqué après injection sur la colonne de la fraction précédente.

Une fraction détectée seulement à 220 nm est éluée par une concentration d'environ 11 % d'acétonitrile. Cette fraction (3 mg) est très active pour révéler les réactions d'hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par des bactéries vivantes et peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

b) Analyse biochimique du glycopeptide purifié

La fraction obtenue à l'étape finale de purification a été séquencée par une technique d'Edman modifiée (Applied Biosystems 473A), selon les instructions du fabricant.

La composition de chaque échantillon est analysée par spectrométrie de masse (spectromètre MALDI-TOF), dans les conditions décrites dans Horn et al., précité.

c) Digestion du glycopeptide par l' α -mannosidase.

9 μ g du glycopeptide purifié ci-dessus sont dissous dans 65 μ g de tampon 100 mM CH₃COONa⁺, pH 5 puis 3 μ l d'une solution à 1 mg/ml d' α -mannosidase (Oxford Glyco System), soit 90 mU d' α -mannosidase, sont ajoutés. La réaction est incubée 24h à 37°C de façon à obtenir une digestion totale, puis le produit obtenu est séché sous vide.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

25

d) Digestion du peptide par la subtilisine

690 ng du glycopeptide purifié ci-dessus sont dissous dans 5 µl de tampon 100 mM carbonate d'ammonium, pH 8, puis 1 µl d'une solution de subtilisine à 100 µg/ml soit environ 100 ng est ajouté. La réaction est incubée 24h à 37°C puis le produit de la réaction est séché sous vide et repris dans le tampon de titrage (tampon D).

e) Titration biologique de l'activité antigénique du glycopeptide par un test d'hypersensibilité de type retardé

0,02 µg du glycopeptide purifié ci-dessus, non-digéré ou digéré par l'α-mannosidase ou la subtilisine sont injectés à des lots de cobayes préalablement immunisés, selon le protocole décrit à l'exemple 1. Les résultats sont exprimés par la valeur du diamètre de la réaction d'érythème. Le témoin est constitué par 0,25 µg de PPD correspondant à 10 UT.

f) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire.

Les conditions du test sont celles décrites dans Horn et al., précité.

2. Résultats

a) Purification et analyse biochimique du glycopeptide Lip

La mesure de masse effectuée sur le glycopeptide purifié indique la présence de molécules complexes, vraisemblablement glycosylées par des mannoses étant donné la présence de mesures différant d'une valeur de 162 unités de masse. Une masse de 6951 Da qui correspond à la masse du peptide traité à l'α-mannosidase est retenue comme la masse minimale de ces molécules.

La séquence N-terminale du glycopeptide purifié indique la présence d'une séquence majoritaire TIPTT... et d'une séquence minoritaire IPTTE...

Ces résultats sont compatibles avec un glycopeptide mannosylé, dénommé Lip dont la séquence (SEQ ID NO:3) est celle d'un fragment N-terminal d'un peptide issu de la protéine codée par le gène Rv1796 de *M. tuberculosis* qui s'étend des

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

26

positions 169 à 239 de ladite protéine, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv de la banque de Sanger.

b) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide Lip par un test d'hypersensibilité de type retardé

5 Le glycopeptide est très actif pour révéler les réactions d'hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par des bactéries vivantes, en revanche il est peu actif chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

10 L'activité antigénique du glycopeptide augmente au cours des étapes de purification :

- Etape 1 : La fraction obtenue a une activité de 180 000 (UT)/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et de 10 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

15 - Etape 2 : La fraction obtenue a une activité de 900 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et de 30 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

- Etape 3 : La fraction purifiée a une activité supérieure à 1 000 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et inférieure à 30 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

20 Les résultats illustrés à la figure 3 montrent que :

- l'action de l' α -mannosidase durant 24h à 37°C fait perdre plus de 95 % de l'activité antigénique : la fraction est passé d'une activité à 1 000 000 UT/mg à une activité inférieure à 30 000 UT/mg après déglycosylation,

25 - l'action de la subtilisine abolit l'activité antigénique, et

- à quantité équivalente de protéines, le glycopeptide Lip est au moins 10 fois plus actif que les protéines standard purifiées de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD).

c) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide Lip par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire.

Les résultats illustrés à la figure 4 montrent que la prolifération des lymphocytes T est dépendante de la concentration de peptide. Cette prolifération est marginale lorsque les lymphocytes T sont traités par un anticorps dirigé contre les molécules CD4 ou lorsque le glycopeptide est traité à l' α -mannosidase.

EXEMPLE 3 : Mise en évidence du rôle des résidus oligosaccharidiques de l'Apa dans la définition d'épitopes T par immunisation avec de l'ADN nu codant pour la protéine Apa.

10 **1. Matériel et Méthodes**

a) Construction d'un plasmide contenant la séquence codant pour la protéine Apa

Le plasmide pS65T (Clontech) contenant la séquence du promoteur précoce du cytomégalovirus est coupé par les enzymes de restriction NheI et BspEI, réparé par l'enzyme de Klenow puis ligaturé de façon à obtenir le plasmide pAG800.

15 Le plasmide pAG800 est coupé par l'enzyme ApaI et ligaturé avec l'oligonucléotide 12M48 (5' CAACGTTGGGCC 3'; SEQ ID NO:4) hybridé sur lui-même, pour donner le plasmide pAG802.

Un fragment de 875 paires de bases contenant la séquence codante de l'Apa dépourvue de la séquence signal est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir du plasmide pLA34-2 (Laqueyrie., 1995, *Infect. Immun.*, 63, 4003-4010), en utilisant :

les oligonucléotides 22M42 (5'TCCCAAGCTTTTGGTAGCCG3', SEQ ID NO:5) et 33M44 (5'CTAGGATC CACCATGCCGGAGCCAGCGCCCCG3', SEQ ID NO:6).

25 L'oligonucléotide 33M44 a été synthétisé de façon à contenir un site consensus d'initiation de la traduction de type Kozak (*Nucl. Acids Res.*, 1987, 15, 8125-8148). Le fragment obtenu par PCR est coupé par BamHI et EcoRV et inséré dans le plasmide pAG802 coupé par BglII et SmaI, pour obtenir le plasmide pAG803. Au cours de ces opérations la séquence d'oligonucléotide 5'CAAC GTTGGGCC3' est perdue ; cette

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

28

séquence, dénommée Psp10461 ISS, est considérée comme une séquence immunostimulante augmentant les réponses immunitaires de même que la séquence IL-12p40 ISS (Lipford GB et al., 1997, *Eur. J. Immunol.*, 27, 3420-3426).

5 Une séquence Psp1046 ISS est insérée au site BamHI du plasmide pAG803 par clonage de l'oligonucléotide 25M45 (5'GATCCGGGGGGAACGTTGGGGGG3', SEQ ID NO:7) hybridé avec l'oligonucléotide 25M46 (5'GATCCCCCCCCAACGTTCCCCCG3', SEQ ID NO:8), pour obtenir le plasmide pAG831.

10 Une séquence IL-12p40 ISS est insérée au site BamHI du plasmide pAG803 par clonage de l'oligonucléotide 24M63 (5'AGCGCTATGACGTTCCAAGGGCCC3, SEQ ID NO:9) hybridé avec l'oligonucléotide 24M64 (5'GGGCCCTTGGAACGTCATAGCGCT3', SEQ ID NO:10), pour obtenir le plasmide pAG832.

Après transformation d'*Escherichia coli* de souche XL1 Blue, les
15 plasmides ci-dessus sont amplifiés dans le milieu de culture LB (Sambrook et al., Molecular cloning : A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) contenant 25 µg/ml de kanamycine. Après une étape préalable d'élimination de l'endotoxine par traitement des lysats bactériens avec du Triton X-114 (1%), l'ADN plasmidique est purifié sur des colonnes filtres QIA MaxiPrep
20 (QIAGEN) selon les indications du fabricant.

b) Immunsation des cobayes avec les plasmides pAG831 et pAG832

Des cobayes (Hartley) pesant 300 à 400 g sont immunisés par 2 injections intradermiques dans les flancs avec 50 µg d'ADN des plasmides pAG831 ou pAG832, préparés et purifiés comme indiqué précédemment.

25 Le témoin est constitué par un groupe de cobayes immunisés par du BCG vivant dans les conditions décrites à l'exemple 1 ou à l'exemple 2.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

29

c) Mesure de l'activité antigénique de la protéine Apa produite par des cellules eucaryotes chez les cobayes immunisés par de l'ADN nu, par un test d'hypersensibilité de type retardé

Un et deux mois après l'immunisation, les réactions d'hypersensibilité de type retardé sont mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native ou de la protéine Apa recombinante, produite dans une souche de *Escherichia coli* transformée, purifiées selon le protocole décrit dans Horn et al., précité.

L'Apa native et l'Apa recombinante sont injectées en intradermique à la dose de 0,2 µg dans 100 µl de tampon de titrage (tampon D). L'activité antigénique est mesurée comme décrit à l'exemple 2.

2. Résultats

Les résultats illustrés par la figure 5 sont les suivants :

- les cobayes immunisés avec le plasmide pAG831 ou pAG832 contenant la séquence codante de l'Apa sous le contrôle d'un promoteur eucaryote développent, dans la très grande majorité des cas, une réponse immunitaire dirigée contre la protéine Apa native (anticorps et une réponse T de type CD4+ mesurable par un test d'hypersensibilité de type retardé ou par un test de prolifération *in vitro* des lymphocytes T lorsqu'ils sont mis en présence des antigènes). Chez les animaux répondant à l'antigène Apa natif, les réponses des lymphocytes T CD4+ vis-à-vis de l'antigène déglycosylé par voie enzymatique ou de l'antigène recombinant non-glycosylé provenant de *E. coli* sont de même intensité que les réponses observées avec l'antigène natif glycosylé.

- en revanche, les cobayes immunisés par le BCG vivant montrent une réaction d'hypersensibilité de type retardé uniquement en réponse à l'Apa native. Ces animaux ne développent aucune réaction ou développent une réaction fortement diminuée en réponse à l'Apa recombinante non-glycosylée produite dans *E. coli* comme indiqué précédemment.

Les enseignements de ces résultats sont les suivants :

1) Les résultats observés chez les animaux immunisés avec l'ADN nu codant l'Apa indiquent que la capacité de la protéine Apa à être phagocytée et présentée par les macrophages ou les cellules dendritiques est identique pour la protéine Apa native ou recombinante (non glycosylée).

2) La combinaison des résultats ci-dessus avec les résultats observés chez les animaux immunisés avec du BCG vivant indique que l'absence de réponse à la protéine Apa déglycosylée n'est pas due à une diminution de sa capacité à être présentée par les macrophages ou les cellules dendritiques mais à une absence de reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺. En conséquence, les résidus oligomannose des chaînes latérales des protéines Apa ou Lip sous forme native, telles que celles produites par *M. tuberculosis* ou par BCG vivant, jouent un rôle dans la constitution d'épitopes T reconnus par des lymphocytes T CD4⁺.

EXEMPLE 4 : Préparation des peptides glycosylés SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

1) Préparation des synthons glycosylés 15, 16 et 19.

Préalablement à la synthèse peptidique, on prépare des synthons glycosylés, c'est-à-dire des thréonines fonctionnalisées par deux ou trois résidus mannoses.

• Préparation des composés 5 et 8 (figure 6)

La préparation des composés 5 et 8 est décrite, respectivement, par H. FRANZYK *et al.* dans *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2883-2898 et par R.K. NESS *et al.* dans *J. Am. Chem. Soc. Perkin*, 1950, 72, 2200-2205.

Le mannose peracétylé commercial 1 (à savoir le 1,2,3,4,5-penta-O-acétyl- α -D-mannopyranose) est bromé en position anomérique par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique, comme décrit par A. LEVENE *et al.* dans *J. Biol. Chem.*, 1931, 90, 89-98. L'intermédiaire 2 activé est cyclisé en orthoester 3 dans un mélange de 2,6-diméthylpyridine/méthanol. L'ouverture régiosélective de l'orthoester par hydrolyse acide, à 0°C, dans un mélange acide trifluoroacétique

10% aqueux/ acétonitrile conduit au 1,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-mannopyranose (5). Le régioisomère 4 est également isolé.

Le mannose commercial 6 est perbenzoylé en 7 par action du chlorure de benzoyle dans la pyridine. Ce dernier est activé en 8 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique. Dans ce protocole et dans ceux qui suivent, d'autres méthodes d'activation que par l'action du bromure d'hydrogène pourraient toutefois être utilisées, telles qu'elles sont connues de l'Homme du métier.

- Préparation des disaccharides 10 et 12 (figure 7a)

La préparation des composés 10 et 12 est décrite, respectivement, par A. JANSSON *et al.* dans *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1992, 1699-1707 et par H. FRANZYK *et al.* (*ibid.*). Les composés 2 et 5 sont condensés en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent (ou tout autre promoteur de la réaction de condensation) dans le dichlorométhane pour conduire au disaccharide peracétylé 9, qui est ensuite activé en précurseur bromé 10 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique. Suivant un protocole identique, les composés 5 et 8 sont condensés pour donner le composé 11, lui-même activé en 12.

- Préparation du trisaccharide 18 (figure 7a)

Le disaccharide activé 12 est condensé sur le monosaccharide accepteur 5, en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent dans le dichlorométhane, pour conduire au trisaccharide peracétylé 17, qui est ensuite activé en précurseur bromé 18 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique.

- Préparation des synthons 15 et 16, porteurs de deux unités mannose, et du synthon 19, porteur de trois unités mannose (figure 7b)

Comme décrit par I. SCHON *et al.* dans *Synthesis*, 1986, 303-305, la fonction acide de la thréonine commerciale 13, dont la fonction amine primaire est protégée par un groupement Fmoc, est bloquée sous forme d'ester par action du pentafluorophénoles (pfp) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) pour conduire au précurseur accepteur 14.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

32

La préparation des synthons 15 et 16 est décrite, respectivement, par A. JANSSON *et al.* (*ibid*) et par H. FRANZYK *et al.* (*ibid*). La condensation du composé 14 avec les disaccharides activés 10 et 12, menée en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent dans le dichlorométhane, conduit aux synthons 15 et 16, respectivement. Selon le même protocole, la condensation du composé 14 avec le trisaccharide activé 18 conduit au synthon 19.

2) Préparation des peptides glycosylés SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

Les peptides sont synthétisés en phase solide en utilisant la chimie Fmoc. La synthèse peptidique est effectuée sur un synthétiseur automatique, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention des séquences souhaitées, en incorporant les synthons glycosylés, qui se présentent sous la forme d'esters activés de pentafluorophérol (synthons 15, 16 et 19).

En fonction des synthons utilisés, on obtient soit des peptides comportant des thréonines fonctionnalisées par deux résidus du mannose (incorporation des synthons 15 et/ou 16 lors de la synthèse peptidique), soit des peptides comportant des thréonines fonctionnalisées par trois résidus du mannose (incorporation du synthon 19 lors de la synthèse peptidique), soit des peptides comportant à la fois des thréonines fonctionnalisées par deux résidus du mannose et des thréonines fonctionnalisées par trois résidus du mannose (incorporation des synthons 19 et 15 et/ou 16 lors de la synthèse peptidique).

En fin de synthèse, après clivage des peptides du support solide à l'aide d'acide trifluoroacétique et déprotection des différents acides aminés et des fonctions hydroxyles des mannoses, les peptides sont purifiés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse. Leur structure est contrôlée par les techniques connues de l'Homme du métier, telles que la spectrométrie de masse et l'analyse en acides aminés.

Les fonctions amides (en position C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3) et acétates (en position N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3) sont ensuite introduites par synthèse chimique, au moyen des techniques de chimie organique connues de l'Homme du métier.

5 **EXEMPLE 5 : Mise en évidence du rôle des résidus oligosaccharidiques de l'Apa dans la définition d'épitopes T par immunisation avec un peptide de l'Apa produit dans *E. coli***

1) Matériel et Méthodes

10 Un peptide correspondant aux positions 250 à 280 de l'Apa a été produit dans *E. coli*, sous forme d'une fusion avec un fragment de la cyclase de *Bordetella pertussis*, selon les techniques classiques de clonage, d'expression et de purification de protéines recombinantes dans *E. coli* qui sont bien connues de l'Homme du métier (cf par exemple, les protocoles décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

15 Trois groupes de 5 cobayes Hartley pesant 300 à 400 g ont été immunisés par 2 injections intradermiques à 1 mois d'intervalle, avec 20 µg de ce peptide de l'Apa purifié, dans 0,1 ml d'une solution d'adjuvant.

Trois groupes de 4 cobayes immunisés quatre mois auparavant par du BCG vivant, dans les conditions décrites à l'exemple 1 sont utilisés comme témoins.

20 Un et deux mois après l'immunisation, les réactions d'hypersensibilité de type retardé ont été mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native, de la protéine Apa recombinante produite dans *E. coli* et de la protéine Apa déglycosylée préparée comme décrit à l'exemple 1, dans les conditions définies à l'exemple 3.

2) Résultats

25 Les réactions d'hypersensibilité de type retardé des cobayes immunisés, soit avec le peptide de fusion de l'Apa, soit avec le BCG vivant ont été mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native, de la protéine Apa recombinante produite dans *E. coli* et de la

protéine Apa déglycosylée. Les résultats exprimés par le diamètre de la réaction d'érythème (mm) sont présentés dans le Tableau I ci-dessous :

Tableau I: Activité antigénique du peptide de fusion de l'Apa exprimé dans *E. coli*

antigène	BCG vivant	Peptide de fusion
Apa native	17-15-11-13	5-12-13-5-5
Apa recombinante <i>E. coli</i>	0 0 0 0	13-14-15-5-15
Apa déglycosylée	0 0 0 0	NT*

*NT: non-testé

5 Comme indiqué dans le Tableau I ci-dessus, les réactions d'hypersensibilité de type retardé observées chez les cobayes immunisés par le BCG vivant, sont importantes après injection de molécules Apa natives. Les réactions sont très faibles ou absentes après injection des molécules déglycosylées par voie chimique ou produites dans *E. coli*. A l'inverse pour les cobayes immunisés par les molécules recombinantes correspondant à la fusion entre le fragment de la cyclase de *Bordetella* 10 *pertussis* et le fragment interne de la molécule Apa, les sensibilisations sont identiques vis-à-vis des molécules natives ou déglycosylées.

Ces résultats montrent que les épitopes T glycosylés de la molécule Apa sont reconnus de façon élective par les cobayes immunisés par les bactéries vivantes. Ils 15 montrent aussi que l'absence ou la moindre reconnaissance par ces cobayes des molécules déglycosylées n'est pas liée à une moindre antigénicité intrinsèque de ces molécules.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les 20 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

- 1°) Glycopeptides immunogènes sélectionnés dans le groupe constitué par :
- a.) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides, issus d'un microorganisme pathogène sont :
- 10 - présentés par une molécule de classe II du CMH,
- reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et
- 15 - capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et
- b.) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a.), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.
- 20 2°) Glycopeptides immunogènes selon la revendication 1, caractérisés en ce que ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.
- 3°) Glycopeptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils contiennent de 1 à 7 résidus thréonine, liés à un di- ou à un
- 25 trisaccharide.
- 4°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que ledit di- ou tri-saccharide est un dimère ou un trimère d'hexose.

- 5°) Glycopeptides selon la revendication 4, caractérisés en ce que ledit hexose est un mannose.
- 6°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que ladite liaison glycosidique est une liaison α -(1,2).
- 5 7°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que ledit microorganisme pathogène est apte à O-glycosyler des protéines.
- 8°) Glycopeptides selon la revendication 7, caractérisés en ce que ledit microorganisme pathogène est *Mycobacterium tuberculosis* ou *Candida albicans*.
- 10 9°) Glycopeptides, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont issus de la protéine Apa de *M. tuberculosis* (Genbank numéro X80268) ou de la protéine Rv1796 codée par le gène *Rv 1796*, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv.
- 15 10°) Glycopeptides selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par :
- un glycopeptide de 39 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:1) est celle qui s'étend des positions 1 à 39 de la séquence de la protéine Apa et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 10, 18 et 27 de la SEQ ID NO:1 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique,
 - 20 - un glycopeptide de 26 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:2) est celle qui s'étend des positions 261 à 286 de la séquence de la protéine Apa (séquence C-terminale) et dans laquelle le résidu thréonine en position 17 de la SEQ ID NO:2 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique, et
 - un glycopeptide de 35 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:3)
 - 25 est celle qui s'étend des positions 169 à 203 de la séquence de la protéine Rv 1796 et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 4, 5, 7, 13, 15, 23 et 25 de la SEQ ID NO:3 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique.

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

37

11°) Procédé de synthèse d'un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- préparation, en solution, d'acides aminés neutres glycosylés, liés à un di- ou à un trisaccharide par une liaison glycosidique,

5 - synthèse, sur support solide, du glycopeptide à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de la séquence peptidique dudit glycopeptide et des acides aminés neutres, obtenus précédemment, et

- coupure du glycopeptide du support solide.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

13°) Procédé de préparation selon la revendication 12, caractérisé en ce que lorsque lesdits glycopeptides présentent les séquences suivantes (**T** représente une thréonine O-glycosylée fonctionnalisée par 2 ou 3 résidus glycosidiques et Ac représente une fonction acétate) :

15 SEQ ID NO:1 :

H₂N-DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPAAAANT-CONH₂

SEQ ID NO:2 :

AcNH-PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA-COOH

SEQ ID NO:3 :

20 AcNH-TIPTTETPPPPQTVTLSPVPPQTVTVIPAPPPEEG-CONH₂,

ledit procédé comprend les étapes suivantes :

i) préparation, en solution, de thréonines O-glycosylées fonctionnalisées par 2 ou 3 résidus glycosidiques,

25 ii) synthèse, sur support solide, des peptides correspondant aux séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 sus-mentionnées, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de ces séquences et des thréonines O-glycosylées obtenues lors de l'étape i),

iii) coupure des peptides du support solide, et

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

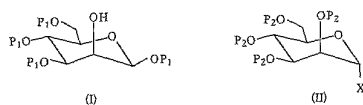
38

iv) introduction, par synthèse chimique, d'une fonction amide au niveau de l'extrémité C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3, et d'une fonction acétate au niveau de l'extrémité N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

14°) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdits 5 résidus glycosidiques portés par les thréonines sont des hexoses, de préférence des mannoses.

15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les thréonines fonctionnalisées par des résidus mannose sont préparées par les étapes suivantes :

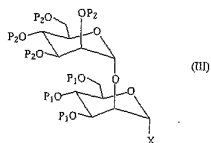
10 a.) préparation de dérivés du mannose de formules (I) et (II) :



15 dans lesquelles P_1 et P_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent des groupes protecteurs d'une fonction hydroxyle, et X représente une fonction activée, telle qu'un atome de brome,

b.) réaction du dérivé de formule (I) avec le dérivé de formule (II), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant deux résidus mannose et répondant à la formule (III) :

20



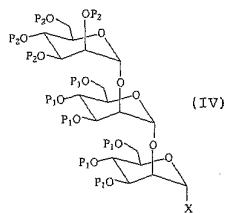
WO 02/50108

PCT/FR01/04100

39

dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II),

- 5 c₂) éventuellement, réaction du composé de formule (III) avec un dérivé du mannose de formule (I) telle que définie en a₂), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant trois résidus mannose et répondant à la formule (IV) :

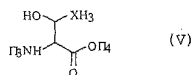


10

dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II), et

- d₂) condensation du composé de formule (III) ou du composé de formule (IV) avec une thréonine convenablement protégée de formule (V) :

15



dans laquelle P_3 représente un groupe protecteur d'une fonction amine primaire et P_4 représente un groupe protecteur d'une fonction hydroxyle,

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

41

- 17°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a₃), il comprend une étape de présélection d'au moins une glycoprotéine antigénique.
- 18°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.
- 19°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, à l'étape c₃), l'activité antigénique dudit glycopeptide est évaluée par mesure de l'activation des lymphocytes T CD4+ d'animaux immunisés par ledit microorganisme pathogène atténué ou par une fraction antigénique dudit microorganisme pathogène.
- 20°) Glycopeptide, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 19.
- 21°) Utilisation d'au moins un glycopeptide sélectionné dans le groupe constitué par les glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20 ou un glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale ou d'un réactif de diagnostic.
- 22°) Composition immunogène apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 23°) Composition vaccinale apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.
- 24°) Composition immunogène ou vaccinale selon la revendication 22 ou la revendication 23, caractérisée en ce que ledit glycopeptide est associé à une protéine ou un fragment de protéine comprenant au moins un épitope B, un épitope T de type CD4+ ou un épitope T de type CD8+.

25°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre l'un ou plusieurs des glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20.

26°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20 ou un anticorps
5 selon la revendication 25.

27°) Procédé de détection d'une infection par un microorganisme pathogène, caractérisé en qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon biologique d'un patient susceptible d'être infecté par ledit microorganisme pathogène, avec un réactif de diagnostic selon la revendication 26 et la détection de la formation d'un complexe
10 anticorps-microorganisme présent dans l'échantillon biologique ou glycopeptide(s)-anticorps présents dans l'échantillon.

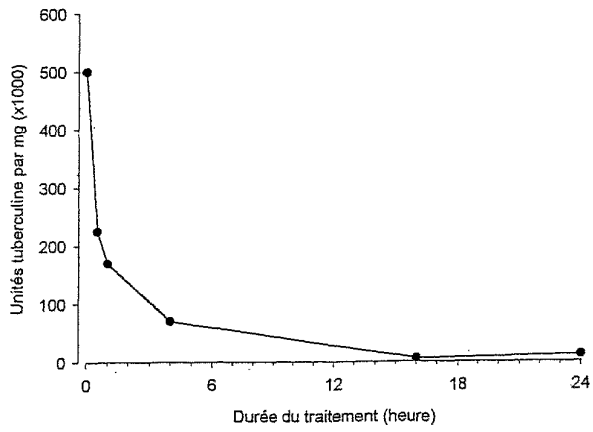


FIGURE 1

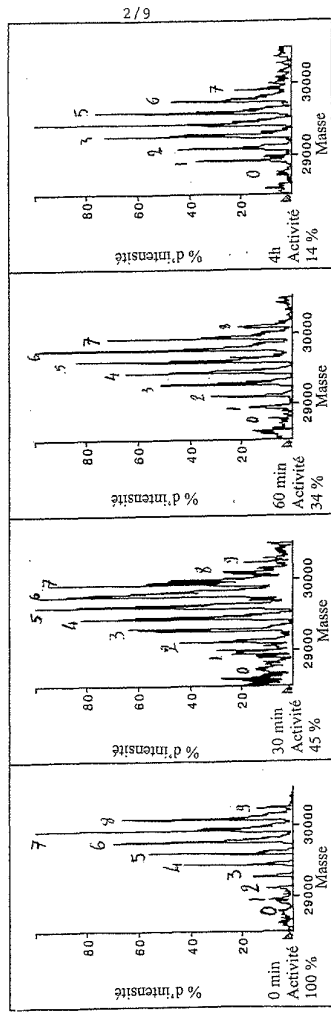


FIGURE 2.1

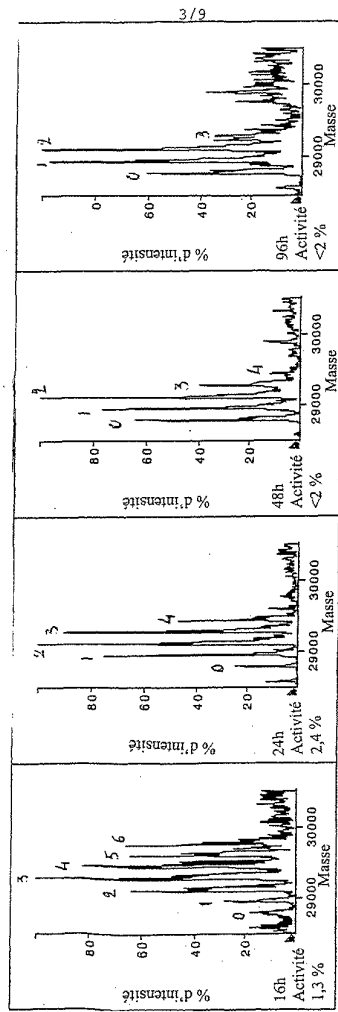


FIGURE 2.2

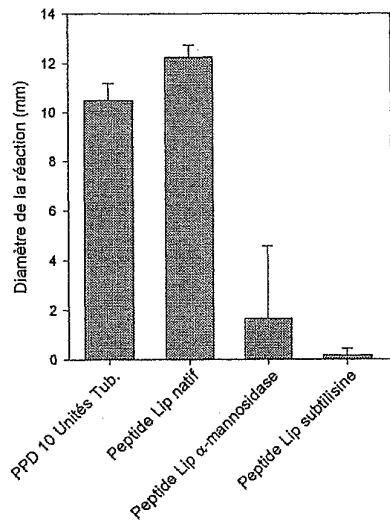


FIGURE 3 .

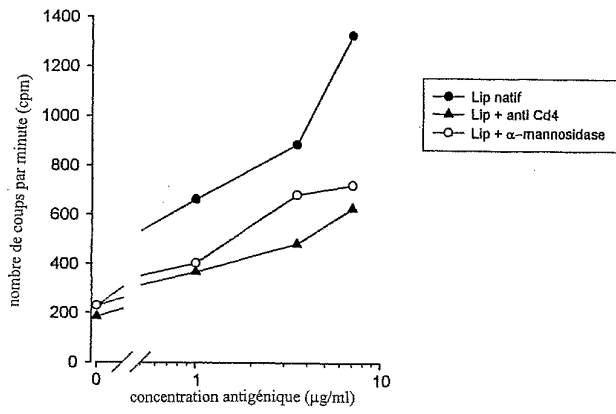


FIGURE 4

6/9

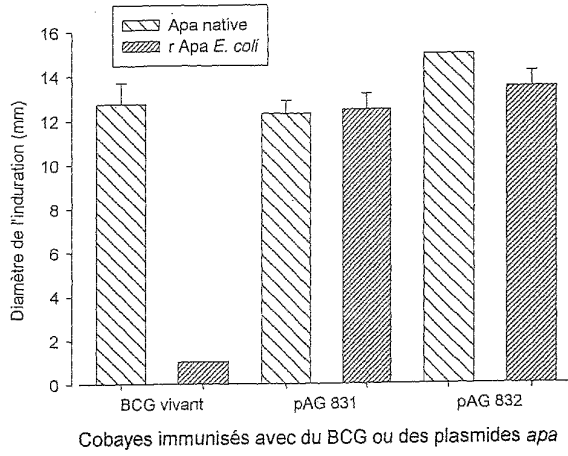


FIGURE 5

7/9

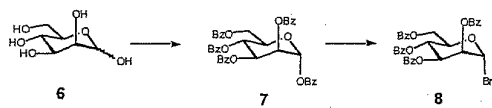
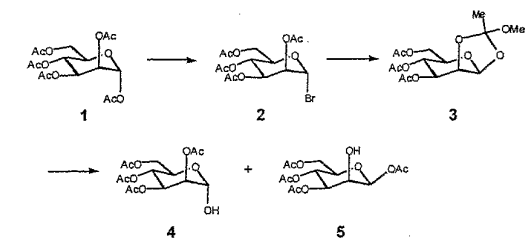


FIGURE 6

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

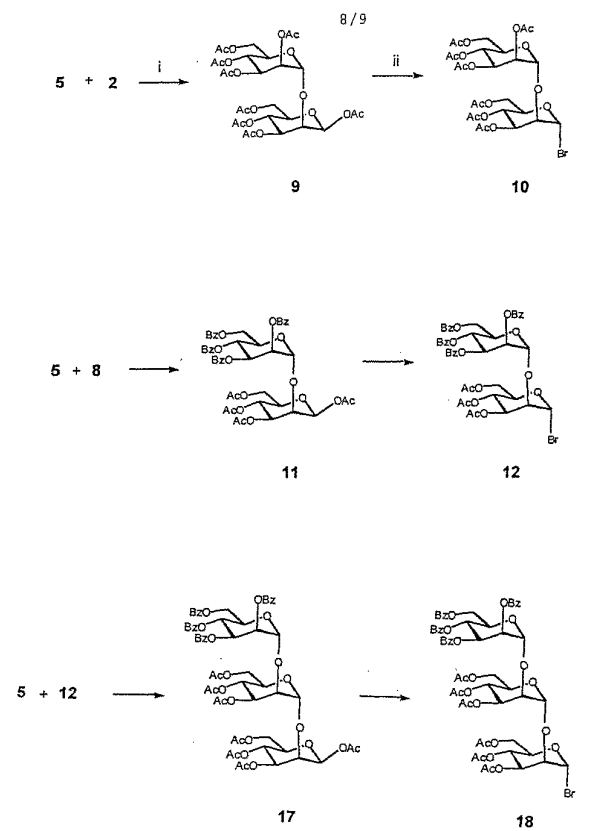


FIGURE 7a

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

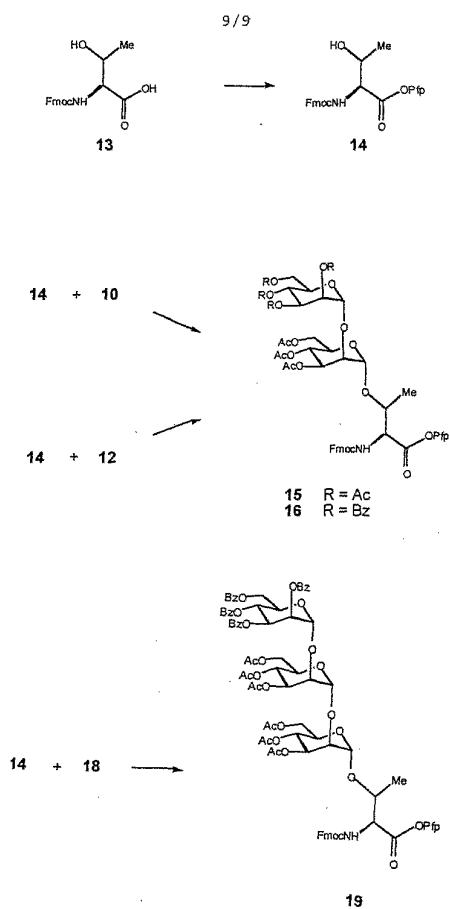


FIGURE 7b

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR
 Marchal Gilles
 Romain Félix
 Pescher Pascale

<120> Glycopeptides immunogènes, criblage, préparation et applications

<130> Seq226FR86

<140>
 <141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)
 <223> liaison glycosidique à un di- ou un tri-saccharide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)
 <223> liaison glycosidique à un di-ou à un tri-saccharide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)
 <223> liaison glycosidique à un di-ou à un tri-saccharide

<400> 1
 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr
 35

<210> 2
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<400> 2

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr
1 5 10 15

Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala
20 25

<210> 3

<211> 35

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un tri-saccharide

<400> 3

Thr Ile Pro Thr Thr Glu Thr Pro Pro Pro Pro Gln Thr Val Thr Leu

WO 02/50108 PCT/FR01/04100

1 5 10 15

Ser Pro Val Pro Pro Gln Thr Val Thr Val Ile Pro Ala Pro Pro Pro
 20 25 30

Glu Glu Gly
 35

<210> 4
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> {29}
 <223> liaison glycosidique à un mannose, un di-mannose
 ou un tri-mannose

<400> 4
 caacgttggg cc 12

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
 tcccaagctt ttggtagccg 20

<210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 6
 ctaggatcca ccattgccgga gccagcgcgc ccg 33

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 7
 gatccggggg ggaacgttgg ggggg 25

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 8
 gatccccccc caacgttccc ccccg 25

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 9
 agcgcctatga cgttocaagg gcco 24

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 10
 gggcccttgg aacgtcatag cgct 24

<210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)
 <223> liaison glycosidique à un mannose, un di-mannose
 ou un tri-mannose

<400> 11
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr
 20 25 30

Pro Gln Arg
 35

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
27 juin 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/050108 A3(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/35, 9/00, C07H 5/02, A61K 39/04(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc., CABINET ORLIS, 6
avenue de Messine, F-75008 PARIS (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/04100(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM,
HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(22) Date de dépôt international :
20 décembre 2001 (20.12.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/16808 21 décembre 2000 (21.12.2000) FR(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR); brevet OAPI (BF, BJ,
CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du
Docteur Roux, F-75724 PARIS (FR).(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-
CHAL, Gilles [FR/FR]; 4 rue Francisco Ferrer, F-94200
IVRY-SUR-SEINE (FR). ROMAIN, Félix [FR/FR];
49 bis rue Dreyfus, F-91640 FONTENAY-LES-BRIS
(FR). PESCHER, Pascale [FR/FR]; 124 rue Damrémont,
F-75018 PARIS (FR).(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 29 août 2002

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: IMMUNOGENIC GLYCOPEPTIDES, SCREENING, PREPARATION AND USES

(54) Titre : GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PRÉPARATION ET APPLICATIONS.

(57) Abstract: The invention concerns immunogenic glycopeptides derived from pathogenic micro-organisms, useful for vaccination and diagnosis of infections caused by said pathogenic micro-organisms (bacteria or fungi), and methods for selecting them and preparing them. Said glycopeptides are selected in the group consisting of: a) glycopeptides essentially consisting of a glycosylated T epitope, comprising 14 to 25 amino acids, among which at least a neutral amino acid is bound to a di- or to a trisaccharide (glycoside linkage) and at least 15 % among said amino acids are proline, one of the proline being located in position -1 to -4, relative to the position of said neutral amino acid, which glycopeptides are: exhibited by a class II MHC molecule, specifically identified by T CD4+ lymphocytes induced by immunisation with the native glycopeptide from which they are derived, but are not identified by the T CD4+ lymphocytes induced by immunisation with a non-glycosylated peptide of same sequence and capable of inducing a proliferation of said T CD4+ lymphocytes by which they are identified and the secretion of cytokines by said lymphocytes and b) glycopeptides having a sequence of 15 to 39 amino acids including the sequence of the glycopeptide as defined in a), excluding the glycopeptide of sequence SEQ ID NO:11.

(57) Abrégé : Glycopeptides immunogènes issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi que leurs procédés de sélection et de préparation. Lesdits glycopeptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par: a) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides sont: présentés par une molécule de classe II du CMII, reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et b) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.

WO 02/050108 A3

WO 02/050108 A3



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/04100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/35 C07K9/00 C07H5/02 A61K39/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C07H A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 29132 A (UNIV NEW YORK) 9 July 1998 (1998-07-09) example III	1-9, 20
X	DOBOS KAREN M ET AL: "DEFINITION OF THE FULL EXTENT OF GLYCOSYLATION OF THE 45-KILODALTON GLYCOPROTEIN OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 9, 1996, pages 2498-2506, XP002180487 ISSN: 0021-9193 cited in the application tables 2,7	1-9, 20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 April 2002		Date of mailing of the international search report 29/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5516 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2943, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/04100
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANZYK, HENRIKŃ ET AL.: "SYNTHESIS OF ALIPHATIC O-DIMANNOSYL AMINO ACID BUILDING BLOCKS FOR SOLID-PHASE ASSEMBLY OF GLYCOPEPTIDE LIBRARIES" J CHEM SOC PERKIN TRANS 1 (1995) (22) 2883-98, XPO02180489 cited in the application the whole document	11,12
A	ROMAIN FELIX ET AL: "DEGLYCOSYLATION OF THE 45/47-KILODALTON ANTIGEN COMPLEX OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DECREASES ITS CAPACITY TO ELICIT IN VIVO OR IN VITRO CELLULAR IMMUNE RESPONSES." INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 67, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 5567-5572, XPO02180488 ISSN: 0019-9567 cited in the application	
A	WO 98 16646 A (CORIXA CORP) 23 April 1998 (1998-04-23)	
A	WO 96 23885 A (MARCHAL GILLES ;PESCHER PASCALE (FR); ROMAIN FELIX (FR); LAQUEYRER) 8 August 1996 (1996-08-08)	

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 01/04100

Continuation of Box I.2

Claims nos.: 1-8, 11-12, 20-27

Claims 1-8 of the present application relate to a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can be found for only a very limited number of said claimed compounds. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention in the description is so limited that it is not possible to carry out any meaningful search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is those parts relating to compounds prepared in the examples and their close homologues. For Claims 11-12, 20-27, the search was limited to those parts concerning the same subject matter as Claims 9-10.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/FR 01/04100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9829132	A	09-07-1998	AU 5905198 A 31-07-1998			
			EP 0952849 A1 03-11-1999			
			WO 9829132 A1 09-07-1998			
WO 9816646	A	23-04-1998	US 6290969 B1 18-09-2001			
			AU 4814497 A 11-05-1998			
			BR 9712518 A 24-10-2000			
			CZ 9901265 A3 17-11-1999			
			EP 0932681 A2 04-08-1999			
			JP 2001501832 T 13-02-2001			
			NO 991694 A 10-06-1999			
			PL 332878 A1 25-10-1999			
			TR 9901571 T2 21-10-1999			
			WO 9816646 A2 23-04-1998			
			ZA 9708969 A 20-04-1998			
			US 6350456 B1 26-02-2002			
			US 2002009459 A1 24-01-2002			
			WO 9623885	A	08-08-1996	US 5714593 A 03-02-1998
						AU 700514 B2 07-01-1999
AU 4667596 A 21-08-1996						
CA 2210928 A1 08-08-1996						
EP 0807178 A1 19-11-1997						
WO 9623885 A1 08-08-1996						
JP 10513349 T 22-12-1998						
NZ 301290 A 23-12-1998						
US 6221353 B1 24-04-2001						
US 6335181 B1 01-01-2002						
US 5866130 A 02-02-1999						

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Requête internationale No PCT/FR 01/04100
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K14/35 C07K9/00 C07H5/02 A61K39/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K C07H A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 29132 A (UNIV NEW YORK) 9 juillet 1998 (1998-07-09) exemple III ---	1-9, 20
X	DOBOS KAREN M ET AL: "DEFINITION OF THE FULL EXTENT OF GLYCOSYLATION OF THE 45-KILODALTON GLYCOPROTEIN OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 9, 1996, pages 2498-2506, XP002180487 ISSN: 0021-9193 cité dans la demande tableaux 2,7 --- -/--	1-9, 20
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à celui de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 avril 2002	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29/04/2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Cervigni, S	

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième édition) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Requête internationale No PCT/FR 01/04100
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FRANZYK, HENRIK ET AL.: "SYNTHESIS OF ALIPHATIC O-DIMANNOSYL AMINO ACID BUILDING BLOCKS FOR SOLID-PHASE ASSEMBLY OF GLYCOPEPTIDE LIBRARIES" J CHEM SOC PERKIN TRANS 1 (1995) (22) 2883-98, XP002180489 cité dans la demande le document en entier	11, 12
A	ROMAIN FELIX ET AL: "DEGLYCOSYLATION OF THE 45/47-KILODALTON ANTIGEN COMPLEX OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DECREASES ITS CAPACITY TO ELICIT IN VIVO OR IN VITRO CELLULAR IMMUNE RESPONSES." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 67, no. 11, novembre 1999 (1999-11), pages 5567-5572, XP002180488 ISSN: 0019-9567 cité dans la demande	
A	WO 98 16646 A (CORIXA CORP) 23 avril 1998 (1998-04-23)	
A	WO 96 23885 A (MARCHAL GILLES ; PESCHER PASCALE (FR); ROMAIN FELIX (FR); LAQUEYRER) 8 août 1996 (1996-08-08)	

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 01 04100

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-8,11-12,20-27

Les revendications 1-8 présentes ont trait à une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux glycopeptides décrits dans les revendications 9-10, et étendue aux composés préparés dans les exemples et leurs homologues proches. Pour les revendications 11-12,20-27, la recherche a été limitée aux parties concernant le même objet que celui des revendications 9-10.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Brevets Internationaux No
PCT/FR 01/04100

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9829132	A	09-07-1998	AU 5905198 A	31-07-1998
			EP 0952849 A1	03-11-1999
			WO 9829132 A1	09-07-1998
WO 9816646	A	23-04-1998	US 6290969 B1	18-09-2001
			AU 4814497 A	11-05-1998
			BR 9712518 A	24-10-2000
			CZ 9901265 A3	17-11-1999
			EP 0932681 A2	04-08-1999
			JP 2001501832 T	13-02-2001
			NO 991694 A	10-06-1999
			PL 332878 A1	25-10-1999
			TR 9901571 T2	21-10-1999
			WO 9816646 A2	23-04-1998
			ZA 9708969 A	20-04-1998
			US 6350456 B1	26-02-2002
			US 2002009459 A1	24-01-2002
			WO 9623885	A
AU 700514 B2	07-01-1999			
AU 4667596 A	21-08-1996			
CA 2210928 A1	08-08-1996			
EP 0807178 A1	19-11-1997			
WO 9623885 A1	08-08-1996			
JP 10513349 T	22-12-1998			
NZ 301290 A	23-12-1998			
US 6221353 B1	24-04-2001			
US 6335181 B1	01-01-2002			
US 5866130 A	02-02-1999			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/569	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ロマイン, フェリックス

フランス、エフ - 9 1 6 4 0 フォンテネイ - レス - ブリース、ピス リュ ドレイファス 4 9

(72) 発明者 ベシャー, パスカル

フランス、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ ダムレumont 1 2 4

F ターム(参考) 2G045 AA28 AA35 AA40 BA11 BB50 CB21 DA13 DA36 FB02

4C085 AA03 BA09 BB12 DD86

4H045 AA10 AA20 AA30 BA17 BA18 BA19 BA53 CA11 DA75 DA86

EA29 EA52 FA33 GA10 GA23 GA25

专利名称(译)	免疫原性糖肽，筛选，生产和使用		
公开(公告)号	JP2004520317A	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2002552001	申请日	2001-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	仪器蒂蒂巴斯德		
[标]发明人	マーチャル,ジル ロメイン,フェリックス ペシャー,パスカル		
发明人	マーチャル,ジル ロメイン,フェリックス ペシャー,パスカル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/10 A61P37/04 C07K9/00 C07K14/35 C07K16/12 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/10 A61P37/04 C07K9/00 C07K14/35		
FI分类号	C07K14/35.ZNA A61K39/00.H A61K39/04 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/10 C07K16/12 G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/569.B		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/CB21 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/BB12 4C085/DD86 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA53 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA33 4H045/GA10 4H045/GA23 4H045/GA25		
优先权	2000016808 2000-12-21 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及来源于病原微生物的免疫原性糖肽，其选择方法和制备方法，其用于疫苗接种和诊断由病原微生物（细菌或真菌）引起的感染。糖肽是a1）基本上由糖基化的T表位组成的糖肽，该表位由14-25个氨基酸组成，其中至少一个中性氨基酸与二糖或三糖（糖苷键）相连，且至少15%的氨基酸是脯氨酸，其中一个相对于中性氨基酸的位置位于-1至-4位置，显示在II类MHC分子中，并且是CD4+，通过用其衍生的天然糖肽免疫来诱导。通过T淋巴细胞而不是通过用具有相同序列的非糖基化肽免疫诱导的CD4+ T淋巴细胞特异性识别的CD4+ T淋巴细胞一种能够诱导淋巴细胞增殖和分泌细胞因子的糖肽，以及b1）a1）中定义的糖肽序列，不包括序列SEQ ID NO：11的糖肽选自具有39个氨基酸序列的糖肽。

