

(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2008-509886

(P2008-509886A)

(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

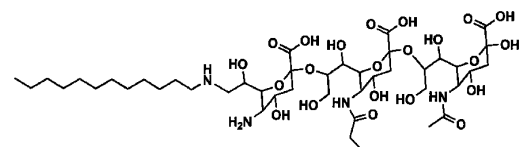
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/702 (2006.01)	A 6 1 K 31/702	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-518334 (P2007-518334)	(71) 出願人	505307563
(86) (22) 出願日	平成17年6月23日 (2005. 6. 23)		チルドレンズ ホスピタル アンド リサ
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月22日 (2006. 12. 22)		ーチ センター アット オークランド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/022590		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オー
(87) 国際公開番号	W02006/002402		克蘭ド 52エヌディー ストリート
(87) 国際公開日	平成18年1月5日 (2006. 1. 5)		7 4 7
(31) 優先権主張番号	60/582, 672	(74) 代理人	100137512
(32) 優先日	平成16年6月23日 (2004. 6. 23)		弁理士 奥原 康司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	モー グレゴリー アール
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アラ
			メダ ステューベン ウェイ 42
		(72) 発明者	グラノフ ダン エム
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パー
			クレー クレストン ロード 1085
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 多糖誘導体および免疫応答の誘導における用途

(57) 【要約】

本発明は一般的に、多糖誘導体を含有する組成物、それらの製造方法、及び、髄膜炎菌、特にグループB (NmB) 株及び大腸菌K1によって生じる疾患の予防又は治療のための使用方法を提供する。本発明は、PSの1又はそれ以上の残基が脱-N-アセチル化によって修飾された脱-N-アセチル化PS誘導体を提供する。また本発明は、脱-N-アセチル化PSを含むPSのN-アセチル基の1又はそれ以上が他のN-アシル基、通常はC₂-C₃の低級アシル基で置換された誘導体も含む。さらに本発明は、長鎖炭化水素を有する脱-N-アセチル化PS誘導体、並びに脱-N-アセチル化PS誘導体がキャリア、例えばキャリアタンパク質に結合したコンジュゲートを含む。



Exact Mass: 1000.5

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アジュバント及び多糖（P S）誘導体とを含む組成物であって、当該 P S 誘導体が、シアル酸又はシアル酸誘導体の第一及び第二の残基の少なくとも 1 つのダイマーを含み、

前記第一の残基が N-アセチル化であり第二の残基が遊離のアミン基を含む、

前記第一の残基が遊離のアミン基を含み第二の残基が N-アセチル化である、

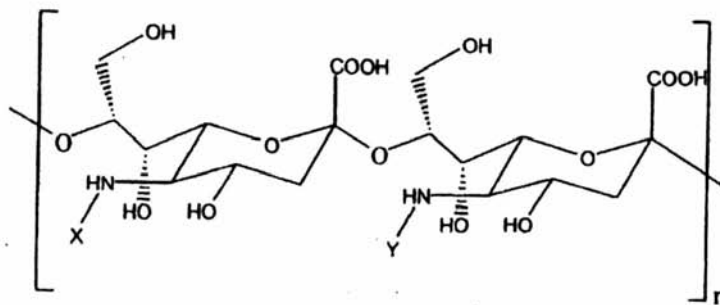
又は、

前記第一及び第二の残基が遊離のアミン基を含む組成物。

【請求項 2】

式：

【化 1】



（式中、X 及び Y は独立して H 又はアセチル基であり、
n は少なくとも 1 である）

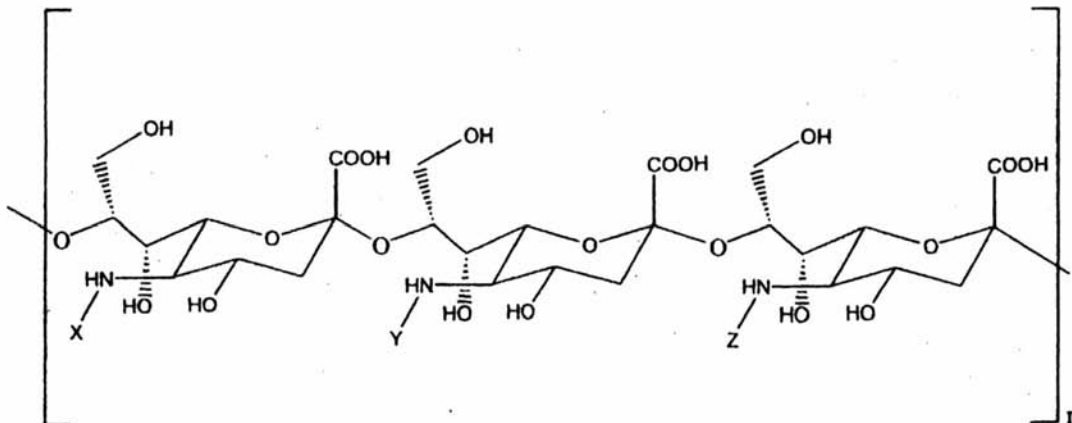
で表される構造を含む多糖（P S）誘導体含有し、

P S 誘導体が担体タンパク質にコンジュゲートしているか、又は P S 誘導体の非還元末端にアルキル第 2 級アミンを有するシアル酸残基を更に含む組成物。

【請求項 3】

式：

【化 2】



（式中、X、Y 及び Z の少なくとも 1 つは H であり、X、Y 及び Z の少なくとも 1 つは飽和アシル基であるという条件で、X、Y 及び Z は独立して H 又は飽和アシル基であり、
n は少なくとも 1 である）

で表される構造を含む多糖（P S）誘導体含有し、

P S 誘導体は任意に担体タンパク質にコンジュゲートしているか、又は P S 誘導体の非還元末端にアルキル第 2 級アミンを有するシアル酸残基を更に含む組成物。

【請求項 4】

X、Y 及び Z のうち 2 つがアシル基であり、それらのアシル基が異なるアシル基である請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

X、Y及びZの少なくとも1つがアセチル基であり、X、Y及びZの少なくとも1つがプロピオニル基である請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

XがHである場合、Y及びZは異なるアシル基であり；Xがアシル基である場合、Y及びZは異なる成分であって、H又はアシル基のいずれかであり；Xがアシル基である場合、Y及びZは異なる成分であって、H又はアシル基のいずれかである請求項3に記載の組成物。

【請求項7】

X、Y及びZがアセチル及びプロピオニルから選択される異なるアシル基である場合；

Xがアセチル基のとき、Y及びZは異なる成分であって、H又はプロピオニル基のいずれかであり、

Xがプロピオニル基のとき、Y及びZは異なる成分であって、H又はアシル基のいずれかである請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

P S誘導体が、P S誘導体の非還元末端にアルキル第2級アミンを持つアミド化シアル酸残基を含む請求項3に記載の組成物。

【請求項9】

P S誘導体が、担体タンパク質にコンジュゲートしている請求項3に記載の組成物。

【請求項10】

P S誘導体が、ラクトン成分又は環状第2級アミンを持つシアル酸残基を含む請求項1から3の何れか一項に記載の組成物。

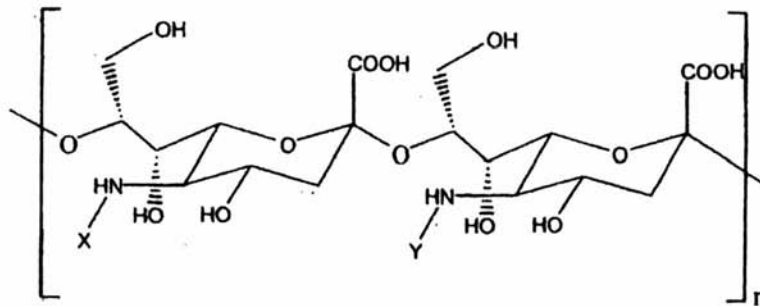
【請求項11】

P S誘導体が、ヘテロポリマー化合物である請求項1から3の何れか一項に記載の組成物。

【請求項12】

式：

【化3】



(式中、X及びYは独立してアミン保護基、又は飽和あるいは不飽和のアシル基であり、nは少なくとも1である)

で表される構造を含む多糖(P S)誘導体を含有し、

P S誘導体が任意にP S誘導体のシアル酸残基にコンジュゲートした担体タンパク質を更に含むか、又は任意にP S誘導体の非還元末端にアルキル第2級アミンを持つシアル酸残基を更に含む組成物。

【請求項13】

アシル基が飽和アシル基及びアセチル基である請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

多糖(P S)誘導体が、式：

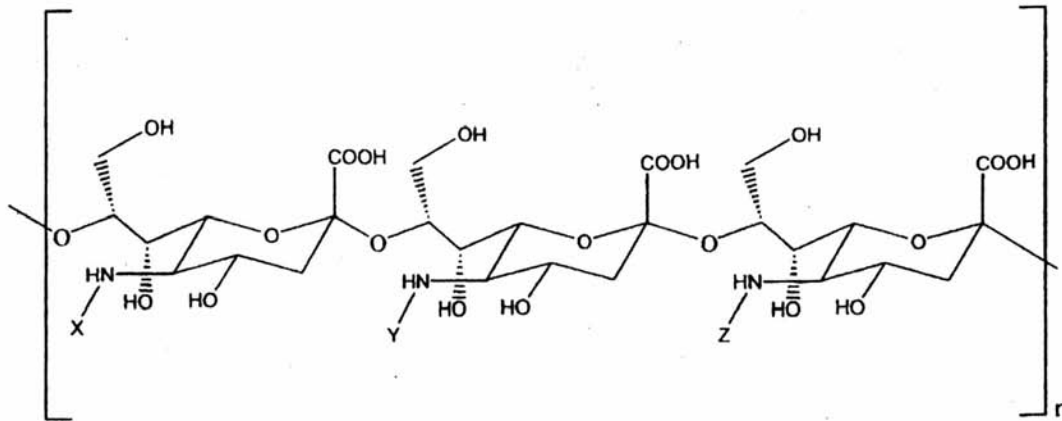
10

20

30

40

【化 4】



10

(式中、X、Y及びZの少なくとも1つはアミン保護基であり、X、Y及びZの少なくとも1つは飽和又は付飽和のアシル基であるという条件で、X、Y及びZは独立してアミン保護基であり、

nは少なくとも1である)

で表される構造を含む請求項12に記載の組成物。

【請求項15】

アシル基が飽和アシル基及びアセチルあるいはプロピオニル基である請求項14に記載の組成物。

20

【請求項16】

対象を免疫化する方法であって、

請求項1から11のいずれか一項に記載のPS誘導体の、免疫反応を誘発するのに有効な量を患者に投与することを含み、

前記投与が、B群髄膜炎菌に対する免疫反応を誘発するのに有効である方法。

【請求項17】

対象を免疫化する方法であって、

請求項1から11のいずれか一項に記載のPS誘導体の、免疫反応を誘発するのに有効な量を患者に投与することを含み、

前記投与が、大腸菌K1に対する免疫反応を誘発するのに有効である方法。

30

【請求項18】

細菌感染に対する消極防護を提供する方法であって、当該方法が、

請求項1から11のいずれか一項に記載の脱-N-アセチル化PS誘導体で宿主を免疫化することにより誘発された殺菌抗体を患者に投与することを含み、

前記投与が、B群髄膜炎菌又は大腸菌K1に対する患者の保護を提供する方法。

【請求項19】

多糖(PS)誘導体の製造方法であって、当該方法が、

少なくとも部分的に脱-N-アセチル化されたPS分子を、アミン保護試薬及びアシル化試薬と、有機溶媒の存在下で反応させることを含み、

前記反応が、アミン保護基及びN-アシル化基を持つ保護されたPS誘導体を生成する方法。

40

【請求項20】

請求項19に記載の方法によって製造された保護された多糖(PS)誘導体。

【請求項21】

保護されたPS誘導体をアミン保護基を除去する条件下で処理することを更に含み、PS誘導体が生成される請求項19に記載の方法。

【請求項22】

当該方法が、

保護されたPS誘導体を担体タンパク質にコンジュゲートさせてコンジュゲートした保

50

護 P S 誘導体を生成させ、

コンジュゲートした保護 P S 誘導体をアミン保護基を除去する条件下で処理することを更に含み、

コンジュゲートした P S 誘導体が生成される請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

当該方法が、

保護された P S 誘導体を N-アシルアミンと反応させて、アルキル第 2 級アミンを有するアミド化シアル酸残基を持つ保護 P S 誘導体を生成させ、

アミド化した保護 P S 誘導体をアミン保護基を除去する条件下で処理することを更に含み、

アルキル第 2 級アミンを有するアミド化したシアル酸残基を持つ P S 誘導体が生成される請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

多糖 (P S) 誘導体を製造する方法であって、当該方法が、

B 群髄膜炎菌細菌を、N-アシル-マンノサミン及びアミン-保護マンノサミンを含有する増殖培地中で培養することを含み、マンノースを追加しないと細菌は莢膜多糖を十分に生産せず、

前記増殖培地が、アミン保護基及び N-アシル化基を持つ保護された P S 誘導体の生産を提供する方法。

【請求項 25】

当該方法が、

保護された P S 誘導体を担体タンパク質にコンジュゲートさせてコンジュゲートした保護 P S 誘導体を生成させ、

コンジュゲートした保護 P S 誘導体をアミン保護基を除去する条件下で処理することを更に含み、

コンジュゲートした P S 誘導体が生成される請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

当該方法が、

保護された P S 誘導体を N-アシルアミンと反応させて、アルキル第 2 級アミンを有するアミド化シアル酸残基を持つ保護 P S 誘導体を生成させ、

アミド化した保護 P S 誘導体をアミン保護基を除去する条件下で処理することを更に含み、

アルキル第 2 級アミンを有するアミド化したシアル酸残基を持つ P S 誘導体が生成される請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

抗体が結合したポリシアル酸 (P S A) エピトープを同定する方法であって、

P S A 誘導体を抗体と接触させること、前記接触は抗体と P S 誘導体との抗原-抗体複合体の形成に適した条件下であり、

抗原-抗体複合体を、抗原-抗体複合体のシアリダーゼが接近しうる P S A 誘導体残基の除去に適した条件下でシアリダーゼと接触させることを含み、

シアリダーゼ処理の後に抗原-抗体複合体に残存する P S A 誘導体残基が抗体の結合したエピトープを特定する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2004 年 1 月 23 日に提出された米国特許仮出願第 60/582,672 号の優先権の利益を主張するものであり、その全開示内容は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0002】

10

20

30

40

50

連邦委託研究に関する説明

本発明は、米国国立アレルギー感染症研究所および米国国立衛生研究所により授与された助成金 A I 4 6 4 6 4 号および A I 4 5 6 4 2 号に基づく政府支援によってなされた。本発明において、政府は一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、多糖誘導体、当該物質を含有する組成物、およびそれらの使用方法に関する。

【0004】

発明の背景

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) はグラム陰性菌であり、細菌性髄膜炎および敗血症を引き起こす主要なヒト病原菌である。罹患率は2歳未満の幼児において最も高い。疾患を引き起こす分離株の大部分を、主要な5種類の莢膜群が占めている。これらはA、B、C、Y、およびW-135と呼ばれる異なる多糖類莢膜によって定義される。A、C、Y、およびW-135群の細菌によって引き起こされる疾患の予防にはワクチンが有効である。しかしながら、B群の菌株（以後「NmB」と呼ぶ）によって引き起こされる疾患の予防に有効なワクチンはなく、米国および欧州では小児の髄膜炎菌性疾患の全症例の50パーセント以上を占める (Jones, D., in “Meningococcal Disease,” John Wiley & Sons, New York, 1995)。

【0005】

B群髄膜炎菌莢膜多糖体（本明細書ではNmB莢膜多糖体または「NmB P S」と呼ぶ）は、 α (2 $\rightarrow$ 8) N-アセチルノイラミン酸のホモ線状ポリマー（ポリシアル酸；以後「P S A」と呼ぶ）からなる。この莢膜P Sは、全NmB菌株にわたって保存されており、また、病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) K1にも見いだされる。NmB P Sは、脳・心臓・腎臓などの胎生組織によって豊富に発現されるポリシアル酸と化学的に同一のものである。

【0006】

B群莢膜は、重要な毒性決定因子である。例えば、莢膜の発現が不足した突然変異体は血清感受性を有し、非病原性である (Stephens 1991, *Infect Immun* 59:4097)。また、B群多糖体に対する血清抗体が、補体媒介性の溶菌作用および／またはオプソニン作用を活性化することにより、疾患に対する防御となることを示す証拠もある (Griffiss, J. M., in “Meningococcal Disease,” John Wiley & Sons, New York, 1995)。

【0007】

しかしながら、NmB莢膜多糖体をワクチン成分として用いるための取り組みは、担体タンパク質にコンジュゲートされた場合でも (Devi et al., 1997, *Infect Immun* 65:1045; Jennings et al., 1981, *J Immunol* 127:1011)、その不十分な免疫原性によって阻まれてきた (Wyle et al., 1972, *J. Infect. Dis.* 126: 514-522; Zollinger, et al., 1979, *J. Clin. Invest.* 63: 836-834)。不十分な免疫原性の原因は、神経細胞接着分子（「NCAM」）のような、種々の宿主組織で発現する交差反応性ポリシアル化糖タンパク質への胎児暴露によって誘発される免疫学的寛容にあると考えられている (Finne et al. 1983, *Biochem Biophys Res Commun* 112:482; Hayrinen et al. 1995, *J Infect Dis* 171: 1481)。抗NmB P Sモノクローナル抗体 (mAb) が、マウスをB群の死菌で免疫化することにより (Mandrell et al. 1982 *J Immunol* 129:2172; Moreno et al. 1983 *J Gen Microbiol* 129 (Pt 8):2451; Shin et al. 2001 *Infect Immun* 69:3335)、またはNZBマウスを単純な多糖体や細菌で免疫化することにより (Frosch et al. 1985 *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1194; Hurpin et al. 1992 *Hybridoma* 11 :677)、作製されている。また、ヒトNmB P S反応性IgM mAbまたはパラプロテインについての報告もされている (Raff et al. 1988 *J Infect Dis* 157:118; Rohr et al. 1980 *J Biol Chem* 255:2332; Azmi et al. 1994 *Infect Immun* 62:1776; Mandrell et al. 1995 *J Infect Dis* 172:1279)。これらのmAbまたはパラプロテインは、補体媒介性の殺菌作用を誘発

10

20

30

40

50

させる。従って、抗原としての多糖体に基づいたワクチンの開発は、免疫原性の増強に関して、当分野において特に重視されてきた。

【0008】

1980年代にJenningsおよび共同研究者は、NmB PSの種々の誘導体の免疫原性について研究した(Jennings et al., 1981, supra; Jennings 1985 J Immunol 134:2651; Ashton et al. 1989 Microb Pathog 6:455; Pon et al. 1997 J Exp Med 185:1929)。NmB PSのN-アセチル基を疎水性の大きいさまざまなアシル基、具体的にはプロピオニル(N-Pr)で置換した多糖体を含有するコンジュゲートワクチンは、免疫原性および誘発性の防御殺菌抗体であった。得られた修飾多糖体は、担体タンパク質にコンジュゲートされており(Jennings et al. 1986, J Immunol 137:1708, 1986; Jennings et al. 1987, J Exp Med 165:1207; Jennings et al., 1981, supra; Jennings et al. 1985 supra; Ashton et al. 1989, supra; Pon et al. 1997, supra; U.S. Pat. No. 4,727,136)、実験動物において免疫原性を有し、in vitroで補体媒介性溶菌を活性化するIgG抗体を誘発させ、NmBに感染した実験動物において消極防御となることが分かった。このワクチンは、類人猿において免疫原性を有し、補体媒介性溶菌を活性化する血清抗体を誘導した(Fusco et al., 1997, J Infect. Dis. 175: 364-372)。ヒトにおいては、殺菌抗体は髄膜炎菌性疾患の発症に対する防御となることが分かっている(Goldschneider et al., 1969, J Exp. Med. 129:1307)。

【0009】

しかしながら、現行の利用可能なワクチンによって誘導される抗体のサブセットは、未修飾NmB PS(すなわちN-アセチル-NmB PS)に対し抗宿主自己抗体活性を有する(Hayrinen et al. 1995 J Infect Dis 171 :1481; Granoff et al., 1998, J. Immunol; 160: 5028- 5036)。PSAは胎生および新生児の組織において、とりわけ脳組織で見られるNCAMで豊富に発現するため、このアプローチには深刻な安全上の懸念が生じる。注目すべきことに、NmB PSのN-Prおよび他の誘導体によって誘発される殺菌抗体のサブセットは細菌に特異的に結合するが、宿主組織には結合せず、また、NmB PSアフィニティマトリックスによって吸収されなかった(Jennings et al. 1989 J Immunol 142:3585; Pon et al. 1997, supra)。Granoffらは、破傷風トキシノイドとコンジュゲートしたN-Pr NmB PSでマウスを免疫化し、モノクローナル抗N-Pr NmB PS抗体(mAb)のパネルを作製した(Granoff et al. 1998 J Immunol 160:5028)。多数のmAbがin vitroで補体媒介性殺菌活性を誘発させ、幼齢のラットモデルにおいて菌血症に対する消極防御となった。防御mAbは、ELISA法における天然NmB PSとの交差反応性の有無、ならびにN-Pr-MBオリゴ糖(平均重合度[DP]=3.8)の抗N-Pr-NmB PS結合抑制能に基づき、4つの異なる微細抗原特異性グループに亜分類された。4つの微細抗原特異性グループのそれぞれを代表するmAbは、長鎖のポリシアル酸を発現するヒト細胞系CHP-134を用いたフローサイトメトリー試験(Granoff et al. 1998, supra)、およびヒト胎生組織を用いた免疫組織学によって、宿主ポリシアル酸に極微ないし検出不能の自己反応性を示した。mAbは、生きた被包性のB群髄膜炎菌の表面に結合したが、莢膜欠損変異体には結合しなかった。これらの抗N-Pr NmB PS mAbによって認識される細菌のエピトープは同定されなかった。

【0010】

本発明は、免疫応答、具体的には、B群髄膜炎菌の菌株に対する防御的免疫応答を誘発させると同時に、宿主組織に対する検出可能もしくは有意な自己抗体を誘発させないワクチン組成物および方法を提供することにより、ワクチン接種への従来技術のアプローチの欠点を克服するものである。

文献

【0011】

PCT第WO99/10372号公報(anti-N-Pr NmB PS mAbs、1997年8月27日に出願された米国特許仮出願第60/058,001号の優先権を主張)；米国特許第6

， 0 4 8 ， 5 2 7 号 (anti-NmB antibodies) ； 米国特許第 6 ， 3 5 0 ， 4 4 9 号 (anti-NmB antibodies) 。

【 0 0 1 2 】

米国特許第 6 ， 0 3 0 ， 6 1 9 号 (Granoff and Moe (mimetics))

【 0 0 1 3 】

米国特許第 4 ， 7 2 7 ， 1 3 6 号 (Jennings (N-Pr NmB PS vaccine))

【 0 0 1 4 】

米国特許第 6 ， 6 3 8 ， 5 1 3 号 ；

【 0 0 1 5 】

Fusco et al. “Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates, ” (1997) J. Infect. Dis. 175:364-72. 10

【 0 0 1 6 】

発明の概要

本発明は一般的に、多糖誘導体を含む組成物、ならびにそれらの作製、および髄膜炎菌、具体的には B 群 (NmB) 菌株と大腸菌 K 1 に起因する疾患の予防・治療のための使用の方法を提供する。本発明は、P S の 1 つまたはそれ以上の残基が脱 N-アセチル化によって修飾された脱 N-アセチル化 P S 誘導体を提供する。本発明はまた、脱 N-アセチル化 P S を含む P S の 1 つまたはそれ以上の N-アセチル基が他の N-アシル基、通常は C₂-C₃ の低級アシル基で置換された誘導体を含む。さらに本発明は、長鎖炭化水素を含む脱 N-アセチル化 P S 誘導体、ならびに脱 N-アセチル化 P S 誘導体が担体タンパク質等の担体に連結されたコンジュゲートを含む。 20

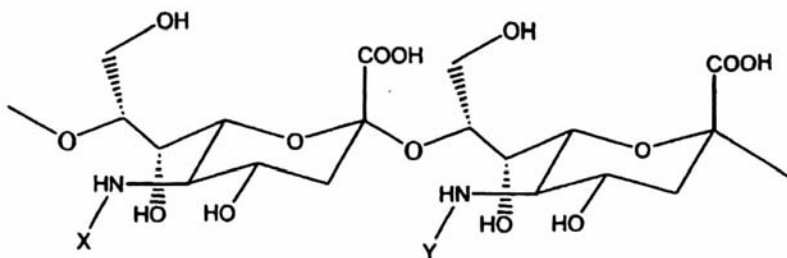
【 0 0 1 7 】

従って、一態様において、本発明はアジュバントおよび多糖 (P S) 誘導体を含む組成物を特徴とし、P S 誘導体はシアル酸またはシアル酸誘導体の第一および第二の残基の少なくとも 1 個のダイマーを有し、ただし第一の残基が N-アセチル化されて第二の残基が遊離アミン基を含むか、第一の残基が遊離アミン基を含み第二の残基が N-アセチル化されているか、または第一および第二の残基が遊離アミン基を含む。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態では、本発明は、次式により表される構造を有する P S 誘導体を含む組成物を特徴とする： 30

【 化 1 】

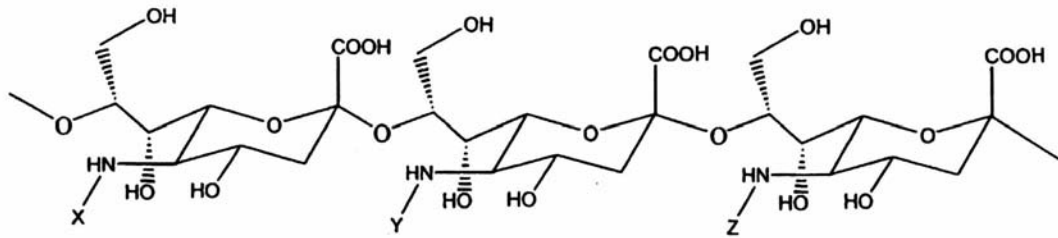


式中、X および Y は独立して H または N-アセチル基であり、P S 誘導体は担体タンパク質にコンジュゲートされているか、またはさらに P S 誘導体の非還元末端にアルキル二級アミンを有するシアル酸残基を含む。本実施形態で P S 誘導体は、一般的にポリマー内に位置する上記構造を 1 つまたはそれ以上有する。 40

【 0 0 1 9 】

別の実施形態では、本発明は、次式により表される構造を有する P S 誘導体を含む組成物を特徴とする：

【化 2】



式中、X、Y、およびZのうちの少なくとも1つがHで、X、Y、およびZのうちの少なくとも1つが飽和アシル基であるという条件で、X、Y、およびZは独立してHまたは飽和アシル基であり、P S誘導体は任意に担体タンパク質にコンジュゲートされているか、またはさらにP S誘導体の非還元末端にアルキル二級アミンを有するシアル酸残基を含む。本実施形態でP S誘導体は、一般的にポリマー内に位置する上記構造を1つまたはそれ以上有する。

【0020】

関連する実施形態では、前記組成構造はX、Y、およびZのうちの2つがアシル基である場合、そのアシル基は異なるアシル基である。さらに関連する実施形態では、前記組成構造はX、Y、およびZのうちの少なくとも1つがアセチル基で、X、Y、およびZのうちの少なくとも1つがプロピオニル基である。またさらに関連する実施形態では、前記組成構造は、XがHである場合、YおよびZは異なるアシル基である；Xがアシル基である場合、YおよびZは異なる部分でありHまたはアシル基である；さらにXがアシル基である場合、YおよびZは異なる部分でありHまたはアシル基である。またさらに関連する実施形態では、前記組成構造は、XがHである場合、YおよびZはアセチルおよびプロピオニルから選択された異なるアシル基である；Xがアセチル基である場合、YおよびZは異なる部分でありHまたはプロピオニル基である；さらにXがプロピオニル基である場合、YおよびZは異なる部分でありHまたはアセチル基である。

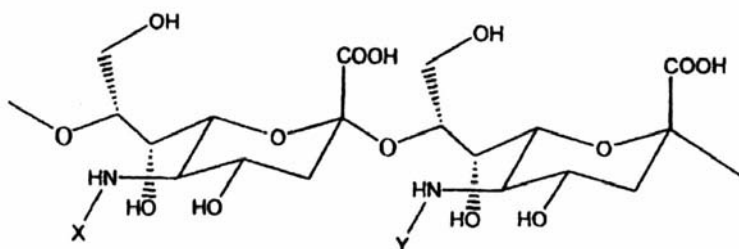
【0021】

またさらに関連する実施形態では、P S誘導体は、P S誘導体の非還元末端で生成されたアルキル二級アミンを有するアミド化されたシアル酸残基を含む。またさらに関連する実施形態では、P S誘導体は担体タンパク質にコンジュゲートされている。別の関連する実施形態では、P S誘導体は、ラクトン部分または環状二級アミンを有するシアル酸残基誘導体を含む。別の実施形態では、P S誘導体はヘテロポリマー化合物である。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、次式により表される構造を有するP S誘導体を含有する組成物を特徴とする：

【化 3】

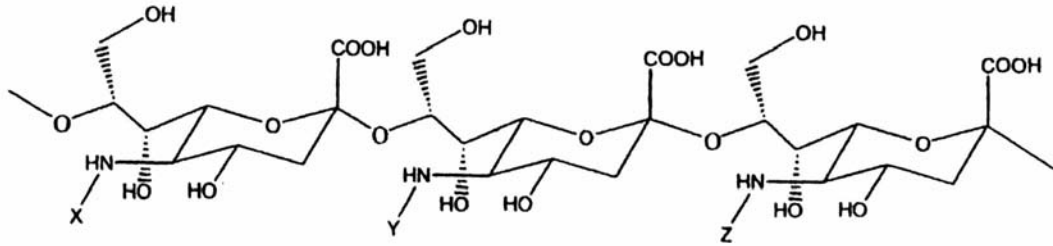


式中、XおよびYは独立してアミン保護基、または飽和もしくは不飽和のアシル基であり、P S誘導体は、任意にさらにP S誘導体のシアル酸残基にコンジュゲートされた担体タンパク質を含むか、または任意にさらにP S誘導体の非還元末端にアルキル二級アミンを有するアミド化されたシアル酸残基を含む。P S誘導体は、一般的にポリマー内に位置する上記構造を1つまたはそれ以上有する。関連する実施形態では、アシル基は飽和アシル基およびアセチルまたはプロピオニルである。

【0023】

関連する実施形態では、P S誘導体は次式により表される構造を有する：

【化4】



10

ただし、X、Y、およびZのうちの少なくとも1つがアミン保護基で、X、Y、およびZのうちの少なくとも1つが飽和または不飽和のアシル基であるという条件で、X、Y、およびZは独立してアミン保護基である。本実施形態でP S誘導体は、一般的にポリマー内に位置する上記構造を1つまたはそれ以上有する。関連する実施形態では、アシル基は飽和アシル基およびアセチルまたはプロピオニルである。

【0024】

別の実施形態では、本発明は、免疫応答を誘発するのに有効な量で本発明のP S誘導体の量を投与することにより対象を免疫化する方法を特徴とし、かかる投与は対象においてB群髄膜炎菌に対する免疫応答を誘発するのに有効である。別の実施形態では、本発明は、免疫応答を誘発するのに有効な量で本発明のP S誘導体の量を投与することにより対象を免疫化する方法を特徴とし、かかる投与は対象において大腸菌K 1に対する免疫応答を誘発するのに有効である。

20

【0025】

別の実施形態では、本発明は、本発明のP S誘導体を用いた宿主の免疫化によって誘発された殺菌抗体を対象に投与することにより細菌感染症に対する消極防護を提供する方法を特徴とし、かかる投与はB群髄膜炎菌または大腸菌K 1に対する対象の防御を提供する。

【0026】

本発明はまた、有機溶媒の存在下で、少なくとも部分的に脱N-アセチル化されたP S分子を、アミン保護試薬およびアシル化試薬を含む混合物と反応させることを包含するP S誘導体を生成する方法を特徴とし、反応はアミン保護基およびN-アシル化基を有する保護P S誘導体を生成する。関連する実施形態では、方法はさらに、P S誘導体を生成するためにアミン保護基を除去する条件下で保護P S誘導体を処理することを包含する。さらに関連する実施形態では、方法はさらに、コンジュゲートした保護P S誘導体を生成するために保護P S誘導体を担体タンパク質にコンジュゲートさせること、ならびにアミン保護基を除去する条件下でコンジュゲートした保護P S誘導体を処理し、その結果、コンジュゲートしたP S誘導体が生成されることを包含する。別の関連する実施形態では、方法はさらに、アルキル二級アミンを有しアミド化したシアル酸残基を有するアミド化した保護P S誘導体を生成するために、保護P S誘導体をN-アシルアミン試薬と反応させること、ならびにアミン保護基を除去する条件下でアミド化した保護P S誘導体を処理し、その結果、アルキル二級アミンを有しアミド化したシアル酸残基を有するP S誘導体が生成されることを包含する。本発明はまた、これらの方法によって生成されるP S誘導体にも係る。

30

40

【0027】

本発明はまた、N-アシルマンノサミンおよびアミン保護マンノサミンを含有する増殖培地でB群髄膜炎菌を培養し、その結果、培養がアミン保護基およびN-アシル化基を有する保護P S誘導体の産生を提供することにより、多糖(P S)誘導体を生成する方法を特徴とする。関連する実施形態では、細菌は、添加マンノサミンの非存在下で莢膜多糖体の産生が不足する。関連する実施形態では、方法はさらに、コンジュゲートした保護P S

50

誘導体を生成するために保護 P S 誘導体を担体タンパク質にコンジュゲートさせること、ならびにコンジュゲートした P S 誘導体を生成するためにアミン保護基を除去する条件下でコンジュゲートした保護 P S 誘導体を処理することを包含する。関連する実施形態では、方法はさらに、保護 P S 誘導体のシアル酸残基上にアルキル二級アミンを提供するために、保護 P S 誘導体を N-アシルアミン試薬と反応させること、ならびにアミン保護基を除去する条件下で保護 P S 誘導体を処理し、アルキル二級アミンを含むシアル酸残基を有する P S 誘導体が生成されることを包含する。本発明はまた、これらの方法によって生成される P S 誘導体にも係る。

【0028】

本発明はさらに、P S A 誘導体を抗体に接触させることによって、抗体により結合されたポリシアル酸 (P S A) エピトープを同定する方法を特徴とし、前記接触が抗体と P S 誘導体との抗原-抗体複合体の形成に適している条件下にあり、前記抗原-抗体複合体とシアリダーゼとの接触が、抗原-抗体複合体中のシアリダーゼ接触可能な P S A 誘導体残基の除去に適している条件下にあり、シアリダーゼ処理の後に抗原-抗体複合体中に残存する P S A 誘導体残基が、抗体により結合されたエピトープを特定することを特徴とする。

【0029】

本発明は、本発明の N m B P S 誘導体が対象に免疫応答を誘発させるために用いられ、正常な宿主組織のポリシアル残基との検出可能な交差反応がほとんどもしくは全くなく、特異的に N m B 細菌に結合する血清殺菌抗体を含むことができるということにおいて有利である。

【0030】

本発明の他の利点は、本明細書の開示を読めば、当業者に容易に明らかとなるであろう。

【0031】

本発明、および本発明の特定の例示的な実施形態を記載する前に、本発明が、記載される特定の実施形態に制限されず、もちろんそれ自体変化し得ると理解されるべきである。また、本発明の範囲は添付された請求項によってのみ制限されるため、本明細書で使用される専門用語は具体的な実施形態を記載するのみの目的のためであって、限定的であることを意図していないと理解されるべきである。

【0032】

数値の範囲が提供される場合には、各々の中間にある数値が、文脈が他に明確に指定しない限りは下限値の単位の少数第 1 位までであり、範囲の上限値、下限値および規定された範囲内で他に規定もしくは中間にある数値との間にあることが、本発明に包含されることが理解される。これらのより狭い範囲の上・下限値は、規定された範囲内で任意に特に除外される限度値を条件として、独立して、本発明に同様に包含されるより狭い範囲内に含まれてもよい。また、規定された範囲が限度値の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限度値の一方または両方を除外する範囲も本発明に含まれる。

【0033】

他に定義されない限り、本明細書中で用いられるすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されたものと類似または同等のいかなる方法および材料も本発明の実施または試験において用いられることができるが、好ましい方法および材料が以下に記載される。本明細書で言及されたすべての刊行物は、参考として本明細書中に組み込まれ、刊行物が引用されたことに関連して方法および／または材料を開示および記載される。

【0034】

本明細書、および添付された請求項で使用されているように、単数形 “a”、“an”、および “the” は、その文脈が他に明確に指定しない限り、複数の指示対象を含むことに注意する必要がある。それ故、例えば “an antigen” への言及は複数個の当該抗原を含んでおり、また、“the peptide” への言及は 1 個またはそれ以上のペプチドへの言及を含

んでおり、その他これらと同等のことは当業者には周知である。

【0035】

本明細書において説明される刊行物は本出願の提出日に先立って単独でその開示を提供される。本明細書における何物も、かかる刊行物が先願発明であるという理由で、本発明が先行する権利がないことを承認すると解釈されない。さらに、提供された刊行日付は個別に確認される必要のある実際の刊行日付と異なる場合がある。

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、NmBが莢膜多糖体（PS）中に脱N－アセチル残基を含むこと、および脱N－アセチル残基（約25%またはそれ以上）を含むNmB PSベースのワクチンがNmBに起因する疾患に対して防護的な抗体を誘発させ得るが、ヒト組織により発現する自己のポリシアル酸（PSA）抗原と交差反応をしない、または最小限の交差反応性であることを発見したことに基づく。具体的には、本発明者は、当該ワクチンの最小エピトープがPS二糖類であり、片方または両方の残基が脱N－アセチル残基を含むことを発見している。

【0037】

当該抗NmB PS抗体の最小エピトープは当該NmB PS誘導体の二糖単位であって、二糖単位が1個またはそれ以上の残基を含み、C－5アミノ基上のN－アセチル基が除去されているか、または2個の残基のうち1個が脱N－アセチル化されており、2番目の残基がN－アセチル基を含む（しかし、いくつかの実施形態では、N－プロピオニル基ではない）。この最小エピトープを規定する二糖単位は、還元末端、非還元末端、または多糖体内部にあってもよい。脱N－アセチル化残基はN－アシル化残基を含むPSAとの関連で免疫原性であり、抗体を誘発させるが、その抗体はNmB莢膜と反応し、ヒトPSA抗原とは最小限に反応するか、または検出可能な反応をしない。このアプローチはNmBに起因する疾患を予防するための安全かつ有効な方法を提供する。さらに、大腸菌K1の莢膜PSはNmBのそれと化学的および免疫学的に全く一致しているため、本発明はまた、大腸菌K1による疾患の予防に使用するPS誘導体の産生に適用できる。

【0038】

脱N－アセチル化NmB多糖体エピトープは、Granoff et al., 1998, J Immunol 160: 5028 (anti-N-Pr NmB PS mAbs (抗N－Pr NmB PS mAb)) ; US 6,048,527 (anti-NmB antibodies (抗NmB抗体)) ; and US 6,350,449 (anti-NmB antibodies (抗NmB抗体)) に記載されている、マウス抗N－Pr NmB多糖体mAb（モノクローナル抗体）パネルを用いて同定された。これらのmAb（以後「SEAM」mAbと呼ぶ）は、NmB多糖誘導体を精製するのに用いられた。

【0039】

従って、本発明は、脱N－アセチル化PSエピトープ、ならびに抗NmB多糖体抗体応答を誘発させるために宿主に投与するのに適合した処方の特徴とする。加えて、大腸菌K1の莢膜多糖体は髄膜炎菌の莢膜多糖体と同じ構造を有するため、本発明はまた、脱N－アセチル化PSエピトープ、ならびに抗大腸菌K1多糖体抗体応答を誘発させるために宿主に投与するのに適合した処方の特徴とする。

【0040】

本発明はまた、宿主に投与するのに適している抗原組成物中の脱N－アセチル化多糖体エピトープ含有化合物のコンジュゲートを包含する。

【0041】

本発明はまた、組成物のモノマー単位またはポリマー単位（例えば、2個またはそれ以上の残基で、そのPSAがホモポリマーまたはヘテロポリマー構造として組成物中に提供されてもよい）として、本発明の脱N－アセチル化PSA誘導体を含有する組成物を含む。組成物は、本発明の脱N－アセチル化PSAの非還元末端、還元末端、または非還元・還元の両末端に結合した追加の残基を含有することができる。

【0042】

本発明はまた、脱N-アセチル化PSを、結果として生じる脱N-アセチル化PS誘導体のN-アシル化残基が化合物の全残基（例えば、化合物中の全残基が普通少なくとも約10～20残基）の90%未満、85%未満、84%未満、80%未満、75%未満、70%未満、60%未満、55%未満、または50%未満を示し、かつ、脱N-アセチル化残基（遊離アミンを持つ残基）が化合物の全残基（例えば、化合物中の全残基が普通少なくとも約10～20残基）の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、または少なくとも50%になるような条件下で、アシル無水物などのアシル化剤に接触させることを含む、脱N-アセチル化PSの製造方法の特徴とする。本態様において、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PS誘導体を提供するために、最終生成物のアシル化レベルを制御するという利点を提供する。

10

【0043】

本発明はさらに、脱N-アセチル化PSを、アシル化剤とアミン保護試薬との混合物に接触させることを含む、脱N-アセチル化PSの製造方法の特徴とする。本態様において、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PS誘導体を提供するために、PSコンジュゲート誘導体の作製時に生じ最終生成物中で容易に除去される不都合な副反応物からC-5アミノ基を保護するという利点を提供する。

【0044】

本発明はさらに、アミン保護マンノサミン（例えば、N-トリハロアセチル-D-マンノサミン）とN-アセチル-D-マンノサミンとの混合物を含む増殖培地を添加することにより、NmB菌株での生合成によって脱N-アセチル化PSを製造する方法の特徴とする。本態様において、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PS誘導体を提供するために、PSコンジュゲート誘導体の作製時に生じ最終生成物中で容易に除去される不都合な副反応物から保護されたC-5アミノ基を有するPSを効果的に生成するという利点を提供する。

20

【0045】

本発明はさらに、脱N-アセチル化NmB多糖体またはコンジュゲート（本明細書で「PSコンジュゲート」とも呼ぶ）の1またはそれ以上の免疫原性用量を投与することによって、宿主中で抗NmB多糖体抗体応答を誘発させる方法の特徴とする。投与は、有意なまたは検出可能な宿主の自己抗体を産生しないで抗NmB莢膜多糖体抗体応答を誘発させるのに有効である。

30

【0046】

本発明はまた、免疫応答を誘発させ、例えば、NmBや大腸菌K1のような細菌性病原体に対して防護的であるが、正常な宿主PSA抗原と反応する抗PSA抗体ではないPSAエピトープを同定する方法であって、

（1）抗体をPS誘導体と接触させ、抗体が、例えば、NmB PS（抗NmB PS抗体）、宿主PSA（抗宿主PSA抗体または「自己抗体」）、または両方と結合し、接触が十分で、PS誘導体との抗原-抗体複合体の形成に適している条件下にあるステップと、

（2）所望の抗体に結合されたエピトープを同定し、エピトープが、例えば、NmB PSと結合するが宿主PSAとは結合しない抗体と結合し、エピトープの同定が、適切な酵素（例えばシアリダーゼであり、例えばエンドまたはエキソシアリダーゼ。ノイラミニダーゼの使用は特に興味深い）を用いた抗原-抗体複合体の処理を含むステップとを含む方法の特徴とする。

40

【0047】

本方法はさらに、ノイラミニダーゼ処理した抗原-抗体複合体のアフィニティー精製に続いて、エピトープを測定するための分析（例えば、MALDI-TOF分析）を含む。関連する実施形態では、PSA誘導体は、種々のPSA誘導体を含むライブラリーとして存在する。

【0048】

50

用語の意味

本明細書で使用される「P S」は、多糖体、普通は莢膜多糖体、具体的には1つまたはそれ以上の脱アセチル化残基を有する莢膜多糖体を指し、髄膜炎菌または大腸菌の莢膜多糖体を含んでおり、B群髄膜炎菌および大腸菌K 1は特に興味深い。本明細書で使用される「Nm B P S」は、B群髄膜炎菌のP Sを指す。本明細書全体においてNm B P Sへの言及は、本発明に関する組成物の生成および方法の使用が可能なP S構造の例示的なものである。

【0049】

本明細書で使用される「P S誘導体 (PS derivative)」は、修飾された、普通は化学修飾された多糖体 (P S)、具体的にはB群髄膜炎菌または大腸菌K 1のP Sを指し、1つまたはそれ以上のN-アセチル基の代わりに遊離アミン (すなわち1級アミン) を有するP S誘導体は特に興味深い。概して、P S誘導体はガングリオシドまたはガングリオシド誘導体を包含しない。

【0050】

本明細書で使用される「脱N-アセチル化P S誘導体 (de-N-acetylated PS derivative)」は、1つまたはそれ以上の脱N-アセチル化残基、例えば、多糖誘導体の1つまたはそれ以上の残基のC-5位置に1つまたはそれ以上の遊離アミンを有するP S誘導体を指す。「脱N-アセチル化P S誘導体」なる用語は、脱N-アセチル化P S誘導体が、P S分子からアセチル基を除去することを含むプロセスによって生成されるP S誘導体に限定されることを意味するものではないが、その代わり、他に特に指示がない限り、任意の適当な方法 (例えば、P S生合成時にP S分子に組み込まれたトリハロアシル保護基を除去することにより脱N-アセチル化P S誘導体中に遊離アミンが生成される生合成的手法によって) で生成される脱N-アセチル化P S誘導体を包含することを意味する。さらに、「脱N-アセチル化残基 (de-N-acetylated residue)」は、本明細書ではP S誘導体との関連で、天然アセチル基の代わりに1級アミンを有する分子中のシアル酸残基に言及するのに用いられる。

【0051】

「遊離アミン (Free amine)」および「1級アミン (primary amine)」は、本明細書では互換的に、例えば、「R」が本発明のP S誘導体のシアル酸残基であるR NH₂において見られるようなNH₂基に言及するのに用いられる。

【0052】

本明細書で使用される「P Sコンジュゲート (PS conjugate)」は、担体分子 (担体タンパク質など) と、α (2→8) N-アセチルノイラミン酸またはこのモノマー単位を含む他の多糖体のホモニアポリマー、または本発明の脱N-アセチル化P S誘導体を含む誘導体とのコンジュゲートを指す。特に興味深いのは、担体タンパク質と髄膜炎菌莢膜多糖体 (具体的にはB群莢膜多糖体) の誘導体とのコンジュゲート、具体的には、本発明の脱N-アセチル化P S誘導体である。また特に興味深いのは、担体タンパク質と大腸菌K 1莢膜多糖体の誘導体とのコンジュゲート、具体的には、本発明の脱N-アセチル化P S誘導体である。

【0053】

「Nm Bコンジュゲート (NmB conjugate)」または「莢膜多糖体コンジュゲート (capsular polysaccharide conjugate)」または「Nm B莢膜多糖体コンジュゲート (NmB capsular polysaccharide conjugate)」なる用語は、髄膜炎菌の莢膜多糖体、具体的には本発明のP S誘導体を含むB群髄膜炎菌莢膜多糖体と、破傷風トキソイド、CPM 197、組換え髄膜炎菌ポリリンBタンパク質、または髄膜炎菌外膜小胞に含まれるタンパク質などの担体との間のコンジュゲートを指すことを意図している。

【0054】

本明細書の脱N-アセチル化P S誘導体とコンジュゲートした担体との関連で使用される「担体 (Carrier)」は、概ね抗原に結合された場合に、T細胞を活性化かつ回復するT依存性抗原としての機能を果たし、それによりT細胞依存性抗体の産生を増大させる物

質を指す。強力な免疫原性担体が本発明の範囲内にあるが、担体はそれ自体強力な免疫原性である必要はない。これに関連して、担体は概してポリペプチドであり、タンパク質の全部または断片でもよい。

【0055】

「コンジュゲートした (Conjugated)」は、概して共有または非共有の、普通は共有の化学結合を指し、近位で脱N-アセチル化PSを担体と結合させ、その結果、非コンジュゲートの脱N-アセチル化PSと比較して、担体コンジュゲート脱N-アセチル化PSが免疫原性を増大させている。

【0056】

「感染防御免疫 (protective immunity)」なる用語は、哺乳動物に投与されるワクチンまたは免疫化スケジュールが、病原菌 (例えば髄膜炎菌) によって引き起こされる疾患の発生を予防・遅延させるかまたはその重篤度を軽減させ、または疾患の症状を軽減または完全に解消するような免疫応答を誘導することを意味する。髄膜炎菌の場合、補体媒介性殺菌活性を活性化する (Goldschneider 1969 J Exp Med 129:1307-26)、または適切な動物チャレンジモデルにおいて髄膜炎菌性菌血症に対する消極防御となる (例、the infant rat model (幼齢ラットモデル) (Welsch et al 2003 J Infect Dis 188:1730)) 血清抗体の能力に基づいて、感染防御免疫が予測され得る。 10

【0057】

「髄膜炎菌のB群の菌株に起因する疾患 (a disease caused by a strain of group B of *Neisseria meningitidis*)」という語句は、任意の臨床症状、または髄膜炎菌のB群の一部の感染において存在する臨床症状の組み合わせを包含する。これらの症状は以下に挙げるものを含むが、これに限定されない：髄膜炎菌のB群の病原性株による上気道コロニー形成 (例、鼻咽頭および扁桃の粘液)、粘膜および粘膜下血管床への細菌の侵入、敗血症、敗血症性ショック、炎症、出血性皮膚病変、フィブリン溶解および血液凝固の活性化、腎臓・肺・心不全などの臓器機能不全、副腎出血および筋梗塞、毛細血管漏出、浮腫、末梢性下肢虚血、呼吸器系疾患症候群、心膜炎、および髄膜炎。 20

【0058】

多糖体・リン脂質・タンパク質・ペプチドなどの抗原に言及する場合の「抗体に特異的に結合する (specifically binds to an antibody)」または「特異的に免疫反応性の (specifically immunoreactive with)」という語句は、他分子の不均質な集団も含んでい 30
る試料中の抗原の存在に基づく、かつ／または証拠となる結合反応を指す。それ故、指定された免疫学的検定条件下では、指定の抗体または抗体類が試料中の特定の抗原または抗原類に結合し、試料中に存在する他の分子には有意な量で結合しない。かかる条件下での抗体への特異的結合は、特定の抗原または抗原類に対する特異性で選択される抗体または抗血清を必要とする。

【0059】

「自己反応性 (autoreactive)」とは、抗体結合の関連で、抗体が宿主の抗原 (例えば、宿主のポリシアル酸 (PSA)) と結合することを意味する。自己反応性抗体は、外来抗原と同様に宿主の抗原にも結合するものを含む (例えば、NmB PS、または大腸菌 K1 PSに対して)。「非自己反応性抗体 (non-autoreactive antibody)」は、宿主の 40
抗原に有意または検出可能に結合しない抗体であり、宿主の抗原に検出可能に結合しないことが好ましい。興味深い非自己反応性抗体は、NmB PSまたは大腸菌 K1 PSに特異的に結合する抗体であって、また、その抗体はNmBおよび／または大腸菌 K1 に対し殺菌性であることが好ましい。

【0060】

「免疫応答を誘発させるのに十分な量で (in a sufficient amount to elicit an immune response)」(例えば、調製物中に存在するエピトープに対して) という語句は、特定の抗原調製物の投与前と投与後に測定された免疫応答インジケータ間に検出可能な差異があることを意味する。免疫応答インジケータは以下に挙げるものを含むが、これに限定 50
されない：酵素結合免疫検定 (ELISA)、殺菌能試験 (例えば、血清の殺菌抗体の

検出)、フローサイトメトリー、免疫沈降、O u c h e r - L o w r y 免疫拡散; スポット・ウエスタンブロット・抗原アレイなどの結合検出アッセイ; 細胞毒性アッセイ、などのようなアッセイによって検出される抗体の力価または特異性。

【0061】

「抗体 (antibody)」なる用語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製物、ならびに、ハイブリッド抗体、変性抗体、F (a b ')₂ フラグメント、F (a b) 分子、F v フラグメント、ファージ上で提示される一本鎖化可変部フラグメント (s c F v)、シングルドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および親抗体分子の免疫学的結合特性を示す機能フラグメントを含む調製物を包含する。

【0062】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」なる用語は、均質な抗体集団を有する抗原組成物を指す。該用語は、作製方法によって限定されない。該用語は、F a b 分子、F (a b ')₂ フラグメント、F v フラグメント、ファージ上で提示される一本鎖化可変部フラグメント (s c F v)、および親モノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子と同様に、全免疫グロブリン分子を包含する。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製方法は、当技術分野で周知であり、以下にさらに詳細に説明する。

【0063】

「抗原 (antigen)」は、本明細書では抗体分子により特異的に結合される任意の物質を含むと定義される。「免疫原 (immunogen)」は、抗原特異的免疫応答を引き起こすリンパ球活性化を開始する能力がある抗原である。

【0064】

「エピトープ (epitop)」とは、特異的 B 細胞および/または T 細胞が応答する抗原上の部位を意味する。該用語はまた、「抗原決定基 (antigenic determinant)」または「抗原決定部位 (antigenic determinant site)」と互換的に用いられる。タンパク質、多糖体、または他のバイオポリマー上にある B 細胞エピトープ部位は、折り畳みにより一緒にもたらされた高分子のさまざまな部分の分子部分から構成される。該部位は直鎖状配列では不連続であるが、折り畳み構造では連続のポリマーのセグメントから構成されるため、この種のエピトープは、立体構造または不連続エピトープと呼ばれる。バイオポリマーまたは他の分子の単一のセグメントから構成されるエピトープは、連続または直線状エピトープと呼ばれる。T 細胞エピトープは、概して直鎖ペプチドに限定される。同一のエピトープを認識する抗体類は、ある抗体が他の抗体の標的抗原への結合を阻止する能力を示す簡単な免疫学的検定で同定されることができる。

【0065】

本明細書で使用される「血清群 (Serogroup)」または「群 (Group)」は、莢膜多糖体中の免疫学的に検出可能な変異に基づいた髄膜炎菌 (*Neisseria meningitides*) の分類を指す。以下に挙げる約 12 の血清群が公知である: A、B、C、X、Y、Z、29-E、W-135、H、I、K、および L。いずれの血清群も多種の血清型および多種の血清亜型を包含することがある。

【0066】

本明細書で使用される「血清型 (Serotype)」は、モノクローナル抗体によって規定される外膜ポリタンパク質 B の抗原性の差異に基づいた髄膜炎菌株の分類を指す。単一の血清型が多種の血清群および多種の血清亜型の中に見つかることがある。

【0067】

本明細書で使用される「血清亜型 (Serosubtype)」は、ポリタンパク質上の抗原性の変異によって規定される抗体に基づいた、または DNA 配列から推定されるアミノ酸配列の VR タイピングに基づいた、髄膜炎菌株の分類を指す (Sacchi et al., 2000, J. Infect. Dis. 182:1169; Multi Locus Sequence Typing web site も参照されたい)。P o r A タンパク質間のほとんどの変異性は、推定される表面露出ループ 8 つのうち 2 つ (ループ I および I V) において生じる。可変ループ I および I V はそれぞれ

10

20

30

40

50

れ V R 1 および V R 2 と呼ばれている。単一の血清亜型が多種の血清群および多種の血清型の中に見つかることがある。

【0068】

「単離される (isolated)」とは、ある化合物が、天然の状態ですれを伴う全部または一部の成分から分離されることを意味する。「単離される」はまた、製造時にそれを伴う全部または一部の成分から分離された化合物の状態を指すことがある (例えば、化学合成)。

【0069】

「精製された (purified)」とは、関心化合物が、天然の状態ですれを伴う成分から分離されたことを意味する。「精製された」はまた、製造時にそれを伴う成分から分離された関心化合物を指すのに用いられることがある (例えば、化学合成時)。通常は、少なくとも 50 重量%ないし 60 重量%の化合物が、天然にそれに付随するかまたは製造時に付随する有機分子が存在しない場合に、化合物は実質的に純粋である。調製物は、概ね関心化合物の少なくとも 75 重量%、より好ましくは少なくとも 90 重量%、最も好ましくは 99 重量%である。実質的に純粋な化合物は、例えば、天然源からの抽出 (例えば、細菌) により、化合物の化学合成により、または精製および化学修飾の組み合わせにより、得ることができる。実質的に純粋な化合物はまた、例えば、目的の抗体に結合する化合物を有する試料を濃縮することにより得ることができる。純度は、任意の適切な方法、例えばクロマトグラフィー、質量分析、HPLC 分析などにより測定することができる。

【0070】

「濃縮される (enriched)」は、組成物中の物質 (例えば、抗体または抗原) が、抗原組成物が得られた菌株中の該抗原の濃度よりも、総重量で少なくとも 3 倍高い濃度、好ましくは少なくとも 10 倍高い濃度、より好ましくは少なくとも 100 倍高い濃度、そして最も好ましくは 1,000 倍高い濃度で存在するように、実験者または臨床医によって操作されることを意味する。従って、例えば、特定の抗原の濃度が、総細菌調製物 (または総細菌タンパク質) のグラムあたり 1 マイクログラムである場合、濃縮調製物は総細菌調製物 (または総細菌タンパク質) のグラムあたり少なくとも 3 マイクログラムを含有することになる。

【0071】

「P S 誘導体に関して免疫学的に未処置である (immunologically naive with respect to a P S derivative)」なる用語は、単独または巨大分子との関連で、免疫応答を引き起こす (例えば、プライムすること) のに十分な量で本発明の P S 誘導体に曝露されたことのない個体 (例えば、ヒト患者などの哺乳動物) を意味する。個体が P S コンジュゲートワクチン (1 回またはそれ以上の投与) に曝露されたことがある場合、その個体は防御抗体および自己反応性抗体を産生する性向があり、(例えば、P S コンジュゲートワクチン) 防御および自己反応性の抗体の混合物を発現する性向がある。

【0072】

「プライムされた (primed)」対象とは、免疫応答を誘発するのに十分な量で抗原 (例えば、本発明の脱 N-アセチル化 P S) に曝露されたことがあり (例えば、投与により)、その後同一または第二抗原 (例えば、P S コンジュゲート) に曝露することにより、防御的免疫応答を提供し、その応答が有意 (例えば、臨床的に妥当な) または検出可能な自己抗体を有しない対象を指す。

【0073】

「臨床的に妥当でない自己抗体応答 (no clinically relevant autoantibody response)」とは、本発明の方法を用いることにより、従来の P S ワクチン (例えば、米国特許 4,727,136 号 (N-Pr-NmB conjugate vaccine) に記載の P S コンジュゲートワクチン) を用いて未処置の対象の免疫化を行った後の自己抗体の産生と比較して、自己抗体の産生が少なくとも 25%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、またはそれ以上減少することを意味する。

【0074】

本明細書で使用される「製薬上許容しうる賦形剤 (Pharmaceutically acceptable excipient)」は、対象に関心化合物を投与するのに製薬上許容しうるビヒクルを提供する任意の適切な物質を指す。「製薬上許容しうる賦形剤」は、製薬上許容しうる希釈剤、製薬上許容しうる添加剤、および製薬上許容しうる担体と呼ばれる物質を包含することができる。

【0075】

多糖誘導体およびコンジュゲート

上で述べたように、本発明は、非自己反応性かつ殺菌性抗NmBのB群莢膜mAbによって認識される最小エピトープがシアル酸またはシアル酸誘導体の残基の二量体であり、二量体がN-アシル化した（例えば、アセチル化またはプロピオニル化した）シアル酸残基またはシアル酸誘導体残基に隣接した少なくとも1個の脱N-アセチル化されたシアル酸残基を含むことを発見したことに基づく。この二量体エピトープは、脱N-アセチル化PS誘導体内部の還元末端・非還元末端に、または化合物内部に配置されることができる（例えば、化合物の還元末端・非還元末端から1、2、3、4、5、10個またはそれ以上の残基）。二量体エピトープは脱N-アセチル化PS誘導体内の1個またはそれ以上の二量体単位として存在することができる（例えば、連続または非連続の二量体反復単位として）か、または脱N-アセチル化PS誘導体内に存在する他の単位内部に存在することができる（例えば、三量体単位内部に、連続または非連続の反復単位として存在してもよい）。本発明の範囲内にある例示的な分子を図10～19、20～22、および23～37に示す。

10

20

【0076】

本発明の、および本発明の方法に有用な脱N-アセチル化PS誘導体は、概ね少なくとも1個の二量体エピトープを含み、完全に脱N-アセチル化された多糖体または少なくとも部分的に脱N-アセチル化された多糖体に存在することができ、また、ホモポリマーまたはヘテロポリマー分子中に存在することができる。例えば、本発明のPS誘導体は、以下に示すように1つまたはそれ以上の構造を含むことができる（例えば、以下の化学式I～VIIを参照）。PS誘導体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60個またはそれ以上のシアル酸残基またはその誘導体を含むことができ、重合度(Dp)が約2～約60、約10～約50、約30～約50、約10～約20、または約12～約18であってよく、Dpが約2～約10のものは特に興味深い。より小さなサイズのPS誘導体は、適当な大きさおよび／または免疫原性の分子を提供するために、さらに修飾（例えば、担体へのコンジュゲート、脂質化など）を含むことができる。本発明のPS誘導体はさらに、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の隣接した脱N-アセチル化残基を含むことができ、いくつかの実施形態では、具体的にはPS誘導体がN-アセチル化および脱N-アセチル化残基のみから構成され、それ以上の修飾（例えば、担体とのコンジュゲートによる、または還元末端のシアル酸残基を修飾して二級アルキルアミンを含むことによる）を受けていない場合に、PS誘導体の脱N-アセチル化残基は該分子の総残基の30%またはそれ以下でもよく、また、N-アセチル化残基は該分子の総残基の約70%またはそれ以下でもよい。

30

40

【0077】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、対象に投与された場合に、細菌と結合する抗体の産生を誘発させる（例えば、抗NmBまたは抗大腸菌K1応答）。抗NmBまたは抗大腸菌K1抗体の場合に殺菌性となりうる当該抗体は、対象のPSA（例えば、ヒトPSA）に対する有意または検出可能の自己反応性がない。

【0078】

概して、本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、少なくとも部分的に脱N-アセチル化されており、その結果、PS誘導体は多糖体残基またはその誘導体からなる双性化合物であって、1個またはそれ以上の二量体、ならびに／または1個またはそれ以上の三量体を含み、前述のようにエピトープを含む。脱N-アセチル化PS誘導体は、概して少なく

50

とも1個の二量体エピトープを含み、ただし二量体エピトープは、(1) 1番目および2番目の脱N-アセチル化残基；(2) 1番目のN-アシル化残基および2番目の隣接した脱N-アシル化残基（すなわち、遊離アミン基を有する残基）であって、ただしN-アシル化残基はN-プロピオニル（N-Pr）基ではない；または(3) 1番目の脱N-アシル化残基（すなわち、遊離アミン基を有する残基）および2番目の隣接したN-アシル化残基を有することを特徴とする。ある実施形態では、N-アシル化残基は不飽和アシル基を含む；さらなる実施形態では、N-アシル化残基はN-プロピオニル（N-Pr）基を含まない（すなわち、二量体中のシアル酸残基はN-プロピオニル化されていない）。

【0079】

本明細書で使用される「アシル基」は、飽和または不飽和アシル基、普通は、飽和または不飽和C₂₋₁₈アシル基、飽和または不飽和C₂₋₁₆アシル基、飽和または不飽和C₂₋₁₂アシル基、飽和または不飽和C₂₋₁₀アシル基、飽和または不飽和C₂₋₈アシル基、飽和または不飽和C₂₋₆アシル基、飽和または不飽和C₂₋₄アシル基、または飽和C₂₋₄アシル基を含む。本明細書で使用される飽和アシル基は、飽和アルキル基に結合したカルボニルを指すことを意図する；本明細書で使用される不飽和アシル基は、不飽和アルキル基に結合したカルボニルを指すことを意図する。いくつかの実施形態では、不飽和アシル基は特に興味深い。二量体の残基は、ラクトンまたは環状シアル酸などのシアル酸またはシアル酸誘導体とすることができる。

【0080】

従って、本発明のPS誘導体は、シアル酸分子部分またはその誘導体（例えば、ラクトン、環状シアル酸など）の1個またはそれ以上の脱N-アセチル化残基を含んでおり、その脱N-アセチル化残基は、PS誘導体内部の還元末端・非還元末端に、またはPS誘導体内部（すなわち還元および非還元末端の間）に配置されることができ、その結果、還元末端に脱N-アセチル化残基を有するPS誘導体は特に興味深い。

【0081】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、単一の二量体エピトープを含む構造か、2個またはそれ以上の二量体エピトープを含むポリマー単位として提供されてよい。脱N-アセチル化PS誘導体はホモポリマーまたはヘテロポリマー構造でもよく、いくつかの実施形態では追加の脱N-アセチル化またはN-アセチル化シアル酸残基と同様に、以下の1つまたはそれ以上の構造から構成されることができる。「n」単位（例えば、二量体または三量体の単位）に関して以下の化学式が与えられる場合、PS誘導体は、多数の当該「n」単位を含むことができる。例えば、本発明のPS誘導体は、所与の二量体または三量体構造の2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の連続または非連続の単位を含むことができ、ただし「n」は各単位内部の連続した二量体または三量体構造の数を指す。当該二量体または三量体構造は、シアル酸残基によって分離されることができる。

【0082】

本発明のPS誘導体はさらに、多糖体ポリマーの非還元末端、還元末端、または非還元・還元末端の両方でシアル酸残基またはその誘導体と結合している追加の分子部分を含むことができる。

【0083】

一実施形態において、本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、次式により表される構造を有するものを含む：

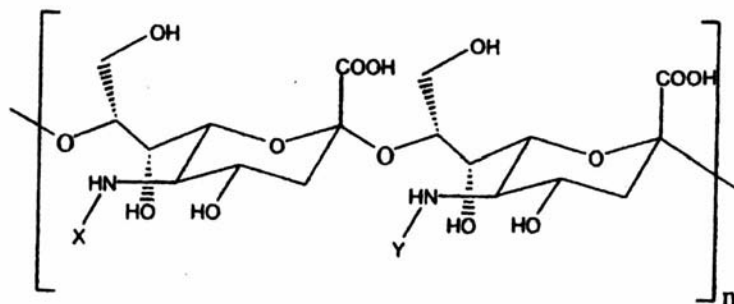
10

20

30

40

【化 5】



FORMULA I

10

式中、XおよびYは独立してH、アミン保護基（例えばトリハロアシル基）、または飽和もしくは不飽和アシル基（普通は飽和アシル基）であって、いくつかの実施形態では、XおよびYは独立して、1）Hまたはアミン保護基；2）飽和もしくは不飽和アシル基であり、さらに、nは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60またはそれ以上、普通は5またはそれより大きく、より普通には約10またはそれより大きく、また、重合度（Dp）が約2～約60、約10～約50、約30～約50、約10～20、または約12～約18であってよく、Dpが約2～約10のものは特に興味深く、

20

またさらに、式中、

Xが飽和もしくは不飽和アシル基（いくつかの実施形態ではプロピオニル基以外で、また、さらなる実施形態では不飽和アシル基以外）である場合、YはHまたはアミン保護基であって；

Yが飽和もしくは不飽和アシル基（いくつかの実施形態ではプロピオニル基以外で、また、さらなる実施形態では不飽和アシル基以外）である場合；XはHまたはアミン保護基である。特に興味深い別の実施形態では、XおよびYは独立してHまたは飽和もしくは不飽和アシル基であって、普通は不飽和アシル基である。さらなる実施形態では、XおよびYは独立してアミン保護基（例えばトリハロアシル基）または飽和もしくは不飽和アシル基であって、普通は飽和アシル基である。いくつかの実施形態では、特にXまたはYがHまたは不飽和アシル基である場合、PS誘導体は90%未満、普通は85%未満、または特にPS誘導体が少なくとも10ないし20残基を含む場合は、80%未満がN-アシル化されている。

30

【0084】

興味深い一実施形態では、化学式IにおけるXが飽和アシル基で、YがHまたはアミン保護基である。特に興味深い一実施形態では、化学式IにおけるXがアセチル基で、YがHまたはアミン保護基である（例えばトリハロアシル基（例えばトリハロアセチル基））。興味深い別の実施形態では、化学式IにおけるXが飽和アシル基で、YがHであって；またはXがアセチル基で、YがHである。

【0085】

40

XまたはYがアミン保護基（例えばトリハロアシル基）である場合、当該PS誘導体は、本明細書で「保護PS誘導体（protected PS derivative）と呼ばれ、例えば分子と担体（例えば担体タンパク質）とのコンジュゲーションや、脂質部分の付加（例えば、保護PS誘導体の非還元末端におけるアシルアミンの付加）などのように、保護PS誘導体をさらに修飾する間に、アミン保護基は、アミン基が反応を受けることを防止するように作用する。続いてアミン保護基は、残基に遊離アミンを供与するために修飾を受けることができる。アミン保護基が可変位置に水素の代わりに存在する場合、保護PS誘導体は、概して本明細書記載の構造によって例示される。これは、PS誘導体において遊離アミンを供与するために水素が要求される可能性がある場合、その残基に遊離アミンの水素の代わりにアミン保護基を含む保護PS誘導体である。

50

【0086】

本明細書で使用する「アミン保護基 (amine protecting group)」は、窒素原子が分子の他の部分で起こる反応に関与するのを妨げるように、アミン分子の窒素原子に結合したラジカルまたは原子団を指す。「アミン保護された (amine-protected)」なる用語は、それによりその窒素原子が分子の他の部分で起こる反応に関与するのを妨げられるアミンの窒素原子を含む分子の構造的特徴を意味する。

【0087】

本発明で用いられる例示的なアミン保護基は、カーバメート、アミド、N-アルキルおよびN-アリルアミン、イミン誘導体、エナミン誘導体、N-スルホニルなどを含むが、必ずしもそれらに限定されない。さらに例示的なアミン保護基は：ホルミル、トリフルオロアセチル、フタリル、およびp-トルエンスルホニルのようなアシル型；ベンジルオキシカルボニル (Cbz) および置換型ベンジルオキシカルボニル、1-(p-ビフェニル)-1-メチルエトキシカルボニル、ならびに9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) のような芳香族カーバメート型；tert-ブチルオキシカルボニル (tBoc)、エトキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、およびアリルオキシカルボニルのような脂肪族カーバメート型；シクロペンチルオキシカルボニル、およびアダマンチルオキシカルボニルのような環式アルキルカーバメート型；トリフェニルメチルおよびベンジルのようなアルキル型；トリメチルシランのようなトリアルキルシラン；フェニルチオカルボニルおよびジチアサクシニルのようなチオール含有型を含むが、必ずしもそれらに限定されない。アミン保護基および保護アミン基は、例えばC. B. Reese and E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry (有機化学における保護基)," J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, New York, N. Y., 1973, Chapters 3 and 4, respectively, and T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis (有機合成における保護基)," Second Edition, John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1991, Chapters 2 and 3に記載されている。

【0088】

さらに、特に興味深い例示的なアミン保護基は、トリハロアセチルおよびトリハロプロピオニル基のようなトリハロアシル基、(例えば、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロプロピオニル、トリフルオロプロピオニル) などを含んでおり、トリハロアセチル基は興味深い。

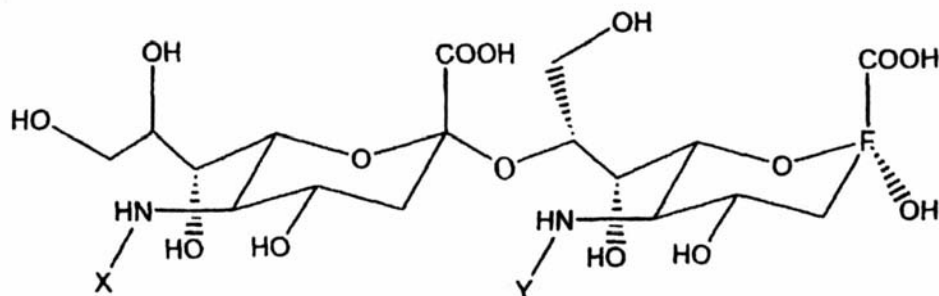
【0089】

特に興味深い一実施形態では、化学式 I の構造を含む PS 誘導体は、以下に記載のように、例えば C2 ケトン、C6 アルデヒド、C7 アルデヒド、または C8 アルデヒドを介した共有結合によって担体にコンジュゲートされており (例えば、C2-NH-担体タンパク質または C6-NH-担体タンパク質)、ただし担体は、還元もしくは非還元末端のいずれか、またはその両方に (例えば、該誘導体の還元末端の残基か、該誘導体の非還元末端の残基、またはその両方との結合を介して) 存在してよい。特に興味深い別の実施形態では、PS 誘導体は少なくとも化学式 I の二量体を1個含み、また、アシルアミンで置換されたN-アシル化または脱N-アシル化シアル酸残基を非還元末端に有する (例えば、飽和または非飽和アシルアミン、普通は飽和または非飽和脂肪族アシルアミン、普通は飽和アシルアミン (例えば、 NHC_2-18 、 NHC_2-12 、 NHC_2-10 、 NHC_2-8 、 NHC_4-12 など)) (例えば、化学式 I V a または I V b の非還元末端部分を参照)。担体/およびまたはアシルアミンを含むこれらの後者の実施形態は、PS 誘導体が化学式 I の構造を有しており、式中、XがHでYがアセチル基である場合、またはXがアセチル基でYがHである場合に、特に興味深い。別の特定の実施形態では、PS 誘導体が化学式 I の構造を有しており、式中、XがHでYがアセチル基である場合、またはXがアセチル基でYがHである場合に、PS 誘導体はアジュバントと組み合わせて供与され、以下に記載のように、PS 誘導体およびアジュバントは、好ましくは製薬上許容する担体 (乾燥または水性希釈剤) 中に供与される。

【0090】

一実施形態では、該二量体は二糖類であって、該二糖類がC-5アミノ基上のN-アセチル基が除去された1個もしくはそれ以上の残基を含む場合、または2個の残基のうち1個が脱N-アセチル化されている場合、第2の残基はN-アセチル基を含む（しかし、いくつかの実施形態でN-プロピオニル基ではない）。この最小エピトープを規定する二糖単位は、還元末端、非還元末端、または多糖体内部にあってよい。脱N-アセチル化PS誘導体が二糖類として供与される場合、組成物は以下の構造を有することができる：

【化6】



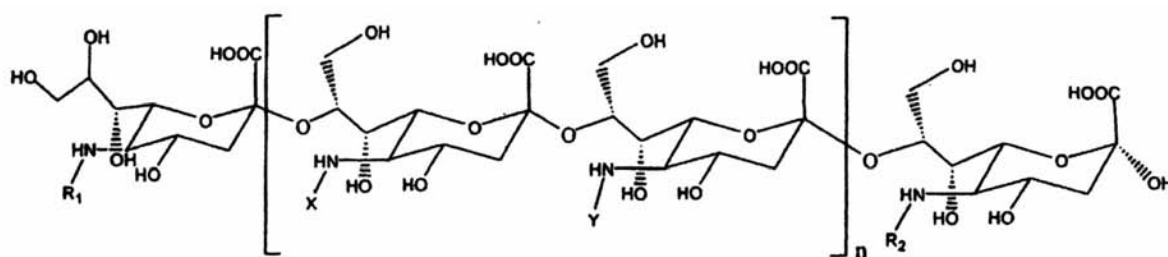
FORMULA II

式中、XおよびYは独立してH、アミン保護基（例えばトリハロアシル基）、または飽和もしくは不飽和アシル基であって；好ましくはさらに、式中、Xがアシル基（好ましくはプロピオニル基以外）である場合にYはHまたはアミン保護基であって、また、Yがアシル基（好ましくはプロピオニル基以外）である場合にXはHまたはアミン保護基である。特に興味深い一実施形態では、Xがアセチル基で、YがHである。Xおよび/またはYがアミン保護基である場合、化合物は本明細書で保護PS誘導体と呼ばれ、該保護基は前述のように利用されることができる。例示的なアミン保護基は前述した。化学式IIのPS誘導体は、化学式IのPS誘導体について既述したように、担体/およびまたはアシルアミンを含むようにさらに修飾されることができ、具体的には、XがHで、Yがアセチル基であり；またはXがアセチル基で、YがHである。

【0091】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体はまた、次式により表される構造を有するものを含む：

【化7】



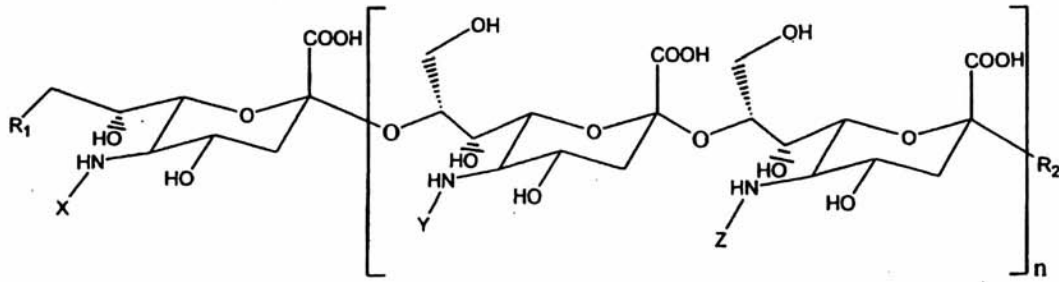
FORMULA III

式中、X、Yおよびnは上記規定した通りであって、前述のように、R₁およびR₂は独立してHまたはアミン保護基（例えばトリハロアシル基）であり；またはアシル基（例えばアセチル基）である。化学式IIIのPS誘導体は、担体/およびまたはアシルアミンを含むようにさらに修飾されることができ、化学式IおよびIIのPS誘導体について既述したように、保護PS誘導体の修飾は興味深く、具体的には、XがHならYがアセチル基であり、Xがアセチル基ならYがHである。

【0092】

別の一実施形態では、脱N-アセチル化PS誘導体は次式により表される構造を有する：

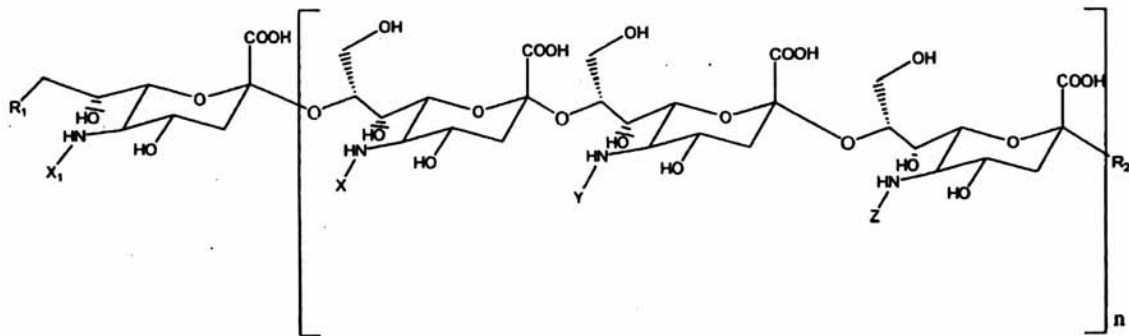
【化 8】



FORMULA IVa

10

又は

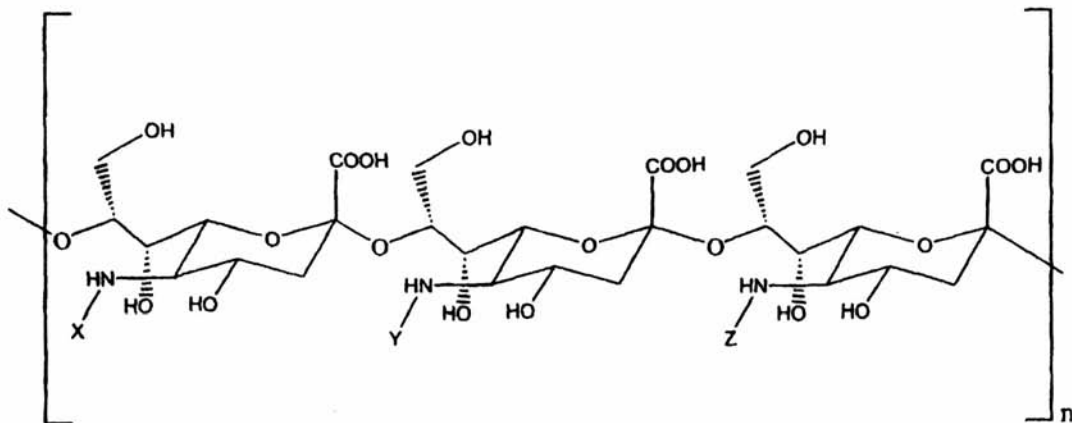


FORMULA IVb

20

または、

【化 9】



FORMULA V

30

式中、 X_1 、 X 、 Y および Z はH、アミン保護基（例えばトリハロアシル基）、または飽和もしくは不飽和アシル基であって、普通は不飽和アシル基であり、普通は式中、 X_1 、 X 、 Y および Z は、1) Hまたはアミン保護基、または、2) 飽和もしくは不飽和アシル基（普通は飽和アシル基）であって；少なくとも X 、 Y および Z のうち1つがHまたはアミン保護基という条件で；また少なくとも X 、 Y および Z のうち1つが飽和もしくは不飽和（普通は飽和）アシル基であって；特に興味深い実施形態では、少なくとも X 、 Y および Z のうち1つがHまたはアミン保護基であって；少なくとも X 、 Y および Z のうち1つがアセチル基で、少なくとも X 、 Y および Z のうち1つがプロピオニル基であって； n は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60またはそれ以上、普通は5残基またはそれより大きく、より普通には約10残基または

40

50

それより大きく（例えば、約 2 ～ 約 60、約 10 ～ 約 50、約 30 ～ 約 50、約 10 ～ 20、または約 12 ～ 約 18 の重合度（Dp）を有し、Dp が約 2 ～ 約 10 のものは特に興味深い）；

R₁ は、飽和または非飽和アシルアミン、普通は飽和または非飽和脂肪族アシルアミン、普通は飽和アシルアミン（例えば、NH C₂₋₁₈、NH C₂₋₁₂、NH C₂₋₁₀、NH C₂₋₈、NH C₄₋₁₂ など）であって；

R₂ は、本明細書記載のように、ヒドロキシル、または 1 個ないしそれ以上のアシル化、アミン保護（すなわち、アミン保護基を有する、例えばトリハロアセチル化）、または脱 N-アセチル化シアル酸残基である。一実施形態では、R₂ は脱 N-アセチル化シアル酸残基およびアシル化シアル酸残基（普通は飽和 N-アシル基を有するシアル酸残基、例えば、アセチル化シアル酸残基、プロピオニル化シアル酸残基など）のポリマーである。

10

【0093】

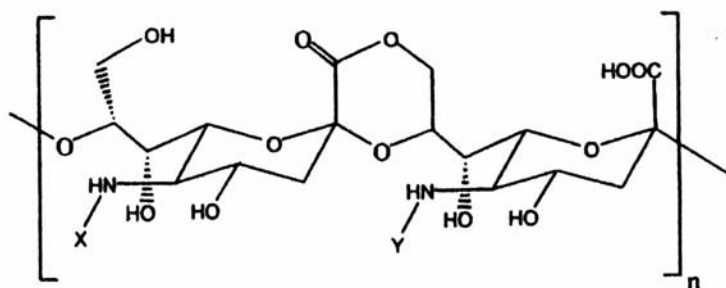
特に興味深い実施形態では、化学式 IV a および IV b の PS 誘導体は、遊離アミン（またはアミン保護基）、アセチル基、およびプロピオニル基のそれぞれのうち、少なくとも 1 個を含む。本実施形態では、PS 誘導体は化学式 V の構造を持つことができ、式中、X が H である場合、Y および Z は異なるアシル基であり、アセチル基またはプロピオニル基のいずれかであって；X がアセチル基である場合、Y および Z は異なる部分であり、H（もしくはアミン保護基）またはプロピオニル基のいずれかであって；さらに X がプロピオニル基である場合、Y および Z は異なる部分であり、H（もしくはアミン保護基）またはアシル基のいずれかである。例示的な実施形態を図 23 ～ 37 に示す。

20

【0094】

別の一実施形態では、本発明の脱 N-アセチル化 PS 誘導体は、少なくとも 1 個の三量体を含むということができ、次式により表される構造を有する；

【化 10】



30

FORMULA VI

式中、X、Y および Z は独立して H、アミン保護基（例えばトリハロアシル基）、または飽和もしくは不飽和アシル基（普通は飽和アシル基）であって；普通は式中、X、Y および Z は独立して、1) H またはアミン保護基、または、2) 飽和もしくは不飽和アシル基、普通は飽和アシル基であって；少なくとも X、Y および Z のうち 1 つが H またはアミン保護基という条件で；また少なくとも X、Y および Z のうち 1 つが飽和もしくは不飽和アシル基で、普通は飽和アシル基であって；特に興味深い実施形態では、少なくとも X、Y および Z のうち 1 つが H またはアミン保護基であって；少なくとも X、Y および Z のうち 1 つがアセチル基で；少なくとも X、Y および Z のうち 1 つがプロピオニル基であって；

40

n は少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60 またはそれ以上、普通は 4 残基またはそれより大きく、より普通には約 10 残基またはそれより大きい（例えば、約 2 ～ 約 60、約 10 ～ 約 50、約 30 ～ 約 50、約 10 ～ 20、または約 12 ～ 約 18 の重合度（Dp）を有し、Dp が約 2 ～ 約 10 のものは特に興味深い）。

【0095】

50

特に興味深い実施形態では、P S 誘導体は、各々の三量体が遊離アミン、アセチル基、およびプロピオニル基のそれぞれのうち、少なくとも1個を含む混合アシル構造を有する。本実施形態では、P S 誘導体は化学式Vの構造を持つことができ、式中、XがHである場合、YおよびZは異なるアシル基であり、アセチル基またはプロピオニル基のいずれかであって；Xがアセチル基である場合、YおよびZは異なる部分であり、Hまたはプロピオニル基のいずれかであって；さらにXがプロピオニル基である場合、YおよびZは異なる部分であり、Hまたはアシル基のいずれかである。

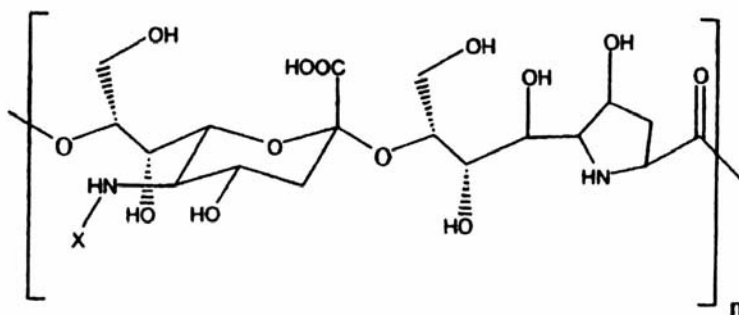
【0096】

本発明の脱N-アセチル化P S 誘導体は、飽和または不飽和の、普通は飽和のC₁ - C₄、普通はC₁ - C₃のアルキル基を有するアシル誘導体を含み、例えばアセチル、プロピオニル、イソプロピル、ブチオニルなどを含む。脱N-アセチル化P S 誘導体はさらに、1個またはそれ以上の脱N-アセチル化された部位を有する混合アシル誘導体を含み、該脱N-アセチル化P S 誘導体は、異なる飽和または不飽和の、普通は飽和のアシル基を含む。

【0097】

本発明の脱N-アセチル化P S 誘導体はさらに、本明細書記載の脱N-アセチル化P S 誘導体の1個またはそれ以上のシアル酸部分に加え、またはその代わりに、ラクトン部分、環状シアル酸部分、または他のシアル酸誘導体を有するものを含む。例えば、ラクトン部分を有するP S 誘導体は、以下の構造を有することができる：

【化11】



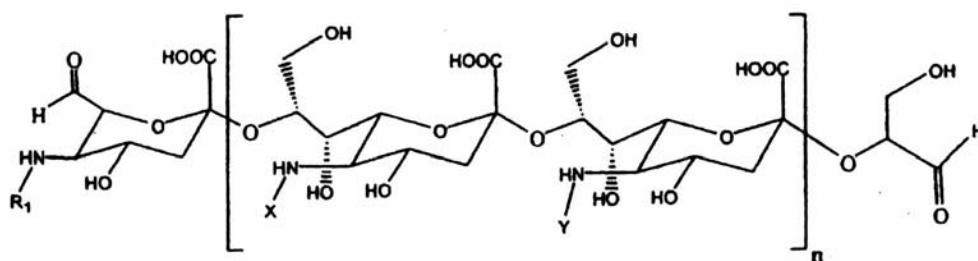
FORMULA VII

式中、X、Yおよびnは上記のように定義する。ラクトン部分を有するP S 誘導体は、本明細書記載のような構造を有する1個またはそれ以上のポリマー（例えば、二量体、三量体）を含むヘテロポリマー中に存在することができる。

【0098】

別の例では、環状イミンを含み、かつ／または還元してシアル酸部分の代わりに環状二級アミン部分（例えば、1-（4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-ピロリジン-2-イル）-エタノン）を得た脱N-アセチル化P S 誘導体は、以下の構造を有することができる：

【化12】



FORMULA VIII

式中、Xおよびnは上記のように定義する。環状イミンまたは環状二級アミン部分を有

する P S 誘導体は、本明細書記載のような構造を有する1個またはそれ以上のポリマー（例えば、二量体、三量体）を含むヘテロポリマー中に存在することができる。

【0099】

脱 N-アセチル化 P S 誘導体が単一の単位のエピトープ（すなわち、前述のような2残基、または下述のような3残基）として提供される場合、脱 N-アセチル化 P S 誘導体は、通常は担体（例えばタンパク質担体）と共有結合で結合する。概して、そして具体的には、脱 N-アセチル化 P S 誘導体が二糖類（例えば図 11 に示すように）、三糖類、または3残基もしくはそれ以下の他の分子である場合、脱 N-アセチル化 P S 誘導体は、C2 ケトンを通じて、または過ヨウ素酸塩処理後の還元的アミノ化による C6 アルデヒドを通じて、担体タンパク質に結合されることができる（例えば、C2-NH-担体タンパク質または C6-NH-担体タンパク質）。別の実施形態では、アミンが C7、C6、および/または C8 のアルデヒドに結合され（例えば図 20 ~ 22 参照）、これは不完全酸化の結果である可能性がある。C7 との結合が最も一般的であり、C6 および C8 との結合はあまり一般的ではない。

【0100】

本発明の脱 N-アセチル化 P S 誘導体はさらに、結合脂質部分を有する1個またはそれ以上の残基を有するものを含む（例えば、米国特許第 6,638,513 号など）。本発明の脱 N-アセチル化 P S 誘導体はまた、結合した N-脂肪アシル基を有する1個またはそれ以上の残基を有するものを含む（例えば、N-ラウロイル、N-オレオイルなど）。特に興味深いのは、N-脂肪アシル基含有の残基が例えば P S 誘導体の残基の 50% またはそれ以下を構成し、結果得られた P S 誘導体がさらに水に溶解しうるような P S 誘導体である。本発明の脱 N-アセチル化 P S 誘導体はまた、1個またはそれ以上のアミド化されたシアル酸残基を有するものを含み、その残基は普通は P S 誘導体の非還元末端にアルキル二級アミンを有する。1個またはそれ以上のアミド化されたシアル酸残基を有する P S 誘導体は、例えば、求核置換反応により、脂肪族アミン（例えば、ドデシルアミン、オレオイルアミンなど）を C1 カルボキシル基とカップリングすることにより調製することができる。特に興味深いのは、該 C1 アミド誘導体が例えば P S 誘導体の残基の約 50% またはそれ以下を構成する P S 誘導体である。脱 N-アセチル化 P S 誘導体はさらに、還元もしくは非還元末端、またはその両方で担体とコンジュゲートしているものを含む（例えば、該誘導体の還元末端の残基、該誘導体の非還元末端の残基、またはその両方との結合を通じて）。

【0101】

本発明の脱 N-アセチル化 P S 誘導体は、前述のように 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60 またはそれ以上の二量体エピトープ単位（最小エピトープを規定）のホモポリマー、またはヘテロポリマーとすることができ、該二量体単位は、シアル酸残基またはその誘導体のモノマーまたはポリマーにより隣接または分離されることができる。

いくつかの実施形態では、脱 N-アセチル化 P S 誘導体の N-アセチル化残基は、化合物の全残基の 90% 未満、85% 未満、84% 未満、80% 未満、75% 未満、70% 未満、60% 未満、または 55% 未満を示すものを含む。

【0102】

別の実施形態では、脱 N-アセチル化残基の N-アシル化残基に対する比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、またはそれ以上である。特定の実施形態では、脱 N-アセチル化残基の N-アセチル化残基に対する比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、またはそれ以上である。さらに特定の実施形態では、脱 N-アセチル化残基の N-プロピオニル化残基に対する比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、またはそれ以上である。別の特定の実施形態では、脱 N-アセチル化残基のアルキル化残基に対する比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、またはそれ以上である。別の特定の実施形態では、脱 N-アセチル化残基の N-アセチル化残基に対する比は、1:1、

2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、またはそれ以上である。

【0103】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、その中に含有される脱N-アセチル化PS誘導体に関して均質または不均質である組成物として提供されることができる。例えば、本発明は、1個またはそれ以上の二量体エピトープ構造、脱N-アセチル化PS誘導体内部の二量体エピトープの位置、コンジュゲートされた担体タンパク質の有無、Dp、分子量、脱N-アシル化残基のN-アシル化残基に対する比、N-アシル化度（例えば、N-アセチル化度またはN-プロピオニル化）などに関し、均質または不均質である脱N-アセチル化PS誘導体を有する組成物を意図している。

【0104】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、未修飾の脱N-アセチル化PSの抗原性または免疫原性の全部を向上または少なくとも実質的に維持する一方で、種々の所望の特性、例えば改良された薬理学的特性を提供するために修飾されてもよいことは理解されるであろう。例として、PSはポリマー中の残基数の増減により修飾が可能である（例えば、異なる重合度（Dp）を提供するために）。「Dp」は、ポリマーの残基数を意味する。

【0105】

天然または非天然の異なる残基との置換もまた、例えば脱N-アセチル化やN-アシル化などにおける化学修飾の結果としてなされることができる。例えば、本発明のPS誘導体は、脂質部分により修飾されること（例えば、下記の実施例1および5、ならびに米国特許第6,638,513号（Seid）に記載のとおり）、担体にコンジュゲート（例えば、還元または非還元末端において）されることが可能であり、また、ラクトン、環状シアル酸、イミンおよび還元イミン構造を有してもよい。別の一実施例では、本発明のPS誘導体は、N-脂肪アシル基（例えば、N-ラウロイル、N-オレオイルなど）の結合により修飾されることができる。さらなる実施例では、本発明のPS誘導体は、アルキル二級アミン（例えば、C1アミド誘導体）を有する1個またはそれ以上のシアル酸残基を含むことができ、例えば、求核置換反応により、脂肪族アミン（例えば、ドデシルアミン、オレオイルアミンなど）をC1ケト基とカップリングすることにより調製することができる。

【0106】

髄膜炎菌莢膜多糖体を選択的に結合し、かつ宿主抗原（例えば、宿主ポリシアル酸（ポリシアル酸））にほとんどまたは全く有意に結合しない抗体の産生を提供する宿主において、主題の脱N-アセチル化PSが免疫応答を誘導することができる限り、主題の発明で使用される脱N-アセチル化PSが後述の実施例で開示されたものと同一である必要はない。従って、多くの誘導体（さらに詳細を後述する）が実質的に脱N-アセチル化PSの活性に影響を及ぼすことなく作製されうるということが、当業者には理解されよう。

【0107】

脱N-アセチル化PS誘導体の作製方法

概して、本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）もしくは大腸菌K1（*E. coli* K1）または他の適当な細菌性PS供給源のPSを脱N-アセチル化し、その次に部分的に再N-アシル化することにより生成されることができる。部分的な再N-アシル化は、化合物中の全残基に対して90%未満、85%未満、84%未満、80%未満、75%未満、70%未満、60%未満、または55%未満であって、普通は約10%、約15%、約16%、約20%、約25%、約30%、約40%、または約45%のN-アシル化残基を有する脱N-アセチル化PS誘導体の産生を提供する。この関連で、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PSを提供するために、最終生成物中のアシル化レベルの制御を提供する。概して、再アシル化はアシル化試薬の量を制限することにより制御または抑制される。

【0108】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）もしくは大腸菌K1（*E. coli* K1）または他の適当な細菌性PS供給源のPSを脱N-アセチル化し、

その次に、アミン保護基とアシル基の混合物（例えば、トリハロアセチルとアセチル基）で再N-アシル化することによっても、該PS誘導体が化合物中の全残基に対して90%未満、85%未満、84%未満、80%未満、75%未満、70%未満、60%未満、または55%未満のアミン保護基、普通は約10%、約15%、約16%、約20%、約25%、約30%、約40%、または約45%のアミン保護基（例えば、N-トリハロアシル基）を有するような所望の比で生成されることができる（ただし、該化合物は概ね少なくとも10ないし20残基を有する）。この関連で、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PSを提供するために、アミン保護基を除去して遊離アミノ基との不都合な副反応を回避した後の最終生成物中のアシル化レベルの制御を提供する。アミン保護基の除去は、脱保護残基の遊離アミンのためである。概して、脱N-アセチル基の割合は、アミン保護試薬の量（例えば、トリハロアシル化試薬の量）を制限することにより制御される。

10

【0109】

本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）もしくは大腸菌K1（*E. coli* K1）または他の適当な細菌性PS供給源のPSを、アミン保護マンノサミン（例えば、N-トリハロアシルマンノサミン）とアシルマンノサミン（例えば、N-トリハロアセチルおよびN-アセチルマンノサミン）の混合物が添加された細菌増殖培地中で生合成することにより、細菌によって発現された該PS誘導体が、産生されたPS中の全残基に対して90%未満、85%未満、84%未満、80%未満、75%未満、70%未満、60%未満、または55%未満のアミン保護（例えば、N-トリハロアシル化）

20

【0110】

この関連で、本発明は、所望のアシル化レベルを有する脱N-アセチル化PSを提供するために、アミン保護基を除去して遊離アミノ基との不都合な副反応を回避した後の最終生成物中のアシル化レベルの制御を提供する。概して、脱N-アセチル基の割合は、アミン保護マンノサミン試薬（例えば、N-トリハロアセチルマンノサミン）の量を制限することにより制御される。

【0111】

NmB PSおよび大腸菌K1を含むPSは、本発明におけるPS誘導体およびコンジュゲートならびに他の分子での使用に適する例示的な分子であって、かかる出発原料は、それらの単離および担体へのコンジュゲートに関する方法と同様に、当技術分野で周知である。

30

【0112】

脱N-アセチル化PS誘導体は、従来の任意の適切な手段によって生成が可能である。例えば、一実施態様では、PSの脱N-アセチル化は、天然のPSを塩基性の水性媒体に高温で、例えば約90℃～約110℃、pH約13～約14で（例えば濃度2Mの水酸化ナトリウム中で）接触させることにより、達成されることができる。もう一つの方法として、ヒドラジン水溶液が使用されてよい。この段階におけるN-脱アセチル化度はさまざまであって、少なくとも約85%、約90%、約95%、または約99%から最高約100%の脱N-アセチル化は興味深い。脱N-アセチル化した生成物は、例えば冷却、中和、必要ならば精製、および凍結乾燥により、回収されることができる。

40

【0113】

非水性および生合成的な生成方法は、実施例と同様に、さらに詳細を後述する。

【0114】

非水性の生成方法

特に興味深い一実施形態では、本発明の脱N-アセチル化PS誘導体は、5%未満の水を含有する極性プロトン性有機溶媒中で生成される。本発明者らは、NmB PS誘導体（例えば、実施例1にあるような）を調製するのに用いられる水溶液ベースの方法が、防御的かつ非自己反応性のmAbとよく反応する物質（例えば、SEAM2、3）を比較的少量生成することを見いだしている。理論によって拘束されることなく、この低収率は、

50

P S アミノ基の反応性の弱さ（分子内 COO^- および NH_3^+ 電荷が対になること）、アシル化試薬の加水分解の競合、および／または非還元末端アルデヒドの調製時における過ヨウ素酸塩によるアミノ基の酸化により、前述の N-アセチル基を全部除去できなかったこと、再 N-アシル化を量的に制御できなかったことのうち、一つまたはそれ以上に起因する。

【0115】

本発明者らは、極性プロトン性有機溶媒中で、所望の場合は少量の水の存在下（例えば、ホルムアミド、2.5%水との混合ホルムアミドなど）で、P S をアシル化し、アミノ基を保護し（例えば、トリハロアシル（例えば、トリハロアセチルまたはトリフルオロアセチル）アミドにより）、後にそれを除去して脱 N-アセチル残基の予測可能なフラクシ

10

【0116】

有機溶媒は、任意の適当な溶媒とすることができ、普通は極性プロトン性または非プロトン性有機溶媒である。例示的な該有機溶媒は、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、混合ホルムアミド／ジメチルホルムアミドなど、または有機溶媒と少量%の水（典型的には水が少なくとも約2%ないし2.5%だが、普通は10%未満、5%未満）の混合物を含む。成分、特に P S の溶解性を確保するために、必要に応じて水を加える。

【0117】

20

該分子のアミン基は、適当なアミン保護基で修飾することにより保護される。例示的なアミン保護基は上に記載があり、また、限定されないがカーバメートまたはアミドを含み、N-アルキルおよびN-アリルアミン、イミン誘導体、エナミン誘導体、N-スルホニルなどを含む。特に興味深い一実施形態では、アミン保護基はトリハロアシルアミドであって、普通は C_2-C_{12} 、より普通には C_2-C_{10} 、より普通には C_2-C_8 、最も普通には C_2-C_6 のトリハロアシル基であり、最も普通にはトリハロアセチルまたはトリハロプロピオニルの保護基である。かかる保護基は、好ましくは pH 8 またはそれ以下での安定性、過ヨウ素酸塩存在下での安定性、および下述のごとく除去の容易さで選択される。概して、アミン保護基は過ヨウ素酸塩存在下で N-酸化を防止する。この保護ステップの後に生成される P S 誘導体の形態は、本明細書では「保護 P S 誘導体 (protected PS derivative)」または「保護アシル化 P S 誘導体 (protected acylated PS derivative)」と呼ばれ、該 P S 誘導体は1個またはそれ以上のアミン保護基（例えば、トリハロアシル-保護アミン基）を有する。

30

【0118】

概して、保護 P S 誘導体の産生は、前述の有機溶媒の存在下で少なくとも部分的に脱 N-アセチル化 P S 分子をアミン保護基試薬およびアシル化試薬と接触させることによって達成される。例えば、アミン保護試薬はトリハロアシル化試薬とすることができ、例えば、トリハロ酢酸無水物またはアルキルトリハロ酢酸エステルは特に興味深い（例えば、トリクロロ酢酸無水物、トリフルオロ酢酸無水物、トリフルオロ酢酸エチルエステル、またはトリクロロ酢酸エチルエステルなど）。アシル化試薬は活性化アシル基を供与し、該活性化アシル基は、普通はアセチル基またはプロピオニル基であって、より普通にはアセチル基である。好ましくは、トリハロアシル化試薬とアシル化試薬が混合物として、脱 N-アセチル化 P S 分子と接触する。

40

【0119】

該混合物中のトリハロアシル化試薬とアシル化試薬の相対量は、保護ステップの最終生成物が P S 誘導体において所望の比のトリハロアシル基とアシル基を含有するように供与され、該トリハロアシル基は概ね除去され、最終生成物中に遊離アミンを供与する。例えば、最終脱 N-アセチル化 P S 誘導体生成物における遊離アミンのアシル基に対する比が約 1:10、1:4、または 1:1 である場合、該混合物中に存在するトリハロアシル化試薬のアシル化試薬に対する比は大体で、約 1:10、1:4、または 1:1 である。つ

50

まり、該混合物中のトリハロアシル化試薬の量は、脱保護後の最終脱N-アセチル化PS誘導体生成物中で所望される脱N-アセチル基のフラクションとほぼ等しい（例えば、10%、25%、50%など）。アシル化試薬はまた、該PS誘導体において別に所望の比のアシル基を供与するために、異なる活性化アシル基（例えば、アセチル、プロピオニル）の混合物として供与されることができる。例えば、該PS誘導体において、アセチル化残基のプロピオニル残基に対する比を2:1または1:1にする場合、活性化アシルおよびプロピオニル基を供与するアシル化試薬は、同一または類似の比でアシル化剤混合物中に供与される。

【0120】

保護ステップの後、保護PS誘導体は所望の通りに修飾されることができる。例えば、該保護PS誘導体は、periodidationとそれに続く還元的アミノ化等によって所望の担体にコンジュゲートされることができる。保護基は次に、遊離アミンを脱離するために除去され（例えば、加水分解または還元）、それ故、最終脱N-アセチル化PS誘導体生成物を提供することができる。アミン保護基は、水性強塩基（例えば、pH9かそれ以上）を用いた加水分解によるか、還元（例えばナトリウムシアノボロハイドライドを用いて）によるか、もしくは還元的アミノ化によるコンジュゲート調製時に加えられるアミンによって、除去されることができる（例えば実施例5を参照）。該PS誘導体は次に、当業界で周知の方法に従い単離されることができる。

【0121】

非水性の産生方法はいくつかの利点を有する。第1に、アシル化反応を有機溶媒中で行うことは、使用できるアシル基のタイプにおいて、より大きな柔軟性を提供する。例えば、有機溶媒の使用は、反応性の高い活性化アシル基と同様、水性系における溶解度に関して問題となりうる炭素数4を超える脂肪アシル基の使用を容易にする（例えば、トリフルオロアセチルおよびトリクロロアセチル）。有機溶媒における反応はまた、該試薬を消耗させる水およびOH⁻との競争反応がないか、または極微であるため、より優れたアセチル化度の制御を提供する。結果的に、多糖体とのアシル化反応はそれらが進行して完了するように策定されることができる。

【0122】

非水性のアプローチはまた、保護アミン基の使用を可能にする。多糖体のアミン基が保護されないままの場合、過ヨウ素酸塩の存在下での酸化、ならびに活性化カルボキシル基または非還元末端に導入したアルデヒドと還元末端のケトンとの分子内反応のような、他の望ましくない反応に関与することがある。トリフルオロアセチルまたはトリクロロアセチルは、約8未満のpHで安定であり、過ヨウ素酸塩の存在下で安定であり、また、塩基水溶液中で、またはナトリウムシアノボロハイドライドで還元されて容易に除去され、保護基で誘導体化されたアミンの量によってその割合が制御されるところの脱N-アセチル残基を有するNmB PS誘導体を産生することができるため、好ましい保護基である。

【0123】

PS誘導体生成の方法

別の一実施形態では、PS誘導体はN. meningitides（髄膜炎菌）、特にB群の菌を、N-アシルマンノサミン誘導体が単数または複数存在し、またN-アシルシアル酸の在留物があるPS誘導体の生成を促進する条件下で培養することにより産生される。

【0124】

一実施形態では、N-アシルマンノサミン誘導体はアミン保護基の（「保護マンノサミン」または「アミン保護マンノサミン」）を含むマンノサミンであり、この中でN-トリハロアシルマンノサミンによって例証され、「バクテリアにマンノサミン誘導体を与えること」を達成する。本発明に適した典型的なアミン保護マンノサミンは保護PS誘導体の生成を助けるためにバクテリアのPS合成経路に取り込まれることのできるアミン保護マンノサミンを含む。典型的なアミン保護マンノサミン試薬はN-トリハロアシルマンノサミン、例えばN-トリハロアセチルマンノサミン（例えばN-トリハロアセチルマンノサミン、トリフルオロアセチルマンノサミン）、N-ホルミルマンノサミン等）を含む。アミン保護マンノ

サミンに加え、その培養液は一般的にまたPS誘導体が保護シアル酸の残基およびN-アセチル化されたシアル酸マンノサミンの残基を持つのを助長するためのN-アセチルマンノサミンを含む。

【0125】

理論によって拘束されることなく、アミン保護マンノサミンの存在下で培養される場合、バクテリアの酵素はアミン保護マンノサミンをシアル酸に取り込み、その後さらに莢膜多糖体に取り込まれる莢膜生合成に関係する。標準的な発酵および精製法は、保護基に付着した目的とするモノマーの分留を含有する、保護NmB PS誘導体を産生するのに使うことができる。

【0126】

関連する一実施形態では、N-アシルシアル酸の残基と混合したPS誘導体を目的とする場合、培養液は混合N-アシルマンノサミン試薬を含む。例えば、N-アシルマンノサミンは飽和または不飽和アシル基特に興味深いアセチルまたはプロピオニル基を持つ、普通はC₁-C₅、より普通にはC₂-C₅、より普通にはC₂-C₄、より普通にはC₂-C₃の飽和アシル基を含むことが可能である。このような混合N-アシルマンノサミン試薬の存在下でのバクテリアの培養は N-アシルシアル酸残基、例えば、N-アセチルシアル酸、N-プロピオニルシアル酸などを混合したPS誘導体の生成を助けることができる。特に興味深い一実施形態では、バクテリアは保護マンノサミン（例えばN-トリハロアシルマンノサミン）およびN-アシルマンノサミン（例えばN-アセチルマンノサミンやN-プロピオニルマンノサミン）の混合物の存在下で培養される。

【0127】

特に興味深い一実施形態では、髄膜炎菌、好ましくはB群株は、N-アシルマンノサミン（例えばN-アセチルマンノサミン）およびN-トリハロアシルマンノサミンの混合物の存在下で培養される。特に興味深い実施形態では、前述の菌は無莢膜株であり、追加のN-アセチルマンノサミンが培養液にない場合、PS莢膜合成において欠陥がある（例えば1種類以上の酵素の欠陥のため、増殖培地にN-アセチルマンノサミンを追加しないと菌が莢膜PSを合成できない）。例えば、株は、NmB M7株のように、N-アセチル-D-グルコサミン-6-リン酸2エピメラーゼに欠陥がある可能性がある。

【0128】

前述の培養物の相対的なマンノサミン試薬の量（例えばN-トリハロアシルマンノサミンやN-アセチルマンノサミンの割合）は、生合成の最終生成物が目的とする割合の異なるシアル酸残基および／またはPS誘導体中の誘導体（例えばPS誘導体上のトリハロアシル化された残基）を含むように規定することができる。一般的に、保護基（例えばトリハロアシル化基）は最終的なPS誘導体生成物中に遊離アミンを与えるために取り除かれる。例えば、最終的なde-N-アシル化PS誘導体生成物中のアシル化残基に対する遊離アミンの割合が1:10、1:4、または1:1である場合、培養液中のN-トリハロアシルマンノサミンの量は脱保護後の最終的な脱-N-アシル化PS誘導体生成物中の脱-N-アセチルシアル酸基の目的とする割合におおよそ等しい。（例えば10%、25%、50%など）

【0129】

同様に、培養物中の“保護されていない”N-アシルマンノサミン（アミン保護基を含まないが、例えばN-アシル基のようにアセチルまたはプロピオニル基で構成されるマンノサミン）の相対的な量は、PS誘導体中で異なる程度にアシル化されたシアル酸残基の目的とする割合に必要な量を供給することを規定することができる。例えば、PS誘導体のアセチル化された残基のプロピオニル化された残基に対する比を2:1または1:1とするとき、N-アセチルマンノサミンおよびN-プロピオニルマンノサミンは培養物中に同じまたは似た割合で供給される。

【0130】

前述のPS誘導体は、当技術分野で周知の方法で菌から単離することができる。PS誘導体がアミン保護基を含む場合、このようなPS誘導体は特に、さらに改変のあるPS誘導体、例えば、アルキル二級アミン、特にC1アミドをPS誘導体の非還元末端位に供与するためのコ

10

20

30

40

50

ンジュゲート（非還元末端の過ヨウ素酸酸化などによる）やシアル酸残基を修飾するのに向いている。改変の完了後、トリハロアキル保護基は前述のように取り除くことができる。例えば、保護基は還元的アミノ化（例えばナトリウムシアノボロハイドライド）またはさらなる還元（例えばナトリウムシアノボロハイドライドまたはpH9以上のアルカリで処理）で遊離アミンを供与することにより取り除くことができる。

【0131】

断片、再アシル化およびその他の改変

PSの残留物質は通常、N-脱アセチル化によって生成され、その残留物質は一般的に3,000から50,000ダルトンの範囲の平均分子量を持つ。本発明が断片だけでなくPSの完全長の誘導体の使用を意図する一方で、PS断片の誘導体は特に興味深い。

10

【0132】

所望の場合は、本発明の脱-N-アセチル化PS誘導体を供給するための再アシル化は脱-N-アセチル化PSをpH8-9程度の水溶性の溶剤（水酸化ナトリウムなど）で再懸濁しその後適切な無水アシルを加えることによってなすことができる。一実施形態では、多糖類およびアシル化試薬（無水アセチルまたは無水プロピオン酸など）両方が有機溶剤／水溶液（ホルムアミドまたはジメチルホルムアミドに水を2% (vol./vol.)加えたものなど）に供給される。この実施形態は特により管理されたレベルの再アシル化を助長する。本発明の方法は1モル当量未満、0.75モル当量未満、0.5モル当量未満、0.25モル当量未満、0.1モル当量未満、0.05モル当量未満、0.025モル当量未満、0.02モル当量未満の無水酸またはアシル化試薬（例えばO-アシルヒドロキシコハク酸などのアシル活性エステル）の使用を含む。

20

【0133】

O-アシル基はpHを12程度に上げることで取り除くことができる。このpHはその後（塩酸などを加えることにより）8程度まで下げられ、前述の誘導体が透析などによって所望通り精製される。反応生成物は、所望通り、さらに精製・凍結乾燥することができる。

【0134】

脱-N-アセチル化PS誘導体の結果としてできるN-アシル化の程度は一般的に90%未満、85%未満、84%未満、90%未満、80%未満、75%未満、70%未満、60%未満、55%未満、90%未満であり、通常10%、15%、16%、25%、30%、40%もしくは45%より大きい。脱-N-アセチル化PS誘導体の分子量は様々で、この文中に書かれた脱-N-アセチル化PS誘導体は約0.5 kDa（ニ糖類など）から約80 kDa、約1 kDaから約70 kDa、約2 kDaから約60 kDa、約3 kDaから約50 kDa、約5 kDaから約25 kDa、約10 kDaから約80 kDa、約20 kDaから約60 kDa、約30 kDaから約50 kDaの範囲におよび、通常は約0.5 kDaから約10 kDaである。

30

【0135】

脱-N-アセチル化PSコンジュゲート

脱-N-アセチル化PS、または好ましくは保護アミンPSは、脱-N-アセチル化PS-担体複合体を供与するため、担体にコンジュゲートすることができる。コンジュゲートされたPS-担体複合体は複数の担体分子、複数のPS分子、またはその両方を含むことが可能である。

【0136】

前述のように、前述のコンジュゲートのPS誘導体は、前述のように最小限のエピトープを決定するダイマーとして、またはポリマー単位（前述のエピトープを決定する2個以上のダイマー単位など）として供与されることが可能である。PS誘導体がポリマー構造である場合、そのPS誘導体はホモポリマー状またはヘテロポリマー状である。その組成は脱-N-アセチル化PS、または好ましくは保護アミンPS誘導体の非還元、還元末端またはその両方に付着した追加の残基から構成されることが可能である。

40

【0137】

一実施形態では、担体はタンパク質、ペプチド、T細胞アジュバントまたは免疫応答を強化する能力があるその他の化合物である。タンパク質はウィルス、細菌、寄生虫、動物、および真菌のタンパク質からなるが、それに制限されるものではないグループから選ぶことができる。一実施形態では担体はアルブミンである。その他の選択肢として、破傷風

50

トキシソイド、ジフテリアトキシソイド、髄膜炎菌外膜タンパク複合体（例えば US4,707,543 ; US6,476,201; US6,558,677を参照）または細菌外膜（組換え髄膜炎菌ポリリンBなど）が担体となる。このような担体は生化学または製薬会社から得るか、標準的な手法（Cruise, J M(ed.) Conjugate Vaccines in Contributions to Microbiology and Immunology vol. 10 (1989)）で用意することができる。担体としての使用に適したT細胞エпитープを含む合成ペプチドは、“一般的な”T細胞エピトープ（Panina-Bordignon et al 1989 Eur J Immunol 19:2237）または非天然Pan DRエピトープペプチド（PADRE）E（del Guercio et al 1997 Vaccine 15:441）を含んでもよい。担体として機能しうる他のタンパクを含むその他の試薬は免疫学の技術分野における通常の技術として知られている。

【0138】

本発明におけるPS誘導体のコンジュゲートのための例示的な手法は、US Pat. Nos. 4,727,136; 5,811,102（B群髄膜炎菌不飽和C3-5N-アシル誘導体多糖類コンジュゲートの記載）、US 5,969,130; および US 6,080,589に記載されたようにPSコンジュゲートを含むが、必ずしもそれに制限されない。例えば、1個以上の担体タンパク質の共有結合に使用するため、コンジュゲートは、de-N-アセチル化PS誘導体の非還元末端、還元末端、またはその両方にアルデヒド基を導入することで達成できる。このようなことは、PSまたはPS誘導体を、例えばメタ過ヨウ素酸ナトリウムなどに接触させて過ヨウ素酸化することにより達成できる。

【0139】

脱-N-アセチル化PS誘導体が誘導体化されていないアミノ基で構成される場合、一定の制限が脱-N-アセチル化PS誘導体を担体タンパク質などの担体に結合させる手順に課される。この実施形態では、担体は一般的に、EDACで活性化されたカルボキシル基における、ヒドラジドまたはアジピン酸ジヒドラジドの担体タンパク質との反応を通じて、1個以上のアジド（ヒドラジドまたはアジピン酸ジヒドラジド）基を含むように改変されている（US Pat, No. 6, 632,437などを参照）。ヒドラジドアミノ基のpKaが約2.5であり、またヒドラジドは強い求核試薬であるので、イミンコンジュゲート反応は、担体タンパク質および多糖類の1級アミンが実質的に完全にプロトン化されているので非反応であるpH5.5-7.5あたりで行われるのが可能である。

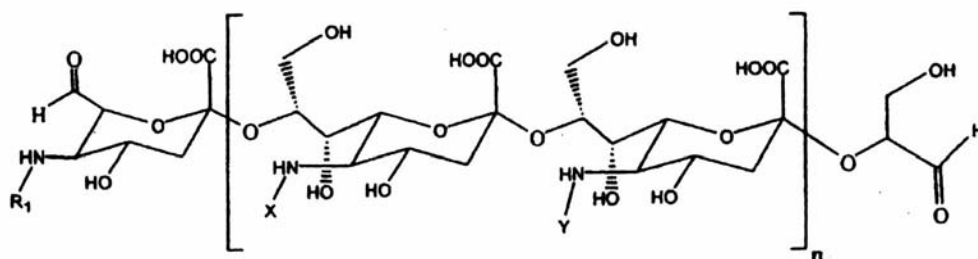
【0140】

PS誘導体-タンパク質コンジュゲートワクチンはサイズ排除クロマトグラフィー（ToyoPerl HW-45F）で精製される。タンパク質濃度はLowryタンパク質定量法、コンジュゲートした多糖類の量はレゾルシノール定量法（Svennerholm 1957 Biochim biophys Acta24:604）によって決定される。タンパク質と多糖類が共有結合していることを確実にするため、コンジュゲートワクチンはSDS-PAGE上で分離され、タンパク質と多糖類は、多糖類を検出するために、ポリクローナル抗担体タンパク質抗血清および抗PS mAbsを使用して、ウェスタンブロットによって別個に検出される。

【0141】

一実施例では、脱-N-アセチル化PS誘導体が二量体エピトープを有する場合、脱-N-アセチル化PS誘導体は担体に結合を提供するよう修飾されることができ、次式により表される構造を有する：

【化12】



FORMULA VIII

10

20

30

40

50

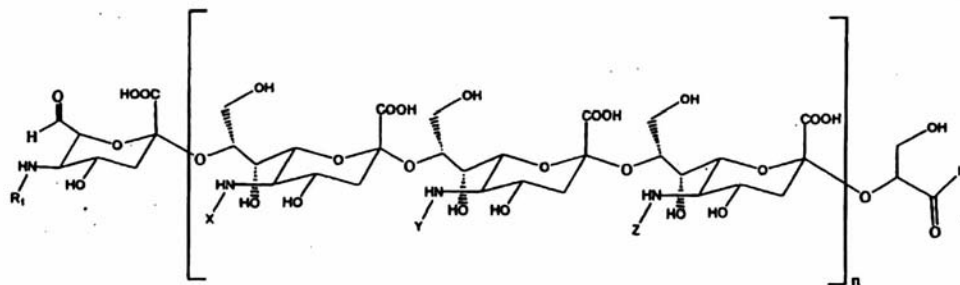
ここでX、Yは前述のように定義され、R1はHまたはアシル基（例えばアセチル基）である。他の実施例では、R1はH；飽和または不飽和アシル基（例として飽和または不飽和C2-18アシル基、飽和または不飽和C2-16アシル基、飽和または不飽和C2-12アシル基、飽和または不飽和C2-10アシル基、飽和または不飽和C2-8アシル基、飽和または不飽和C2-6アシル基、飽和または不飽和C2-4アシル基、飽和C2-4アシル基）；N-脂肪酸アシル基（例：N-ラウロイル、N-オレオイルなど）；または脂肪酸アミン（ドデシルアミン、オレオイルアミンなど）とは独立して選択される。1つの実施例ではR1は（例えばUS5,576,002中に記載されているように）n-ブタノイル、イソブタノイル、n-ペンタノイル、n-ヘキサノイル、n-ヘプタノイルまたはn-オクタノイルなどのC4からC8のアシル基であるか、US6,350,449に記載されているような不飽和C3-C5アシル基である。

10

【0142】

脱-N-アセチル化PS誘導体が三量体の反復で構成される別の一実施形態では、脱-N-アセチル化PS誘導体は担体に結合を提供するよう修飾されることができ、次式により表される構造を有する：

【化13】



20

FORMULA IX

ここで、

X、YおよびZは独立したHまたはアミン保護基；または、飽和または不飽和アシル基（通常は飽和アシル基）、但し、少なくともX、YおよびZの1つはHまたはトリハロアシル基；また少なくともX、YおよびZの1つは飽和または不飽和アシル基、通常は飽和アシル基で、その中に特に興味深い実施形態があり、それらにおいては少なくともX、YおよびZの1つはH（またはアミン保護基）、少なくともX、YおよびZの1つはアセチル基、そしてX、YおよびZの1つはプロピオニル基である；

30

nは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、600またはそれ以上であり、通常はおよそ4以上の残基、より通常にはおよそ10以上の残基（ポリマー化の程度（Dp）が2程度から60程度、10程度から50程度、30程度から50程度、10程度から20程度、12程度から18程度であり、Dpが2程度から10程度が特に興味深い）；そして

R1はH、アミン保護基、またはアシル基（例としてアセチル基などの飽和アシル基）である。他の実施例では、R1はH；アミン保護基；飽和または不飽和アシル基（例として飽和または不飽和C2-18アシル基、飽和または不飽和C2-16アシル基、飽和または不飽和C2-12アシル基、飽和または不飽和C2-10アシル基、飽和または不飽和C2-8アシル基、飽和または不飽和C2-6アシル基、飽和または不飽和C2-4アシル基、飽和C2-4アシル基）；N-脂肪酸アシル基（例としてN-ラウロイル、N-オレオイル）；または脂肪酸アミン（例としてドデシルアミン、オレオイルアミンなど）とは独立して選択される。一実施形態ではR1は（例えばUS5,576,002中に記載されているように）n-ブタノイル、イソブタノイル、n-ペンタノイル、n-ヘキサノイル、n-ヘプタノイルまたはn-オクタノイルなどC4からC8のアシル基であるか、US6,350,449に記載されているような不飽和C3-C5アシル基である。

40

【0143】

脱-N-アセチル化PSおよび脱-N-アセチル化PSコンジュゲートの免疫原性

50

単離された脱-N-アセチル化PSは、さらなるコンジュゲートがあろうとなかろうと、または提示の構造があってもなくても、免疫原性を持つか、あるいはその代わりに、その免疫原性がコンジュゲートから起こる可能性がある。免疫原性を測定する方法は当業者には周知であり、主に作成物注入後の様々な時点での濃度、結合活性、アイソトープ分布などの血清抗体の測定を含む。より大きな免疫原性は、より高い力価および／または抗体の寿命の伸びによって反映される。免疫原性は、インビトロバクテリア定量法や、受動的な保護を適切な動物の暴露モデルの感染または疾病に与えるために免疫化した動物の血清の能力で測定が可能である。免疫原性は治療を受ける患者の集団、または患者集団の免疫応答を模倣する集団の中で測定が可能である。

【0144】

特定の物質の免疫原性を決定する特に好ましい手段は、まず動物（例としてマウス）の血清を、免疫化前と、脱-N-アセチル化PSで初回抗原刺激し追加の脱-N-アセチル化PSコンジュゲートの投与でブーストした後の両方の時点で得ることである。これに続いて、脱-N-アセチル化PSに結合している免疫化後の血清の強度を、ELISAを用いて確認し、対照偽免疫化動物の対応する結果と比較する。

【0145】

本発明の脱-N-アセチル化PSは、脱-N-アセチル化PSで初回抗原刺激されておらず、同じPSコンジュゲートを接種された個体の反応と比較した場合、自己抗体を避け、かつPSコンジュゲートに対して強化された抗体反応を助長することができるPSコンジュゲート、例としてNmB PSコンジュゲート、ワクチンなどに対する免疫応答を、初回抗原刺激することができる。

【0146】

抗原性組成物の製剤形態

「抗原組成物」「抗原性組成物」または「免疫原性組成物」は、ここでは脱-N-アセチル化PSまたは本発明のコンジュゲートを便宜上総称して指す。N-脱アセチル化NmB PS、NmB PSコンジュゲート、またはその両方が特に興味深い。NmB、大腸菌 K1、またはガン細胞に対する抗体を誘発するのに有用な組成物は本発明により意図される。

【0147】

ワクチンとして使用される組成物は免疫原的に効果的な量の抗原、および必要に応じてその他の互換性がある成分から構成される。“免疫原的に効果的な量”とは、その量の個体への投与、同じまたは異なる抗原組成物の、一連の投与の一部としての単回投与で、治療、または例えばナイセリアによる感染、特に髄膜炎菌、より特定のにはB群髄膜炎菌；または大腸菌K1による感染による症状または疾病の予防に有効な抗体反応を誘発するのに有効である量である。この量は治療を受ける個体の健康および肉体的条件、年齢、治療を受ける個体の分類学的グループ（例としてヒト、ヒト以外の霊長類、霊長類など）、その個体の抗体を作る免疫システム、目的とする保護の程度、ワクチンの製剤形態、治療する臨床家の医学的状況の診断、および他の関係する要素によって異なる。その量は定期的な治験によって決定することができ、相対的に広い範囲にわたることが予想される。調剤治療は単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュール（例としてブースター投与を含む）が可能である。このワクチンは他の免疫調節性剤と組み合わせて投与できる。

【0148】

本発明の組成物は、医薬的に許容される賦形剤中に、水溶液、しばしば生理食塩水のような溶液として供給することができ、または粉状で供給することができる。本発明の組成物は、本発明の1個の脱-N-アセチル化PS誘導体および1個のアジュバントで構成されることが可能である。ヒトに使用できる、既知の適当なアジュバントは、ミョウバン、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、MF59（4.3 % w/v Squalene、0.5 % w/v Tween、0.5 % w/v Span 85）、CpG含有核酸（シトシンがメチル化されていないもの）、QS21、MPL、3 DMPL、Aquilaからの抽出物、ISCOMS、LT/CT変異体、poly（D,L-lactide-co-glycolide）（PLG）微小粒子、Quil A、インターロイキン、などを含むが、必ずしもこれに留まるものではない。実験動物に対しては、Freund's、N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglu

10

20

30

40

50

tamine (thr-MDP)、N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (CGPl 1637, nor-MDPと呼ばれる)、N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-di palmitoyl-Sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (CGP 19835A, MTP-PEと呼ばれる)、および、バクテリア、monoPhosphoryl lipid A、trehalose dimycolate、および細胞壁骨格 (MPL+TDM+CWS) から抽出した3種類の成分を含むRIBIを2% squalene/Tween 80乳濁液中に入れたものを使用することができる。アジュバントの効果は免疫原性抗原に対する抗体の量を測定することで決定できる。

【0149】

さらに組成物の効果を強める例示的なアジュバントは下記を含むが、それに限定されない。：(1) 水中油型乳剤形態 (ムラミルペプチド(下記例参照)、または細菌細胞壁成分のようなその他特定の免疫賦活性剤があってもなくてもよい。) 例として(a)Microfluidizerを用いてサブミクロンの粒子形状に製剤された、5% Squalene、0.5% Tween80、および0.5% Span 85 (任意にMTP-PEを含む) を含有する MF59TM (W090/14837; Chapter 10 in Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995)、(b) サブミクロンの乳剤にマイクロ流体化された、もしくはより大きな粒子サイズの乳剤を産生するためボルテックスで攪拌された、10% Squalane、0.4% Tween80、5% pluronic-blocked polymer L121、およびthr-MDPを含有する SAF (c) 2% Squalane、0.2% Tween 80、および1種類以上の細菌細胞壁成分、例としてmonophosphoryl lipid A (MPL)、trehalose dimycolate (TDM) および細胞壁骨格 (CWS)、望ましくはMPL+CWS+(Detox?)を含む、RIBI? adjuvant system (AS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) ; (2) QS21またはStimulon? M (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) のようなサポニンアジュバントは使用可能、またはISCOMs (免疫賦活性複合体) のような、それより作られる粒子。ISCOMsは、例えばWO 00/07621のような追加の洗浄剤を欠いてもよい。(3) 完全なFreud's Adjuvant (CFA) および不完全なFreud's Adjuvant (IFA) ; (4) インターロイキン (例としてIL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (W099/44636) など)、インターフェロン(例としてガンマインターフェロン)、マイクロファージコロニー刺激因子 (M-CDF)、腫瘍壊死因子 (TNF) などのようなサイトカイン; (5) monophosphoryl lipid A (MPL) または3-O-deacylated MPL (3dMPL)、例としてGB-2220221、EP-A-0689454、pneumococcal saccharides、例としてWO 00/56358とともに使用されるとき、任意にミョウバンの実質的非存在下で; (6) 3dMPLと、例えばQS21および/または水中油乳剤、例として、EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231との組み合わせ; (7) CpGモチーフ (Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr opin Mol Ther 2001 3: 15-24; Roman et al., Nat. Med, 1997, 3, 849-854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al., J Immunol 1998, 160, 870-876; Chu et al., J. Exp. Med, 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al, J. Immunol 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al, J. Immunol, 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al, Cell Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey et al. J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina et al, J. Immunol. 1991, 147, 1759-1764; Yi et al, J. Immunol, 1996, 157, 4918-4925; Yi et al, J. Immunol, 1996, 157, 5394-5402; Yi et al, J. Immunol. 1998, 160, 4755-4761; and Yi et al, J. Immunol, 1998, 160, 5898-5906; International patent applications W096/02555, W098/16247, W098/18810, W098/40100, W098/55495, W098/37919 および W098/52581) で構成されるオリゴヌクレオチド、すなわち、シトシンがメチル化されていない場合、少なくとも1個のCGジヌクレオチドを含むもの; (8) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル、例としてW099/52549; (9) ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性物質とオクトキシノールとの併用 (W001/21207)、またはポリオキシエチレンアルキルエーテル、またはエステル界面活性物質と少なくとも1種類の、オクトキシノールのような非イオン界面活性物質の併用 (W001/21152); (10) サポニンと免疫賦活性のオリゴヌクレオチド (例としてCpGオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド) (WO 00/62800) ; (11) 免疫賦活薬および金属塩粒子、例としてWO 00/23105 ; (12) サポニンおよび水中油乳剤、例としてWO 99/11241 ; (13) サポニン (例としてQS21) + 3d MPL + IM2 (任意に+ステロール)、例としてWO 98/57659 ; (14) 前述の組成物の効力を強化する免疫賦活剤として作用するその他の物質。N-aCetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-25 acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutarninyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-Sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine MTP-PE)などのムラミルペプチド。

【0150】

抗原組成物は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、ブドウ糖、ショ糖、マグネシウム、炭酸塩などの他の成分を含むことが可能である。その組成物は医薬的に許容される補助的な物質、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを、pHの調整、緩衝液、毒性調整剤などにより生理的条件下に近づけるため、必要に応じて含むことができる。これらの組成中の抗原の濃度は広い範囲にわたる可能性があり、主に液量、粘性、体重などにより、投薬の特定の方法と患者の必要性に従って選択される。結果として得られた組成は、溶液、懸濁剤、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、ジェル、クリーム、ローション、軟膏、煙霧剤などの形態となることができる。

10

【0151】

本発明の医薬製剤の抗体の濃度は広い範囲すなわち、重量で約0.1%以下、通常は2%またはそれ以上から20%~50%、またはそれ以上まで、で変化することが可能であり、主に液量、粘性などにより、選択された投薬の特定の方法に従って選択される。

20

【0152】

脱-N-アセチル化PSおよび脱-N-アセチル化コンジュゲートは単独で、あるいは従来のPS誘導体および／またはPSコンジュゲートと組み合わせて使用できる。組み合わせて使用する場合、様々な組成物を同じまたは異なる剤形に供給することができる。異なる剤形で投薬された場合、その組成物は同じまたは異なる用法 (例として同じまたは異なる経路で、同時または異なる時点 (例として同日または別の日) など) で投与することができる。一般的に、本書に記載されている脱-N-アセチル化PSおよび脱-N-アセチル化PSコンジュゲートの投与は、下記に詳細が記載されているように、連続して、同時に、または混合して行

30

ってよい。好ましいのは、投与は連続で、脱-N-アセチル化PSコンジュゲートの反復投与である。典型的な免疫化療法はより詳細が後述されている。

【0153】

一般的に免疫化は、その組成物を、経口、経鼻、経鼻咽頭、非経口、腸内、胃内、局所的、経皮的、皮下、筋肉内、錠剤、固形、散剤、液体、噴霧剤の形態での投与などの適切な経路を通じて、局所または全身に、追加の賦形剤のあるなしにかかわらず投与することによって達成される。非経口的な投薬可能な組成物の実際の調製方法は当業者には周知または明白となり、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) のような出版物により詳しく記載されている。

【0154】

脱-N-アセチル化PSおよび前述の関連した化合物は、経口的に投与したとき、消化されないように保護されるべきであることが認識されている。これは典型的には、脱-N-アセチル化PSまたは脱-N-アセチル化PSコンジュゲートを酸または酵素加水分解に対して耐性を持たせる組成物と複合させるか、リポゾームのような適切な耐性のある担体に詰め込むことで達成される。興味深い化合物を保護する方法は当該技術分野では周知である。

40

【0155】

血清の半減期を強化するため、注入される抗原の調製もまたカプセル化し、リポゾームの内腔に導入し、コロイドとして調製することができ、あるいはペプチドの半減期を延長する他の従来の技法を利用することができる。リポゾームを調製するには、例としてSzoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980), U.S. Patents Nos. 4,235,871, 4

50

,501,728および4,837,028に記載されているような様々な手法が使用できる。調製はまた、抗原調製の放出および投与に対して制御放出または持続放出の形態を混在した、または連続した方法で与えることができる。

【0156】

前述の組成物は、ナイセリアの疾患にかかる危険のある被験体に、予防または少なくとも部分的に発病およびその合併症を抑止するために投与される。これを達成するのに適切な量は、“治療効果のある用量”として定義される。治療に用いるのに効果的な量は、例えば抗原組成物、投与方法、患者の体重および一般的健康状態、および処方する内科医の判断によるであろう。抗原組成物の単回または複数回投与は、投与量、および患者に必要なかつ許容される頻度、そして投与の経路によって管理することができる。一般的に、免疫化は、被験体の免疫応答を誘発するために与えられ、本発明は免疫化が、被験体のポリシアル酸に有意に交差反応する、検出可能な抗体を誘発せず、かつ髄膜炎菌や大腸菌K1に対して殺菌性のある抗体生成を含むことができる利点がある。別の言い方をすれば、本発明の組成物での免疫化は、ホストのシアル酸に対する、臨床的に関連する自己抗体の反応を一切誘発しない。

10

【0157】

免疫化療法

脱-N-アセチル化PSコンジュゲートは、検出可能なホストの自己抗体生成がほとんどまたは全くないホストに選択的抗PS抗体、特に、抗NmB PS抗体の生成を助長するように投与される。

20

【0158】

具体的な実施形態では、本書に記載されている抗原組成物は連続して投与される。まず、免疫原的に効果がある量の脱-N-アセチル化PS（担体とコンジュゲートしていてもよく、賦形剤のある場合とない場合がある）を被験体に投与する。初回の用量は一般的に免疫応答を誘発させるのに効果がある量（例としてBおよび／またはT細胞の賦活化）である。初回の免疫化の量は一般的に、70kgの患者に対して約0.001mgから約1.0 mg の範囲であり、より一般的には70kgの患者に対して約0.001mgから約0.2mg の範囲、通常は約0.005mgから約0.015mg の範囲である。特に抗原が、体腔内や臓器の内腔など、隔離した部位に投与され、血流中に投与されない時には、1日に1人の患者につき0.001から約10mgまでの用量を使うことができる。実質的に高用量（例として10から100 mg以上）は、経口、経鼻、または局所的な投与で可能である。

30

【0159】

初回の脱-N-アセチル化PSの抗原組成物投与後、第2の抗原組成物（例として脱-N-アセチル化PS、任意に、コンジュゲート型のもの、賦形剤のある場合とない場合がある）の治療効果のある用量を、被験体が初回投与への曝露により免疫学的に初回刺激を受けた後に、被験体に投与する。このブースターは患者の反応および状態によって、初回の免疫化より数日後、数週間後、または数ヵ月後に投与される。

【0160】

初回の抗原組成物に対する免疫応答の存在は周知の手法（例として免疫化の前後に個体から血清を取り、その個体の免疫状態の変化を示すことによる、例えば免疫沈降定量法、またはELISAまたは殺菌定量法、またはWestern Blot、またはフローサイトメトリー定量法など）および／または2回目の注入に対する免疫応答の大きさが、2回目の注入（例として免疫学的初回刺激）に使われた物質の組成物で初めて免疫化された対照動物のそれと比較して高いことを示すことによって決定できる。

40

【0161】

ある好ましい実施形態においては、調製された第3の抗原組成物の治療効果のある用量が、その個体が初回刺激を受け、かつ／または第2の抗原組成物に対する免疫応答を備えた後に被験体に投与される。第3の抗原組成物は脱-N-アセチル化PSまたは脱-N-アセチル化PSコンジュゲートにすることができる。第3のブースターは被験体の応答および状態によって、2回目の免疫化の数日後、数週間後、または数ヵ月後に投与できる。

50

【0162】

第2の抗原組成物に対する初回刺激および／または免疫応答の存在は、第2の抗原組成物に対する免疫応答を検出するのに使用されたのと同じ手法で決定できる。第2の抗原組成物に対する初回刺激および／または免疫応答の存在はまた、2回目の免疫化の後、以前の経験に基づいて、免疫応答が起こるのに十分な期間一例として2、4、6、10または14週待つことにより推定できる。第2の抗原組成物のブースト用量は典型的な場合、約0.001mgから約1.0 mgの抗原で、免疫原の性質および免疫化の経路によって変わる。

【0163】

本発明はさらに、第4、第5、第6の抗原組成物を使用した第4、第5、第6またはそれ以上のブースター免疫化を意図する。

【0164】

1つの実施例では、脱-N-アセチル化PSまたは脱-N-アセチル化PSコンジュゲートが少なくとも1回、通常は少なくとも2回投与され、またいくつかの実施例では2回以上投与される。

【0165】

1つの実施例では、脱-N-アセチル化PS誘導体または脱-N-アセチル化PS誘導体コンジュゲートが初回の抗原組成物として免疫応答を初回刺激するように投与される。続いて投与される抗原組成物（例えばブースター投与）は脱-N-アセチル化PS誘導体または脱-N-アセチル化PS誘導体コンジュゲートが可能であり、または初回刺激された第1の抗原組成物に対する免疫応答をブーストする抗原性組成物が可能であるが、抗原性組成物は必ずしもホストの自己抗体応答を回避したり軽減したりするようデザインされない。この実施例では、最初の初回刺激投与後に投与される抗原組成物は、例えば、ベシクル製剤（例として外膜小胞および／または微小胞製剤）、興味深い細菌の単離された1種類以上のタンパク質製剤（例としてPorBまたは髄膜炎菌からなる製剤）などが可能である。理論にとらわれず、それについての本発明の脱-N-アセチル化PS誘導体またはコンジュゲートの最初の初回刺激投与は免疫応答を最小限にホストの抗原と交差反応性がある抗体の生成に対して向け、自己反応性の抗体から遠ざける。いったんホストの免疫がこの方法で初回刺激されれば、たとえブースター投与が脱-N-アセチル化PSを含んでいても、そうしない場合に自己免疫応答を誘発する抗原への曝露は十分な自己抗体の生成が得られない結果となるであろう。

【0166】

1つの実施例では、抗原組成物は、髄膜炎菌または大腸菌K1に免疫学的にナイーブな哺乳類の被験体（例としてヒト）に投与することができる。特定の実施例では、この哺乳類はおよそ5歳以下、好ましくはおよそ2歳以下のヒトの子どもで、抗原組成物は次の1つ以上の時点で投与される：出生後2、3、4、5、6、7、8、9、10、11ヶ月、1年、15、18、21ヶ月、または2、3、4、5歳時。

【0167】

一般的に、哺乳類への投与は、初めて病気の症状の徴候、または、可能性のある、もしくは実際に感染または病気への曝露の最初の徴候（例としてナイセリアまたは大腸菌K1への曝露による）が見られる前に始めるのが好ましい。

【0168】

特定の抗PS抗体に基づく診断法および治療法

脱-N-アセチル化PSは、誘導体でもコンジュゲートでも、本書に記載されているように抗体を産生するために使用でき、その抗体を試薬として診断の測定法および抗体を元にした治療に使用できる。このように、一面では、本発明は選択的に髄膜炎菌のPS、特にNmB PS；または大腸菌K1 PSを結合し、ホストのポリシアル酸をほとんどまたは全く結合しない抗体からなる組成物を特徴とする（すなわち、抗体が有意にホストの組織と交差反応性をもたない）。抗PS抗体（特に抗NmB PS、抗大腸菌K1 PSまたは抗ガン細胞抗体）は、単クローン性、または多クローン性が可能で、適切な賦形剤を供給されることが可能である。いくつかの実施例では、抗PS抗体は担体上で不動化され、またはバイアルのような容

10

20

30

40

50

器、特に滅菌バイアルに入れられ、下記により詳細が記載されているように、診断または治療法に使用するためにラベリングされる。

【0169】

診断法

脱-N-アセチル化PSと反応性がある抗体は、免疫診断の技法を用いて、生物学的サンプル中の髄膜炎菌莢膜多糖類（PS）、または大腸菌K1PSを検出するために使用することができる。この文脈において、本発明はこのような脱-N-アセチル化PS抗体が、宿主由来のPSAへの結合がほとんどまたは全く検出不可能なサンプル中の細菌のPSを検出するのに役に立ち、それによって誤った陽性反応が出る頻度を減らすという利点を提供する。適切な免疫診断の技法は、競合、直接反応、またはサンドイッチタイプ測定法などを含むが、必ずしもそれだけに限らない。このような測定法には、Western Blots; 凝集試験、ELISAのような酵素標識および仲介免疫試験; ビオチン／アビジン型測定法; 放射免疫測定法; 免疫電気泳動法; 免疫沈降などが含まれる。反応は一般的に、蛍光性、化学発光性、放射性、酵素的標識のような標識の明確化、または色素分子、またはその他の、サンプル中のPSおよび抗体またはそれによって反応した抗体中の複合体の組成を検出する手法を含む。

【0170】

前述の測定法は一般的に、PS抗体複合体が結合している固体相担体から液体相での非結合の抗体の分離を含む。本発明の実践で使用可能な固体の担体はニトロセルロース（例として膜中またはマイクロタイターウェルの形）; ポリ塩化ビニル（例としてシートやマイクロタイターウェル）; ポリスチレンラテックス（例としてビーズまたはマイクロタイタープレート）; ポリフッ化ビニリデン; ジアゾ化紙; ナイロン膜; 活性化ビーズ; 磁氣的反応性ビーズなどのような基質を含む。

【0171】

典型的には、固体の担体はまず、成分が十分に担体に対して不動化される適切な結合条件の下で、最初固体相の成分（例えば抗PS抗体）と反応させる。時には担体に対する不動化が、よりよい結合特性をもつ、または、抗体結合活性または特異性を顕著に失わず、担体上での抗体の不動化を助長するタンパク質への抗体の最初の結合によって強化できる。適切な結合タンパク質は、牛血清アルブミン(BSA)を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵白アルブミン、その他の当業者には周知のタンパク質などの高分子を含むが、それに限定されない。抗体を担体に結合させるのに使用できる他の分子は、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどを含む。このような分子およびこれらの分子を抗原にカップリングする手法は、当業者には周知である。例えば、Brinkley, M. A. Bioconjugate Chem. (1992) 3:2-13; Hashida et al., J. Appl. Biochem. (1984) 6: 56-63; Anjaneyulu and Staros, International J. of Peptide and Protein Res. (1987) 30: 117-124。を参照のこと。

【0172】

固体の担体を固体相の成分と反応させた後、非不動化固体相成分は洗浄により担体から取り除かれ、担体に結合した成分は、次に適切な結合条件下でリガンド部分（例えばPS、特にNmB PSまたは大腸菌PS）を含むと思われる生物学的サンプルに接触させる。洗浄して非結合のリガンドを全て取り除いた後、適切な結合条件下で二次的結合剤部分が加えられ、この二次結合剤は選択的に結合リガンドに結合する能力がある。二次的結合剤の存在は、当業者には周知の技術を用いて検出できる。

【0173】

さらに特別には、本発明に従ってマイクロティルタープレートのウェルが脱-N-アセチル化PS抗体でコーティングした方法のELSA法を使用することができる。PS（特にNmB PSまたは大腸菌K1 PS）を含む、または含むと思われる生物学的サンプルがコートされたウェルに加えられる。抗体を結合させるのに十分なインキュベーションの後、プレートは非結合の部分を取り除くため洗浄され、検出可能な程度に標識のついた二次結合分子が加えられる。二次結合分子は、捕獲されたいかなる抗原にも反応させ、プレートを洗浄し、に字

結合分子の存在が当業者には周知の手法で検出される。

【0174】

このように、具体的な一実施形態では、生物学的サンプル中の結合PSの存在が、抗体リガンドに対する抗体からなる二次結合剤を用いて直ちに検出できる。当業者には周知の手法を用いて、直ちに検出できる程度にワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスフォターゼ、またはウレアーゼなどの酵素標識にコンジュゲートできる、多くの抗ウシ免疫グロブリン(Ig)分子が当技術分野では周知である。適切な酵素基質が次に検出できる信号を生成するのに使われる。その他の関連した実施例では、競合型ELISA技法が当業者には周知の手法で実行できる。

【0175】

測定法はまた、沈降条件下で抗体とPSが複合体を形成する溶液中でも行うことができる。具体的な一実施形態では、当技術分野では周知の、直接化学的または間接カップリングなどによるカップリング技法を用いて、抗体を固体相粒子（アガロース・ビーズなど）に付着させることができる。抗体でコートされた粒子は次に適切な結合条件下で、PSを含むと思われる生物学的サンプルと接触させ、粒子-抗体-PS複合凝集体の形成を助長する。この凝集体は洗浄および／または遠心分離を用いて沈降させサンプルから分離できる。反応混合物は上記の免疫診断法など、標準的な多くの手法のいずれかを用いて、抗体-抗原複合体の有無を決定するため分析することができる。

【0176】

本書中に記載される手法に従って産生される脱-N-アセチル化PSを含む上記の測定法の試薬は、上記に記載の免疫測定法を行うために、適切な説明書および他の必要な試薬とともに、キットで供給することが可能である。キットにはまた、どの特定の免疫測定法を使うかによって異なる、適切な標識および他の包装された試薬および材料（すなわち洗浄緩衝液など）を含むことができる。上記に記載されているような、標準的な免疫測定法を、これらのキットを使用して実施することができる。

【0177】

受動的免疫化およびその他の抗体に基づく治療法

さらに、哺乳類を対象とした髄膜炎菌に仲介される、または大腸菌K1に仲介される病気の治療または予防のための本発明の手法で産生される抗体。特に、本発明に従って、脱-N-アセチル化PSまたはそのコンジュゲートを用いて産生される抗体は、被験体の髄膜炎菌または大腸菌K1によって起こる病気に対する受動的保護、またはガン治療を助長するために、被験体への投与に適した医薬組成物に入れて提供することができる。

【0178】

また特に、本書に記載された手法に従って産生される免疫保護抗体、およびナイセリアPSまたは大腸菌K1エピトープを認識する免疫保護抗体は、感染または病気が起こるのを予防するため、またはすでに病気が確立した患者の臨床結果を改善する療法（例としてショックなどの合併症の減少、死亡率の減少、または聴覚障害などの罹患率の減少）として、ナイセリアによる病気に対する受動的免疫を誘発するために、被験体（例としてヒトの患者）に投与することができる。抗体をガン治療のために投与する場合、抗体は任意にガン細胞を標的にする薬、（例として毒素（リシンなど）、放射性核種など）に添付して腫瘍死滅や排除に効果をもたらすことができる。

【0179】

それが産生される種以外の生物に投与される抗体はしばしば免疫原性がある。従って例えばマウスまたはブタの抗体をヒトに投与するとその抗体に対してしばしば免疫性応答が誘発される。抗体の免疫原性特性は、抗体の部分または全部を特徴的にヒトの配列に変化させ、それによってキメラまたはヒトの抗体それぞれを生成することによって低下する。

【0180】

キメラ抗体はヒトおよび非ヒトの部分からなる免疫グロブリン分子である。より特異的には、ヒト化したキメラ抗体の抗原混合領域（または可変領域）はヒト由来ではなく（マウスなど）、キメラ抗体の定常的な領域（生物学的エフェクター機能を免疫グロブリンに

10

20

30

40

50

与える)はヒト由来である。キメラ抗体は、望ましくは、その非ヒト抗体分子の特異性に結合する抗原とヒト抗体分子によって与えられたエフェクター機能を持つ。キメラ抗体を産生する多くの手法が当業者にはよく知られている。例としてU.S.Pat.Nos. 5,502,167, 5,500,362, 5,491,088, 5,482,856, 5,472,693, 5,354,847, 5,292,867, 5,231,026, 5,204,244, 5,202,238, 5,169,939, 5,081,235, 5,075,431および4,975,369を参照)。代替となるアプローチは、組換えDNA技術によって、非ヒト抗体のCDR領域をヒトの定常領域に連結することによって、ヒト化抗体を産生することである。Queen et al., Proc. Natl. AcadSci. USA86:10029-10033 (1989) およびWO90/07861を参照。

【0181】

好ましい一実施形態では、本発明のペプチドに対する抗体を生成する細胞系を形質移入するために組換えDNAベクターが使われている。新規の組換えDNAベクターは、細胞系の免疫グロブリンの定常領域をエンコードする遺伝子の全部または一部を置き換える“置換遺伝子”(例として、置換遺伝子はヒト免疫グロブリン、または特定の免疫グロブリン分類の全部または一部をエンコードできる)、また抗体生成細胞内で標的である相同の免疫グロブリン配列組換えを許可する“標的配列”を含む。

【0182】

別の一実施形態では、組換えDNAベクターは、目的とするエフェクター機能(例としてヒト免疫グロブリンの定常領域)を持つ抗体を生成する細胞系を形質移入するために使われ、その場合、組換えベクターに含まれる置換遺伝子は抗体の一領域の全部または部分をエンコードすることができ、抗体生成細胞内で組換えベクターに含まれる標的配列によって相同の組換えと標的遺伝子組み替えができる。どちらの実施形態においても、可変または定常領域の一部のみが置き換えられた場合、結果として作られるキメラ抗体が同じ抗原を決定し、および/または、キメラ抗原がより大きな抗原特異性、定常的な増大したエフェクター機能を結合するより大きな親和性、または形質移入した抗体生成細胞系による分泌と生成の増大などを示すことができるように、まだ変化したり改良されたりしていない同じエフェクター機能を持つことができる。

【0183】

別の一実施形態では、本発明は完全なヒト抗体に必要なものを供給する。ヒト抗体は、全面的に特徴的なヒトポリペプチド配列からなっている。本発明のヒト抗原は広範囲にわたる様々な手法で生成することができる。(例として、Larrick et al., U.S. Patent No. 5,001,065参照)一実施形態では、本発明のヒト抗体は最初にtrioma細胞(2個のヒト細胞と1個マウス細胞に由来する)の内で生成される。抗体をエンコードする遺伝子はそれから複製され、他の細胞内、特にヒト以外の哺乳類の細胞内で発現する。一般的なアプローチtrioma技術によるヒト抗体生成のアプローチはOstberg et al. (1983), Hybridoma 2: 361-367, Ostberg, U.S. Patent No. 4,634,664, およびEngelman et al., U.S. Patent No. 4,634,666に記載されている。Triomaは通常のヒト細胞から作られるハイブリドーマよりもより安定であることがわかっている。

【0184】

抗体を生成と被験体(例えばヒトの被験体)への投与に適した調製の方法は、当技術分野ではよく知られている。例えば、抗体は、効果的な量の抗体と、医薬的な賦形剤(生理食塩水など)から構成される、医薬品の組成物から構成される。医薬品の組成物は、任意に他の添加剤を加えてもよい(例として緩衝液、安定剤、保存料など)。抗体の効果的な量は一般的に、目的とする期間内(例えば少なくとも約2日から10日、または1ヶ月から2ヶ月)のナイセリアによる病気または大腸菌K1による病気または症状に対する保護のために必要な量である。

【0185】

ポリシアル酸のエピトープ同定法

本発明はまた抗体に結合されているポリシアル酸(PSA)エピトープを同定する手法を特徴とする。一般的にこのような手法は、PS誘導体(本書中ではPSA誘導体とも呼ばれる)の、抗体とPS誘導体の抗原抗体複合体の形成に適した条件下での、抗体への接触がある

。次に抗原抗体複合体を、適切な酵素（例としてendo-またはexo-sialidaseなどのsialidase、特に興味深いノイラミナーゼと併用）に接触させ、抗原抗体複合体のノイラミナーゼ酵素到達可能PSA誘導体の残基の除去を促進させる。sialidase酵素治療の後の、抗原抗体複合体に残る、PSA誘導体残基は、こうして抗体に結合しているエピトープを決定する。結果として生じる抗原抗体複合体は抗体に結合したエピトープを決定するために分析に供することができる。このような分析は抗原抗体複合体の精製とその後の質量分析（例としてMALDI-TOFなど）を含むことができる。

【0186】

いくつかの実施形態では、その手法は、興味深い抗体に結合したエピトープを持つPS誘導体の同定を促進するため、数のPS誘導体（例として異なるPS誘導体のライブラリー）の選別を含む。例えば、その抗体は、ホストPSAとの検出しうる程度の交差反応が最小限であるか、反応しない抗PS特異抗体でありえる。

【0187】

実施例

本書に記載される実施例および実施形態は説明のためのみのものであり、それを踏まえた様々な改変や変更は当業者に提案され、この応用の意図と範囲、添付の請求範囲内に含まれることになっている。本書において引用されている全ての出版物、特許、および特許申請は、参照することにより全体として本書に含まれる。

【0188】

実施例1： N-アシルNmB PSおよび誘導体

N-アシルNmB PS (acyl=acetyl [Ac] またはpropionyl [Pr])がGuoおよびJenningsの手法で、以下のように本発明のPS誘導体を生成するため、下記に言及されているような差異を持って調製された。(Guo, Z, and Jennings, H. In 2001. N-Propionylation. In Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols. A. J. Pollard, and C, J. M. Maiden, eds. Humana Press Inc., Totowa, N.J., P55)。コロミン酸またはNmB PS(231g; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO)および20 mgのホウ化水素ナトリウム (Sigma-Aldrich) が 10 mlの2M NaOHに溶かされ、密閉した試験管内(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)で100°Cに6時間熱せられた。

【0189】

脱-N-アセチル化反応の条件はGuoおよびJenningsによって記載されたものとは異なる。GuoおよびJenningsが記したように、完全に脱-N-アセチル化したPS誘導体を使う代わりに、本生成物は典型的に下記に記載されるresorcinol測定法によって測定された20%のN-アセチル残基を含んでいた。図1は模範的な脱-N-アセチル化PSの構造を示す。本書に記載されているアプローチは、最低でも残基の20%はN-アセチル化だったことを確実にするので、N-アセチルとN-アシル残基の混合（例としてN-プロピオニル、N-ブタノイルなど）を含むPS誘導体を調製することができる利点、またN-アセチル化と脱-N-アセチル化 残基の混合を含むPS誘導体も同様に調製できる利点がある。また、ホウ化水素ナトリウムを追加するとPSの還元性末端のケトンアルコールに還元し、また、脱-N-アセチル化されたアミノ基と還元性末端残基のC2ケトンの間に形成されることができるイミンを二級アミンに還元する。還元末端残基にN-アセチル基、脱-N-acetyl部位、環状2級アミンを持つ残基を含むNmB PS誘導体は、非自己反応性、抗NmB PS mAbs (“SEAM” mAbs、図 2)によって結合され（下記の実施例3を参照）、従って、保護性、非自己反応性の抗NmB莢膜抗原を更新する重要な抗原である。

【0190】

溶液を室温に冷却後、溶液は2M HCLでpH8.0に調整され、水に対して透析し、凍結乾燥された。このPSは2 mlの0.1x PBS (0.1 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 13.7 mM NaCl, 0.27mM KCl, pH 7.0)中に再懸濁され、沈降した物質を取り除くために10分間遠心分離 (5000 xg) された。CuoおよびJenningsの方法とは対照的に、再懸濁されたPSは0.1X PBSで平衡化されたToyoperl HW-55F (Supelco, Bellefonte, PA)の1.5cm x 25 cmのカラムに搭載された。見かけの質量が10kDaより大きい、溶出している画分は化合され、凍結乾燥された。H

W-55Fのカラムは青色のデキストランを、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、carbonic anhydrase、および標準としてアジピン酸ジヒドラジドのtrinitrophenyl誘導体を使って、校正された(Sigma Aldrich)。

【0191】

遊離アミノ基はPS (～100 mg) を5 mlの 0.1M NaOH中で再懸濁し、0.2mlの無水アシル (例として無水酢酸または無水プロピオン酸) を加え、5アリコート中で数時間攪拌したことによりアシル化された (無水酢酸はGuoおよびJenningsによって以前に調製された誘導体には含まれていなかった)。溶液のpHは2M NaOHを必要に応じて加えることで～8-9に維持された。O-アシル基を取り除くため、溶液pHは1時間の間、～12まで上げられ、次に2 M HClを使ってpH 8まで下げられ、溶液は透析され、凍結乾燥され、その生成物が上記に記載のように精製され凍結乾燥された。

10

【0192】

ほとんどのアミノ基はこの手順中でアシル化されたが (? 90%) いくつかのアミノ基は誘導体化されておらず、遊離アミノ基のままであった。アシル化の効率は無水酸の水中の溶解性に依存する。従って、無水酢酸よりも水中溶解性が低い無水プロピオン酸のアシル化は無水酢酸よりも遊離アミノ基の量が多い結果となるであろう。脱-N-アセチル部位を持つPSを含む残基はSEAM mAbsによって結合された (下記の実施例3参照)。結合されるのであるから従って保護性、非自己反応性の抗NmB莢膜抗体を誘発するための重要な決定因子である。

【0193】

PSのより小さな断片 (平均ポリマー化程度 [Dp] 30) が酸処理によって生成された。N-acyl NmB PS (20 mg) の一部が5 mlの 0.2M NaOAc, pH 5.1に溶解され、密閉した試験管中で70℃で30分加熱した。溶液は上記に記載のように、透析され、凍結乾燥され、精製され、再び凍結乾燥された。

20

【0194】

開始した時点のPSより平均してDpが小さいPSを生成することに加えて、酸処理の結果、C1カルボキシル基と前述の残留分 (図3) のC9OH基との間にラクトンが形成される。少量のラクトンを含むPSはNmB細菌莢膜内で発生する可能性があるが、人のポリシアル酸内での発生は起こりそうにない。NmB PS中に少量のラクトンがあることは、保護性、非自己反応性抗NmB莢膜抗体を誘発するために重要であるかもしれない。

30

【0195】

アルデヒド基は単体タンパク質への共有結合に使用するためPSの非還元性および還元性末端に導入された。PS (20 g) を1 mlの0.1M NaOAc緩衝液pH6.5に溶解した。メタ過ヨウ素酸ナトリウム (5 mg, Sigma-Aldrich) が加えられ、溶液は暗所に30分間置かれた。残ったNaIO4は分解された 0.1mlの10% (wt/vol) エチレングリコールを水に入れ、30分放置した。この手順は還元性のない末端残基のC8および/またはC7にアルデヒド基を生成し、その中で脱アセチル化の間に (上記参照) C2ケトンがアルコールに還元された、還元末端残基を含むPSについては、アルデヒド基をC6に生成する (図4)。

【0196】

ドデシルアミンとタンパクPS誘導体コンジュゲート

40

ドデシルアミン誘導体は、非還元性末端または還元性の末端アルデヒドまたはケトンに接触する20ミリグラムのNmB PS誘導体と、5ミリリットルの水中の10ミリグラムのドデシルアミンとを組み合わせで調製された。混合液を温めながらおよそ50℃で30分間攪拌した時に、5 mgのナトリウムシアノボロハイドライドが加えられた。混合物は室温24時間で攪拌され、その後超過のドデシルアミンを取り除くため水中で透析が3-5日行われた。

【0197】

ドデシルアミン誘導体のSEAM mAbsとの反応性は、直接ELISAに結合させることで決定され、その中の抗原 (すなわちドデシルアミン PS 誘導体など) が抗原の溶液をウェルの中のPBS緩衝液の中で、4℃で1晩インキュベートすることにより、マイクロタイタープレートの表面に吸収された。プレートはPBS緩衝液 (5 x) で洗浄され、1% (w/w) のウシ血清

50

アルブミン (Sigma; ブロッキング緩衝液) を含むPBS緩衝液で、1時間室温でブロックされた。抗体はブロッキング緩衝液中に希釈され、プレートに加えられた。(ウェルごとに100マイクロリットル)。室温4時間のプレートのインキュベーションが終わった後、プレートはPBS緩衝液 (5x) で洗浄され、ブロッキング緩衝液中に希釈されたウサギ抗マウスアルカリフォスファターゼコンジュゲート抗体 (Zymed) が加えられた。さらに1時間のインキュベーションの後、プレートはPBS緩衝液 (5x) で洗浄され、P-nitrophenyl phosphatase基質を1mM MgCl₂を含む50mMの炭酸ナトリウム緩衝液pH 9に加えることにより、結合していた抗体が検出された。30分の室温でのインキュベーション後、405nmにおける吸光度がBioRad Model microtiter plate readerを使うことによって測定された。結合実験の結果は図38に示されている。

10

【0198】

担体タンパクにコンジュゲートしたPS誘導体は、10ミリグラムのウシ血清アルブミン (BSA, Pierce Chemical Co.,) を20mgのPS誘導体または非還元性末端アルデヒド基を含むPS誘導体とPBS緩衝液中で混合させることで調製された。5ミリグラムのsodium cyanoborohydrideが加えられ、混合液が暗所で5日間攪拌された。その溶液はPBS緩衝液で透析された (10-14kDaカットオフ膜)。PS誘導体-BSAコンジュゲートのmAbsとの反応性は、前述のパラグラフに記載されているように、直接ELISAを結合させることで測定された。結合実験の結果は図39に示されている。

【0199】

NmB PS誘導体の原液中のシアル酸と脱-N-アセチルシアル酸の濃度は、次のように改変したSvennerholm resorcinol反応 (Svennerholm, L. (1957) Biochim. Biophys. Acta 24:604) によって測定された。9.75ミリリットルの水、0.25ミリリットルの0.1M CuSO₄ · 5H₂O, 10ミリリットルの 20 mg/ml Resorcinol水溶液、および80ミリリットルの濃HCLを混合してResorcinol作用試薬を調製した。Resorcinol作用試薬 (300マイクロリットル) はシアル酸または脱-N-アセチルシアル酸サンプル溶液 (シアル酸は最高50マイクログラムまで) または水溶液標準原液 (300マイクロリットル) とポリプロピレンの深いウェル (2ミリリットル) のマイクロティルタープレート内で混合された。プレートはプレートカバーで密封され、沸騰した湯に30分間つけられた。室温まで冷却した後、イソアミルアルコール (600マイクロリットル) がピペットを用いて加えられ、混合された。分離するにまかせ、マイクロティルタープレートを清掃するために上側のイソアミル層が取り除かれた。250マイクロリットルのイソアミルアルコール抽出物および下側の水溶液は別々にポリスチレンのマイクロティルタープレートに移され、495nmおよび580nmでの吸光度が測定された。

20

30

【0200】

N-アセチルシアル酸の量は、イソアミルアルコール画分の580nmでの吸光度から決定され、脱-N-アセチルシアル酸の量は、水溶液画分の495nmでの吸光度からそれぞれ標準曲線との比較により決定された。脱-N-アセチルシアル酸の量は、シアル酸標準中で生じた脱-N-アセチル化の量を測定することにより、測定法の酸加水分解段階の間に生じた脱-N-アセチル化の量に修正された。

【0201】

長鎖アルキル基を含むNmB PS誘導体の逆相HPLC精製。長鎖 (すなわち>C8) アルキル基 (例としてドデシルアミン誘導体) NmB PS誘導体はPoros R1/HカラムとBioCAD灌流クロマトグラフィーワークステーションを用いて逆相HPLCによって分離された。誘導体は0%から80%のアセトニトリル勾配で、20mM酢酸アンモニウム緩衝液中、pH6.5に30分以上、流量5 ml/minで溶出された。画分 (それぞれ1ミリリットル) が捕集された。

40

【0202】

mAbsと反応性がある誘導体を含む画分 (たとえばSEAM3, SEAM12 Granoff et al. 1998, supra) は、それぞれの画分を100マイクロリットルずつ96 well microtiter plate (Immulon II, Dynatech) のウェルに加え、プレートを4°Cで1晩インキュベーションすることにより決定された。プレートはPBS緩衝液 (5x) で洗浄され、1% (w/w) のウシ血清アルブ

50

ミン (Sigma; ブロッキング緩衝液) を含むPBS緩衝液で、室温で1時間ブロックされた。抗体はブロッキング緩衝液内に希釈されてプレートに加えられた (ウェルごとに100マイクロリットル)。プレートを室温で4時間インキュベーションした後で、プレートはPBS緩衝液 (5x) で洗浄され、ブロッキング緩衝液内に希釈されたウサギ抗マウスアルカリフォスフォターゼコンジュゲート抗体 (Zymed) が加えられた。さらに1時間のインキュベーションの後、プレートはPBS緩衝液 (5x) で洗浄され、1mM MgCl₂を含む50mMの炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9にp-nitrophenyl phosphate 基質を加えることにより、結合された抗体が検出された。室温で30分のインキュベーションの後、BioRad Model microtiter plate readerを用いて405nmにおける吸光度が測定された。

【0203】

NmB PSの非還元末端ドデシルアミン誘導体のMALDI-TOF質量分析。逆相HPLCから得られた画分中の溶媒はSpinVac(TermoSavant)を用いて蒸発させられた。残留分はアセトニトリル/水 (1:1) 中に溶解された。アセトニトリル/水中で濃度3mg/mlにおけるTrihydroxyacetophenone (THAP)のマトリクスでターゲット上にスポットがつけられた (1スポットにつき0.5マイクロリッター)。マトリクススポットを真空化で乾燥させた後、サンプルをマトリクススポットの上にスポットした (0.5マイクロリッター)。MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics) が正負双方のリニアモード (30ショットN₂レーザー、50%レーザー出力)、レフレクターの正および負モード (30ショットN₂レーザー、50%レーザー出力) で運転された。質量スペクトルは外部ペプチド (Bruker Daltonics) とシアル酸 (EY Scientific) 標準を用いて校正された。観察された質量の誤差は $\pm 0.1\%$ だと推定された。図20-22に、保護性、非自己反応性抗NmB莢膜mAb SEAM 3と反応性があり、前述の記載のように逆性HPLCで精製したNmB PSの標本から得た、MALDI-TOFによって同定された構造式を示す。誘導体は、少なくとも1つの脱-N-アセチル残基がある、脱-N-アセチル、N-アセチル、およびN-プロピオニル残基の混合物を含む。

【0204】

実施例2: N-アシルNmB PS合成の中間生成物によるELISAにおける非自己反応性NmB莢膜mAbsとN-Pr NmB PSの結合阻害。

NmB PSのN-アセチル基がプロピオニル基 (N-Pr NmB PS) によって置換されている、NmB PSから調製される多糖類-タンパク質コンジュゲートワクチンはマウス (特許前述) および非ヒト霊長類 (Fusco) の血清殺菌抗体を誘発し、これらの抗体の部分セットは最小限の自己反応性をもっている (特許前述)。ヒトPSと反応しない抗N-Pr NmB PS抗体がNmBシステムに対して殺菌性があった理由は不明であった。この実施例では、我々は N-アシルNmB PS合成中の中間生成物がELISA中で非自己反応性抗NmB莢膜mAbsを阻害することを示す。阻害固体相ELISAは次のように実施された。

【0205】

リン酸緩衝食塩水 (PBS; pH 7.4) 中の100 μ l/wellのアビジン (4 μ g/ml; ExtrAvidin; Sigma-Aldrich) を含むマイクロティルタープレート (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc.) が4℃で一晩インキュベーションされた。PBSで3回洗浄した後、1:800にPBS内に希釈した100 μ lのビオチン化したN-Pr MenB PSが各ウェルに加えられ、37℃、2時間インキュベーションされた。プレートは次にPBSで3回洗浄され、ウェルは250 μ lのブロッキング緩衝液 (1%のウシ血清アルブミン[BSA]および0.1%のアジ化ナトリウムを含むPBS; [pH7.4]) を充填され、30-60分室温で非特異的な結合部位をブロックするためにインキュベーションされた。プレートは洗浄緩衝液 (PBS-0.1% Tween 20 -0.1% アジ化ナトリウム; [pH7.40]) で3回洗浄された。基質とともにおよそ30分のインキュベーションの後、非自己反応性抗NmB莢膜単クローン抗体が0.5から1.0のODを得る濃度まで事前に希釈された。この単クローン抗体がレプリカプレートのウェルに加えられ、それぞれが最終的な阻害剤濃度100 μ g/mlの高分子量N-PrNmB PSまたはPS誘導体または緩衝液単独を含んでいた。プレートはカバーされ、4℃で一晩インキュベーションされた。翌日、ウェルは洗浄緩衝液で5回洗浄され、希釈緩衝液で1:2000に希釈された、100 μ l/wellのアルカリフォスフォターゼコンジュゲート抗マウス多クローン抗体 (IgA + IgG + IgM; Zymed) とともに、4

℃で3時間インキュベーションされた。それからプレートは洗浄緩衝液で洗浄され、新たに調製され、基質緩衝液（1.0M diethanolamine, 0.5mM MgCl₂ [pH9.8]）で1mg/lに希釈された100 μlの基質（p-Nitrophenyl phosphatase; Sigma）が各ウェルに加えられた。405nmにおける吸光度の値がおよそ30分測定された。、阻害剤を含むウェルと、それに対応する阻害剤を含まないウェルの中の基質とともに30分インキュベーションした後の405nmにおける吸光度値を比較することにより阻害パーセントが計算された。

【0206】

次のNmB PS誘導体が阻害活性をテストされた；脱アセチル化NmB PS（deAc NmB PS）、再合成N-アセチル NmB PS（N-Ac NmB PS）、N-プロピオニル NmB PS（N-Pr NmB PS）、過ヨウ素酸酸化N-Ac NmB PSおよびN-Pr NmB PS（それぞれOx N-Ac NmB PSおよびOx N-Pr NmB PS）、そして酸で処理し平均Dpを減少させたNmB PS誘導体（H+TN-Ac NmB PS, H+Ox N-Ac NmB PS, H+N-Pr NmB PS, H+Ox N-Pr NmB PS）。さらに、負の対照として、髄膜炎菌B群MC 58系統から分離したNmB PSと、大腸菌K1（Sigma-Aldrich）から分離したコロミン酸もまた供試された。NmB PSはConstantino et al.（1999 Vaccine 17:1251）によって記載された方法によって分離された。分離途中で起こる加水分解の結果生じる脱-N-アセチル化NmB PSの可能性を排除するために、前述のように髄膜炎菌のNmB PSは0.1M NaOH中の過剰な無水酢酸で処理され、O-アセチル基を取り除くためのアセチル化の後、pH11で1時間インキュベーションされた。

【0207】

図5に示されているように、N-Pr NmB PSは4つのSEAM mAbsの中で最良の阻害剤であった。一方、コロミン酸やNmB PSはどのmAbs結合も阻害しなかった。対照実験では、コロミン酸やNmB PSの同じ溶液が抗NmB PS mAb 2-1-B（class IgM,（Mandrell et al. 1982 J. Immunol 129:2172）の N-Ac NmB PS または阻害剤濃度が0.1 μg/ml未満であるELISAのN-Pr NmB PSに対する結合を完全に阻害した。SEAM mAbsはN-Pr NmB PSをELISA中で結合する能力のため、可溶性のN-Pr NmB PSによって阻害されるべき結合のため、しかしELISAの表面抗原としてNmB PS（アジピン酸ジヒドラジド誘導体として）には結合されないために選択されたものであったので、これらの結果は予期されたものであった。しかしながら、コロミン酸は簡単な脱アセチル化の後SEAM 3およびSEAM 18において、また再アセチル化の後SEAM12において阻害剤となる。対照的に、結果としてラクトンが形成される酸処理（図3）、およびN-Ac

とN-Pc両方の酸化（図4）は対応する変更していない多糖類よりも性能の低い阻害剤となる結果となった。この結果はmAbsが少なくとも一部脱-N-アシル化残基を含むエピトープを認識することを示している。さらに、酸化の後には、阻害の濃度が全ての誘導体に対して増大するので、mAbsによって認識されたエピトープは過ヨウ化処理によって変更された多糖類の非還元性および／または還元性末端にあることが多い（図4）。

【0208】

実施例3：NmB8047系統に対して測定された抗N-Pr NmB PS Mabs の補体媒介殺菌活性

この実施例はSEAM抗体の殺菌活性が脱-Nアセチル残基を含むPS誘導体によってブロックされる可能性があり、従って脱-Nアセチル残基が生きているNmBバクテリアの莢膜PSおよび保護性抗体の抗原性標的にあったことを示す。

【0209】

補体媒介殺菌活性は髄膜炎菌B群8047系統で測定された。一晚チョコレート寒天で増殖した後、いくつかの髄膜炎菌のコロニーがMueller-Hintonブロス（A620nm of~0.1で開始）に播種され、供試生物が約2時間でA620nm of~0.6になるまで育成された。バクテリアを1%のウシ免疫アルブミン（BSA；RIA等級、Sigma-Aldrich）を含むGey緩衝液で2回洗浄した後、およそ300から400CFUが反応混合物に加えられた。試験法はウサギの補体（Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadaより得た貯蔵子ウサギ血清）で行われた。40 μLの最終反応混合物は20%(v/v)の補体、Gey1%BSA緩衝液中に希釈された、阻害剤がある場合とない場合があるmAbsを含んでいた。反応混合物のCFU/mlは一晚チョコレート寒天（Remel, Ranch o Cordova, CA）で増殖させた後測定された。殺菌性力価または濃度は、バクテリアを反

応混合液に入れ60分のインキュベーションの後、対照となる時間0でmLあたりのCFUと比較して1mLあたりのコロニー形成単位（CFL）が50%減少する結果となる血清希釈度（または抗体濃度）によって定義される。典型的には、負の対照抗体と補体とともにインキュベートされたバクテリアはCFU/mLで150から200%の増加を示した。

【0210】

実施例2に記載されているように、抗N-Pr NmB PS mAb SEAM 3とELISA中の固体相N-Pr NmB PSとの結合は可溶性の脱-Nアセチルコロミン酸またはre-NアセチルNmB PSによって阻害された。図6はすべての抗N-Pr NmB PS mAbの髄膜炎菌B群8047系統に対する殺菌活性をこれらの中間物質が阻害する能力を示す。図7はSEAM3の阻害データを示す。re-N-アセチル化NmB PSは、N-Pr NmB PSとほとんど同じくらいよいSEAM3殺菌活性の阻害剤であった（0.6 μ g/mlに対して0.2 μ g/ml）。一方で、脱-N-Ac NmB PSは7倍高い濃度、NmB PSは20倍以上高い濃度を要した。従って、SEAM3に認識される莢膜エпитープ、殺菌非自己反応性抗N-Pr NmB PS mAbが、プロピオニル基を含まないN-Pr NmB PS 誘導体の合成中に生成される、中間物の中に存在した。ナイーブなNmBのみがSEAM2の殺菌活性を阻害した（図6）。さらに特異性の対照として、50 μ g/mlの髄膜炎菌性A莢膜多糖類は試験に供したいかなるmAbsの殺菌活性も阻害しなかった。

【0211】

実施例4：MALDI-TOF質量分析による、保護性、非自己反応性抗NmB胸膜単クローン抗体に認識されるNmB PS誘導体の構造の決定

保護性、非自己反応性抗NmB胸膜単クローン抗体（図2）は次のように電磁ビーズに連結していた。MagnaBind[®]ヤギ抗マウスIgGビーズ（200 μ l; Pierce）がPBS緩衝液中で5 μ gのSEAM2、SEAM3、SEAM12、SEAM18、混合された。混合物は室温で1時間、回転ホイール上でインキュベートされた。ビーズは洗浄緩衝液で3回された（上記実施例2を参照）。結合した抗体はBS3TM（Pierce）をPBS緩衝液中に2mMの濃度加え、室温で30分ボルテックスすることにより交差結合された。未反応のものはTrisを0.1M, pH8.0で10分間加えることにより分解された。ビーズはPBS緩衝液で3回洗浄された。実施例1で調製されたN-Pr NmB PS（240マイクログラム）がPBS緩衝液中で洗浄したビーズに加えられた。混合物質を回転ホイールに載せ室温で1時間インキュベートした後、非結合物質は取り除かれ、ビーズは洗浄緩衝剤で2回、PBS緩衝域で1回洗浄され、その後200 μ lのOBS緩衝液中で再懸濁された。ノイラミニダーゼ（0.00175U, EC 3.2.1.18; Sigma）が各試験管に加えられ、混合物質は37 $^{\circ}$ Cで一晩、回転ホイール上でインキュベートされた。結合PSはDpの点では不均一であるので従ってビーズ抗体PS複合体はノイラミニダーゼとともに処理された。ノイラミニダーゼは連続して残基をポリマーの非還元末端から取り除き、さらに抗体に消化されることから保護されるようポリマーのサイズを小さくする。ノイラミニダーゼ処理の後、ビーズは50 mMの炭酸アンモニウム緩衝液、pH8.5で3回洗浄され、結合PSは最後に0.1M tris(hydroxymethyl)amin e水溶液に溶出された。

【0212】

マトリクス分析レーザー脱離イオン化フライト時間（MALDI-TOF）質量分析のため、溶出PS溶液、トリエチルアミン/水はSpin-Vac（Savant）内での蒸発によって取り除かれた。乾燥したサンプルは4 μ lの50%（vol/vol）アセトニトリル/水内で再懸濁された。マトリクスは、50%アセトニトリル/水（0.5 μ l）中の2',4',6'-trihydroxyacetophenone（THAP, Fluka Chemival）の飽和溶液が、ステンレスの標的プレートの上にスポットされた。PSサンプル（2回、0.5 μ l）は、乾燥したTHAPの一番上にスポットされた。サンプルはBurker autoflex MALDI-TOF質量分析計を使用して分析された。マイナスイオンレフラクターモードでぶんせきされた。

【0213】

図8はノイラミニダーゼ処理の後、SEAM3に結合したPS誘導体の代表的な質量スペクトルを示す。図9は各サンプルの観察された質量、および観察された質量に一致する対応するイオンの理論的質量を示す。PS誘導体の構造が図10および19に示されている。全ての質量は1個以上の残基を含む二糖類に対応し、その中でC-5アミノ基のNアセチル基が取り除か

れている。また、1個の脱-N-アセチル化残基を含む二糖類は、Nアセチル基を2級シアル酸残基に含むがN-プロピオニル基は含まない。さらに、exosialidaseは残基を非還元末端から前向きに取り除くので、SEAM mAsbによって結合され、MALDI-TOHによって検出されたすべての誘導体は還元末端誘導体である。これは類似の脱-N-アセチル化誘導体が末端の非還元または多糖体の内部残基でも生じうることを除外するものではない。多糖類はDpに関して不均一であるので、このような誘導体は検出が困難であろう。

【0214】

まとめると、N-Pr NmB PSおよびN-Pr NmB PSの誘導体の合成中における、SEAM mAbsによって捕獲され、MALDI-TOF質量分析によって同定された中間生成物質に対する阻害ELISAの結果は、非自己反応性、殺菌性抗NmBB群莢膜mAbsによって認識される最小の決定要因は、1個以上の脱-Nアセチル化残基を含む二糖類だということを示している。

10

【0215】

実施例5: PSおよびアキル化剤を有機溶剤／水懸濁を使用した脱-Nアセチル化PS誘導体の調製

トリクロロアセチル（またはトリフルオロアセチル）アミドとして保護されるC5アミノ基を持つNmB PS誘導体の調製

20ミリグラムの脱-Nアセチルコロミン酸がA G 501-8X 温床レジン（BioRad）で脱イオン化され、2.5%(vol/vol)の水を含む4ミリリットルのホルムアミドに溶解された。遊離アミノ基のモル量1.1に等しいメタノール中のナトリウム・メトキシドの量に加えられ、その後でtrichloroacetic anhydride（またはエチルトリフルオロアセチルエステル）と無水酢酸（または他の賦活化されたアシル基、例えば無水プロピオン、ride, lauric N-hydroxysuccinimide esterなど）の混合物（1.2モル当量）が加えられ、ここでトリハロアシル化試薬の量は最終生成物で目標とする脱-Nアセチル基の割合に等しい（例えば、10%、25%、50%など）。混合物は数分間攪拌され、必要に応じて水酸化ナトリウムまたはメトキシドを余分に加えることでpHが8に（pH試験紙につけて測定）調整された。反応混合物は水中で透析され、凍結乾燥された。生成物はサイズ排除（例えば実施例1を参照）および／またはイオン交換クロマトグラフィーにより当業者にはよく知られた手法に従って精製することができた。望む場合、トリクロロアセチル（またはトリフルオロアセチル）基はホウ化水素ナトリウム（またはトリフルオロアセチルで保護されたアミドには濃度0.1M, pH9の炭酸アンモニウム）加え、水中で透析し凍結乾燥の前に室温で1時間攪拌することで取り除かれた。

20

30

【0216】

非還元性末端アルデヒドを含む再アシル化NmB PS誘導体の調製

メタ過ヨウ素酸ナトリウム（10ミリグラムの多糖類につき1ミリグラムの過ヨウ素酸）がre-N-アシル化NmB PSの溶液に加えられ、そのなかではすべてのアミノ機がトリフルオロアセチルか（実施例6に記載のように獲得）または保護されたトリクロアセチル（実施例5に記載のように調製）、または他のアミドの形で、0.1Mの酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.5の中にあった。反応は暗所で30分から1時間かけて行われ、過剰のエチレングリコール水溶液を加えてクエンチされた。その後反応混合物は水中で透析され、凍結乾燥された。

40

【0217】

ナトリウムシアノボロハイドライドでの還元的アミノ化により、生成物は次に担体タンパク質（BSA）にコンジュゲートされた。非還元性末端アルデヒド基を含むPS誘導体はPBS緩衝液中で、2：1の割合で担体タンパク質に混合された。ナトリウムシアノボロハイドライド（担体タンパク質1mgにつき1mg）が加えられ、混合物は暗所で5日間攪拌され、その後PBS緩衝液（10-14kCaカットオフ膜）中で透析された。

【0218】

実施例6：N-トリクロロアセチル（またはトリフルオロアセチル）保護シアル酸残基のNmB PSへの生合成的な導入、及び、得られた莢膜PSのPS-タンパクコンジュゲートワクチン調製のための使用

50

0.5ミリモル（108ミリグラム）の塩酸マンノサミンが0.55ミリモルのメトキシドナトリウムを含んだ10ミリリットルのメタノールに溶解され、4℃に冷却された。0.6ミリモルの無水トリクロロ酢酸（またはトリフルオロ酢酸エチル）が加えられ、混合物は2時間攪拌された。反応の進行は反応混合物をシリカゲルTLCプレートにスポットしてプレートをエチルアセテート、メタノール、水（5：2：1）で展開し、開始時点では存在したマンノサミンがヨードの蒸気とともになくなっているのを検出することによってモニターされた。反応が完了すると、1.5ミリ当量のAG501-8X温床レジン（BipRad）と、10ミリリットルの水が加えられ、必要に応じてNaOHまたはHClを加えてpHが7に調整され、混合物は1時間おだやかに振盪された。溶媒の混合物とビーズが分けられ、溶媒は凍結乾燥で取り除かれた。必要に応じてTLCのために記載されたのと同じ溶媒システムを使い、シリカゲルクロマトグラフィーによってさらに生成物の精製が実施された。目的の物質を含む混合した画分の溶媒は蒸発によって取り除かれた。最後に乾燥した生成物を水中で再懸濁し、凍結乾燥した。

10

【0219】

NmB M7系統のコロニーを新たに画線したチョコレート寒天プレートに播種し、OD620nm~0.1になるまで一晩37℃、5%の二酸化炭素中で増殖させ、それを5ミリモルのNアシルマンノサシン（例えばN-アセチル、トリクロアセチル、トリフルオロアセチルマンノサミン）を補充したMueller-Hintonブロスに移すことにより、トリハロアセチル化したマンノサミンがNmB PSに組み入れられた。M7系統は遺伝子のエンコーディング N-acetyl-D-glucosamine- 6-Phosphate 2 epimeraseを翻訳するトランスポゾンを含む。（J. Swartley, J.S. and Stephens, D.S.,1994,J. Bact. 176:1530; Swartley,,S.,Ahn,J.H. Liu, L-J,Kahle r.C.M. and Stephens, D.S., 1996, J. Bact. 178:4).結果として、増殖培地にNアセチルマンノサミンが補充されないとバクテリアは莢膜PSを合成できなかった。従って、このシステムで合成される莢膜PSのN-アシルの含有量は増殖培地に供給されるN-アシルまたはN-アシルマンノサミンの混合物によって決定される。バクテリアは37℃でOD 620nmまで一晩で増殖させる。

20

【0220】

トリハロアセチル基を含む莢膜PSの生成は蛍光顕微鏡で測定することができるmAb SEAM 12を使ってM7生成系統の莢膜PSの有無を検出することができた。N-アセチルマンノサミンを補充したSEAM12とM7の結合は、赤い蛍光色の、検出ローダミン標識のついた二次抗体（Zymed）として検出された。細胞はDNA系統SYTO（Molecular Probes Inc.）で標識され、これは緑で現れた。N-アシルマンノサミンがないか、またはN-トリクロアセチルマンノサミンの補充があるSEAM12のM7との結合はなかった。SEAM12はトリクロロメチル基の大きなサイズが結合を乱すせいで、トリクロロアセチル基を含む莢膜PSを結合しなかった。

30

【0221】

多糖類はGuoおよびJenningsによって記載されているように、増殖培地から精製された。（Guo,Z.and Jennings, H. In 2001.In Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols. A. J. Pollard, and C. J. M. Maiden, eds. Humana Press Inc., ‘Totawa, N.J. p41）。精製された多糖類は前述のように還元的アミノ化によって酸化され、担体タンパク質、または脂質アミンにコンジュゲートされ、トリハロアセチル基はホウ化水素素菜ナトリウムの還元によって取り除かれた。最終生成物は前述のように、サイズ排除クロマトグラフィーで精製され、PBSで透析され、凍結乾燥された。

40

【図面の簡単な説明】

【0222】

【図1】本発明による脱N-アセチル化された後のNmB PSの構造を示す図である。ほとんどの残基においてRはHであり、（脱アセチル化基に）遊離アミンを供与する。脱N-アセチル化された生成物中の残基の小フラクションにおいて、RはCH₃C=O（アセチル基）であってもよく、「n」はポリマー中のシアル酸残基の数を表し、本明細書中に記載した他の化学式中の「n」の値であってよい。

【図2】殺菌抗NmB PS抗体により特異的に結合され、宿主PSAと交差反応する抗

50

体によっては結合されないNmB PS誘導体のエピトープの同定を容易にするための実施例で用いられるSEAM抗体を記載した表である。

【図3】NmB PSを酸処理した後のNmB PSにおいて先行する残基のC1カルボキシル基とC9ヒドロキシル基間に形成されるラクトン部分の構造を示す図である。

【図4】非還元末端の末端残基にアルデヒド基を有するPS誘導体の構造を示す図である。

【図5】SEAMモノクローナル抗体とN-Pr NmB PSとの結合時における種々のNmB PS誘導体の阻害活性を判定するためのELISA阻害アッセイの結果の概要を示す表である。

【図6】B群髄膜炎菌の菌株8047に対して測定されるところの抗N-Pr NmB PS mAbの補体媒介性殺菌活性の阻害における、種々のNmB PS誘導体の活性を判定するためのアッセイの結果の概要を示す表である。

【図7】種々のNmB PS誘導体の存在下におけるSEAM 3 mAbについて、補体媒介性殺菌活性の阻害のデータを示すグラフである。

【図8】SEAM 3によってノイラミニダーゼの開裂から選択かつ保護されたPS誘導体の質量スペクトルを示す図である。

【図9】各々の試料についての実測質量、ならびに対応するイオンが実測質量と一致している理論質量をまとめた表である。

【図10】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図11】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図12】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図13】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図14】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図15】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図16】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図17】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図18】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図19】図9において同定された脱N-アセチル化PS誘導体の構造を示す図である。

【図20】実施例1において作製かつ同定されたドデシルアミンNmB PS誘導体の構造を示す図である。

【図21】実施例1において作製かつ同定されたドデシルアミンNmB PS誘導体の構造を示す図である。

【図22】実施例1において作製かつ同定されたドデシルアミンNmB PS誘導体の構造を示す図である。

【図23】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図24】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図25】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図26】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図27】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図28】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図29】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図30】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図31】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図32】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図33】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図34】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図35】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図36】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図37】本発明の例示的アシルアミン脱N-アセチル化PS誘導体の構造を提供する。

【図38】直接結合ELISAによって測定されるところの、ドデシルアミンMBPS誘

10

20

30

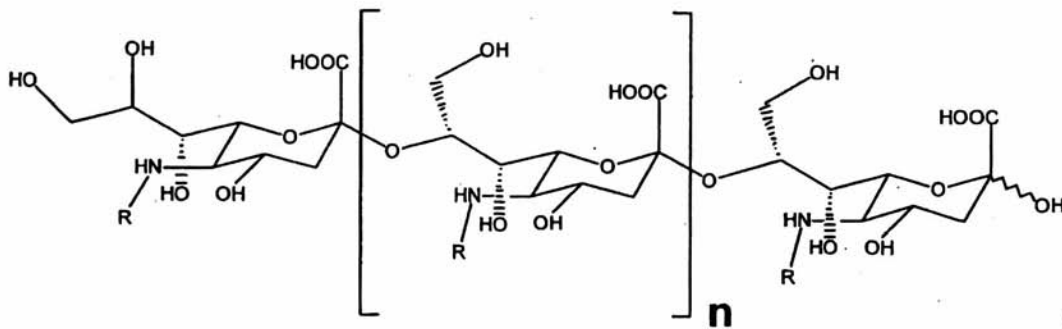
40

50

導体と結合するmAbの結果をまとめた表である。mAb SEAM-2、3、12、および18は、米国特許第6,048,527号に記載されている。mAb SEAM 38は、Granoff et al. 1998, J. Immunol. 160:5028に記載されている。

【図39】直接結合ELISAによって測定されるところの、BSA-MBPS誘導体コンジュゲートと結合するmAbの結果をまとめた表である。mAb SEAM-2、3、12、および18は、米国特許第6,048,527号に記載されている。mAb SEAM 38は、Granoff et al. 1998, J. Immunol. 160:5028に記載されている。

【図1】



【図 2】

ヒトポリシアル酸抗原と最小の反応性を持つ又は反応性を持たない抗-N-Pr NmB
PS mAbs (「SEAM」) の詳細な抗原特異性^a

mAb	IgG サブクラス	N-Ac NmB PS に対する ELISA 反応性 ^b	N-Pr NmB PS オリゴ糖類 による結合の ELISA 阻害 ^c	ヒト PSA との 交差反応性 ^d
SEAM 2	3	0	0	0
SEAM 3	2b	0	+++	0
SEAM 12	2a	++	0	+
SEAM 18	2b	+++	+++	+

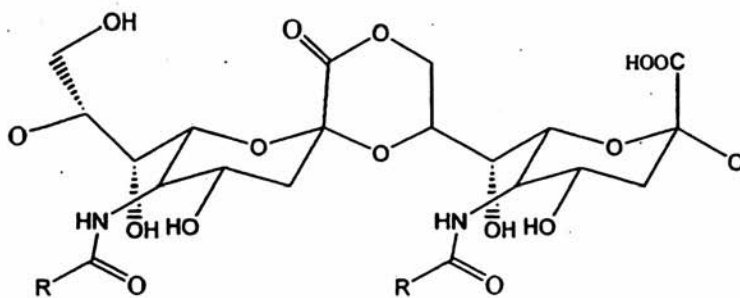
^aGranoff and Moe, 米国特許第 6,048,527 号からのデータ

^bN-Ac MbB PS への Ab 結合 : 0, OD<0.15; +, OD=0.15-0.5; ++, OD=0.5-1.0;
+++, OD>1.0 5-25 μ g/ml の Ab で ELISA により試験した場合。

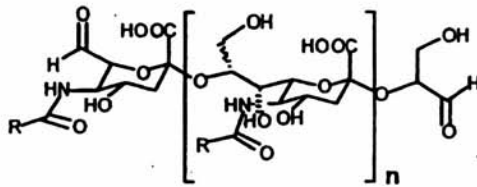
^c可溶性 N-Pr NmB PS による ELISA での N-Pr NmB PS への Ab 結合の阻害 (Dp<6;
平均 Dp=3.8) : 0, <20%; +, 21%-48%; ++, 49%-74%; +++, 75%-100%阻害 30m で OD=0.5
を与える[Ab]で試験した場合。

^d間接蛍光フリーサイトメトリーで測定したときの CHP-134 神経芽細胞腫でのポリシアル酸
の結合 : 0, 100 μ g/ml の Ab で試験した場合に PSA に対する結合活性なし ; ++, 10 μ g/ml
の Ab で結合活性が検出された ; +, 100 μ g/ml で結合活性が検出されたが 10 μ g/ml では
検出されなかった。

【図 3】



【図 4】



【図 5】

FIGURE 5

E L I S AにおけるPS誘導体によるN-Pr NmB PSへの抗-N-Pr NmB PS mAb (SEAM mAb) 結合阻害の概要^a

阻害剤	SEAM mAb			
	2	3	12	18
NmB PS ^b	>100	>100	>100	>100
コロミン酸	>100	>100	>100	>100
脱アセチルコロミン酸	>100	0.8	>100	1.7
N-Ac NmB PS	>100	0.32	1.2	0.3
Ox N-Ac NmB PS	>100	10.1	>100	12.6
H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	1.9	>100	>100
Ox H ⁺ N-Ac NmB PS	>100	13.4	>100	>100
N-Pr NmB PS	0.1	0.004	0.004	0.001
Ox N-Pr NmB PS	<0.02	0.07	<0.02	<0.02
H ⁺ N-Pr NmB PS	1	0.03	0.05	0.03
Ox H ⁺ N-Pr NmB PS	1.5	2.2	1.3	1.8

^a30分で405 nmでの最大ODの50%を阻害する $\mu\text{g/ml}$ 濃度

^bConstantino et al. (1999 Vaccine 17:1251)に記載されているようにB群髄膜炎菌から単離した。

このアッセイで用いた NmB PS は、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満の濃度で N-Ac NmB PS 及び N-Pr NmB PS の両方に結合する (データは示さず) 抗-NmB PS mAb 2-1-B の結合を完全に阻害した。

【図 6】

B群髄膜炎菌株8047に対して測定された抗-N-Pr NmB PS mAbの
補体媒介殺菌活性の阻害

阻害剤	抗-N-Pr NmB PS mAb ^a			
	SEAM 2	SEAM 3	SEAM 12	SEAM 18
天然 N-Ac NmB PS ^b	>50	>14	>12	>50
脱-N-アセチル-NmB PS	>50	4	>50	>50
再合成 N-アセチル NmB PS ^d	>50	0.6	>50	12
合成 N-プロピオニル NmB PS ^e	0.03	0.2	0.2	<0.04

^a 8047株に対する mAb の殺菌活性の阻害をもたらした NmB PS 誘導体の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)。

阻害は、補体とインキュベーションしたときの細菌の 50%生存及び阻害剤の不存在下で 0%生存 (即ち 100%殺傷) を与える mAb の濃度によって定義した。60 分における CFU/ml は、時間 0 における CFU/ml の >200%であった。コントロール mAb 抗-莢膜 2-1-B は、NmB PS によって阻害されたが、再合成 N-Ac NmB PS を含む他のいずれの誘導体でも阻害されず、コントロール抗-ProA Pl.2 mAb は NmB PS 又はいずれの NmB PS 誘導体によっても阻害されなかった。50 $\mu\text{g/ml}$ の A 群髄膜炎菌多糖類によって阻害された mAb はなかった。

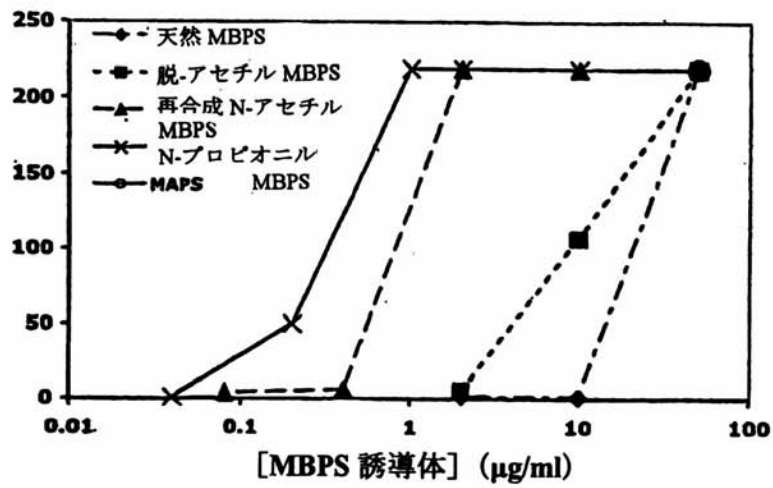
^b Constantino et al. (1999 Vaccine 17:1251) に記載されるように B 群髄膜炎菌から単離された。

^c 大腸菌 K 1 から調製した。コロミン酸は、幾つかの大腸菌 K 1 株が C7 又は C9 O-アセチル化多糖類を発現する (Oeskov et al. 1979 J Exp Med 149:669) 以外は、NmB PS のものと化学的及び免疫学的に同一である (Rohr et al. 1980 J Biol Chem 255:2332; Bhattacharjee et al. 1975 J Biol Chem 250:1926)。

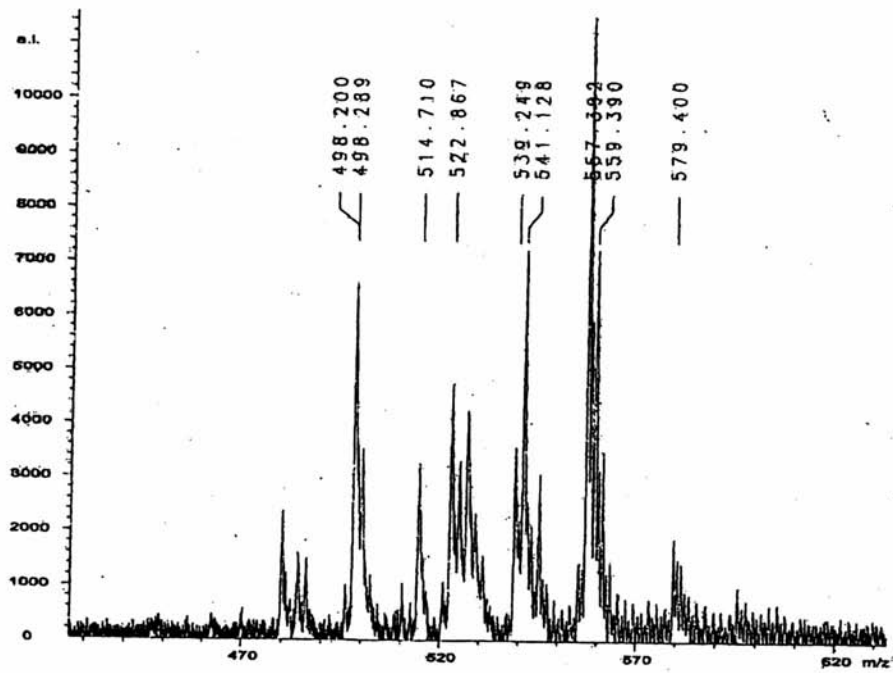
^d 実施例 1 に記載したような脱アセチル化され再 N-アセチル化された再合成 N-Ac NmB PS。

^e 実施例 1 に記載したような脱アセチル化され N-プロピオニルされた NmB PS。

【図 7】



【図 8】



【図 9】

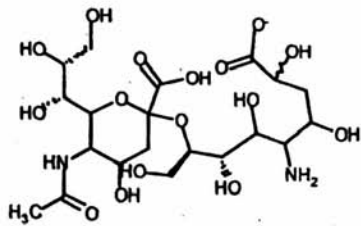
SEAM MABによって選択された多糖類についてのMSデータの概要

イオンの 推定構造	計算質量 (Daltons)		選択「SEAM」モノクローナル抗体			
			2	3	12	18
	モノアイソトピック	平均	実測質量／電荷			
[II + Na] ⁺	579.16	579.46	579.378	579.400	579.482	1. 579.328
[I]	559.20	559.50	559.290	559.390	559.314	559.525
[III] ⁻	557.18	557.48	557.289	557.392	557.403	557.305
[III or IV] ⁻	541.17	541.45	541.162	541.128	541.168	-
[V]	539.17	539.46	539.169	539.249	539.157	-
[VI]	523.18	523.47	522.731	522.867	522.813	-
[VII] ⁻	515.17	515.44	514.540	514.710	514.616	-
[II-CH ₂ O] ⁻	527.17	527.45	-	-	526.975	526.991
[VII, VIII の 混合物] ⁻	499.18, 497.16		498.219	498.289	498.273	-

実測質量についての推定誤差が±0.1%である。

【図 10】

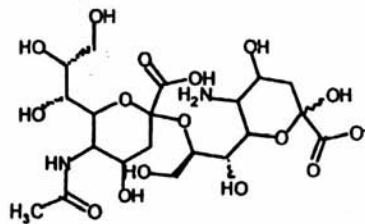
Structure I



C₂₀H₃₅N₂O₁₆⁻
 Exact Mass: 559.20
 Mol. Wt.: 559.50
 C, 42.93; H, 6.31; N, 5.01; O, 45.75

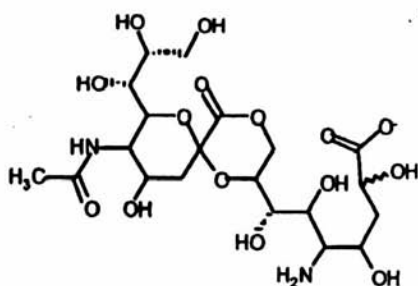
【図 11】

Structure II



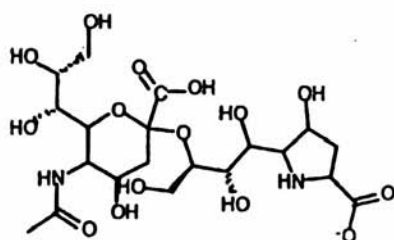
C₂₀H₃₃N₂O₁₆⁻
 Exact Mass: 557.18
 Mol. Wt.: 557.48
 C, 43.09; H, 5.97; N, 5.03; O, 45.92

【 図 1 2 】

Structure III

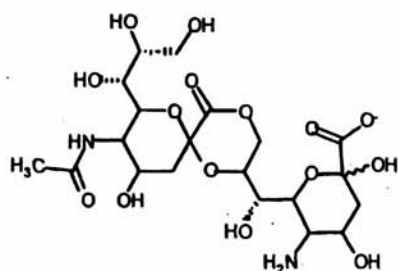
$C_{20}H_{33}N_2O_{15}^-$
 Exact Mass: 541.19
 Mol. Wt.: 541.48
 C, 44.36; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

【 図 1 3 】

Structure IV

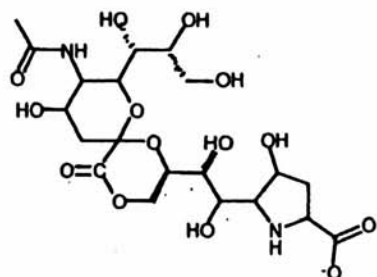
$C_{20}H_{33}N_2O_{15}^-$
 Exact Mass: 541.19
 Mol. Wt.: 541.48
 C, 44.36; H, 6.14; N, 5.17; O, 44.32

【 図 1 4 】

Structure V

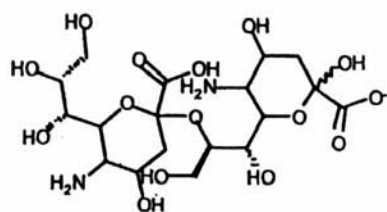
$C_{20}H_{31}N_2O_{15}^-$
 Exact Mass: 539.17
 Mol. Wt.: 539.46
 C, 44.53; H, 5.79; N, 5.19; O, 44.49

【 図 1 5 】

Structure VI

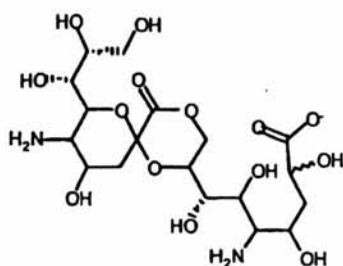
$C_{20}H_{31}N_2O_{14}^-$
 Exact Mass: 523.18
 Mol. Wt.: 523.47
 C, 45.89; H, 5.97; N, 5.35; O, 42.79

【 図 1 6 】

Structure VII

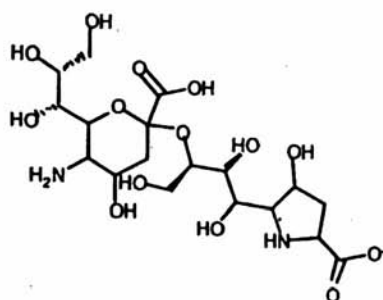
$C_{18}H_{31}N_2O_{15}^-$
 Exact Mass: 515.17
 Mol. Wt.: 515.44
 C, 41.94; H, 6.06; N, 5.43; O, 46.56

【 図 1 7 】

Structure VI

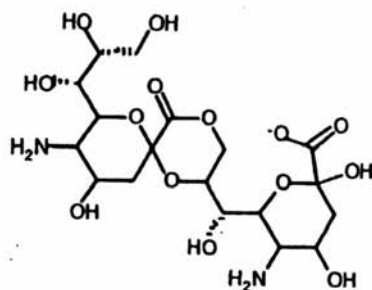
$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
 Exact Mass: 499.18
 Mol. Wt.: 499.44
 C, 43.29; H, 6.26; N, 5.61; O, 44.85

【 図 1 8 】

Structure VII

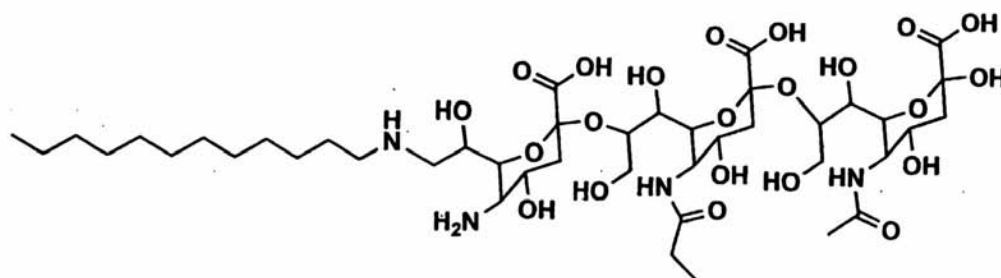
$C_{18}H_{31}N_2O_{14}^-$
 Exact Mass: 499.18
 Mol. Wt.: 499.44
 C, 43.29; H, 6.26; N, 5.61; O, 44.85

【 図 1 9 】

Structure VIII

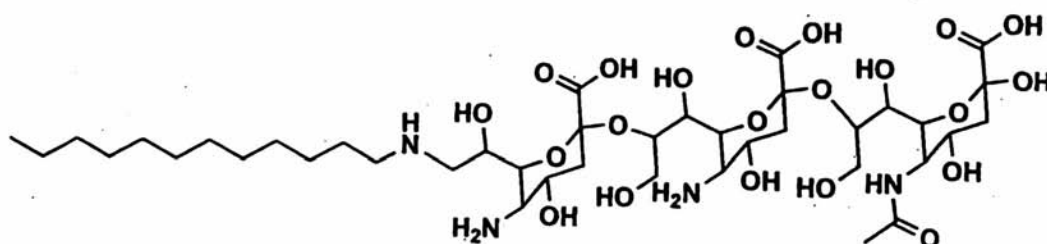
$C_{18}H_{29}N_2O_{14}^-$
 Exact Mass: 497.16
 Mol. Wt.: 497.43
 C, 43.46; H, 5.88; N, 5.63; O, 45.03

【図 20】



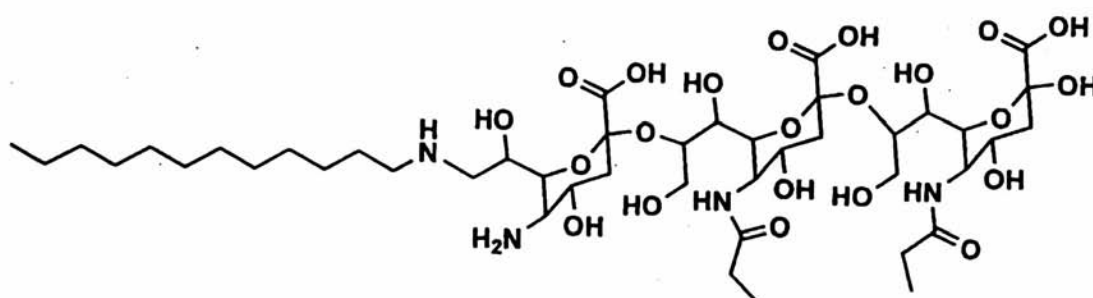
Exact Mass: 1000.5

【図 21】



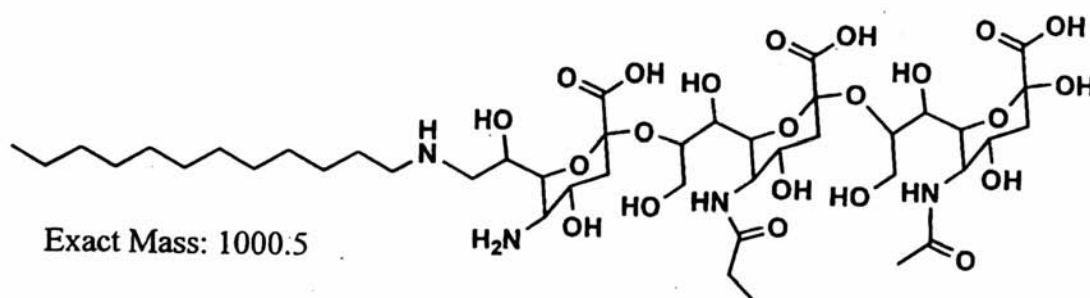
Exact Mass: 944.47

【図 22】



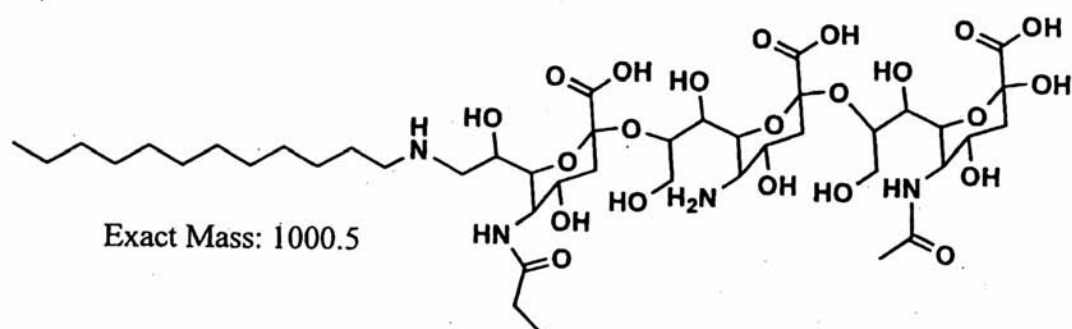
Exact Mass: 1014.51

【図 23】

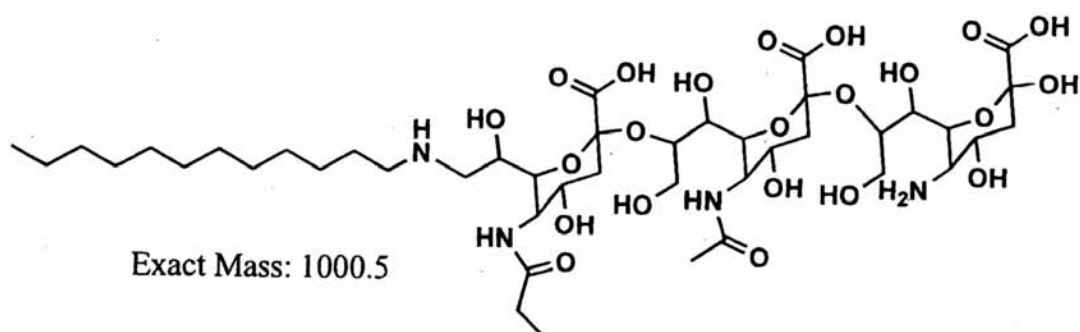


Exact Mass: 1000.5

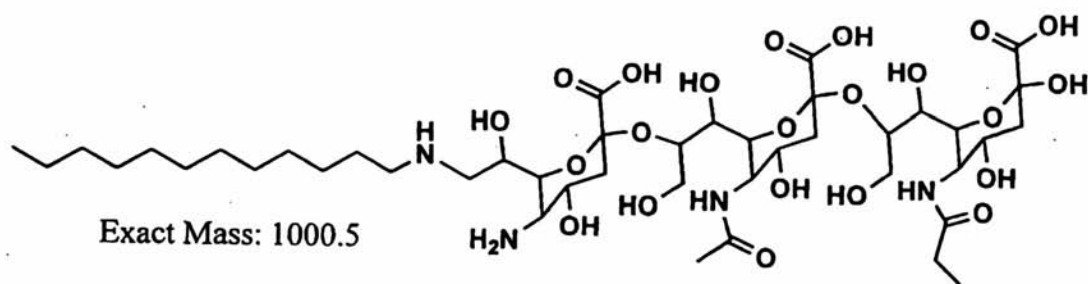
【図 2 4】



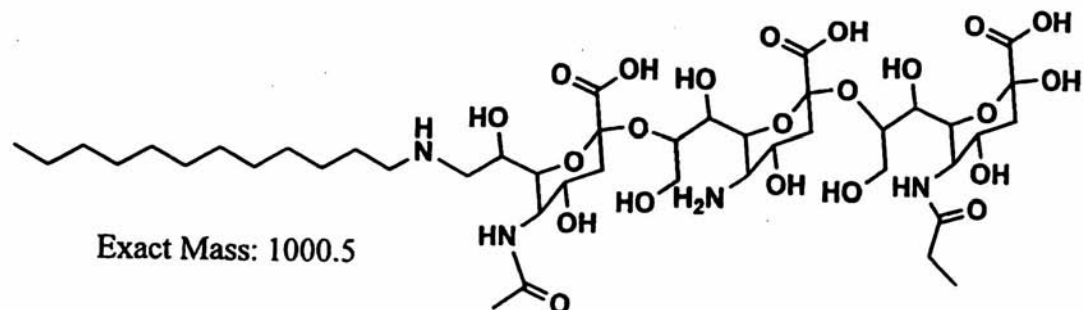
【図 2 5】



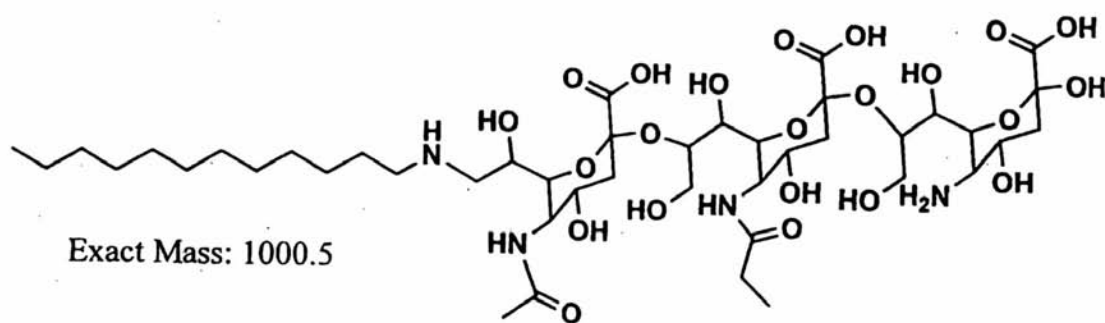
【図 2 6】



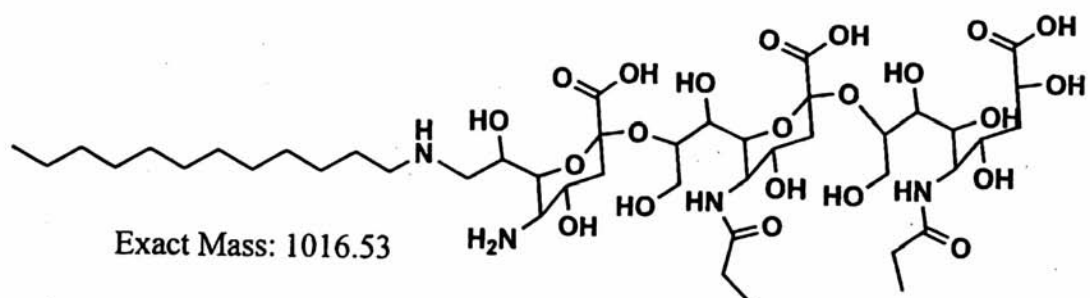
【図 2 7】



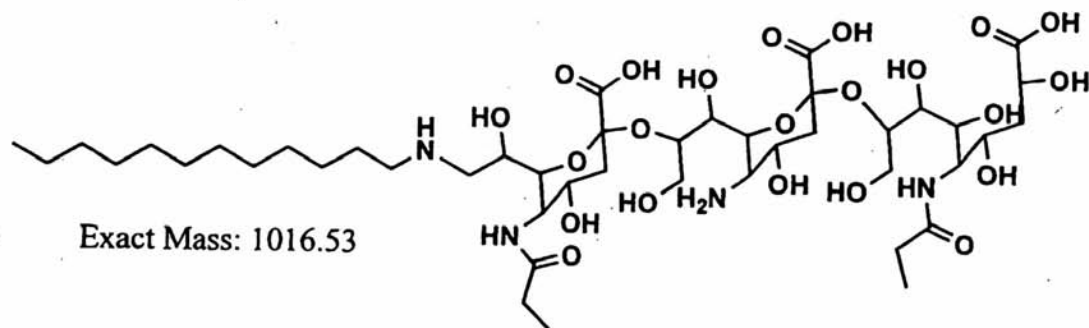
【図 28】



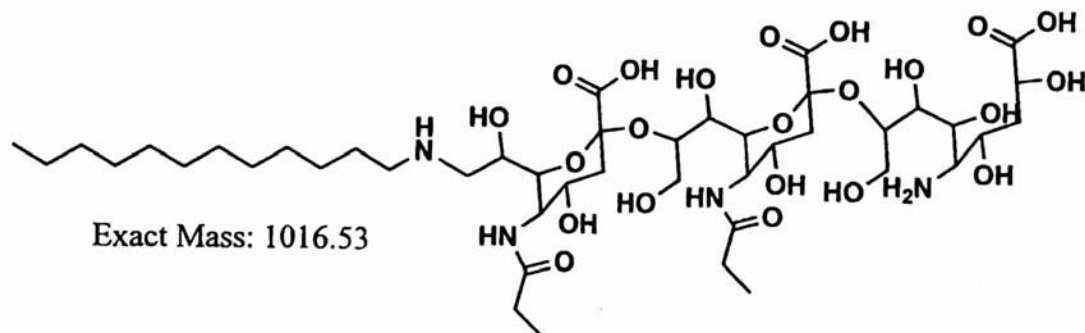
【図 29】



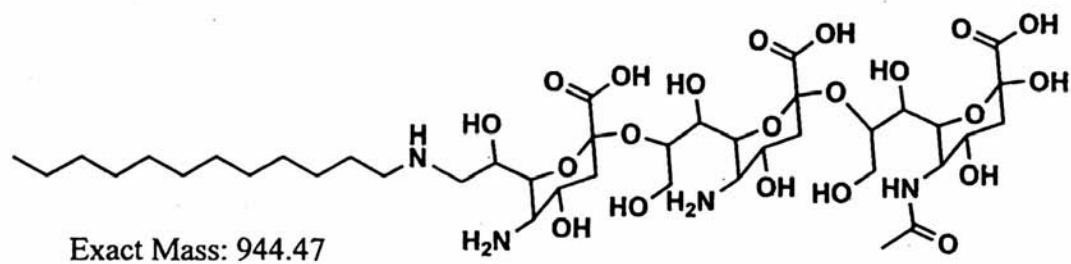
【図 30】



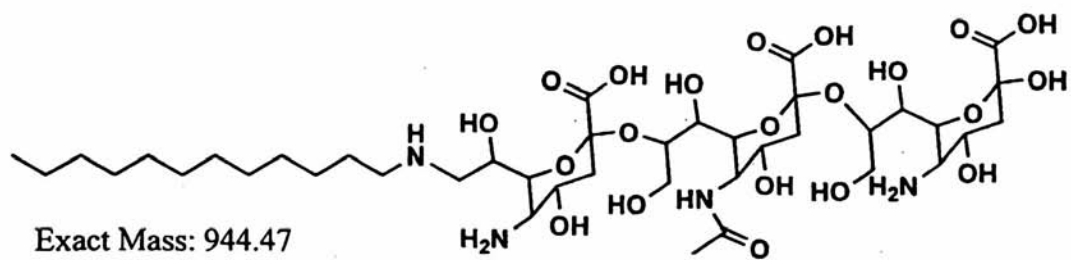
【図 31】



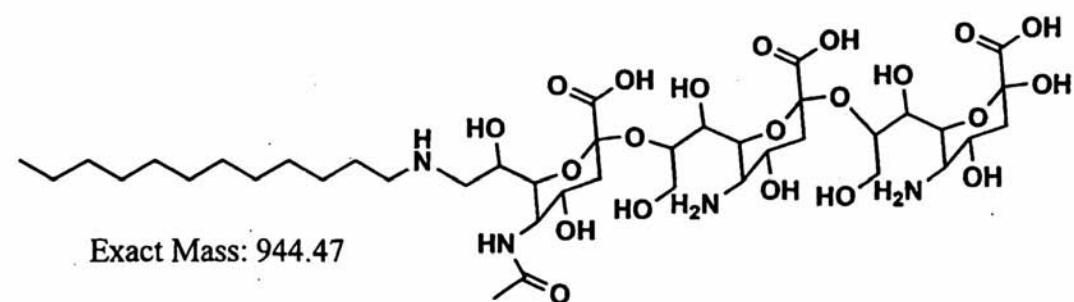
【 図 3 2 】



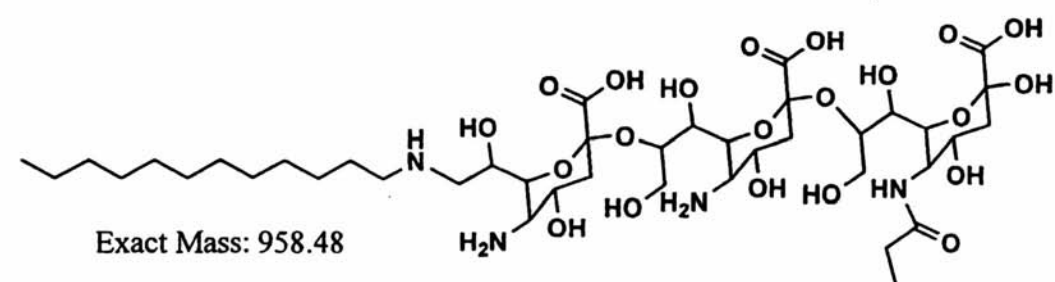
【 図 3 3 】



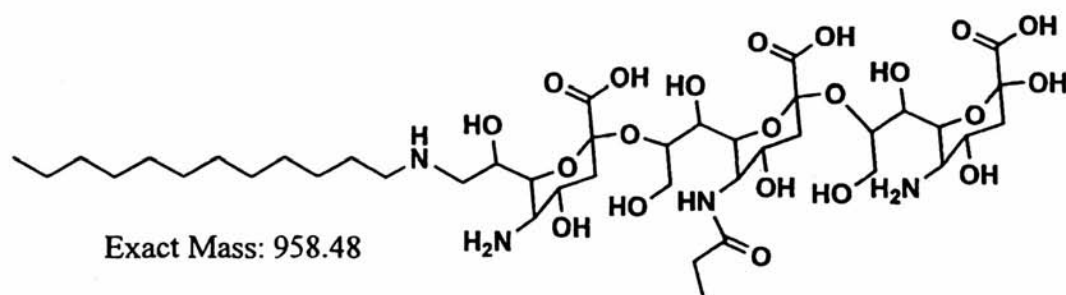
【 図 3 4 】



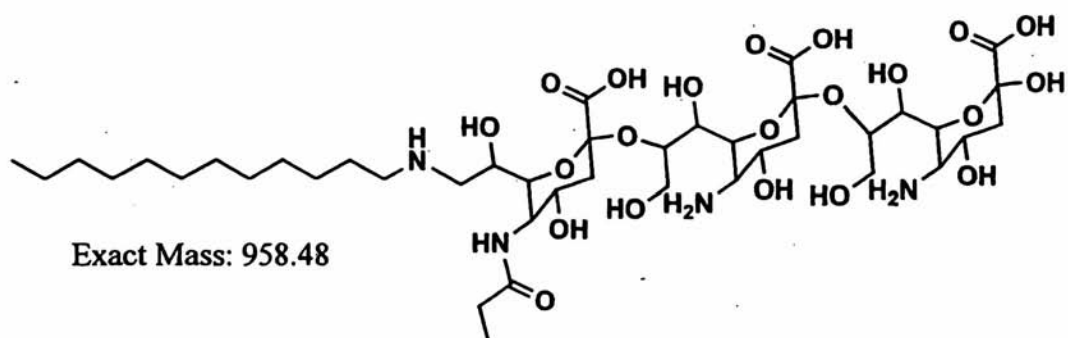
【 図 3 5 】



【図 3 6】



【図 3 7】



直接結合 ELISA によって測定したドデシルアミン PS 抗原への mAb 結合についての濃度^{a, b}

SEAM mAb	非還元 末端 MBPS	非還元末端ドデシル Re-N-Ac MBOS/PS		非還元末端ドデシル N-Pr MBOS/PS	
	Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14
2	>10	>10	>10	>10	0.94
3	>10	0.05	0.05	0.03	0.03
12	0.52	0.37	0.29	0.11	0.01
18	>10	>10	>10	0.87	0.05
35	>10	>10	>10	5.73	0.5

a プレートに被覆した非還元末端ドデシルアミン MBPS 誘導体での ELISA により、1 時間で 0.5 に等しい OD₄₀₅ を与えるのに必要な mAb のマイクログラム/ml 単位の濃度及び明細書中に記載したようなヤギ抗-マウス IgG、M、A アルカリホスファターゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出された結合 mAb。

b MBPS 誘導体の調製及び組成は明細書中に記載した。コロミン酸を、この誘導体の調製に使用した。コロミン酸は、C7 及び C9 のヒドロキシル基が O-アセチル化されない大腸菌 K1 株からのもので、多糖類は B 群髄膜炎菌多糖類 (MBPS) と化学的に同一である。N-Pr, N-プロピオニル; N-Ac, N-アセチル; OS オリゴ糖類; PS, 多糖類; Dp, 重合度。

直接結合ELISAによって測定したBSA-P S誘導体コンジュゲート抗原へのmAb結合についての濃度^{a, b}

SEAM mAb	非還元 末端 MBPS	非還元末端ドデシル Re-N-Ac MBOS/PS		非還元末端ドデシル N-Pr MBOS/PS	
	Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14	OS, Dp<7	PS, Dp>14
2	>10	>10	>10	4.6	3.8
3	>10	0.012	0.014	0.018	0.016
12	0.52	0.18	0.14	0.01	0.02
18	>10	>10	>10	0.07	0.007
35	>10	>10	>10	33	0.23

a プレートに被覆した非還元末端 BSA MBPS 誘導体での ELISA により、1 時間で 0.5 に等しい OD₄₀₅ を与えるのに必要な mAb のマイクログラム/ml 単位の濃度及び明細書中に記載したようなヤギ抗-マウス IgG、M、A アルカリホスファターゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出された結合 mAb。

b MBPS 誘導体の調製及び組成は明細書中に記載した。コロミン酸を、この誘導体の調製に使用した。コロミン酸は、C7 及び C9 のヒドロキシル基が O-アセチル化されない大腸菌 K1 株からのもので、多糖類は B 群髄膜炎菌多糖類 (MBPS) と化学的に同一である。N-Pr, N-プロピオニル; N-Ac, N-アセチル; OS オリゴ糖類; PS, 多糖類; Dp, 重合度。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/022590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C08B37/00 A61K39/095		
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) C08B 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, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 350 449 B1 (JENNINGS HAROLD J ET AL) 26 February 2002 (2002-02-26) cited in the application column 4, line 47 - column 5, line 15 column 5, line 61 - column 6, line 3 column 6, lines 55-59 examples 1,3,8; table 1 ----- -/--	2-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family 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 "T" 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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 February 2006		03/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Lanz, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/022590

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JENNINGS H J ET AL: "INDUCTION OF MENINGOCOCCAL GROUP B POLYSACCHARIDE-SPECIFIC IGG ANTIBODIES IN MICE BY USING AN N-PROPIONYLATED B POLYSACCHARIDE- TETANUS TOXOID CONJUGATE VACCINE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 137, no. 5, 1 September 1986 (1986-09-01), pages 1708-1713, XP002052677 ISSN: 0022-1767 page 1710, left-hand column, paragraph 1 figure 2	1-23
X	US 2002/034518 A1 (SEID ROBERT) 21 March 2002 (2002-03-21) example 1	1-23
A	WO 02/09744 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; JENNINGS, HAROLD, J; ZOU, WEI; BO) 7 February 2002 (2002-02-07) table 4	24-26
A	WO 01/09298 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 8 February 2001 (2001-02-08) example 3	24-27
X	R. ROY, R. A. PON: "Efficient Synthesis of alpha(2-8)-linked N-Acetyl and N-Glycolylneuraminic Acid Disaccharides from Colominic acid" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 7, 1990, pages 3-12, XP009062285 the whole document	3,12,19, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/022590

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6350449	B1	26-02-2002	NONE	
US 2002034518	A1	21-03-2002	US 2004052805 A1	18-03-2004
WO 0209744	A	07-02-2002	AU 7832301 A	13-02-2002
			CA 2417574 A1	07-02-2002
			EP 1307221 A2	07-05-2003
			US 2004009195 A1	15-01-2004
WO 0109298	A	08-02-2001	AU 6420000 A	19-02-2001
			CA 2279134 A1	29-01-2001
			EP 1198244 A2	24-04-2002
			JP 2003506034 T	18-02-2003
			MX PA02000958 A	21-07-2003
			ZA 200200731 A	28-01-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	S	
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569	F	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B064 AF11 CA02 CD09 CD12 DA01 DA13
 4C085 AA03 BB24 EE01 EE06 FF24
 4C086 AA01 AA02 EA02 EA25 MA02 MA05 NA14 ZB35

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008509886A5	公开(公告)日	2008-08-14
申请号	JP2007518334	申请日	2005-06-23
申请(专利权)人(译)	儿童医院研究中心在奥克兰		
[标]发明人	モーグレゴリーアール グラノフダンエム		
发明人	モー グレゴリー アール グラノフ ダン エム		
IPC分类号	A61K39/00 C12P19/04 A61K31/702 A61K31/715 A61P31/04 A61K39/39 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C08L5/00 A61K39/0258 A61K39/095 A61K2039/6037 C08B37/0063 Y02A50/474		
FI分类号	A61K39/00.H C12P19/04.C A61K31/702 A61K31/715 A61P31/04 A61K39/39 G01N33/53.S G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B064/AF11 4B064/CA02 4B064/CD09 4B064/CD12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/BB24 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA02 4C086/EA25 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB35		
优先权	60/582672 2004-06-23 US		
其他公开文献	JP2008509886A		

摘要(译)

技术领域本发明一般涉及含有多糖衍生物的组合物，其制备方法和用于预防或治疗由脑膜炎球菌引起的疾病的方法，特别是B组（NmB）菌株和大肠杆菌K1。提供。本发明提供了脱-N-乙酰化PS衍生物，其中PS的一个或多个残基已经通过脱-N-乙酰化被修饰。此外，本发明还涉及制备N-乙酰化PS的方法，其中含有脱-N-乙酰化PS的PS中的一个或多个N-乙酰基被另一个N-酰基取代，通常为C₂-C₁₂，其被低级酰基取代。本发明进一步包括具有长链烃的脱-N-乙酰化PS衍生物，和其中脱-N-乙酰化PS衍生物与载体如载体蛋白缀合的缀合物。