

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 520765

(P2003 - 520765A)

(43)公表日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/195	ZNA	C 0 7 K 14/195	ZNA 4 B 0 6 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/07	4 C 0 8 4
39/07		39/395	R 4 C 0 8 5
39/395		A 6 1 P 1/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/02		C 0 7 K 16/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 74数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 602265(P2000 - 602265)

(86)(22)出願日 平成12年3月1日(2000.3.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月3日(2001.9.3)

(86)国際出願番号 PCT/AU00/00142

(87)国際公開番号 W000/052041

(87)国際公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(31)優先権主張番号 PP 8939

(32)優先日 平成11年3月1日(1999.3.1)

(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71)出願人 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・メルボーン
オーストラリア・ヴィクトリア・3052・
パークビル・ロイヤル・パレード(番地なし)

(71)出願人 シーエスエル、リミテッド
オーストラリア連邦ビクトリア州、パーク
ビル、ポプラー、ロード、45

(71)出願人 ヴィクトリアン・デアリー・インダストリー・
オーソリティ
オーストラリア・ヴィクトリア・3067・
アボッツフォード・ヴィクトリア・スト
リート・651 - 653

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外7名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポルフィロモナス・ジンジヴァリスによる歯周炎の治療及び予防のための保護エピトープを含有する合成ペプチド

(57)【要約】

本発明は、ポリフィロモナス・ジンジヴァリスに対する免疫応答を生じるために使用される組成物を提供し、この組成物は、適切なアジュバント及び/または許容可能なキャリアーもしくは賦形剤と、少なくとも一つのP.ジンジヴァリスエピトープを含む、50以下のアミノ酸の少なくとも一つのペプチド、または上記ペプチドのマルチマーを含む。本発明は、患者におけるP.ジンジヴァリス感染の可能性及び/または疾患のひどさを減少する方法を提供し、上記方法は、P.ジンジヴァリスに対して向けられた患者における免疫応答を誘導するのに有効な第一の特徴点の組成物の量を、患者に投与することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポルフィロモナス・ジンジヴァリスに対する免疫応答を惹起するのに使用する組成物であり、適切なアジュバント及び/又は許容されるキャリア又は賦形剤、及び少なくとも1のペプチドであって50アミノ酸以下であり、少なくとも1のP・ジンジヴァリスエピトープ又はそのペプチドの多量体を含み、当該少なくとも1のP・ジンジヴァリスのエピトープが、下記：

「配列表1」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
 LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
 LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
 TNPEPASGKMWIAGDGGNQF (SEQ ID NO:4),
 RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5),
 DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)
 TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD
 SEQ ID NO:7).

からなる群より選択されるペプチドに含まれるエピトープより選択されることを特徴とする組成物。

【請求項2】 前記の少なくとも1のペプチドが、下記：

「配列表2」

NTFGSVIPATGPL (SEQ ID NO:8),
 LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
 LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
 PASGKMWIAGDG (SEQ ID NO:9),
 EAGKKYTFTMRR (SEQ ID NO:10)
 EAGKKYHFLMKKM (SEQ ID NO:11).

からなる群より選択される配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の組成物

。

【請求項3】 前記の少なくとも1のペプチドが、下記：

「配列表3」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5),
DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)

TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD
(SEQ ID NO:7).

からなる群より選択される配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の組成物

。

【請求項4】 前記の少なくとも1のペプチドが、下記：

「配列表4」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5),
DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD
SEQ ID NO:7).

からなる群より選択されることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 1つを越えるペプチドを含むことを特徴とする請求項1乃至5の何れか一項に記載の組成物。

【請求項6】 前記のペプチドが、多量体の形態をとることを特徴とする請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記の多量体が、異なるペプチドを含むことを特徴とする請

求項6に記載の組成物。

【請求項8】 50以下のアミノ酸を有するペプチドであって、少なくとも1のP．ジンジヴァリスエピトープを含み、当該少なくとも1のP．ジンジヴァリスのエピトープが、下記：

「配列表5」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5),
DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD
SEQ ID NO:7).

からなる群より選択されるペプチドに含まれるエピトープより選択されることを特徴とするペプチド。

【請求項9】 下記：

「配列表6」

NTFGSVIPATGPL (SEQ ID NO:8),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
PASGKMWIAGDG (SEQ ID NO:9),
EAGKKYTFTMRRRA (SEQ ID NO:10)
EAGKKYHFLMKKM (SEQ ID NO:11).

からなる群より選択される少なくとも1の配列を含むことを特徴とする請求項8に記載のペプチド。

【請求項10】 下記：

「配列表7」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
RYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGT (SEQ ID NO:5),
DDYVFEAGKKYHFLMCKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGT
(SEQ ID NO:7).

からなる群より選択される少なくとも1の配列を含むことを特徴とする請求項8に記載のペプチド。

【請求項11】 前記ペプチドが、下記：

「配列表8」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
RYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGT (SEQ ID NO:5),
DDYVFEAGKKYHFLMCKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGT
SEQ ID NO:7).

からなる群より選択されることを特徴とする請求項8に記載のペプチド。

【請求項12】 診断試験における抗原としての、請求項8乃至11の何れか一項に記載のペプチドの使用。

【請求項13】 請求項1乃至7の何れか一項に記載の組成物、又は請求項8乃至11の何れか一項に記載のペプチドに対して特異的に向けられた抗体。

【請求項14】 モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項13に記載の抗体。

【請求項15】 診断試験における、請求項13又は14に記載の抗体の使用。

【請求項16】 請求項13又は14に記載の抗体、及び薬学的に許容されるキャリア又は希釈剤を含むことを特徴とする組成物。

【請求項17】 個体が、P・ジンジヴァリスに感染すること及び/又は弛緩が発病することの見込みを低減する方法であって、当該個体に対して、請求項1乃至7の何れか一項に記載の組成物の、当該個体内に置いてP・ジンジヴァリスに向けられた免疫反応を誘導するのに十分な量を投与することを含むことを特徴とする方法。

【請求項18】 個体がP・ジンジヴァリスに感染すること、及び/又は疾患が発病することの見込みを低減する方法であって、個体に対して、請求項16に記載の組成物の有効量を投与することを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、歯周病と関連する口内細菌ポリフィロモナス・ジンジヴァリス (*Porphyromonas gingivalis*) の病原性効果の抑制のための、口腔組成物および免疫原性組成物に関する。本発明はまた、歯肉下プラークサンプルにおけるポリフィロモナス・ジンジヴァリスの存在についての診断試験、および血清中のP. ジンジヴァリス抗原に対する特異的抗体にも関する。上記組成物は、ポリフィロモナス・ジンジヴァリスのPrtR-PrtKプロテイナーゼ - アドヘシン複合体の保護エピトープに対応する合成ペプチド構築物を含む。上記合成ペプチド構築物は、活性免疫化のためのワクチン製剤における免疫原として有用であり、受動免疫のために有用な、および診断アッセイのための試薬として有用な、タンパク質特異的及びペプチド特異的抗血清を生産するために使用できる。

【0002】**【従来技術】**

歯周病は、歯の支持組織の細菌関連性炎症性疾患であり、歯肉下組織の非特異的な可逆的炎症である、比較的穏やかな形態の歯肉炎から、歯の支持構造の破壊によって特徴づけられるより悪化した形態の歯肉炎までの範囲に及ぶ。歯肉炎は、歯周組織の破壊を導く特異的なグラム陰性細菌の集団の歯肉下の感染と関連し、主要な一般的健康上の問題である。非常に関心の集まっている細菌の一つはポリフィロモナス・ジンジヴァリスであり、成人の歯周炎病変からのこの微生物の回収は、歯肉下の嫌氣的培養可能なフローラの50%までに達し、一方でP. ジンジヴァリスは健常な部位からも少数ではあるがまれに回収される。歯肉下プラーク中のP. ジンジヴァリスの濃度の増大は、歯肉炎のひどさの増大と比例的に関連し、培養可能な歯肉下微生物集団からの上記微生物の根絶により、上記疾患の治療が達成される。歯肉炎病変の進行は、P. ジンジヴァリスの歯肉下への移植により、サル、ラット及びマウスにおいて示されている。動物と人の両者におけるこれらの発見は、成人の歯肉炎の形成におけるP. ジンジヴァリスについての主要な役割を示唆する。

【0003】

P. ジンジヴァリスは、特異的なアミノ酸の代謝からエネルギーを得る、黒色で、嫌気性で、タンパク質溶解性のグラム陰性桿菌である。上記微生物は、鉄、好ましくはヘムまたはFe(III)酸化産物ヘミンの形態の鉄を独立の増殖のために必要とし、過剰なヘミンの条件下で増殖する場合、実験動物において非常に毒性である。カプセル、アドヘシン、細胞毒素、及び細胞外加水分解酵素を含む数多くの毒性因子が、P. ジンジヴァリスの病原性において考慮されている。P. ジンジヴァリスのコロニー形成を妨げる有効で安全なワクチンを開発するために、中和抗体の生産のための免疫原として有用である、毒性に關与する有効な抗原を同定することが必要である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

我々は、ポリフィロモナス・ジンジヴァリスの主要な毒性因子であるシステインプロテイナーゼとアドヘシンのマルチタンパク質複合体を精製し特徴付けした。この複合体は、生化学的に特徴づけされており、国際特許出願出願番号PCT/AU96/00673に開示された。上記複合体は、C末端アドヘシンドメインを有する160kDa Arg-特異的プロテイナーゼ (PrtRと称する) と会合した、C末端アドヘシンドメインを有する163kDa Lys-特異的プロテイナーゼ (PrtKと称する) より成る。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、P. ジンジヴァリスの主要な毒性因子である、システインプロテイナーゼとアドヘシンのPrtR-PrtK複合体のアドヘシン上のエピトープを含む数々多くのペプチドを同定した。これらの配列は、表1に示される。

【0006】

【表1】

P. gingivalis の PrtR-PrtK タンパク質複合体のエピトープを含むペプチドのアミノ酸配列

名称	<u>PrtR-PrtK</u>	アミノ酸配列[一文字表記]
	アドヘシン	
EP1	PrtR27	FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (配列番号1)
EP2	PrtR27	LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (配列番号2)
EP3	PrtK39	LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (配列番号3)
EP4	PrtR27	TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (配列番号4)
EP5	PrtR27	RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (配列番号5)
EP6	PrtR44	DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (配列番号6)
EP7	PrtR27	TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKY TFTMRRAGMGDGTD (配列番号7)

【0007】

表1のペプチド(EP1-EP7)は、PrtRとPrtKタンパク質-アドヘシン複合体のアドヘシンドメインの配列を表す。

【0008】

従って、第1の特徴点として、本発明は、ポリフィロモナス・ジンジヴァリスに対する免疫応答を生じるために使用される組成物を提供し、上記組成物は、適切なアジュバント及び/または許容可能なキャリアーもしくは賦形剤と、少なくとも一つのP. ジンジヴァリスエピトープを含む、50以下のアミノ酸の少なくとも一つのペプチド、または上記ペプチドのマルチマーとを含み、上記少なくとも一つのP. ジンジヴァリスエピトープは、以下のものよりなる群から選択されるペプチドを内部に含むエピトープから選択される：

「配列表9」

EP1 FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1),
EP2 LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2),
EP3 LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3),
EP4 TNPEPASGKMWLAGDGGNQP (SEQ ID NO:4),
EP5 RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5),
EP6 DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6),
EP7 TNPEPASGKMWLAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAG
MGDGTD (SEQ ID NO:7).

【0009】

上記組成物が一つ以上のペプチドを含む場合、上記ペプチドは、個々のペプチドとして、またはマルチマー形態で存在してもよい。マルチマー形態が使用される場合、上記マルチマーは同じペプチドの複数のコピーを含んでもよいが、上記マルチマーは異なるペプチドを含むことが好ましい。ペプチドマルチマーは、PC T/AU98/00076に記載されたように調製されてもよく、この文献の全内容は、参考としてここに取り込まれる。

【0010】

第二の特徴点として、本発明はペプチドを提供し、上記ペプチドは、少なくとも一つのP. ジンジヴァリスエピトープを含み、上記P. ジンジヴァリスエピトープは、以下のものよりなる群から選択されるペプチドを含むエピトープから選択される。

「配列表10」

EP1 FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1)
EP2 LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2)
EP3 LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3)
EP4 TNPEPASGKMWLAGDGGNQP (SEQ ID NO:4)
EP5 RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5)
EP6 DDYVFEAGKKYHFLMCKMGS GDGTE (SEQ ID NO:6)
EP7 TNPEPASGKMWLAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAG
MGDGTD (SEQ ID NO:7)

【0011】

本発明の好ましい形態として、上記ペプチドは、以下のものよりなる群から選択される少なくとも一つの配列を含む：

「配列表11」

NTFGSVIPATGPL (SEQ ID NO:8)
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2)
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3)
PASGKMWLAGDG (SEQ ID NO:9)
EAGKKYTFTMRRRA (SEQ ID NO:10),
EAGKKYHFLMCKM (SEQ ID NO:11).

【0012】

本発明の別の好ましい実施態様として、上記ペプチドは、以下のものよりなる群から選択される少なくとも一つの配列を含む：

「配列表12」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1)
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2)
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4)
RYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5)
DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6),
TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTMRRAG
MGDGTD (SEQ ID NO:7).

【0013】

本発明のまた別の好ましい実施態様として、上記ペプチドは、以下のものよりなる群から選択される：

「配列表13」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1)
LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2)
LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQP (SEQ ID NO:4)
RYDDFTFEAGKKYFTMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5)
DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6),

TNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYFTMRRAG
MGDGTD (SEQ ID NO:7).

【0014】

当業者に容易に明らかなように、これらのペプチドは、診断試験における抗原として、または製剤中の免疫原として使用されてもよい。

【0015】

第三の特徴点として、本発明は、本発明の第一の特徴点の組成物、または本発明の第二の特徴点のペプチドに対して特異的に向けられた抗体を含む抗体調製物を提供する。上記抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

【0016】

当業者に容易に明らかなように、これらの抗体は、診断試験において、または製薬学的製剤において使用されてもよい。

【0017】

第四の特徴点として、本発明は、患者におけるP. ジンジヴァリス感染の可能性及び/または疾患のひどさを減少する方法を提供し、上記方法は、P. ジンジヴァリスに対して向けられた患者における免疫応答を誘導するのに有効な第一の特徴点の組成物の量を、患者に投与することを含む。

【0018】

第五の特徴点として、本発明は、患者におけるP. ジンジヴァリス感染の可能性及び/または疾患のひどさを減少する方法を提供し、上記方法は、第三の特徴点の抗体の有効量を患者に投与することを含む。

【0019】

ペプチドは、ポリアミド支持体(Druiland等, 1986, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 125-137)上の、t-ブチルオキシカルボニルアミノ酸(Mitchell等, 1978, J. Org. Chem. 43: 2845-2852)を使用する、または9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)アミノ酸を使用する標準的な固相ペプチド合成、ペプスカン合成(Geyssen等, 1987, J. Immunol Methods 03: 259; 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998)、または標準的な液相合成を含む、当該技術分野で周知のペプチド合成のいくつかの方法の一つを使用して合成できる。

【0020】

多価/マルチペプチド高分子量ペプチド分子の合成のための各種の方法が、ペプチド抗原を合成するために使用できる。これは、当該技術分野で周知の方法を使用して、及び新規なライゲーションストラテジーを使用して達成されるであろう。

【0021】

表1のペプチドは、同じでも異なってもよく、相補的なリガンドであってもなくてもよい、二つのリガンドを含む態様で合成できる。かくしてこれらの二項性ペプチドは、いずれかのリガンドを取り込むことができ、チオエーテル、チオエ

ステル、ヒドラゾン、オキシム、チアゾリジン等の結合が、マルチペプチド構築物の合成のために利用できる(Shao及びTam, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117, 3893-3899, Rose等, 1996, Bioconjugate Chem, 7(5): 552-556, Rose. K., 1994, J. Am. Chem. Soc. 116: 30-33, Canne等, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 2998-3007, Lu等, 1991, Mol. Immunol 28(6): 623-630, Liu及びTam., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91, : 6584-6588)。新規なライゲーション戦略は、酸性条件において二重結合によるチオアニゾールのパラ置換を引き起こす、チオアニゾールとアクリロイルペプチドの間の周知の反応を使用するものである(O'Brien-Simpson等, 1997, J. Am. Chem. Soc. 119(6))。アクリロイル-ペプチドとフェニルチオアセチルペプチドを合成して混合し、それらを酸性条件にさらすことによって、Friedal-Craftアルキル化によりライゲーションが進行できる。ライゲーションは、ペプチドの間で、リガンドの一つで誘導化されたオリゴリジン支持体上で達成できる。ライゲーションのための条件は、以下のものより成ることができる：当該技術分野で周知であるFriedal-Craft反応条件と、周知のペプチド切断条件。

【0022】

二項性ペプチドを形成するためにリガンド基の導入は、ペプチドのNまたはC末端で、あるいはペプチド配列の内部で、当該技術分野で周知である遊離アミノ基にリガンドを結合することによって達成できる。これは、ペプチド配列のN末端またはC末端または内部に、標準的なペプチドカップリングプロトコールを使用して、例えばFmoc(Fmoc)_{2,3}ジアミノプロピオン酸、またはFmoc Lys(Fmoc)-OHまたはFmoc Lys(Mtt)-OHのようなオルト位で保護されたリジン残基をカップリングすることによって達成できる。脱保護の後、リガンド基をアミノ基に結合でき、例えばFmoc Lys(Mtt)の選択的な脱保護により、異なるリガンドを単一のペプチドに結合できる。合成のいずれかの時点で、スペーサー分子をペプチドとリガンドの間、及び/または離岸の同士の間導入でき、それはライゲーション反応における立体障害を減少するために使用できる。図1は、合成プロトコールを示す。

【0023】

ペプチドライゲーシオンは、溶液中でまたは固相で達成できる。異なるリガンドの取り込み及び一つのリガンドの選択的な保護は、多価、マルチペプチド構築物の合成を可能にし、それによってペプチドを連続的にライゲーシオンする。この戦略は、ライゲーシオンされるペプチドの向き及び順序が周知であり、制御できるという利点を有する。リガンドのための保護基は例えば、Fmoc、アリルオキシカルボニル(Aloc)またはニトロシナミルオキシカルボニル(Noc)であってもよく、それらは標準的な切断条件で安定であるが、塩基性条件または触媒的アリルトランスファーの下で容易に除去できる。図2は、二項性ペプチドを使用した多価ペプチド構築物の合成のためのライゲーシオンスキームを示す。このプロトコールは、二項性ペプチドを形成するためにペプチドに結合されるリガンドを単純に変更することによって、各種のライゲーシオン化学式に適用できる。

【0024】

かくペプチドの段階的な付加は、固相上で達成できる。これは、例えば4-ヒドロキシメチル安息香酸といったベース置換活性ハンドルを介して固相上でペプチドを構成することによって達成できる。これは、固相に結合したままであるペプチドで、ペプチドの全側鎖の脱保護を可能にする。これは、非反応二項性ペプチドからライゲーシオン産物を分離することが、固相の支持体の単純な洗浄によって達成できることを除いて、液相ライゲーシオンについて使用されるものと同様な水性溶媒中でライゲーシオンを実施できることを可能にするであろう。反応は、ニンヒドリンまたはトリニトロベンゼンスルホン酸試験によってモニターでき、それによって、二項性ペプチド内のリジン残基を、例えば酸切断に対して安定であるが、ヒドラジンで除去できる(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-イリデン)エチル(Dde)で保護することが必要である。図3は、固相のためのライゲーシオン戦略を示す。

【0025】

二項性ペプチドは、リガンドがN及びC末端で存在するように合成できる。これは、環状ペプチドの調製とジペプチド構築物の形成を可能にし、これによってペプチドは、NとN末端、及びCとC末端、またはNとC末端のそれぞれで互いに結合す

ることによって、互いに平行にまたは逆平行に配置できる(図4)。

【0026】

多価ペプチド構築物の合成のための別の方法は、オリゴリジン支持体へペプチドをライゲーシオンすることである(Rose等 1996, *Bioconjugate Chem.* 7(5): 552-556, Canne等 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2998-3007及びLu等, 1991, *Mol. Immunol* 28(6): 623-630)。多数の異なるリガンドを取り込ませ、リジン支持体に保護されたリガンドを取り込ませることによって、ペプチドは支持体上の特定の位置にライゲーシオンできる。ハロアシル化及びFriedal-Craftアルキル化を使用するオキシムまたはヒドラゾンのようなライゲーシオン化学は、リガンド保護の必要性なしに連続的に使用できる。リガンド保護は、リジン支持体へ取り込まれる異なるペプチドの数を増大するために使用できる。図5は、合成プロトコールを示す。

【0027】

当該技術分野で周知の別の方法は、アクリロイルペプチドの合成と、アクリルアミド(0' Brien-Simpson等, 1997, *J. Am. Chem. Soc.* 119(6))、またはアクリロイルアミノ酸でのそれらの重合である。表1に掲げられたPrtR-PrtKタンパク質複合体由来のペプチドはアクリロイル化でき、単一でまたは組み合わせて重合できる。この方法は、多数のペプチドを共に重合可能であるが、そのペプチドを取り込む順序は制御できない。

【0028】

最後のペプチド構築物は、表1に掲げたペプチドの全て、合計または一部を含んでも含まなくてもよい。上記構築物はまた、当該技術分野で周知の混在したT細胞エピトープ(Kaumaya等 1994, *Solid Phase Synthesis*, Epton, R編)、またはMHCクラスII結合ペプチドの構造的/結合モチーフ由来の多様化した配列を含んでも含まなくてもよい(0' Sullivan等, 1991, *J. Immunol*, 147: 2663-2669, Hammer等, 1993, *Cell*, 74: 197-203及びAlexander等, 1994, *Immunity*, 1: 751-761)。さらに、パルミチン酸またはコレステロール等の脂質分子が、ペプチド構築物の免疫原特性を促進するために含まれることができる。当該技術分野で周知の酵素的切断配列(Duncan等, ref)または切断モチーフ由来の多様化した配列(

Van Noort及びVan der Drift, ref)もまた、ペプチド構築物に取り込まれることができる。

【0029】

表1に同定された合成ペプチド抗原は、中和抗体を含む口腔組成物を通じた受動免疫、及びワクチン開発による、診断及び中和について特に興味深い。以前に開示されたP. ジンジヴァリス抗原に対するこれらの合成ペプチド抗原の優越点は、これらのペプチドが動物及びヒト由来の保護血清と反応することが示されていることである。上記ペプチドは、PrtR及びPrtKのアドヘシンドメイン中の配列を表し、そのことが上記ペプチドを診断及び免疫予防産物の開発のために理想的なものとする。

【0030】

上記抗原に対する抗体は、抗原を中和しかくして疾患を予防するための、歯磨き粉及びマウスウォッシュのような口腔組成物において使用できる。抗原特異的抗体はまた、診断アッセイによる歯肉下プラークサンプル中のP. ジンジヴァリスの早期の検出のために使用できる。鼻腔スプレーにより、経口的に、または注射により輸送されるこれらの抗原と適切なアジュバントに基づくワクチンは、これらの抗原に対する特異的な免疫応答を生じ、それによってP. ジンジヴァリスのコロニー形成と悪性を減少し、結果として疾患を予防できる。本発明のペプチド抗原は、予防的及び/または治療的ワクチン製剤における免疫原として；またはP. ジンジヴァリス特異的抗体の血清力価の増大を測定することによるP. ジンジヴァリス感染の検出に向けた診断的イムノアッセイにおける抗原として使用されてもよい。本発明の合成ペプチドはまた、受動免疫のために有用な抗原特異的抗体を生産するために使用されてもよく、歯肉下プラークサンプルのような臨床上の標本中のP. ジンジヴァリスの存在を検出することに向けた診断アッセイのための試薬として使用されてもよい。

【0031】

上述のように、上記組成物はアジュバントを含むことが好ましい。理解されるように、「アジュバント」は、ワクチン組成物の免疫原性及び効力を増大する一つ以上の物質より成る組成物を意味する。適切なアジュバントの非制限的な例と

して、スクアラン及びスクアレン（または他の動物起源の油）；ブロックコポリマー；Tween（登録商標）-80のような界面活性剤；Quil（登録商標）A、DrakeolまたはMarcolのような鉱物油、ピーナッツ油のような植物油；Corynebacterium parvumのようなCorynebacterium由来のアジュバント；Propionibacterium acneのようなPropionibacterium由来のアジュバント；Mycobacterium bovis (Bacille Calmette and GuerinまたはBCG)；インターロイキン2及びインターロイキン12のようなインターロイキン；インターロイキン1のようなモノカイン；腫瘍壊死因子；ガンインターフェロンのようなインターフェロン；サポニン-水酸化アルミニウムまたはQuil-A水酸化アルミニウムのような組み合わせ；リポソーム；ISCOMアジュバント；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ムラルミルジペプチドまたは他の誘導体のような合成グリコペプチド；Avridine；リポドA誘導体；デキストラン硫酸；DEAE-デキストランまたはリン酸アルミニウムを有するDEAE-デキストラン；Carbopol'EMAのようなカルボキシポリメチレン；Neocryl A640のようなアクリル酸コポリマーエマルション（例えば米国特許第5,047,238）；ワクシニアまたは動物ポックスウイルスタンパク質；これら毒素のようなウイルス下粒子アジュバント、またはこれらの混合物が含まれる。

【0032】

【発明の実施の形態】

本発明は、歯周病と関連する口内細菌ポリフィロモナス・ジンジヴァリスの病原性効果の抑制のための口腔組成物及びワクチンに関する。本発明はまた、歯肉下プラークサンプル中のポリフィロモナス・ジンジヴァリスの存在のための診断試験、及び血清中の特異的抗P.ジンジヴァリス抗体に関するの存在のための診断試験に関する。表1のペプチド抗原は、個々のまたはマルチマー若しくはマルチペプチド構築物として合成できる。

【0033】

上記合成ペプチド抗原は、標準法を使用してポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を生産するために使用される。抗体の生産のために使用される動物は、マウス、ウサギ、ヤギ、チキン、ヒツジ、ウマ、ウシ等であることができる。抗原に対する高い抗体力価がイムノアッセイにより検出される場合、動物の血

が採取され、または卵若しくはミルクが回収され、標準法を使用して血清が調製され、及び/または抗体が生成され、あるいは標準法を使用してミエローマ細胞と脾臓細胞を融合することによってモノクローナル抗体が生産される。抗体(イムノグロブリン分画)は、培養物または腹水液、血清、ミルク、または卵から、塩溶液に浸して、ゲル濾過、イオン交換及び/またはアフィニティークロマトグラフィー等により分離してもよいが、塩溶液に浸すことが好ましい。塩抽出法においては、抗血清またはミルクが硫酸アンモニウムで飽和されて沈降物を生じ、その後生理食塩水に対して沈降物を透析して、特異的抗体を有する精製イムノグロブリン分画を得る。好ましい抗体は、ウマ抗血清及びウシ抗血清及びミルクから得られる。本発明において、抗原での動物の免疫化によって得られた抗血清及びミルク中に含まれる抗体は、口腔組成物内に混合される。この場合、抗血清及びミルク、並びに抗血清及びミルクから分離され精製された抗体が使用されてもよい。これらの物質のそれぞれは、単独でまたは二つ以上を組み合わせで使用されてもよい。抗体は、P. ジンジヴァリスを中和し、かくして疾患を予防するために、歯磨き粉及びマウスウォッシュのような口腔組成物において使用できる。抗体はまた、歯科診察室における固相酵素免疫検定法(ELISA)による歯肉下プラークサンプル中のP. ジンジヴァリスの早期の検出のために使用できる。

【0034】

口腔組成物について、投与される上述の抗体の量は0.0001-50g/kg/日であり、上述の抗体の含有量は、組成物の0.0002-10重量%、好ましくは0.002-5重量%であることが好ましい。上述の血清またはミルク抗体を含む本発明の口腔組成物は、歯磨き粉、粉状歯磨き粉、及び液体歯磨き粉のを含む歯磨き剤、マウスウォッシュ、トローチ、チューインガム、デンタルペースト、歯肉下マッサージクリーム、うがい剤、日用品、及び他の食料品のような、口内に適用可能な各種の形態で調製され使用されてもよい。本発明に従った口腔組成物はさらに、特定の口腔組成物のタイプ及び形態に依存してさらなる周知の成分を含んでもよい。

【0035】

本発明の特に非常に好ましい形態として、口腔組成物は、マウスウォッシュまたはリンスのような実質的に液体の特徴を有してもよい。上記調製物において、

ビヒクルは典型的に、好ましくは以下に記載される湿潤剤を含む水 - アルコール混合物である。一般的に水 : アルコールの重量比は、約 1 : 1 から約 20 : 1 の範囲である。このタイプの調製物中の水 - アルコール混合物の総量は典型的に、調製物の約 70 から約 99.9 重量%の範囲である。アルコールは典型的に、エタノールまたはイソプロパノールである。エタノールが好ましい。

【0036】

本発明の上記液体または他の調製物のpHは一般的に、約 4.5 から約 9 の範囲、典型的には約 6 から約 8.0 の範囲、好ましくは 7.4 である。PHは酸（例えばクエン酸または安息香酸）または塩基（例えば水酸化ナトリウム）あるいは緩衝液（例えばクエン酸、安息香酸、炭酸、または重炭酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等）でコントロールできる。

【0037】

本発明の口腔組成物の他の望ましい形態は、歯磨き粉、うがい剤、または歯磨き粉（歯用クリーム）またはゲル歯磨き剤である歯磨き剤のような実質的に固体またはペースト状の特徴を有してもよい。上記固体またはペースト状口腔調製物のビヒクルは一般的に、口内で許容可能な研磨物質を含む。研磨物質の例として、水不溶性メタリン酸ナトリウム、メタリン酸カリウム、リン酸三カルシウム、二水和リン酸カルシウム、無水リン酸二カルシウム、ピロリン酸カルシウム、オルトリン酸マグネシウム、リン酸トリマグネシウム、炭酸カルシウム、水和アルミナ、焼きアルミナ、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸ジルコニウム、シリカ、ベントナイト、及びこれらの混合物が含まれる。他の適切な研磨剤としては、メラミン性、フェノール性、及びウレア性ホルムアルデヒド、及び架橋ポリエポキシドとポリエステルのような粒子状熱形成樹脂が含まれる。好ましい研磨剤として、約 5 ミクロンまでの平均サイズ、約 1.1 ミクロンまでの平均粒子サイズ、及び約 50,000 cm^2 / gm までの批評面積を有するシリカ、シリカゲルまたはコロイド状シリカ、及び非晶性アルミノケイ酸アルカリ金属錯体が含まれる。

【0038】

視覚的に透明なゲルが使用される場合、Syloid 72及びSyloid 74のようなSYLOID（当職商標）、またはSantocel 100のようなSANTOCEL（登録商標）の下で販売

されているもののようなコロイド状シリカの研磨剤、アルミノケイ酸アルカリ金属錯体が、歯磨き剤において一般的に使用される薬剤液体（水及び/または湿潤剤を含む）システムをゲル化する屈折率に近い屈折率を有しているため特に有用である。

【0039】

「水不溶性」研磨剤と称されるものの多くはアニオン性の特徴を有し、少量の可溶性物質をも含む。かくして、不溶性メタ硫酸ナトリウムは、Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 第4版, pp. 510-511に説明されているいずれかの適切な態様で形成されてもよい。Madrell's塩及びKurrol's塩として周知である不溶性メタリン酸ナトリウムの形態はさらに、適切な物質の例となる。これらのメタ硫酸塩は、水中で数分間のみの可溶性を示し、それ故一般的に不溶性メタ硫酸塩(IMP)と称される。これらは、不純物として可溶性硫酸塩物質の少量で存在し、通常4重量%までの数パーセントで存在する。不溶性メタ硫酸塩の場合に可溶性トリメタ硫酸ナトリウムを含むと解される、可溶性硫酸塩物質の量は、所望されるのであれば水での洗浄によって減少または除去されてもよい。不溶性メタ硫酸アルカリ金属は典型的に、上記物質の1%以下が37ミクロン未満であるような粒子サイズのパウダー形態で使用される。

【0040】

研磨剤は一般的に、約10%から約99%の重量濃度で固体またはペースト状組成物中に存在する。好ましくはそれは、歯磨き粉中で約10%から約75%の量で存在し、粉状歯磨き粉中で約70%から約99%の量で存在する。歯磨き粉において、研磨剤が天然でシリカ質である場合、それは一般的に約10-30重量%の量で存在する。他の研磨剤は典型的に、約30-75重量%の量で存在する。

【0041】

歯磨き粉において、液体ビヒクルは、典型的に調製物の約10から約80重量%の範囲の量で、水と湿潤剤を含んでもよい。グリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール、及びポリプロピレングリコールが、適切な湿潤剤/キャリアーとして例示される。さらに水、グリセリン及びソルビトールの液体混合物が有

利である。屈折率が重要な要素である透明なゲルにおいて、約2.5 - 30%w/wの水、0から約70%w/wのグリセリン、及び約20 - 80%w/wのソルビトールが好ましくは使用される。

【0042】

歯磨き粉、クリーム及びゲルは典型的に、宅0.1から約10,好ましくは約0.5から約5%w/wの割合で、天然または合成の増粘剤またはゲル化剤を含む。適切な増粘剤は、合成ヘクトライト、例えばLaporte Industries Limitedにより販売されているLaponite(例えばCP, SP2002,D)のような入手可能な、合成コロイド状ケイ酸アルカリ金属錯体クレーである。Laponite Dは、約58.00重量%のSiO₂、25.40重量%のMgO、3.05重量%のNa₂O、0.98重量%のLi₂O、及びいくらかの水と微量元素を含む。その正確な特異的重量は2.53であり、それは8%湿度において1.0g/mlの見かけの体積密度を有する。

【0043】

他の適切な増粘剤には、Irishモス、イオタカラゲナン、トラガカントゴム、デンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルプロピルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース(例えばNastrosolとして入手可能)ナトリウムカルボキシメチルセルロース、及び微細に製粉されたSyloid(例えば244)のようなコロイド状シリカが含まれる。プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、及びヘキシレングリコールのような湿潤性ポリオール、メチルセロソルブ及びエチルセロソルブのようなセロソルブ、オリーブ油、ヒマシ油及びワセリンのような直鎖状で少なくとも約12の炭素を含む植物油及びワックス、並びに酢酸アミル、酢酸エチル、及び安息香酸ベンジルのようなエステルといった可溶化剤もまた含んでもよい。

【0044】

従来品のように、警句調製物は、適切にラベル化されたパッケージで販売または配置されてもよいことが理解されるであろう。かくして、マウスリンスのピンは、マウスリンスまたはマウスウォッシュのための物質であることを記載し、使用のための説明書を有するラベルを有する；並びに歯磨き粉、クリームまたはゲ

ルは通常、歯磨き、クリームまたはゲルのための物質であることを記載するラベルを有する、折り畳み可能なチューブ、典型的にアルミニウム、直線状の鉛またはプラスチック、あるいは他のピン型絞り出し容器、内容物を計量するためのポンプ式または加圧式ディスペンサー内に配置されるであろう。

【0045】

有機表面活性剤は、予防効果の増大を達成し、口腔内での活性剤の全体的な完全な配置を達成することを補助し、素のままの組成物をより化粧品的に許容可能にするために、本発明の組成物中で使用される。有機表面活性剤は好ましくは、本発明の抗体を変性しない、天然においてアニオン性、非イオン性または両性のものであり、組成物に界面活性特性と起泡特性を与える一方で、抗体を変性しない界面活性物質を表面活性剤として使用することが好ましい。適切なアニオン性界面活性剤の例として、例えば水素化ココナツ油脂肪酸のモノ硫酸モノグリセリドのナトリウム塩のような脂肪酸モノグリセリドモノ硫酸の水溶性塩、ラウリル硫酸ナトリウムのような硫酸高級アルキル、ナトリウムドデシルベンゼンスルホナートのようなアルキルアリアルスルホナート、高級アルキルスルホアセタート、1,2-ジヒドロキシプロパンスルホナートの高級脂肪酸エステル、並びに脂肪酸、アルキルまたはアシル基等の中に12から16の炭素を有するもののような、低脂肪性アミノカルボン酸化合物の実質的に飽和した高級脂肪性アシルアミドが含まれる。最後に挙げられたアミドの例はN-ラウロイルサルコシン、及びN-ラウロイル、N-ミリストイル、またはN-パルミトイルサルコシンのナトリウム、カリウム、及びエタノールアミン塩であり、これらは実質的に石けんを含まないか、同様な高級脂肪酸物質である。本発明の口腔組成物中のこれらのサルコシン化合物の使用は、酸性溶液中での歯のエナメル質の溶解性のいくらかの減少を発揮することに加えて、炭化水素骨格のため口腔内で酸の形成を阻害する長期的な顕著な効果を、これらの物質が発揮するため、特に有利である。

【0046】

抗体と共なる使用に適した水溶性非イオン性界面活性剤の例は、長い疎水性鎖（例えば約12から20の炭素原子の脂肪鎖）を有する各種の反応性水素含有化合物と、エチレンオキシドとの反応縮合産物であり、この縮合産物（「エトキサ

マー」)は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、ポリ水素アルコール(例えばソルビタンモノステアレート)、及びポリプロピレンオキシド(例えばPluronic物質)と、ポリ(エチレンオキシド)との縮合産物のような親水性ポリオキシエチレン部分を含む。

【0047】

表面活性剤は典型的に、約0.1 - 5重量%の量で存在する。表面活性剤が本発明の抗体の溶解を補助し、それによって必要とされる可溶性湿潤剤の量を減少することは有利である。

【0048】

白色化剤、防腐剤、シリコーン、クロロフィル化合物、及び/または尿素、リン酸アンモニウムのようなアンモニア化合物、並びにこれらの混合物のような各種の他の物質が、本発明の口腔組成物中に取り込まれてもよい。これらのアジュバントは存在する場合、所望される特性及び特徴に実質的に負に影響しない量で調製物中に取り込まれる。

【0049】

いずれかの適切な香味剤または甘味剤物質もまた使用されてもよい。適切な香味成分の例は、スペアミント、ペパーミント、ウインターグリーン、サッサfras、クローブ、サージ、ユーカリ、マヨラナ、シナモン、レモン、及びオレンジの油のような香味油、並びにサリチル酸メチルである。適切な甘味剤は、スクロース、ラクトース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、ナトリウムシクラーマート、ペリラルチン、AMP(アスパルチルフェニルアラニン、メチルエステル)、サッカリン等を含む。適切には、香味剤及び甘味剤は、調製物の約0.1%から5%以上でそれぞれまたは共に含まれてもよい。

【0050】

本発明の好ましい実施態様として、本発明の組成物を含むマウスウォッシュまたは歯磨き剤のような本発明に従った口腔組成物は、好ましくは少なくとも2週間から8週間までまたは生涯を通じて、約4.5から約9, 一般的には約5.5から約8, 好ましくは約6から8のpHで、毎日または2若しくは3日おきで、または好ましくは毎日1から3回、歯肉と歯に規則的に適用される。

【0051】

本発明の組成物は、ロゼンジ内に取り込むことができ、または例えば暖かいゴムベース内に攪拌することによって、またはゴムベースの外表面をコートすることによって、チューインガムまたは他の製品に取り込むことができ、それらの説明として、ジェルトン、ラバーラテックス、ビニライト樹脂等が挙げられ、望ましくは可塑剤または軟化剤、糖類または他の甘味料、例えばグルコース、ソルビトール等と共に取り込まれる。

【0052】

本発明の別の重要な形態は、鼻腔内スプレー、経口的、または注射により、上記抗原に対する特異的免疫応答を生産し、それによってP. ジンジヴァリスのコロニー形成を減少し、その悪性を減少し、結果として疾患を予防するために、上記合成ペプチド抗原と適切なアジュバントに基づくワクチンである。P. ジンジヴァリスの細胞全体または他の以前に調製された抗原とは異なり、ここに記載されるペプチド抗原は、P. ジンジヴァリス関連歯周病の予防のためのワクチンの調製のための、安全で有効な抗原である。さらに本発明に従って、生産された抗原性ペプチドは、P. ジンジヴァリスによって引き起こされる歯周病及び感染に対する受動免疫に有用な、P. ジンジヴァリス抗血清を生産するために使用されてもよい。

【0053】

以下の実施例は、本発明の性質をさらに説明するが、本発明はそれらに制限されるわけではないことが理解されよう。本明細書及び添付された特許請求の範囲に示された全ての量及び割合は、別の記載がなければ重量単位である。

【0054】

【実施例】

実施例1

(i) PrtR - PrtKプロテイナーゼ付着因子複合体中の保護エピトープの同定

PrtR - PrtKプロテイナーゼ付着因子複合体を、以前、国際特許出願PCT/AU96/00673に記載された通り精製した。これは、ワクチンとし

て用いられるとき、マウスに、*P.gingivalis*による攻撃に対する保護を与えることを示した。PrtR - PrtK複合体は、マウス膿瘍モデルで試験された。このモデルは、おおよそKesavaluら(1992)[Infect Immun 60:1445-1464]の方法に基づく。典型的な実験の概要を以下に示す。簡潔にいうと、ARC(パース、オーストラリア)からBALB/cマウスを得、調製物で首筋に皮下免疫し、生存*P.gingivalis*株W50での攻撃の前に、10週齢のマウスに表2に従って投与した。マウスにワクチンを、攻撃4週前と1週前に2回投与した。ホルマリンで殺された*P.gingivalis*W50細胞を、4 一晚、0.5%(容量/容量)の緩衝化ホルモル生理食塩水中で、細胞の一定量をインキュベーションにより調製した。接種前にすべての調製物を等量のフロイント不完全アジュバント(FIA、Sigma)で乳化した。動物は、免疫スケジュールの前と1週間後に血を抜き取った。血清は、吸着された抗原として*P.gingivalis*超音波破砕物を用いてELISAによりスクリーニングした。

【0055】

【表2】

免疫スケジュール

グループ	投与回数	処理	n
1	2	FIA ¹ 中の、ホルマリンで殺した 1×10^8 の <i>P.gingivalis</i> 細胞	11
2	2	FIA 中のアフィニティ精製 <i>P.gingivalis</i> PrtR-PrtK 複合体	5
3	2	FIA 中のトリス-システインバッファー	10
4	2	トリスシステインバッファー	10

¹ FIA=フロイント不完全アジュバント

【0056】

細菌の攻撃の調製のために、*P.gingivalis*細胞を、溶解ホースブラッドアガー(HBA)プレート上で37℃で、3日から4日まで、嫌気チャンバーで増殖させ(Mark 3 Anaerobic Workstation, Don Whiteley Scientific Limited; 8% H₂, 12% CO₂, 80% N₂の空気混合物を含む)、ついで0.5g/Lのシステ

インと1 mg / Lのヘミンが添加された20 mlのブレインハートインフュージョンブロス(BHIB:オキシド)に24時間、37 °Cの標準インキュベーター内で継代した。最後に、3 mlのこの培養液を400 mlのBHIBシステム培地に添加し、約15時間、37 °Cの標準インキュベーター内で、650 nmの比色度が0.18になるまでインキュベートした。細胞について、Beckman高速遠心分離でJAローターを用いて10,000 g、30分間の遠心分離によりペレットにし、ついで再懸濁し、これらの実験で用いられたW50株での前もって確立された増殖曲線により最終希釈度をBHIB-システム培地1 ml当たり 3×10^{10} 細胞とした。同定のためにマウスに印をつけ、病変の測定を可能にするためにそれらの背中と胸を剃り、背中の一箇所への攻撃投与の接種の前に体重を測定した。0.1 mlの投与は、マウス当たり 3×10^9 細菌の予想攻撃投与を与えたことに相当する。接種投与量は、溶解HBAプレート上の攻撃投与量の種々の希釈を培養することと、7日後のコロニー数を調べることにより確認した。

【0057】

攻撃の後、毎日、マウスを、それらの体の病変の数とサイズを調べ、それらのサイズを、関与する mm^2 でのおおよその表面積を測定することにより評価した。以前の実験では、非免疫マウスでは、病変は、生存細菌の背中又は脇への接種の後マウスの腹上で進んだ。苦痛のマウスをすべて選択した。観察を2週間行ない、そのような実験の1つの要約を表3にまとめる。この実験においてマウス当たり 3×10^9 細菌の投与量が細菌の所望の数であったが、接種からプレートに塗布した後、各マウスは実際に、生存*P.gingivalis*細菌株W50の 3.17×10^9 の攻撃投与量を受けたことを計算した。

【0058】

マウスが免疫されたとき、ホルマリンで殺された*P.gingivalis*株W50細胞(グループ1)全体で、PrtR-PrtK複合体(グループ2)で、病変のサイズにおいて、FIAを受けている動物の(グループ3)での病変サイズと比較したときに、著しい減少($p < 0.005$)が見られた(表3)。これらの結果は明らかにPrtR-PrtK複合体が、免疫原として有効に働くことを示す。目に見える病変を全く示

さない動物の数が40%であった動物の唯一のグループは、PrtR-PrtK複合体グループであった(グループ2)。他のグループはすべて、ホルマリンで殺された細胞も含めて(グループ1)、すべての動物が目に見える病変を示しており、PrtR-PrtK複合体が、ホルマリンで殺された細胞よりよい免疫原であることを示した。

【0059】

【表3】

グループ	病変サイズ 平均最大病変サイズ mm ²	P*
1	30.2 ± 28.4 †	0.0008
2	30.0 ± 36.0	0.0028
3	86.8 ± 41.1	—
4	201.7 ± 125.8	0.012

* グループ3を他のグループと比較した Mann Whitney ランク合計テストにより計算された可能性

† 平均±SD

【0060】

PrtR-PrtK複合体で免疫されたグループ2マウスからの保護血清を集め、ブールし、PrtR-PrtK免疫原でのウェスタンブロットで用いた。マウス保護血清と同様に、ウェスタンブロットも、歯周炎(D24、D20)の2人の被験者と、歯肉下のプラークにP.gingivalisを有する歯周炎の徴候のない健康な被験者(H10)からの血清を用いて行なった。被験者D20は、非常に進んだ歯周炎を有していたが、被験者D24は軽い疾患の程度であった。

【0061】

イムノブロットティング

精製されたPrtR-PrtK複合体を、ミニゲルシステム(BioRad、Richmond、CA)で12.5%アクリルアミドゲル(1mm)を用いたSDS-PAGEに供した。タンパク質を、PVDF膜上で電気泳動で移動させた。膜の分画の後、0.1%w/v CBB R250で分子量標準を染色した。残りの分画を1時間20

で、TNバッファー(50mMトリス-HCl、pH7.4、100mM NaCl)中の5%w/v脱脂スキムミルク粉末でブロックした。その後、分画を、TNバッファーで1:25に希釈された以下の抗血清、被験者H10、被験者D24、被験者D20又はマウス保護PrtR-PrtK血清とインキュベートした。205時間後、分画を洗浄し(0.05%v/v Tween20を含む4×TNバッファー)、ついで1時間20 で適当なコンジュゲート抗体、抗ヒトIgGホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートと又は抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートとインキュベートした。洗浄の後(0.05%v/v Tween20を含む4×TNバッファー)、結合した抗体を、2.8M 4-クロロ-1-ナフトール、16.6%v/vメタノールと0.05%v/vの30%H₂O₂溶液を含むTNバッファーで、検出した。Milli Q水で膜をリンスすることにより発色を停止した。

【0062】

44kDaでのタンパク質のバンドは、テストしたすべての血清との反応を示した(データは示さず)。保護マウス血清と、歯周炎でない被験者H10からの血清も、27kDaのタンパク質バンドに結合した(PrtR27付着因子)。D20(進行した歯周炎)からの被験者の血清は、この27kDaタンパク質と反応せず、27kDa付着因子に対する抗体は、被験者H10と免疫保護されたマウスに歯周炎に対する保護を提供できたことを示唆した。

【0063】

エピトープマッピング分析

PrtR27のN末端の148残基に相当する、20の重なる13merのペプチド(6残基でオーバーレイ、7残基でオフセット)を、Chiron Technologies(メルボルン、オーストラリア)により、マルチピンペプチド合成システムを用いて合成した。PrtR27付着因子のN末端148残基の配列は以下の通りである:

「配列表14」

ANEAKVVLAADNVWDGNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTAS
SDLYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCTINPEPASGKM
WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEEVDDSPA
(SEQ ID NO: 12).

【0064】

合成されたオーバーラッピングペプチドは以下の通りである。

「配列表15」

ANEAKVVLAADNV (SEQ ID NO:13)
LAADNVWDGNTGY (SEQ ID NO:14)
DGNTGYQFLLDAD (SEQ ID NO:15)
FLLDADHNTFGSV (SEQ ID NO:16)
NTFGSVIPATGPL (SEQ ID NO:17)
PATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:18)

TGTASSDLYSANF (SEQ ID NO:19)
LYSANFESLIPAN (SEQ ID NO:20)
SLIPANADPVVTT (SEQ ID NO:21)
DPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:22)
NIIVTGQGEVVIP (SEQ ID NO:23)
GEVVIPGGVYDYC (SEQ ID NO:24)
TNPEPASGKMWLA (SEQ ID NO:25)
GKMWLAGDGGNQP (SEQ ID NO:26)
DGGNQPARYDDFT (SEQ ID NO:27)
RYDDFTFEAGKKY (SEQ ID NO:28)
EAGKKYFTMRRRA (SEQ ID NO:29)
FTMRRRAGMGDGT (SEQ ID NO:30)
MGDGTMEVEDDS (SEQ ID NO:31)
DGTMEVEDDSPA (SEQ ID NO:32).

【0065】

ピン結合ペプチドのエピトープマッピングをELISAにより、通常のChiron Technologiesの指示通りに、ヒトとマウスのプロテイナーゼ抗血清を、0.1% v/v Tween20を含む0.1Mリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4中の1% w/vの脱脂スキムミルクパウダーで、1:1000の希釈度で用いて行なった。結合

された抗体は、ペプチド - PINSを、0.004% v/v H₂O₂を含む0.1 M酢酸ナトリウム / クエン酸バッファー中の0.4 mM 3,3',5,5',-テトラメチルベンジジンとインキュベートすることにより検出した。発色を2 M H₂SO₄の添加により停止した。比色度 (O.D.) を450 nmで、BioRadマイクロプレートリーダーモデル450を用いて測定した。

【0066】

D20、D24、H10と保護マウスからの血清を用いて、PIN結合オーバーラッピングペプチドを用いたPrtR27付着因子のN-末端148残基のエピトープマップを作成した。図6は、抗体に結合する4つの領域を明白に示し、以下の配列を有する：

「配列表16」

FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASS (SEQ ID NO:1)
LYSANFESLIPANADPVVITQNIIVTG (SEQ ID NO:2)
TNPEPASGKMWIAGDGGNQF (SEQ ID NO:4)
RYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5)

最後の2つのエピトープは、PrtR27付着因子の連続配列の一部である。

「配列表17」

TNPEPASGKMWIAGDGGNQFARYDDFTFEAGKKYFTFMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:7).

【0067】

PrtR27付着因子のこれらの保護エピトープ配列は、PrtR-PrtKプロテイナーゼ接着複合体のPrtK39付着因子とPrtR44付着因子にも見出され、これは保護マウス血清を用いた複合体のウェスタンブロットの44、39、27 kDaのバンドを説明するものである。PrtR27保護エピトープに相同なPrtK39配列は、以下のものである。

「配列表18」

LYSANFEYLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:3).

P r t R 2 7 保護エピトープに相同な P r t R 4 4 配列は以下のものである。

「配列表19」

DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6).**【0068】**

ペプチド構築物又はペプチドタンパク質コンジュゲートに取りこまれるこれらの配列は、したがって歯周炎に対する保護を提供するための免疫原の基礎を形成する。

【0069】

(ii) ペプチド抗原とマルチプル構築物の合成

表1のペプチド(EP1-EP7)は、標準のFmoc又はtBoc合成法を用いて合成することができ、マルチプル構築物は図1乃至5に概略を示した方法を用いて合成することができる。

【0070】

(iii) 抗体の調製

血清抗体は、ウマ、ウサギ、ヒツジ、又は乳牛を免疫することにより得ることができる。

【0071】

免疫は、標準的な方法を用いて行なうことができる。最初の免疫は通常、抗原とフロイント不完全アジュバントとの混合物である。抗体は、標準的な方法を用いて動物血清又は乳から回収することができる。

【0072】**実施例2**

診断的イムノアッセイでの抗原ペプチドを用いる方法

ここで記載したP.gingivalisペプチド抗原は、ワクチン処方における免疫原と

して、及び診断的アッセイのための抗原として又は治療及び/又は診断的価値の *P.gingivalis* 特異的抗血清を生成させるための抗原としての使用に合成することができる。

【0073】

表1に開示されているペプチドは、図1乃至5の方法を用いて、個々に、又は化学的に結合して合成することができる。ペプチドは、tert-ブチルオキシカルボニルアミノ酸を用いた(Mitchellら、1978, *J. Org. Chem.* 43: 2845-2852)、ポリアミド支持体上の9-フルオレニルメチルオキシカルボニルアミノ酸を用いた(Drylandら、1986, *J. Chem. So. Perkin Trans, I*, 125-137)、標準固相ペプチド合成; ペプスキャン(pepscan)合成(Geyssenら、1987, *J. Immunol. Methods* 03:259; 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998)による方法、又は標準液相ペプチド合成による方法を含む、当業者に知られたペプチド合成のいくつかの方法の1つを用いて合成することができる。例えばアミノ酸の欠失及び置換(アミノ酸への延長及び付加を含む)によるもの、又は他の方法での、ペプチド又はオリゴペプチドの修飾を、ペプチド又はオリゴペプチドの免疫的特性を実質的に損ねないように行なうことができる。特に、ここに記載された抗原のアミノ酸配列を1つ以上のアミノ酸を機能的に等価なアミノ酸で置換し、その結果、ペプチド又はオリゴペプチド又はキメラの物理化学的挙動に観察し得る相違なしに変化させることにより変えることができる。機能的に等価なアミノ酸は当業者に、関連する及び/又は極性や電荷が類似するアミノ酸として知られている。こうして、実質的にアミノ酸配列のそれがここで配列表に表されているものであるアミノ酸配列は、ペプチド、オリゴペプチド又はキメラの主な生物学的機能を変化せずに、機能的等価アミノ酸による置換を含むアミノ酸配列として参照される。

【0074】

精製された合成ペプチドを、*P.gingivalis*によって起こる感染を疑われる個体の体液に存在する*P.gingivalis*特異的抗血清の検出のために、イムノアッセイでの抗原として用いることができる。イムノアッセイにおける抗原又は関連するペプチドの検出は、ラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、“サンドイッチ”アッセイ、沈降反応、凝集アッセイ、蛍光イムノア

ッセイ、及び化学発光ベースのイムノアッセイなどのイムノアッセイのいかなるものも含み、これらに限定されない。

【0075】

実施例3

保護エプト - プの合成とネズミ科病変モデル

表4に挙げられた保護エピトープで示される以下のペプチドを合成し、コンジュゲートし、ネズミ科動物病変モデルで試験した。

【0076】

【表4】

合成されたペプチドの起源とアミノ酸配列

起源	アミノ酸配列 (一文字コード)	略記
Protective Peptide Epitopes PrK39 (531-557)	FLLDADHNFFGVSVPATGFLFTGTASS (SEQ ID NO:1)	EP1
PrK39 (559-585)	LYSANFESLIPANADPVVTTQNIIVTG (SEQ ID NO:2)	EP2
PrK39 (601-620)	TNPEPASGKMWLAGDGGNQP (SEQ ID NO:4)	EP4
PrK39 (622-648)	RYDDFTFEAGKKYTFMRRAGMGDGTD (SEQ ID NO:5)	EP5
PrR44 (604-627)	DDYVFEAGKKYHFLMKKMGSGDGTE (SEQ ID NO:6)	EP6

【0077】

(i) 材料

別記しない限り、化学品はペプチド合成グレート又はそれと等価のものとした。O-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフロオロホスフェート(HBTU)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ピペリジン、トリフルオロ酢酸(TFA)及び9-フロオ

レニルメトキシカルボニル (Fmoc) 保護アミノ酸は、Auspep Pty Ltd (メルボルン、オーストラリア) から入手した。トリイソプロピルシラン (TIPS) とエタンジチオール (EDT) はAldrich (New South Wales, オーストラリア) から入手し、1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデク-7-エン (DBU) はSigma Chemical Company (New South Wales, オーストラリア) から入手した。フェノール及びジエチルエーテルはBDH (Poole, UK) より入手した。

【0078】

(ii) 固相ペプチド合成

ペプチドは、手動で、又は431A ABIペプチド合成機を使用して合成した。Fmoc化学についての標準的な固相ペプチド合成プロトコールを全てにおいて使用した。ペプチドは、Fmoc-Pal-Peg-PS樹脂 (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA) を使用してカルボキシアミドの形態で組み立てた。カップリングは、HBTU/HOBt活性化により、4等量のFmoc-アミノ酸と6等量のDIPEAを使用して行った。Fmoc基は、2% v/vのピペリジンを含む、2% v/vのDBU (DMF中) を使用して除去した。樹脂製支持体からのペプチドの開裂は、TFA:フェノール:TIPS:EDT:水 (92:2:2:2:2) 開裂カクテルを、2.5時間又は4時間、当該ペプチド中のアルギニン含有量に応じて使用して行った。開裂後、樹脂は、濾過で除去し、口液を約1mlまで窒素気流下で濃縮した。ペプチド産物を冷エーテル中で沈殿させた後、遠心してから3回洗浄した。ペプチド沈殿物を5乃至10mlの水 (0.1% v/vのTFA含有) に溶解して、不溶性の残渣を遠心で除去した。

【0079】

(iii) S-アセチルメルカプト酢酸ペプチドの合成

ペプチドを有する樹脂をDMF中で膨張させ、N末端のFmoc基を、2% v/vピペリジン含有の2% v/v DBU (DMF中) で除去した。S-アセチルメルカプト酢酸 (SAMA) 基は5等量のSAMA-OPfpと5等量のHOBtを使用して、当該N末端アミノ基に導入した。反応は、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBSA) 試験でモニターした。陰性のTNBSA試験 (結果) がで

たときには、当該樹脂を洗浄した(5 × DMF、3 × DCM、及び3 × ジエチルエーテル)。樹脂を減圧下で乾燥し、SAMA-ペプチドは、上記のようにして当該樹脂支持体から開裂させた

【0080】

(iv) ペプチド精製

合成されたペプチドの精製は、Waters HPLCシステムに設置したBrownlee C18 Aquapore ODSカラム(250 × 100 mm)を使用して行った。クロマトグラムは、0.1% v/v TFA(水中)(溶媒A)及び、限界緩衝液として0.1% v/v TFA(90%アセトニトリル水溶液)(溶媒B)を使用して、5 ml/分の流速で展開した。ペプチドは、10-30%の溶媒Bの勾配で、40分間で溶出した。分析HPLCは、Applied Biosystems HPLCシステムに設置したBrownlee C8 Aquapore RP-300カラム(220 × 4.6 mm)を使用して行った。クロマトグラムは、溶媒A及び溶媒Bを流速1 ml/分で使用して展開し、溶媒Bの0-100%の線形勾配を30分間行った。カラムから溶出した物質は、214 nmでの吸光度で決定した。ペプチド画分をプールし、凍結乾燥した。ペプチドは、PerSeptive Biosystems Voyager DE MALDI-TOFを使用してマスペクトロスコピーにより分析した。

【0081】

(v) SAMA-ペプチドの、ジフテリア毒素への共役

ジフテリア毒素(DT)は、CSLリミテッド、メルボルン、オーストラリアから入手したが、これは、62 kDaの分子当たり9等量のアミノ基を有している。10 mg/mlのDTをリン酸緩衝液生理食塩水(0.1 Mのリン酸ナトリウム、0.9%のNaCl、pH 7.4)中に含む溶液に対して、0.1 mlの1% w/vのm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(MBS)(DMF中)を添加した。30分後、未反応のMBSを除去して、MBSで修飾されたDTは、共役緩衝液(0.1 Mのリン酸ナトリウム、5 mMのEDTA, pH 6.0)で平衡化したPD10カラム(Pharmacia, NSW, オーストラリア)を使用してゲル濾過して除去した。精製されたSAMA-ペプチド(1.3 μmol)を200 μlの6 M塩酸グアニジン(0.5 Mのトリス、2 mMのEDT

A、pH6含有)中に溶解し、800 μ lのミリQ水で希釈し、25 μ Lの2MのNH₂OH(40等量)(ミリQ水中に溶解)を添加して原位置的に脱保護した。回収したMBS-DTは、脱保護されたSAMA-ペプチドと反応させ、室温で1時間反応させた、ペプチド-DT共役物は、PBS(pH7.4)で平衡化したPD10カラムを使用して、未反応のペプチドからゲル濾過により分離し、凍結乾燥した。反応は、Ellmans試験を使用してモニターした。SAMA-ペプチドからMBS-DTへの共役収率は、34%乃至45%の範囲であり、これは1分子のDT当たり3乃至4ペプチドがカップリングしたことを意味する。

【0082】

(iv) 免疫とマウス病変モデルプロトコール

6-8週齢のBALB/cマウスを、50 μ gのペプチドDT共役物、又は50 μ g若しくは25 μ gのPrtR-PrtKプロテイナーゼアドヘシン複合体(P.ジンジヴァリス株W50由来)の何れかを完全フロイトアジュバント(CFA)に乳化したもので皮下的免疫した。30日後、マウスに抗原(50 μ gのペプチドDT共役物、50 μ gのDT、又は25 μ gのPrtR-PrtKプロテイナーゼアドヘシン複合体(P.ジンジヴァリス株W50由来))を不完全フロイトアジュバント(IFA)を乳化したもので皮下的に注射し、そして12日後に、球後叢(retrobulbar plexus)から出血させた。マウス全てを7.5 \times 10⁶のP.ジンジヴァリスの細胞(200 μ l)で、腹部に皮下注射でチャレンジし、10日間体重と病変部のサイズを測定した。病変部のサイズは、mm²で表し、Kruskal-WallisのワンウェイANOVA法、Mann-Whitney U-Wilcoxonランク合成試験を使用して分析し、そしてペプチド群を対照群(DT)と比較する場合には、1型の誤差のBonferroni補正を行った。

【0083】

図7は、それぞれの群で展開された病変部の最大のサイズを示す。データの統計分析により、EP1-DT、EP2-DT、EP4-DT、EP5-DT、EP6-DT、及び前記複合体の何れかで免疫したマウスは、DTのみで免疫した対照群と比較して、顕著に小さい(p<0.005)病変部を有していることが示された。

【0084】

結果は、免疫原として使用すると、EP保護ペプチドは、マウス病変部モデルにおいて、P・ジンジヴァリスのチャレンジを防止する効果があることが示された。

【0085】

(実施例4)

方法、合成ペプチド抗原及び多重ペプチド構築物に関係したワクチン組成物用の化合物

【0086】

本発明のこの態様は、P・ジンジヴァリスにより引き起こされる感染から保護するか又はそれを治療するための能動免疫用の、予防用及び/又は治療用ワクチンとして使用するための、表1のペプチド抗原を提供するためのものである。ワクチン用には、合成ペプチド構築物を含むP・ジンジヴァリス抗原は、免疫原性であって、生きた細菌上の1以上の表面露出エピトープに対する機能的抗体を誘導しなくてはならないが、ここで当該エピトープは、P・ジンジヴァリス株中において保存されているものである。

【0087】

本発明を例示するための1例である、ワクチン抗原に要求される性質を有するジペプチド、EP4-EP5構築物は、本願の図1乃至5に記載される方法により合成できる。

【0088】

当該合成ペプチドは、ワクチン調剤中に、関連免疫原性物質として治療的に有効な量で含まれて、免疫応答が誘導される。ワクチン調剤を、ワクチンを受けるとは動物に導入する多くの方法が知られている。その中には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、接眼的(ocular)、鼻腔内、及び経口的な投与方法が含まれるが、これらには限定されない。当該ワクチンは更に、生理学的なキャリア、例えば溶液、ポリマー又はリポソーム等、そしてアジュバント、又はこれらの組合せを含むことができる。

【0089】

種々のアジュバントが、ワクチン調剤と組み合わせて使用されている。アジュバントは、免疫応答を調節して、ワクチン抗原が単独で使用されるよりも少量のワクチン抗原又はより少ないドースを使用して、より長期間又はより高いレベルの免疫を達成するのを補助する。アジュバントの例には、不完全フロイトアジュバント (ISA)、アジュバント65 (ピーナッツオイル、モノオレイン酸マンニド (mannide monooleate)、及びモノステアリン酸アルミニウムを含有する)、油乳濁液、Rib i アジュバント、プルロニックポリオール (pluronic polyol)、ポリアミン、アビリジン (Aviridine)、キルA (Quil A)、サポニン、MPL、QS-21、及びミネラルゲル (例えば水酸化アルミニウムやリン酸アルミニウム等) が含まれる。

【0090】

本発明のこの様式の別の態様は、抗原特異的なアミノ酸配列をハプテンとして、即ちそれ自身では免疫応答を惹起できない分子として、製造することを含む。このような場合、ハプテンは、キャリア、又は免疫系に露出されたときに、カップリングされたハプテンに免疫原性を付与するであろう他の免疫原性分子に共有結合してもよい。従って、このように、キャリア分子に連結した抗原特異的なハプテンは、ワクチン調剤中において免疫原性となることができる。

【0091】

活性免疫の代替法として、免疫を受動的にすることもできるが、即ちこれは、合成ペプチドに対する抗体を含む、精製した免疫グロブリンを投与することを含むものである。

【0092】

(実施例5)

以下は、抗-ペプチド抗体を含む、ハミガキペースト調剤の例である。

【0093】

【表5】

成分	%w/w
リン酸二カルシウム二水和物	50.0
グリセリン	20.0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5
ナトリウム=ラウリル=サルコニセート(sarconisate)	0.5
香味料	1.0
サッカリンナトリウム	0.1
グルコン酸クロルヘキシジン	0.01
デキストラナーゼ	0.01
抗-ペプチドAbs含有ヤギ血清	0.2
水	残量

【0094】

(実施例6)

以下は、ハミガキペースト調剤の例である。

【0095】

【表6】

成分	%w/w
リン酸二カルシウム二水和物	50.0
ソルビトール	10.0
グリセリン	10.0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5
ナトリウム=ラウリル=サルコニセート	0.5
香味料	1.0
サッカリンナトリウム	0.1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.3
グルコン酸クロルヘキシジン	0.01
デキストラナーゼ	0.01
抗-ペプチドAbs含有ウシ血清	0.2
水	残量

【0096】

(実施例7)

以下は、ハミガキペースト調剤の例である。

【0097】

【表7】

成分	%w/w
リン酸二カルシウム二水和物	50.0
ソルビトール	10.0
グリセリン	10.0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1.0
ラウロイルジエタノールアミド	1.0
モノラウリン酸スクロース	2.0
香味料	1.0
サッカリンナトリウム	0.1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.3
グルコン酸クロルヘキシジン	0.1
デキストラナーゼ	0.01
抗-ペプチドAbs含有ウシ乳Ig	0.1
水	残量

【0098】

(実施例8)

以下は、ハミガキペースト調剤の例である。

【0099】

【表8】

成分	%w/w
ソルビトール	22.0
トチャカ(Irish moss)	1.0
水酸化ナトリウム(50%)	1.0
Gantrez	19.0
水(脱イオン)	2.69
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.76
サッカリンナトリウム	0.3
ピロリン酸	2.0
アルミナ水和物	48.0
香油	0.95
抗-ペプチドマウスモノクローナル	0.3
ラウリル硫酸ナトリウム	2.00

【0100】

(実施例9)

以下は、液体ハミガキ調剤の例である。

【0101】

【表9】

成分	%w/w
ポリアクリル酸ナトリウム	50.0
ソルビトール	10.0
グリセリン	20.0
香味料	1.0
サッカリンナトリウム	0.1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.3
グルコン酸クロルヘキシジン	0.01
エタノール	3.0
抗-ペプチドAb含有ウマIg	0.2
リノール酸	0.05
水	残量

【0102】

(実施例10)

以下は、マウスウォッシュ (mouthash) 調剤の例である。

【0103】

【表10】

成分	%w/w
エタノール	20.0
香料	1.0
サッカリンナトリウム	0.1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.3
グルコン酸クロルヘキシジン	0.01
ラウロイルジエタノールアミド	0.3
抗-ペプチドAb含有ウサギIg	0.2
水	残量

【0104】

(実施例11)

以下は、マウスウォッシュ調剤の例である。

【0105】

【表11】

成分	%w/w
Gantrez S-97	2.5
グリセリン	10.0
香油	0.4
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.05
グルコン酸クロルヘキシジン	0.01
ラウロイル時エタノールアミド	0.2
マウス抗-ペプチドモノクローナル	0.3
水	残量

【0106】

(実施例12)

以下は、トローチ剤 (lozenge) の例である。

【0107】

【表12】

成分	%w/w
砂糖	75-80
コーンシロップ	1-20
香油	1-2
NaF	0.01-0.05
マウス抗-ペプチドモノクローナル	0.3
ステアリン酸Mg	1-5
水	残量

【0108】

(実施例13)

以下は、歯肉マッサージクリーム調剤の例である。

【0109】

【表13】

成分	%w/w
白色ワセリン	8.0
プロピレングリコール	4.0
ステアリルアルコール	8.0
ポリエチレングリコール 4000	25.0
ポリエチレングリコール 400	37.0
モノステアリン酸スクロース	0.5
グルコン酸クロルヘキシジン	0.1
マウス抗-ペプチドモノクローナル	0.3
水	残量

【0110】

(実施例14)

以下は、チューイングガム調剤の例である。

【0111】

【表14】

成分	%w/w
ガムベース	30.0
炭酸カルシウム	2.0
結晶ソルビトール	53.0
グリセリン	0.5
香油	0.1
マウス抗-ペプチドモノクローナル	0.3
水	残量

【0112】

当業者ならば、広く記載されている本発明の要旨を逸脱しない範囲で、特定の

実施態様に記載の発明について、数多くの変形例及び/又は修飾例を設けることが可能であることがわかるであろう。本発明の実施態様は、したがって、例示のためであり限定するためのものではない。

【0113】

【参考文献】

- Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., et al (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1: 751-761.
- Canne, L. E., Ferre-D'Amare, A. R., Burley, S.K., and Kent, S.B.H. (1995). Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMyc-Max. *J. A. Chem. Soc.* 117: 2998-3001.
- Druland, et. al. (1986). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 125-137.
- Duncan, R., and Kopeček, J. (1980). Degradation of side chains of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by lysosomal enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 284-290.
- Geysen, H. M., Meleon, R.H., and Barteling, S.J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3998.
- Geysen, H. M., Rodda, S.J., Mason, T.J., et al. (1987). Strategies for epitope mapping using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods.* 102: 259.
- Hammer, J., Valsasini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sinigaglia, F. (1993). Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74: 197-203.
- Kaumaya, P. T. P., Kobs-Conrad, S., and DiGeorge, A. M. (1994). Synthetic peptide vaccines: Misconceptions and problems, strategies and prospects *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*. R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 279-292.
- Kesavalu, L., Ebersole, J.L., Machen, R.L., Holt, S.C. (1992). *Porphyromonas gingivalis* virulence in mice: induction of immunity to bacterial components. *Infect. Immun.* 60: 1455-1464

- Liu, C. F. a. T., J.P. (1994). Peptide ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6584-6588.
- Lu, Y. A., Clavijo, P., Galantino, M., Shen, Z.Y., and Tam, J.P. (1991). Chemically unambiguous peptide immunogen: Preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the multiple antigen peptide system. *Mol. Immunol.* 28(6): 623-630.
- Mitchell, e. a. (1978). *J. Org. Chem.* 43: 2845-2852.
- O'Brien-Simpson, N.M., Ede, N.J., Brown, L.E., Swan, J., and Jackson, D.C. (1997). Polymerisation of unprotected synthetic peptides: a view towards a synthetic peptide vaccines. *J. Am. Chem. Soc.* 117(6).
- O'Sullivan, D., Arrhenius, T., Sidney, J., et al (1991). On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *J. Immunol* 147(8): 2663-2669.
- Rose, K. (1994). Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 30-33.
- Rose, J., Zeng, W., Regamey, P. O., Chernusheivich, I.V., Standing, K. G., and Gaertner, H.F. (1996). Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages. *Bioconjugate Chem.* 7(5): 552-558.
- Shao, J., and Tam, J.P. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3893-3899.
- Spetzler, J. C. a. T., J.P. (1994). A general approach for the synthesis of branched peptides for synthetic vaccines: Synthesis of multiple antigen peptides using unprotected segments. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis.* R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 293-300.
- van Noort, J. M., and van der Drift, A.C.M. (1989). The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes. *J. Biol. Chem.* 264(24): 14159-14164.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Applicants: The University of Melbourne,
 Victorian Dairy Industry Authority, and
 5 CSL Limited

Title of Invention: Synthetic peptides for containing protective epitopes for
 the treatment and prevention of periodontitis associated with *porphyromonas*
gingivalis

10

Prior Application Number: PP8939
 Prior Application Filing Date: 1999-03-01

15 Number of SEQ ID NOs: 32

Software: PatentIn Ver. 2.1

SEQ ID NO: 1

20 Length: 27

Type: PRT

Organism: *Porphyromonas gingivalis*

Sequence: 1

25 Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe Gly Ser Val Ile Pro Ala

1 5 10 15

Thr Gly Pro Leu Phe Thr Gly Thr Ala Ser Ser

20 25

30

SEQ ID NO: 2

Length: 27

Type: PRT

35 Organism: *Porphyromonas gingivalis*

Sequence: 2

Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Ser Leu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro
 1 5 10 15

5 Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly
 20 25

SEQ ID NO: 3

10 Length: 27

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 3

15 Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro
 1 5 10 15

Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly
 20 25

20

SEQ ID NO: 4

Length: 20

Type: PRT

25 Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 4

Thr Asn Pro Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly
 1 5 10 15

30

Gly Asn Gln Pro
 20

SEQ ID NO: 5

Length: 27

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

5

Sequence: 5

Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe Thr

1 5 10 15

10 Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp

20 25

SEQ ID NO: 6

15 Length: 25

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 6

20 Asp Asp Tyr Val Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr His Phe Leu Met Lys

1 5 10 15

Lys Met Gly Ser Gly Asp Gly Thr Glu

20 25

25

SEQ ID NO: 7

Length: 48

Type: PRT

30 Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 7

Thr Asn Pro Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly

1 5 10 15

35 Gly Asn Gln Pro Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys

20 25 30

Lys Tyr Thr Phe Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp
 35 40 45

5

SEQ ID NO: 8

Length: 13

10 Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 8

Asn Thr Phe Gly Ser Val Ile Pro Ala Thr Gly Pro Leu

15 1 5 10

SEQ ID NO: 9

Length: 12

20 Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 9

Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly

25 1 5 10

SEQ ID NO: 10

Length: 13

30 Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 10

Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe Thr Met Arg Arg Ala

1 5 10

35

SEQ ID NO: 11
 Length: 13
 Type: PRT
 Organism: Porphyromonas gingivalis

5

Sequence: 11
 Glu Ala Gly Lys Lys Tyr His Phe Leu Met Lys Lys Met
 1 5 10

10

SEQ ID NO: 12
 Length: 148
 Type: PRT
 Organism: Porphyromonas gingivalis

15

Sequence: 12
 Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Asp Gly
 1 5 10 15

20

Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe Gly
 20 25 30

Ser Val Ile Pro Ala Thr Gly Pro Leu Phe Thr Gly Thr Ala Ser Ser
 35 40 45

25

Asp Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Ser Leu Ile Pro Ala Asn Ala Asp
 50 55 60

30

Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu Val
 65 70 75 80

Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys Ile Thr Asn Pro Glu Pro
 85 90 95

35

Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro Ala
 100 105 110

Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe Thr
 115 120 125

5 Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu Asp
 130 135 140

Asp Ser Pro Ala
 145

10

SEQ ID NO: 13

Length: 13

Type: PRT

15 Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 13

Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val

1 5 10

20

SEQ ID NO: 14

Length: 13

Type: PRT

25 Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 14

Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Asp Gly Asn Thr Gly Tyr

1 5 10

30

SEQ ID NO: 15

Length: 13

Type: PRT

35 Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 15

Asp Gly Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp

1 5 10

5

SEQ ID NO: 16

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

10

Sequence: 16

Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe Gly Ser Val

1 5 10

15

SEQ ID NO: 17

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

20

Sequence: 17

Asn Thr Phe Gly Ser Val Ile Pro Ala Thr Gly Pro Leu

1 5 10

25

SEQ ID NO: 18

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

30

Sequence: 18

Pro Ala Thr Gly Pro Leu Phe Thr Gly Thr Ala Ser Ser

1 5 10

- 5 SEQ ID NO: 19
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- Sequence: 19
Thr Gly Thr Ala Ser Ser Asp Leu Tyr Ser Ala Asn Phe
1 5 10
- 10 SEQ ID NO: 20
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- 15 Sequence: 20
Leu Tyr Ser Ala Asn Phe Glu Ser Leu Ile Pro Ala Asn
1 5 10
- 20 SEQ ID NO: 21
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- 25 Sequence: 21
Ser Leu Ile Pro Ala Asn Ala Asp Pro Val Val Thr Thr
1 5 10
- 30 SEQ ID NO: 22
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 22

Asp Pro Val Val Thr Thr Gln Asn Ile Ile Val Thr Gly
1 5 10

5

SEQ ID NO: 23

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

10

Sequence: 23

Asn Ile Ile Val Thr Gly Gln Gly Glu Val Val Ile Pro
1 5 10

15

SEQ ID NO: 24

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

20

Sequence: 24

Gly Glu Val Val Ile Pro Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Cys
1 5 10

25

SEQ ID NO: 25

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

30

Sequence: 25

Thr Asn Pro Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Trp Ile Ala
1 5 10

35

- 5 SEQ ID NO: 26
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- Sequence: 26
Gly Lys Met Trp Ile Ala Gly Asp Gly Gly Asn Gln Pro
1 5 10
- 10 SEQ ID NO: 27
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- 15 Sequence: 27
Asp Gly Gly Asn Gln Pro Ala Arg Tyr Asp Asp Phe Thr
1 5 10
- 20 SEQ ID NO: 28
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis
- 25 Sequence: 28
Arg Tyr Asp Asp Phe Thr Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr
1 5 10
- 30 SEQ ID NO: 29
Length: 13
Type: PRT
Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 29

Glu Ala Gly Lys Lys Tyr Thr Phe Thr Met Arg Arg Ala

1 5 10

SEQ ID NO: 30

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 30

Phe Thr Met Arg Arg Ala Gly Met Gly Asp Gly Thr Asp

1 5 10

SEQ ID NO: 31

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 31

Met Gly Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu Asp Asp Ser

1 5 10

SEQ ID NO: 32

Length: 13

Type: PRT

Organism: Porphyromonas gingivalis

Sequence: 32

Asp Gly Thr Asp Met Glu Val Glu Asp Asp Ser Pro Ala

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】 二項性 (bi-modal) ペプチドの合成。特定の例をここに示すが、リジンの a 又は e アミノ基には、何れのリガンドも導入できる。(a) アシル化、例えばアミノ酸 : HOBt : HBTU : DIPEA 1 : 1 : 1 : 1.5 ジメチルホルムアミド (DMF) 中。(b) Fmoc 脱保護、例えば 20% ピペリジン (DMF 中)。(c) レブリン酸 : ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 2 : 1 (ジクロメタン (DCM) 中)、1 h。(d) Mtt 除去、3 × 1%

TFA (DCM中)、3分。(e) Fmoc-ヒドラジド安息香酸 : DIC 2 : 1 (DCM中) 1 h。(f) 酸開裂、例えばTFA : 水 95 : 5。

【図2】 二項性ペプチドを使用した、多価ペプチド構築物の合成。(a) ライゲーション。8 M尿素、及び0.1 M NaHPO₄ (pH範囲 : 3-4.7)。ライゲーションは、逆相分析HPLC及びマススペクトロスコピーによりモニターできる。(b) 脱保護、例えばAllocは、塩基性受容体への、パラジウム(0)-触媒アリル基トランスファーにより除去される。ライゲーション産物は、調製HPLCで精製して、凍結乾燥できる。(c) ライゲーション。(a)に記載されるのと同じ条件。異なるリガンドを有するペプチドを合成し、当該ペプチドに非相同的なリガンドを合成して、それにより保護されたリガンドを避けることによる、異なるライゲーション化学を使用できる。四角の印は、保護を示し、(L) はリガンドを、(P) はペプチドを示す。

【図3】 二項性ペプチドを使用した多価ペプチド構築物の、固相による合成。(a) 脱保護及びライゲーション。S-アセチル保護基は、ヒドロキシアミン水溶液0.05 M (pH 7.3)。洗浄後、第一のペプチドをSH基に連結する。6 M塩酸グアニジン、及び0.05 M EDTA、pH 6.4-6.5 (1 Mトリス-HClで調節)、窒素気流。ライゲーション緩衝液には、有機溶媒、例えばアセトニトリル等を含められる。(b) 脱保護、S-アセチル保護基は、ヒドロキシアミン水溶液0.05 M (pH 7.3)で除去できる。(c) ライゲーション。(a)と同様。もっとも、異なるリガンドを有するペプチドを合成し、当該ペプチドに非相同的なリガンドを合成し、それによって保護されたリガンドを避けることによる、異なるライゲーション化学も使用できる。四角の印は、保護を示し、(L) はリガンドを、(P) はペプチドを、(B) は塩基不安定性ハンドルである、4-ヒドロキシメチル安息香酸を示す。

【図4】 二項性ペプチドを使用した環状化。(a) 脱保護及び環状化。そのN末端及びC末端に相補的リガンドを有する二項性ペプチドを合成することにより、これらのペプチドを緩衝水溶液中で環状化することができる。(i) ライゲーション。(ii) 脱保護およびライゲーション。(iii) 延期不安定性ハンドルからの、環状ペプチドの開裂。例 : 図示のペプチドは表1に由来し、Pr

t R 2 7 又は P r t K 3 9 上の主要な保護エピトープを表す。(a) ライゲーション。95% T F A 水溶液。ライゲーションは、逆相分析 H P L C とマススペクトロスコピーを使用してモニターできる。ライゲーション条件は、ペプチド合成に通常しようされるスカベンジャーを含むようにし、そしてフリーデルクラフツアルキル化を促進するように、異なる酸性条件に改変することもできる。(b) 脱保護とライゲーション。S-アセチル保護基は、ヒドロキシアミン水溶液 0.05 M (pH 7.3) により除去できる。ライゲーション、6 M の塩酸グアニジン及び 0.05 M の E D T A (pH 6.4-6.5) 1 M のトリス-H C l で調節。窒素気流。ライゲーションは、固相でもできる。どのリガンドを N 末端及び C 末端に導入するかを選択することにより、平行型及び非平行型の環状ペプチドを合成することができる。

【図5】 代替的なライゲーション法を使用した、多価のマルチプル抗原ペプチド (M A P s) の合成。異なるライゲーション方法を使用して、種々のペプチドを単一のマルチプル抗原ペプチドへ連結することができる。図示した例は、表1にリストされるペプチドである。(a) ライゲーション。95% T F A 水溶液。ライゲーションは、逆相分析 H P L C とマススペクトロスコピーでモニターできる。脱保護、A l o c は、塩基性受容体へのパラジウム(0)-触媒アリル基トランスファーにより除去できる。精製後、第二のペプチドを M A P へ連結できる。(c) 8 M 尿素及び 0.1 M N a H P O₄ (pH 範囲3-4.7)。

【図6】 ポルフィロモナス・ジジヴァリス P r t R - 2 7 の重複ペプチドに対する E L I S A で調べた、血清 I g G 抗体応答。21の P I N 結合ペプチドを、正常なマウス血清でプローブした()、保護されたマウスの血清()、正常なヒトの血清(: 濃く斜線がかかったもの)、患者 D 2 4 の血清(: 薄く斜線がかかったもの)、患者 H 1 0 の血清()、患者 D 2 0 の血清(: 濃い斜線がかかったもの)。E L I S A は、実施例1のようにした。

【図7】 ペプチド-D T 共役物で免疫したマウスの最大病変部サイズ。B A L B / c マウスを、ペプチド-D T 共役物 (50 µg) で、皮下 (s . c .) 的に免疫したが、最初のドース及び二回目のドースは I F A 中で投与し、二回目のドースの12日後に、皮下的に P . ジンジヴァリス株 A T C C 3 3 2 7 7 (7 .

5 × 10⁹生細胞)でチャレンジした。動物を14日間、体重減少と病変部サイズについてモニターした。データは、Kruskell-Wallisランク合成試験と、Mann-Whitney U-Wilcoxonランク合成試験 (Bonferroni補正有)で分析した。* = P 0.005、n s = 顕著でない。

【図1】

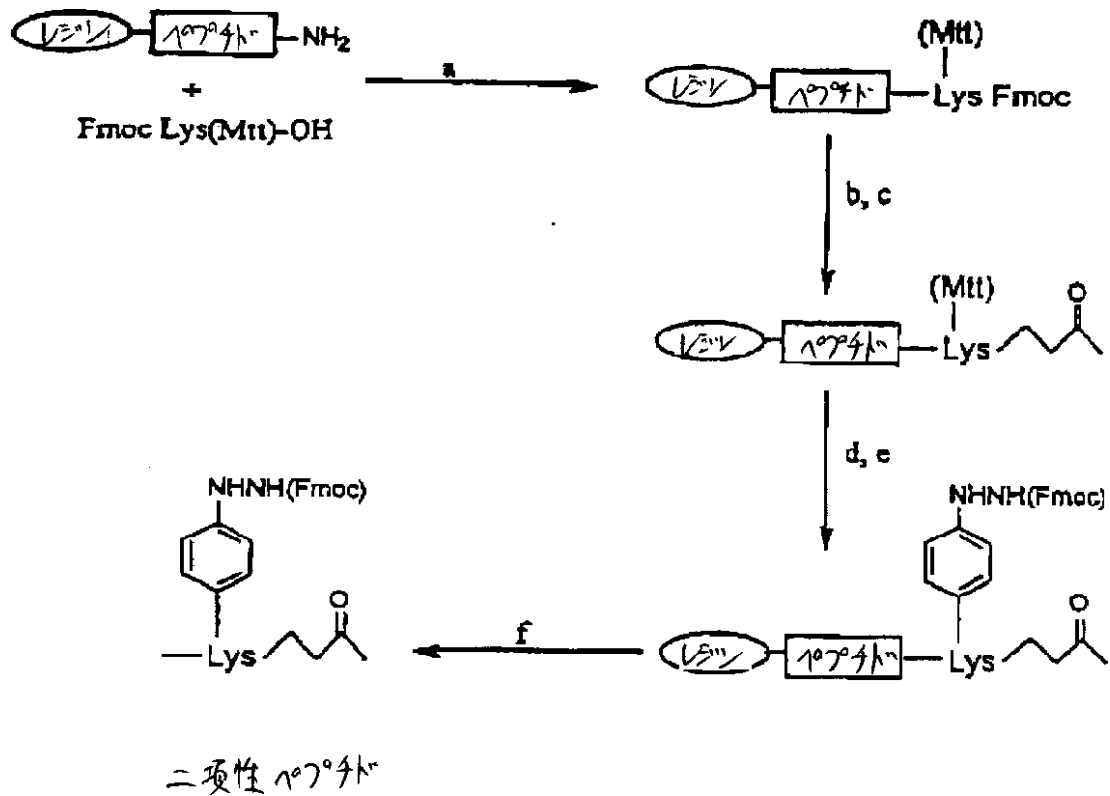
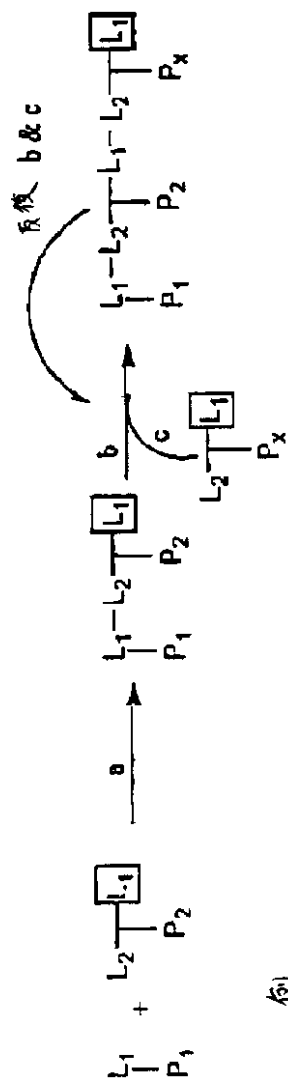


Figure 1

【图2】



例)

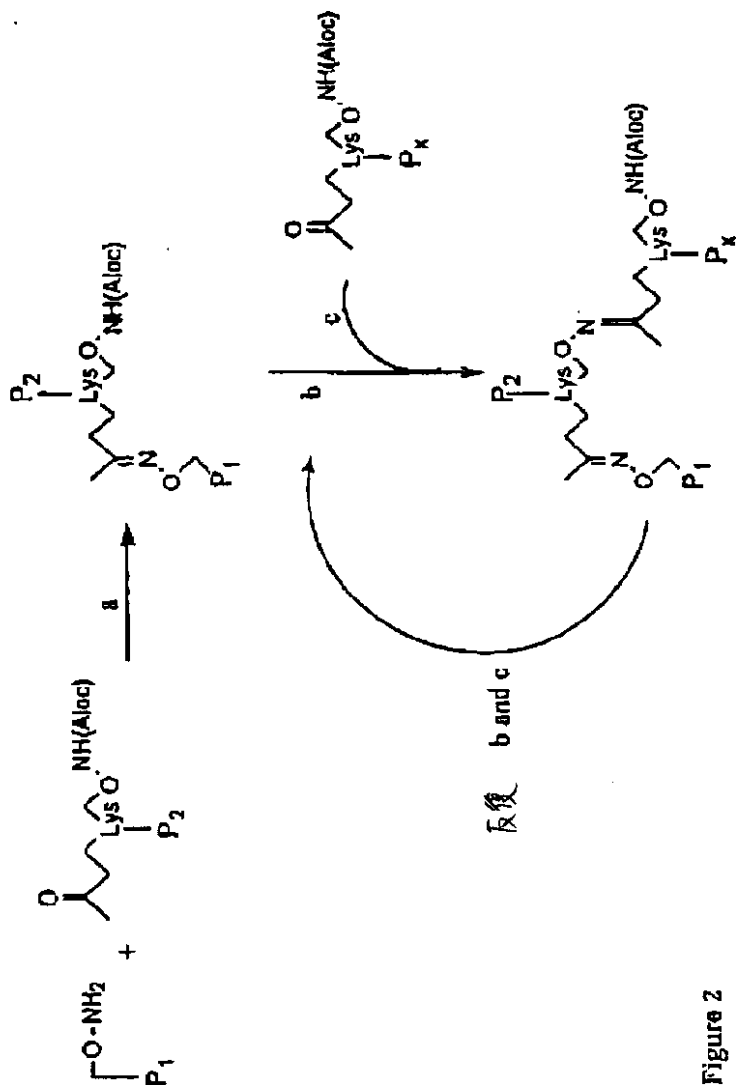


Figure 2

【图3】

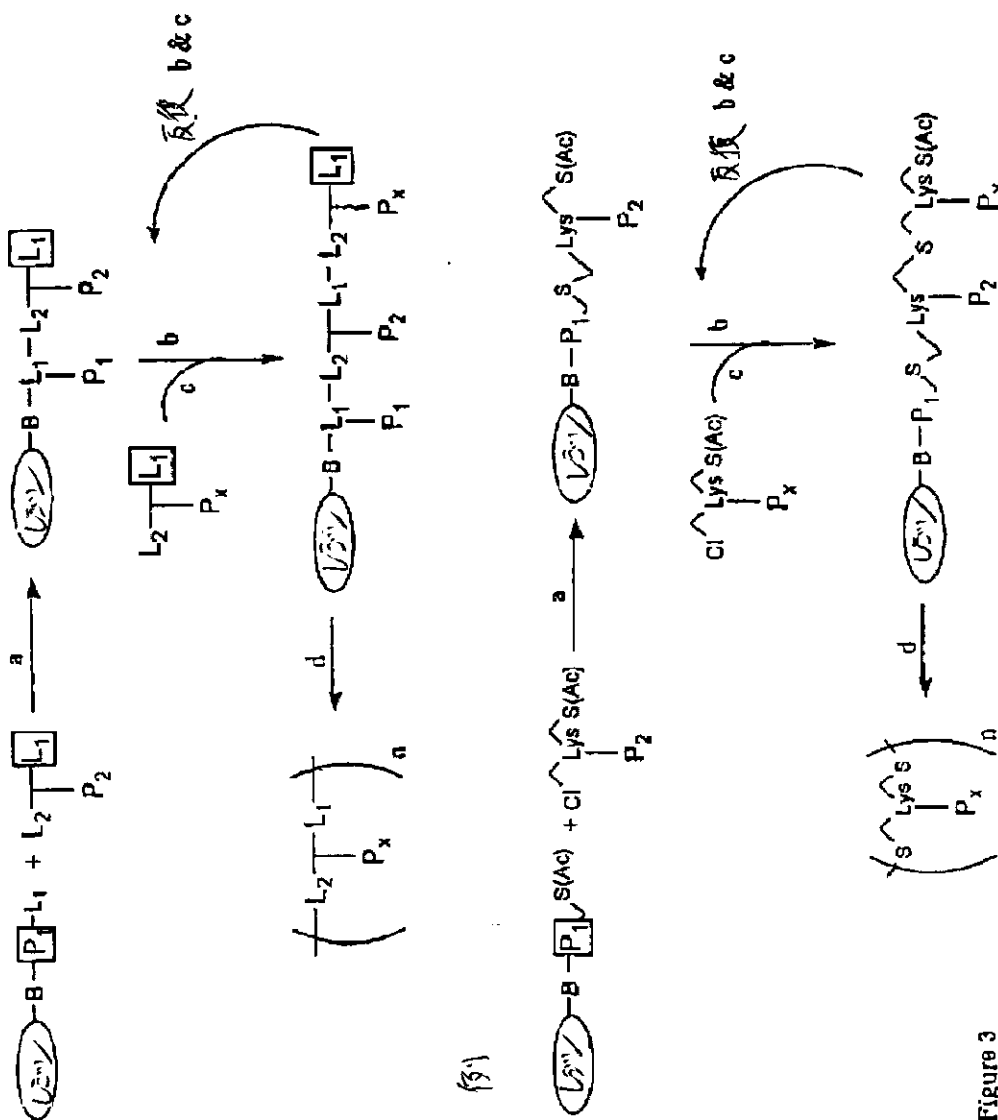


Figure 3

【図4】

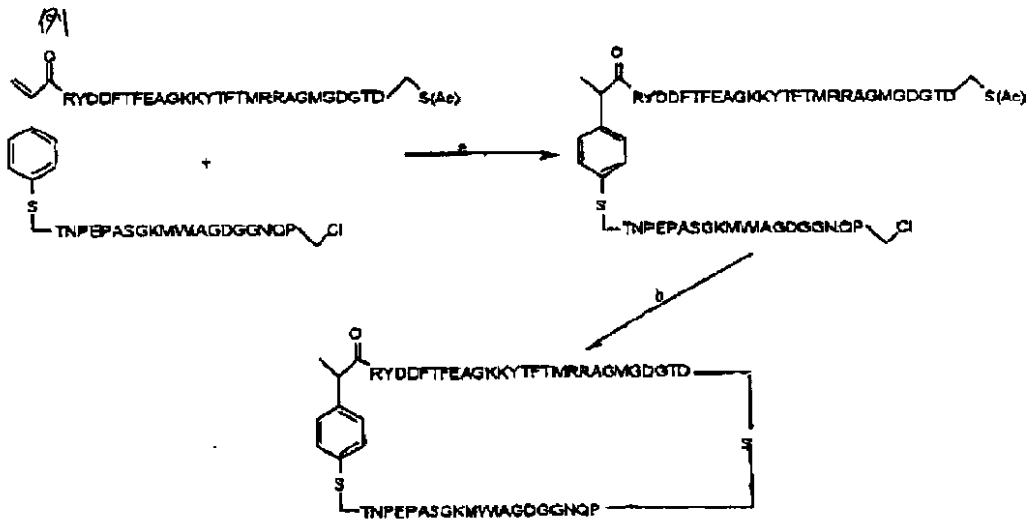
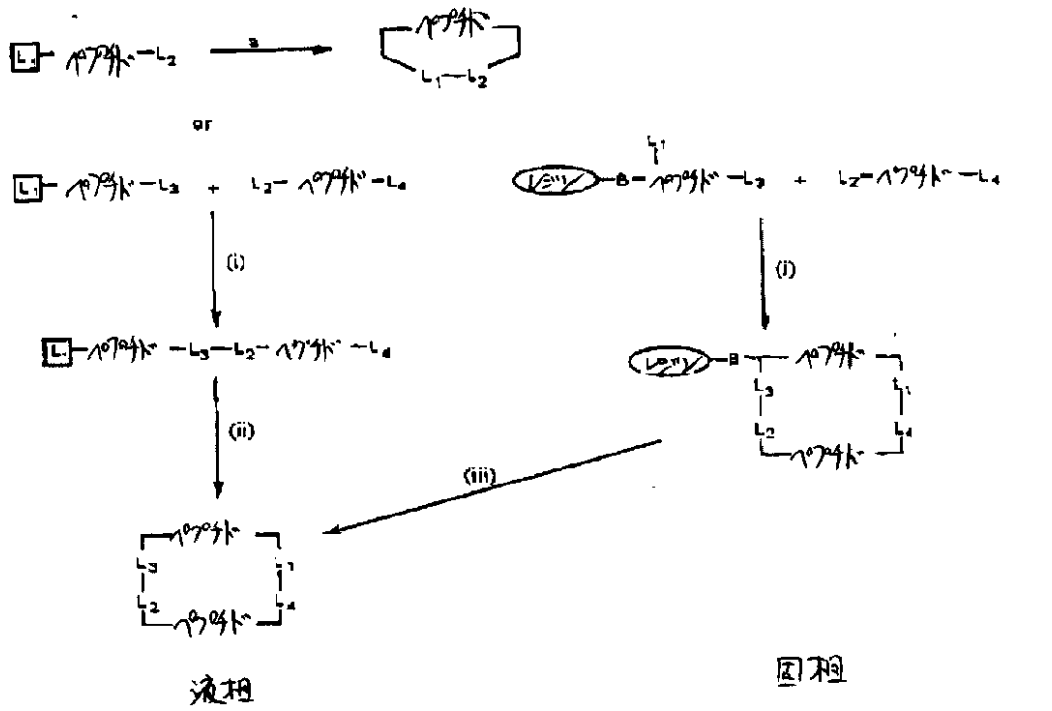


Figure 4

【図6】

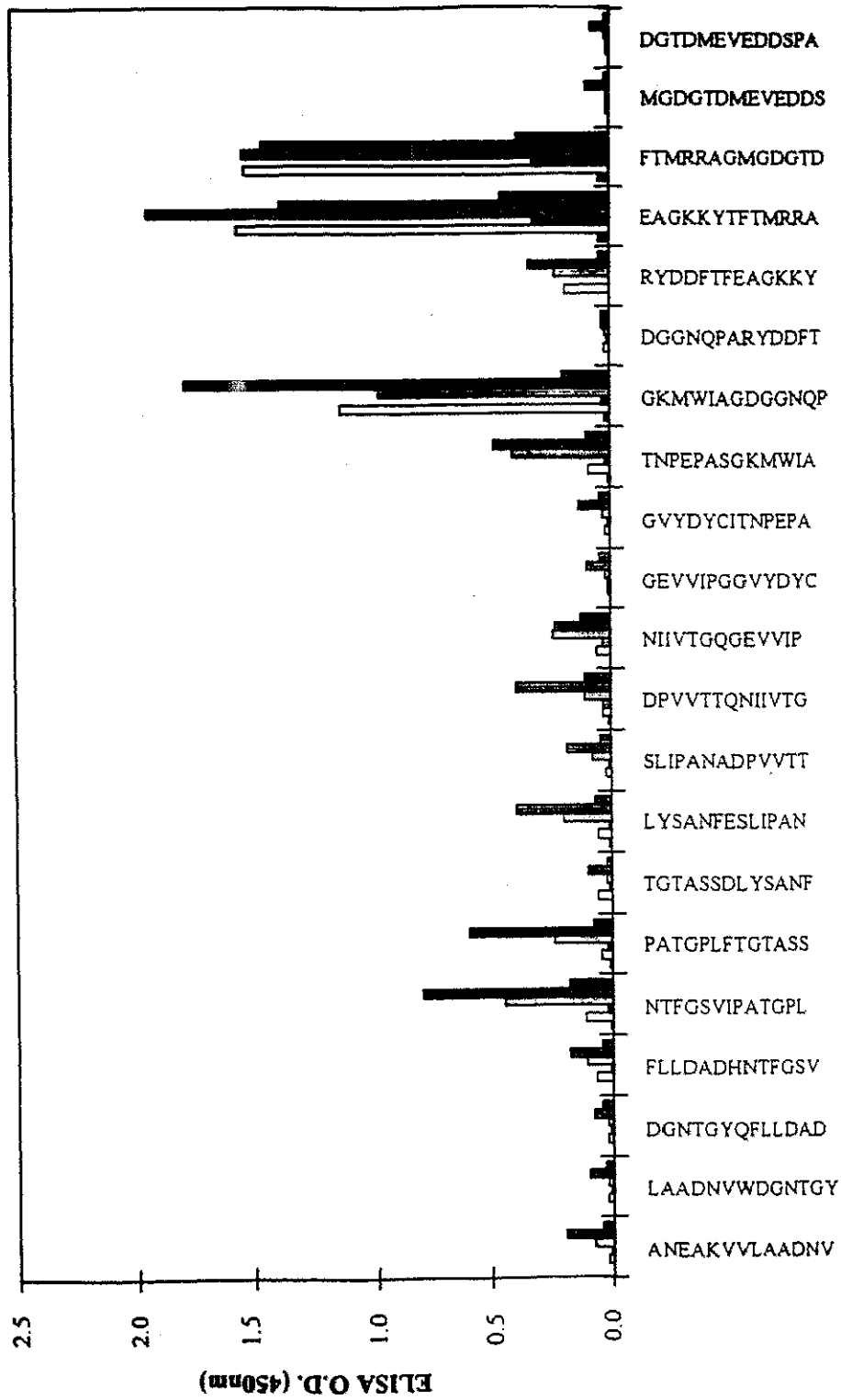


Figure 6

【图7】

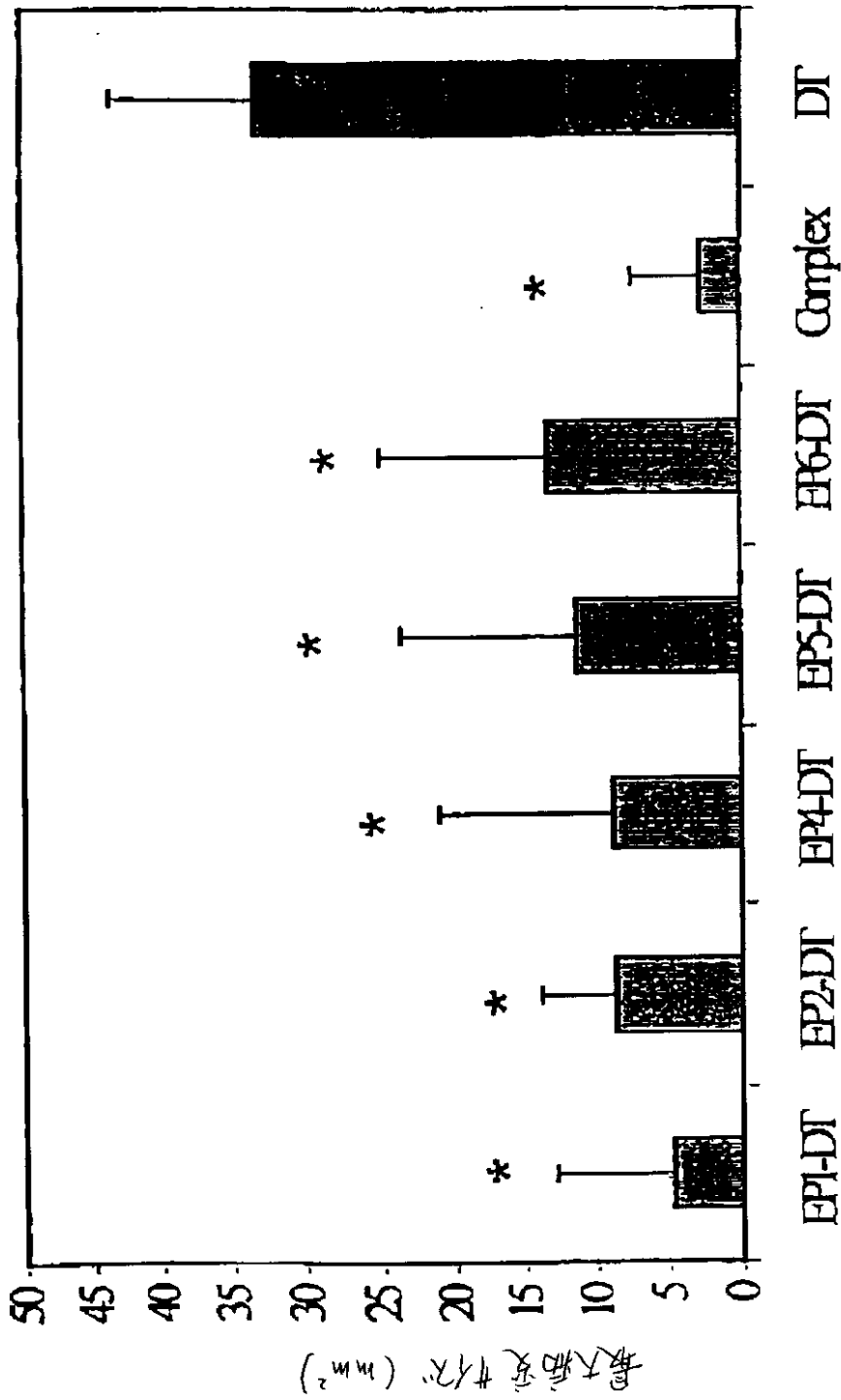
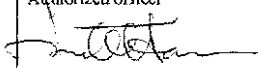


Figure 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU00/00142
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁷ : C07K 14/195, 16/12, G01N 33/569, A61K 39/02, 39/40, 38/10, 38/16, A61P 37/00		
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)		
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 practicable, search terms used) STN: Subsequence Search of Peptides STN: (CA, Medline, WPIDS, Biosis) and Keywords Gingiv?, Epitop?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/36923 A (The University of Melbourne et al) 9 October 1997	
A	WO 98/49192 A (The University of Melbourne et al) 5 November 1998	
A	Biochemical and biophysical Research Communications Vol. 180, No 3, 1991, Issue date Nov 14 1991 Tomohiko Ogawa et al. "Immunobiological Activities of Synthetic Pigment Segments of Fimbrial Protein from Porphyhydromonas Gingivalis, pages 1335-1341.	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 22 March 2000		Date of mailing of the international search report 28 MAR 2000
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustrialia.gov.au Facsimile No.: (02) 6285 3929		Authorized officer  J.G. HANSON Telephone No.: (02) 6283 2262

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU00/00142

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 97/36923	
WO 98/49192	
END OF ANNEX	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)	
C 0 7 K	16/12	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53		33/569	F
	33/569		33/577	B
	33/577	C 1 2 P	21/08	
//	C 1 2 P	A 6 1 K	37/02	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(72)発明者	ネイル・マーティン・オブリエン - シンプ ソン オーストラリア・ヴィクトーリア・3056・ ブランズウィック・サウス・オードリー・ ストリート・7/10			
(72)発明者	エリック・チャールズ・レイノルズ オーストラリア・ヴィクトーリア・3104・ ノース・バルウィン・ヒル・ロード・104			
F タ-ム(参考)	4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA15 4C084 AA02 BA02 BA19 CA04 NA14 ZA67 4C085 AA02 AA04 AA38 BA15 BB11 CC07 CC21 EE01 EE06 FF02 GG08 4H045 AA10 AA11 BA16 BA17 BA18 BA19 CA11 DA76 DA86 EA29 EA52 FA20			

专利名称(译)	含有受保护表位的合成肽，用于治疗 and 预防牙龈卟啉单胞菌引起的牙周炎		
公开(公告)号	JP2003520765A	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2000602265	申请日	2000-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	盐湖城梅尔伯恩 CSL有限公司 维多利亚时代的乳品业委会		
申请(专利权)人(译)	盐湖城墨尔本 CS萨尔瓦多有限公司 维多利亚时代的乳品业委会		
[标]发明人	ネイルマーティンオブリエンシンプソン エリックチャールズレイノルズ		
发明人	ネイル・マーティン・オブリエン・シンプソン エリック・チャールズ・レイノルズ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K6/00 A61K8/64 A61K38/00 A61K38/10 A61K38/16 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/07 A61K39/395 A61K39/40 A61P1/02 A61P37/00 A61Q11/00 C07K14/195 C07K16/12 C07K16/40 C12P21/08 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	A61K8/64 A61K39/0216 A61K2039/6037 A61P1/02 A61Q11/00 C07K16/40		
FI分类号	C07K14/195.ZNA A61K39/07 A61K39/395.R A61P1/02 C07K16/12 G01N33/53.D G01N33/569.F G01N33/577.B C12P21/08 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084 /BA19 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZA67 4C085/AA02 4C085/AA04 4C085/AA38 4C085/BA15 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/GG08 4H045 /AA10 4H045/AA11 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA20		
优先权	1999PP8939 1999-03-01 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于产生针对齿龈多毛菌的免疫应答的组合物，该组合物包含合适的佐剂和/或可接受的载体或赋形剂以及至少一种。至少一种50个或更少氨基酸的肽包含牙龈卟啉单胞菌抗原决定簇或上述肽的多聚体。本发明提供了一种减少患者中牙龈卟啉单胞菌感染的可能性和/或疾病严重性的方法，所述方法包括在患者中诱导针对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答。包括向患者施用有效量的第一特征组合物以

グループ	病変サイズ 平均最大病変サイズ mm ²	P*
1	30.2 ± 28.4 †	0.0008
2	30.0 ± 36.0	0.0028
3	86.8 ± 41.1	-
4	201.7 ± 125.8	0.012