

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4163251号
(P4163251)

(45) 発行日 平成20年10月8日(2008.10.8)

(24) 登録日 平成20年8月1日(2008.8.1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09
A 6 1 K 39/116 (2006.01)	A 6 1 K 39/116
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00

請求項の数 14 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平6-508441	(73) 特許権者	500034365
(86) (22) 出願日	平成5年9月24日(1993.9.24)		ブリガム・アンド・ウーマンズ・ホスピタル・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表平8-501563		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, フランシス・ストリート75
(43) 公表日	平成8年2月20日(1996.2.20)	(73) 特許権者	591106945
(86) 国際出願番号	PCT/US1993/009056		ナショナル・リサーチ・カウンシル・オブ・カナダ
(87) 国際公開番号	W01994/006467		NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(87) 国際公開日	平成6年3月31日(1994.3.31)		カナダ、ケイ1エイ・Oアール6、オンタリオ、オタワ、モンリオール・ロード1200番
審査請求日	平成12年9月18日(2000.9.18)		
審査番号	不服2005-10347(P2005-10347/J1)		
審査請求日	平成17年6月6日(2005.6.6)		
(31) 優先権主張番号	07/949, 970		
(32) 優先日	平成4年9月24日(1992.9.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/125, 556		
(32) 優先日	平成5年9月23日(1993.9.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グループBストレプトコッカス・タイプ▲11▼およびタイプ▲V▼多糖-蛋白質接合ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グループBストレプトコッカス(GBS)・タイプIIバクテリアに由来する莢膜多糖と、蛋白質成分を含む抗原接合分子であって、ここで、該多糖成分のシアル酸残基で終わる2以上の側鎖が、第二アミン結合で蛋白質にそれぞれリンクされており、該多糖の分子量が5000ダルトン以上であり、ここで、各多糖の末端シアル酸残基の5~10%が、蛋白質にリンクされる、抗原接合分子。

【請求項2】

各多糖の末端シアル酸残基の7%が、蛋白質にリンクされる、請求項1の接合分子。

【請求項3】

前記抗原接合分子が0.2ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌されうる請求項1の接合分子。

【請求項4】

前記多糖成分が約5,000~1,000,000ダルトンの分子量を有する請求項1の接合分子。

【請求項5】

前記多糖成分が約50,000~500,000ダルトンの分子量を有する請求項4の接合分子。

【請求項6】

前記多糖成分が約100,000~300,000ダルトンの分子量を有する請求項5の

接合分子。

【請求項 7】

前記多糖成分が約 200,000 ダルトンの分子量を有する請求項 6 の接合分子。

【請求項 8】

前記蛋白質が破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド及び CRM (交差反応物質) 197 からなる群から選ばれる請求項 1 の接合分子。

【請求項 9】

グループ B ストレプトコッカス・タイプ II バクテリアの莢膜多糖と蛋白質の接合分子を製造する方法であって、

(a) グループ B のストレプトコッカス・タイプ II の莢膜多糖を、該多糖の骨格にリンクした 2 以上の末端シアル酸残基にアルデヒド基を導入するに充分なだけ、過ヨウ素酸化し、

(b) 酸化されたグループ B のストレプトコッカス・タイプ II の莢膜多糖を、還元的アミノ化によって、蛋白質と連結させ、該莢膜多糖と該蛋白質の間に第二アミン結合を生じさせること、

を特徴とする方法であって、

ここで、各多糖のシアル酸残基の約 5 ~ 10 % が、蛋白質に共有結合される、方法。

【請求項 10】

各多糖のシアル酸残基の約 5 ~ 10 % が酸化されて、蛋白質に連結可能なアルデヒド群を形成する請求項 9 の方法。

【請求項 11】

各多糖のシアル酸残基の 7 % が酸化されて、蛋白質に結合するアルデヒド基を形成する請求項 10 の方法。

【請求項 12】

各多糖のシアル酸残基の 7 % が共有結合的に蛋白質にリンクされる請求項 9 の方法。

【請求項 13】

請求項 9 の方法により製造される接合分子。

【請求項 14】

請求項 1 の接合分子を含むワクチン。

【発明の詳細な説明】

本発明は、1992年9月24日に出願された米国特許出願第 07/949,970 号の一部継続出願である。

発明の権利に関する説明

本発明は、国立衛生研究所の支給する NIH 交付金 A123339、A130628 および A128040 により、政府の援助で行われた。政府は、本発明に若干の権利を有する。

発明の分野

本発明は、蛋白質に共役結合したグループ B ストレプトコッカス・タイプ II またはタイプ V の莢膜多糖 (capsular polysaccharide) から成る抗原接合分子 (antigenic conjugate molecule) に関する。また本発明は、グループ B ストレプトコッカス・タイプ II (GBS II) および / またはタイプ V (GBSV) による感染に対してヒトを包含する哺乳動物を免疫するワクチンおよび方法に関する。本発明の接合分子から成る多価ワクチンおよび他の病原菌に対する抗原も請求される。

発明の背景

グループ B ストレプトコッカス類 (GBS) による感染は、発展途上国での新生児における敗血症および髄膜炎の最も普通の共通の原因である (3, 31)。米国の二三のセンターからの最近の報告は、多分早期の診断および集中医療の結果として、1970年代からの一連の報告におけるよりも低い死亡率 (9ないし 13%) を示している (1, 10)。それにもかかわらず、致死感染がやはり起こっており、同じように見過ごせないのは、GBS 髄膜炎の生存者の 50% までが難聴および軽度の学習能力欠失から強い運動、知覚お

10

20

30

40

50

よび認識の損傷に亘る慢性の神経学的損傷を持っている(3)。改良された診断または治療でなく予防が、GBSに関連する罹患率および死亡率を減らすのに一番重要な効果を持つようである。

GBSの莢膜多糖特異性の抗体は実験動物(23、24)およびヒト幼児(4、5)の両方を保護するようであるので、若干の多糖を精製し、実験的ワクチンとして健常成人で試験した(6)。安全で有効なGBSワクチンが入手可能であれば、妊娠前または妊娠中の女性に投与して、子宮内の胎児に移行し、新生児の感染を防御する抗原を誘発することができる。ボランティアで試験した三種のGBS多糖(タイプIa、II、III)のうち、タイプIIは最高の免疫原性を有し、事前非免疫の受容体の88%にタイプII特異性の抗体応答を誘発する(6)。種々のGBSの血清型がGBS感染の患者のパーセントに重大な寄与をすることが従来認められてきたが、タイプVはGBS感染の高いパーセントの原因となるとは考えられて来なかった。新生児では、タイプII GBS感染からの保護に必要な特定の抗体の水準は正確には明示されていないが、2または3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と評価されてきた(6)。保護に必要な最小量をごく僅かに超える抗体応答を達成するワクチン受容体では、母体のIgGの胎児または後期感染開始の幼児への不完全な移行のため、胎盤を通して移行する母体の抗体の量は、早産児を保護するには不十分である。新生児内の母体の免疫グロブリンG(IgG)抗体の半減期は約25日であるからである(13)。予防接種への特定の抗体の応答の規模が大きい場合、この二群の患者内の幼児の多くは保護される。母体のIgGの胎児への移行は、第三の3ヶ月期の間を通じて増加し、そのため母体の抗体水準が高いほど、保護は早くなり、すなわち、早熟度の高い幼児を保護する(16)。同様に、母体の水準が高いと、幼児内での母体の抗体の持続が長くなり、そのためさらに後期開始の疾患を保護する。

種々の細菌性多糖抗体の免疫原性が、多糖または誘導体オリゴ糖への適当な担体蛋白質の接続によって増加されてきた(2、14、17-19、22、27、29、30、34)。多糖-蛋白質接合ワクチンに望まれる性質には、多糖の高い免疫原性、ブースター投与量への高いハプテン特異性抗体応答、およびIgGクラスの抗体の優勢が含まれる。最近我々は、指定の蛋白質カップリングの部位として側鎖シアル酸部分を使用することによって、GBSIII-破傷風トキソイド(TT)ワクチンを開発することに成功した(33)。III-TTワクチンは、GBSタイプIII-特異性のオプソニン活性の抗体を誘発し、非共役のタイプIII多糖はウサギにおいて非免疫原性であった(33)。

発明の要約

本発明は、タイプIIまたはタイプVの多糖成分のシアル酸残基中で終わる2以上の側鎖が第二アミン結合で蛋白質にそれぞれリンクされていることを特徴とする、グループBストレプトコッカス・タイプIIから誘導された莢膜多糖と蛋白質成分を含む抗原接合分子、またはグループBストレプトコッカス・タイプVから誘導された莢膜多糖と蛋白質成分から成る抗原接合分子である。

更に、グループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプVの莢膜多糖と蛋白質との接合分子を製造するための方法において、

(a) グループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプVの莢膜多糖を、多糖の骨格に結合した二つ以上の末端シアル酸残基中にアルデヒド基を導入するのに十分な過ヨウ素酸酸化に供し；

(b) 酸化されたグループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプVの莢膜多糖を、還元的アミノ化によって蛋白質に結合させて、莢膜多糖と蛋白質の間に第二アミン結合を形成させる

ことから成る方法も請求されている。

また、上記の方法で製造された接合分子も請求されている。

本発明は、さらに上記の接合分子のそれぞれから成るワクチンも請求する。さらに本発明は、本発明の接合分子およびグループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプV以外の病原性物質に対する抗体の製造を誘発しうる他の免疫原性分子の少なくとも一種を含む多価ワクチンを請求する。特に、GBSタイプIIおよび/またはGBSタイプVの接合

10

20

30

40

50

分子を含むことに加えて、本発明による多価ワクチンはさらにグループBストレプトコッカス・タイプI a、I b、III、IVおよびヘモフィラス・インフルエンゼ・タイプbおよびエシェリキア・コリ・タイプK 1から成る群から選ばれた病原体に抗体の産生を誘発できる他の免疫原性分子を含む。

本発明の別の実施態様では、誕生時の新生児における感染症に対する保護を生じさせるのに十分な量、ワクチンの投与の前または後に身籠もった胎児に推移しうる抗体を産生するために、本発明の接合分子から成るワクチンを免疫原性量、女性に投薬することを特徴とする、新生児を免疫性にする方法が請求される。

本発明の接合分子から成るワクチンを免疫原性量、成人に投与することを特徴とする、成人を免疫性にする方法も請求する。さらに、グループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプVに感染される危険性のある人に、本発明の接合分子から成るワクチンを免疫原性量で投薬することを特徴とする、成人を免疫性にする方法も請求する。

本発明の別の実施態様においては、上記のグループに積極的に投与できる血清または血漿を供給できるボランティアのワクチン受容体に、本発明の接合分子から成るワクチンを免疫原性量、投与する。本発明はまた、グループBストレプトコッカス・タイプIIまたはタイプV感染される危険性のある新生児、小児または成人を含む人を免疫する方法も提供する。危険性のある人には、癌または糖尿病を含む種々の原因で免疫系が抑制されている人を含んでもよく、癌または糖尿病に限定されない。

本発明の別の実施態様は、本発明の接合分子から成るワクチンを免疫原性量、乳牛に投薬することから成る、乳牛類のウシ乳腺炎に対する免疫法である。

【図面の簡単な説明】

図1．タイプII GBS 莢膜多糖のヘプタサッカライド繰り返し単位の構造(920)。

図2．GBSタイプII多糖競合ELISA。タイプII多糖を塗布したプレートにII-TTワクチン抗体結合の抑制剤としてGBSタイプI a()、タイプII()、およびタイプIII()の多糖が使用された。結果は、抑制剤なしの対照ウエルのそれに対する抑制の百分率として表している。

図3．GBSタイプII多糖競合ELISA。天然()および脱シアリル化またはコア()タイプII多糖をII-TTワクチンで誘発した抗体の抑制剤として使用した。データ点は、三回の測定の平均(標準偏差つき)である。結果は、抑制剤なしの対照ウエルのそれに対する抑制の百分率として表している。

図4．タイプV GBS 莢膜多糖の繰り返し単位の構造。

図5．GBSタイプV多糖競合ELISA。GBSタイプI a(- -)、タイプI B(- -)、タイプII(- -)、タイプIII(- 0 -)、タイプV(- -)、およびタイプVI(- -)多糖を、V-TTワクチンで誘発した抗体の抑制剤として使用した。データ点は、二回の測定の平均である。結果は、抑制剤なしの対照ウエルのそれに対する抑制の百分率として表している。

図6．GBSタイプV-TT接合ワクチンに起こったウサギ抗血清によってオプソニン化されたGBSタイプV株CJB111のヒト末梢血リンパ球によるインビトロのオプソニン食作用的死滅。C'は補体である。

好ましい実施態様の説明

本発明は、莢膜多糖成分と蛋白質成分とから成る抗原接合分子に関する。

細菌株．GBSタイプII菌株18RS21およびタイプI a菌株090は、もともとロックフェラー大学の故レベッカ・ランスフィールドから入手したもので、冷凍培養物として-80で保存した。菌株18RS21は、インビトロおよびインビボの検定に使用し、接合ワクチンに使用したタイプII莢膜多糖の原料であった。二種のGBSタイプIIの臨床単離物(菌株S16およびS20)およびタイプIII菌株781は、チャンニング・ラボラトリーの培養物コレクションから入手した。

以前はヒトのGBS感染の数に大きく寄与するとは考えられていなかったが、最近の証拠はタイプVの血清型がGBS感染の約15%に寄与することを示している。GBS-タイプV接合ワクチンを調製するために、GBSタイプV菌株1169-NT1はチェコ共和

10

20

30

40

50

国、プラハ、衛生疫学研究所の J. ジェリンコバ博士から入手し、冷凍培養物として - 80 で保存した。菌株 1169 - NT1 は、インビトロおよびインビボの検定に使用し、接合ワクチンに使用したタイプ V 莢膜多糖の原料であった。GBS タイプ V 菌株 CJB111 は、もともとベイヤール大学のキャロル・ベイカー博士から入手した。

GBS タイプ II 多糖またはタイプ V 多糖の TT への接合、タイプ III 多糖の精製に以前記載されている方法によって、タイプ II 莢膜多糖を菌株 18RS21 から精製した (33)。タイプ II 多糖の単量体 TT への接合は、TT の GBS タイプ III 多糖への接合のために以前詳細に記載された方法を使って実施した (33)。要するに、天然のタイプ II 多糖はセファローズ CL - 6B カラム (1.6 x 85 cm; ファーマシア・ファインケミカルズ) 上でサイズ画分した。主ピークの中央で溶出する物質をプールし、水に対して透析し、凍結乾燥して、相対分子量 200,000 の物質を得た。この物質の 500 MHz での ¹H - 核磁気共鳴分光分析により、天然タイプ II 多糖構造 (20) およびグループ B 抗原 (26) の不存在が確認された。本発明の接合分子に使用するのに適した多糖は、分子量が広範囲に変化してもよい。多糖成分の好ましい分子量は、約 5,000 および 1,000,000 ダルトンの間である。もっと好ましい範囲は、100,000 と 300,000 の間である。100,000 から 300,000 の範囲の中で、約 200,000 ダルトンの分子量を持つ多糖が好ましい。

サイズ画分されたタイプ II 多糖は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムによる穏和な酸化に供された (18)。この過程で、多糖上のシアル酸残基の一部がシアル酸の炭素 8 個の同族体である、5 - アセトアミド - 3, 5 - ジデオキシ - D - ガラクトシルオクツロソン酸に変化した (33)。酸化されたシアル酸残基の百分率は、前述のようなシアル酸残基およびその酸化誘導体のガスクロマトグラフィー - 質量分光分析によって評価された (33)。好ましくは、各 GBS タイプ II 多糖のシアル酸残基の約 5 ないし 50% が、変性されて蛋白質に結合可能になる。最も好ましくは、GBS タイプ II 多糖のシアル酸残基の約 5 ないし 25% が、変性されて蛋白質に結合可能になる。

GBS タイプ II 多糖の約 5 ないし 10% の変性が最も好ましい。末端シアル酸残基の約 5 ないし 80% の変性を達成するために、GBS タイプ V を酸化して、反応性のアルデヒドを生成するのが好ましい。末端シアル酸残基の約 10 ないし 50% の変性が最も好ましい。

本発明の接合分子の蛋白質成分は、どんな生物学的に許容される蛋白質でもよい。好ましい蛋白質としては、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、および CRN₁₉₇ のような交差反応の物質がある。

酸化されたタイプ II 多糖は、前述のような還元的アミノ化によって、単量体の破傷風トキソイド (「TT」) (カナダ、モントリオール、アーノルド・フラッピピャー研究所) に還元的アミノ化で結合させた (33)。TT はやはり前述されたゲル濾過クロマトグラフィーによってその単量体に精製された (33)。要するに、過ヨウ素酸塩で処理されたタイプ II 多糖 10 mg および精製 TT 10 mg を 0.6 ml の 0.1 M 重炭酸ナトリウム (pH 8.1) に溶解した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (20 mg) をその混合物に加えて 37 で 5 日間培養した。接合の進行は、スーパーローズ 6 (ファーマシア) ゲル濾過カラム上での少量の反応生成物の高速蛋白質液体クロマトグラフィー (FPLC) によって監視した。反応は、(高分子量の接合体を示す) カラムの空隙容積で溶出するピークの高さが一定になった時に終了した。接合体は、前述のようにバイオゲル A、0.5 M (カリフォルニア州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ) のカラム上でのクロマトグラフィーで精製した (33)。ワクチンの蛋白質含有量は、ウシ血清アルブミンを標準として使用して、ロウリらの方法 (25) で評価した。炭水化物の含有量は、精製したタイプ II 多糖を標準として使用して、デュポアらの方法 (11) で分析した。

タイプ II 莢膜多糖は、前述のタイプ III 多糖の精製法で、GBS タイプ V 1169 - NT1 細胞から精製した (33)。タイプ V 多糖の単量体 TT への接合は、TT の GBS タイプ III 多糖への接合について前述した方法を使って実施した (33)。

天然のタイプ V 多糖は、200,000 の相対分子量を有した。500 MHz における H

10

20

30

40

50

- 核磁気共鳴分光分析によるこの物質の分析で、天然のタイプVの構造(2)およびグループB抗原の不存在が確認された(26)。

蛋白質に結合させるために、タイプV多糖の末端シアル酸残基に反応性のアルデヒド基を導入するために、タイプV多糖をメタ過ヨウ素酸ナトリウムによる穏和な酸化に供した(8)。この過程の結果、多糖上のシアル酸残基の一部が、シアル酸の炭素8個の同族体である、5-アセトイミド-3,5-ジデオキ-D-ガラクトシルオクツロソン酸に変換された(33)。酸化されたシアル酸残基の百分率は、シアル酸残基およびその酸化誘導体のガスクロマトグラフィー-質量分析によって評価した。

酸化されたタイプV多糖は、前述の還元的アミノ化によって単量体TT(カナダ、モントリオール、アーモンド・フラッピアー研究所)に結合させた(33)。TTは、やはり前述したゲル濾過クロマトグラフィーでそのモノマーに精製した(33)。要するに、8.6mgの過沃素酸処理したタイプV多糖および8.7mgの精製したTTを、0.5mlの0.1M重炭酸ナトリウム(pH8.2)に溶解した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(31.5mg)をこの混合物に加えて37°Cで10日培養した。接合の進行は、スーパーローズ6(ファーマシア)ゲル濾過カラム上で分析した少量の反応混合物の高速蛋白質液体クロマトグラフィー(FPLC)で監視した。反応は、(高分子量の接合体を示す)カラムの空隙容積で溶出するピークの高さが一定になった時に終了した。接合物は、流動緩衝液として0.01Mの燐酸塩、0.15MのNaClプラス0.01%のチメロサルを使用して、セファクリルS-300HR(ファーマシア)の2.6×91cmのカラム上でのクロマトグラフィーで精製した。ワクチンの蛋白質含有量は、ウシ血清アルブミンを標準として、ロウリーらの方法(25)で評価した。炭水化物含有量は、ガラクトースを標準として、デュボアらの方法(11)で評価した。

II-TTワクチンおよびV-TTワクチンによるウサギのワクチン接種

体重が約3kgである3羽の雌のニュージーランド白ウサギ(マサチューセッツ州、アムハースト、ミルブルック農場)の群を、それぞれ合計容積2mlに完全フロイントアジュバントで乳化した、未結合の天然タイプII多糖またはII-TTワクチンの50µgで、背部の4箇所皮下接種した。これらの動物は、20日目および41日目に不完全フロイントアジュバントで調製したワクチンのブースター注射(50µg)を受けた。0、20、34、41、55および70日目に各動物から血清を得て、無菌濾過し、-80°Cで貯蔵した。

約3kgの1羽の雌のニュージーランド白ウサギ(マサチューセッツ州、アムハースト、ミルブルック農場)を、合計容積2mlにミョウバンと混合したGBSタイプV-TT接合ワクチン50µgで、背部の4箇所皮下接種した。この動物は、22日目および42日目にミョウバンで調製したワクチンのブースター注射(50µg)を受けた。0、35、56および91日目にその動物から血清を得て、無菌濾過し、-80°Cで貯蔵した。

E L I S A . GBSタイプII-特異性のウサギ抗体を、アルカリホスファターゼ(カリフォルニア州、バーリンガム、タゴ・インコーポレーテッド)に接合したヤギ抗-ウサギIgGで、1/3,000の希釈で、酵素結合抗体免疫アッセイ(E L I S A)によって定量した。マイクロタイタープレート(イムロン2;バージニア州、シャンティイー、ダイナテック・ラボラトリーズ)に、前記のようにウエルあたり100ngのポリ-L-リシンに結合した精製タイプII多糖を塗布した(15,33)。抗体価を逆数希釈として記録し、1/800の希釈時に対照血清(全GBS18RS21細胞に生じたウサギ抗血清)を含むウエルが0.5のA₄₀₅に達したとき、0.3のA₄₀₅を示した。接合ワクチンの蛋白質部分に特異的な抗体の量は、単量体TT(ウエルあたり100ng)を塗布したプレートを使用してE L I S Aで評価した。TT-特異性のIgG価(タイター)を逆数希釈として記録し、基体であるp-ニトロフェニルホスフェート(シグマ104ホスファターゼ基体錠;シグマ・ケミカル・カンパニー)の添加後、0.3のA₄₀₅を示した。

GBSタイプV-特異性のウサギ抗体も、アルカリホスファターゼ(カリフォルニア州、バーリンガム、タゴ・インコーポレーテッド)に接合したヤギ抗-ウサギIgGで、1/3,000の希釈で、E L I S Aによって定量した。マイクロタイタープレート(イムロ

10

20

30

40

50

ン2；バージニア州、シャンティイー、ダイナテック・ラボラトリーズ）に、前記のようにウエルあたり100 ngのポリ-L-リジンに結合した精製タイプV多糖を塗布した（15）。抗体価を逆数希釈として記録し、1/3000の希釈時に対照血清（全タイプV菌株1169-NT1）を含むウエルが0.3のA₄₀₅に達したとき、0.3のA₄₀₅を示した。

免疫ウサギ血清からのIgGおよびIgMの分離．70日目に得られた、別記（28）のようにII-TTに育成した免疫ウサギ血清のプール品0.5 mlから免疫グロブリン（IgGおよびIgM）を分離するのに、蛋白質A-アガロース・アフィニティーカラムクロマトグラフィー（イリノイ州、ロックフォード、ピアス・ケミカル・カンパニー）を使用した。抗体クラスの分離は、1/500の希釈で使用したヤギ抗-ウサギIgG（およびL鎖特異性；タゴ）および11/200の希釈で使用したヤギ抗-ウサギIgM（μ鎖特異性；ニューヨーク州、ウエストバリー、セラ-ラブ）でタイプII多糖を塗布したELISAプレートで確認した。

競合ELISA．II-TTワクチンを生じさせるウサギ血清の特異性は、抑制剤として同質（タイプII）及び異質（タイプIa及びIII）多糖類を用いた競合ELISAによって決定された。ワクチン誘導されプールされたウサギ血清（70日目に得られた）のエピトープ特異性は、抗体結合の抑制剤として、先天及び脱シアル化されたタイプII多糖及び-O-メチルガラクトピラノースを用いて試験された。先天タイプII多糖は、80で2時間、6%酢酸で処理することにより脱シアル化された。多糖抑制剤は、順次4倍希釈し、II-TTワクチンを用いたワクチン接種後70日目に得られたプールされたウサギ血清（10000倍希釈）の当容積（75 μl）と混合した。それから、この混合物（100 μl）を、タイプII多糖コートされたELISAウエルに添加した。アルカリ性ホスファターゼ接合した抗ウサギIgGが、1/3000の希釈割合で第二抗体として使用された。結果が、以下に示されている。 $\%抑制 = \left[\frac{抑制剤なしのA_{405} - 抑制剤を用いたA_{405}}{抑制剤なしのA_{405}} \right] \times 100$

GBS V-TTウサギ抗血清の血清タイプ特異性は、GBSタイプ特異多糖類Ia、Ib、II、III、V及びVIを用いて評価された。ELISAウエルは、ポリ-L-リジンにリンクしたGBSタイプV多糖を含む100 ng/ウエルでコートされた。V-TTワクチンに対するウサギ抗血清で、1/6000に希釈されたものは、各多糖抑制剤を用いて培養された。培養された抗血清は、ELISAウエルに添加され、このプレートは、ヤギ抗ウサギIgGアルカリ性ホスファターゼ接合体（1/3000希釈）と、これまでに詳述されている基質（28）を用いて処理された。

インビトロにおけるGBSの抗体媒介死滅．ヒトの末梢血白血球により引き続いて死滅させるためのGBS細胞をオプソニン化するためのワクチン誘発ウサギ抗体の能力を、インビトロオプソノ食作用アッセイ（7、8）により評価した。

GBSタイプV反応性抗体のオプソノ食作用活性を測定するための反応アッセイは、300 μlの緩衝液における 1.5×10^7 白血球（WBC）；50 μlにおける 3×10^6 CFUのタイプV GBS菌株CJB 111；ヒト補体（GBSタイプV菌株細胞を用いて吸収された）（50 μl）；抗体-抗V-TT熱不活性化（50 μl）；変性されたイーグル培地（50 μl）を培養することによって行われた。混合物は、37にて60分間混合しながら培養した。GBSコロニー形成ユニット（CFU）における違いは、標準プレートカウント法により37にて1時間、引き続いて培養して測定された。

ワクチン誘導されたウサギ抗体によるマウスの受動的防御．10匹のSwiss-Webster非近交雌マウス（タコニックファームス、ジャーマンタウン、N.Y.）のグループで、各マウスの体重が18~20 gであるものに、タイプII多糖又はII-TTワクチンのいずれかでワクチン接種したウサギからプールされた血清（70日）0.2 mlを腹腔内的に注入した。タイプII多糖を用いて免疫化したウサギからの70日目に得られたプールされた血清のELISAによって測定された力値（タイター）は100であり、II-TTワクチンの場合には12800であった。5匹のマウスの対照グループには、プールされた事前免疫ウサギ血清又は結合されないTTを生じさせるプールされた抗血清（27）

10

20

30

40

50

を投与した。24時間後に、1.0mlのトッド-ヘウITTブrossの全量において、マウスは、タイプII菌株18RS21(1.5×10⁵CFU/マウス)を用いて誘発した。各菌株に対する誘発投薬量は、事前に同じ体重で同じ月齢のマウスの90%以上が死に至るように決定された。生き残ったマウスを、3日間引き続いて毎日数えた。

統計分析．致死GBS感染に対するマウスを受動的に防御する異なったウサギ血清の能力を比較するために、フィッシャーズの正確試験が使用された。

結果

II-TTワクチン及びV-TTワクチンの調製及び組成物．GBS II-TTワクチン及びGBS V-TTワクチンを、GBSタイプIII結合ワクチンの構成について以前に詳述された方法によって調製した(33)。タイプII GBS多糖の制御された過ヨウ素酸塩の酸化により、ガスクロマトグラフィー-質量スペクトル分析によって決定されたものとして、7%の多糖のシアル酸残基の変化が起こった。単一TTは、還元性アミノ化により、タイプII多糖上の変異したシアル酸位置に共有結合で結合した。この精製されたII-TTワクチンは、32%(wt/wt)の蛋白質及び68%(wt/wt)の炭水化物を含んでいた。II-TTワクチンの最終収量は7.8mg、39%であった。

タイプV GBS多糖の制御された過ヨウ素酸塩の酸化により、この多糖において約8%、25%及び50%のシアル酸残基の変化が生じた。単一のTTは、還元性アミノ化によって、タイプV多糖上の変化したシアル酸位置に共有結合で結合した。多糖類は酸化された結果、そのシアル酸残基の約8%が変化し、蛋白質のモル比に対して低い多糖を有する接合体が生じた。末端のシアル酸残基の25%又は50%が変化した多糖類は、蛋白質のモル比に対してより望ましい多糖を有する接合分子が生じた。シアル酸残基の25%が変化したGBSタイプV多糖類を、表Iに示される生化学的な特徴を有する接合ワクチンを製造するのに使用した。

表1. GBSタイプV-TTワクチンの組成

多糖の大きさ (M ^T)	200,000
酸化されたシアル酸残基 (%)	25
破傷風トキソイドとしてのワクチンの量 (% dry wt.)	38
炭水化物としてのワクチンの量 (% dry wt.)	62
炭水化物のモル/蛋白質のモル*	0.56

* 破傷風トキソイドモノマーの測定されたM^T は、150,000 であった。

ウサギにおけるII-TTワクチン及びV-TTワクチンの免疫原性．II-TTワクチン及び先天タイプIII多糖の免疫原性を、ウサギにおいて比較した。タイプII特異抗体における増加は、II-TTワクチンの初期投薬の後に観察された(表2)。ワクチンのブースター投与により、更に抗体応答が増加した。抗体レベルは、変化せずに維持されるか、あるいは、41日の第2のブースター投与の後にわずかに上昇し、この研究の残りの間を通して維持された(表2)。II-TTワクチンとは対照的に、結合していない先天GBSタイプII多糖は、特異的な抗体応答をもたらさなかった(表2)。II-TTワクチンを用いてワクチン接種された動物はまた、TTに対する抗体を生成し、前免疫レベルを越えて、約3-10g₁₀増加を達成した。

表2. 先天GBSタイプII多糖又はII-TTワクチンを用いてワクチン接種されたウサギのGBSタイプII多糖-特異抗体価

ワクチン及びウサギ	日におけるELISAにおける抗体価： ^a					
	0	20 ^b	34	41 ^b	55	70
先天タイプII 多糖						
1	100	100	100	200	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	200	100	100	100	100	100
II-TT						
1	100	400	3,200	3,200	6,400	12,800
2	100	1,600	3,200	6,400	6,400	25,600
3	100	6,400	12,800	25,600	12,800	12,800

^a 100という値は、抗体価が ≤ 100 であることを示す。値は、二回の測定
の平均値である。ウサギは、0日で完全フロインドアジュバントを用い
て乳化された50 μ gのワクチンで皮下にワクチン接種された。

^b 不完全フロインドアジュバントを用いたブースター投薬を投与した。

V-TTワクチン(25%まで多糖が酸化された)の免疫原性もまた、ウサギにおいて評
価した。抗体(IgG)レベルは、第1及び第2のタイプV-IIワクチンの投薬の後に増
加し、この研究を実施する間、維持された(表3)。

表3. GBSタイプV多糖-特異IgG価

ワクチン	日におけるELISAにより測定されたIgG価 ^a ：			
	0	35	56	91
V _{25%OX} -TT ウサギ 1 ^a	100	800	1,600	1,600

^a この動物は、0日に開始してから3週間の間隔でミョウバンと混合
したワクチンの50 μ gの投薬量を3回投与された。

ワクチン誘発されたウサギの血清の抗原性・蛋白質キャリアへの多糖の接合は、その先
天的な形態で多糖において見い出されている重要な抗原エピトープを変化させることはな
い。我々は、抑制剤として同種及び異種GBS多糖類を用いた競合ELISAによって、
II-TTワクチン誘発された抗体の特異性を試験した。450ng/mlの濃度にて先天
タイプII多糖は、ウサギ抗体の結合の50%を抑制し、II-TTワクチンが生じた(図2
)。GBSタイプIa及びタイプIII多糖類は、500 μ g/mlよりも高い濃度であっ

10

20

30

40

50

てもII - TTワクチンを生じさせる血清の結合を抑制しなかった(図2)。これらの結果は、標的抗原に対するII - TTワクチン誘発された抗体の血清タイプ特異性を証明しており、接合ワクチンの多糖部分の抗原エピトープの保存を示している。

シアル酸によって影響されたエピトープが、II - TTワクチンの調製の際に維持されるかどうかを調べるために、先天及び脱シアル化されたタイプII多糖が、II - TTワクチンを生じさせるウサギ抗体の結合の抑制剤として競合ELISAにおいて使用された。この多糖の脱シアル化は、80にて2時間、6%酢酸を用いた処理によって行われた。シアル酸残基の定量的な除去は、標準としてのN - アセチルノイラミン酸(シグマ)を用いて、チオバルビツール酸アッセイ(32)によって行われた。Superose 6 FPLCカラム(LKB - ファルマシア、スウェーデン)における、酸処理を行う前の先天タイプII多糖の K_{av} は0.49であり、一方、酸処理された多糖の K_{av} は0.52であり、先天多糖が重量で20%になるような側鎖のシアル酸残基の損失により、多糖の分子の大きさにわずかな縮小が示された。mlあたりの脱シアル化したGBSタイプIIが200 μ gであっても、先天タイプII多糖に対するII - TTワクチン抗体の33%の結合によって抑制された(図3)。II - TTワクチン抗血清による脱シアル化又はコアタイプII多糖が相対的に認識しにくいことは、免疫電気泳動ゲルによって確かめられ、このゲルは、(示されていないが)コアタイプII多糖ではなく、先天のものと一緒に生成した沈降素バンドを示していた。先天タイプII多糖に対するII - TTワクチン抗血清の結合は(示されていないが)0.01~10mg/mlの濃度範囲で使用された-O-メチルガラクトピラノースによって抑制することができなかった。

GBSタイプV - TTワクチン誘発された抗体の特異性は、抑制剤として同種及び異種GBS多糖類を用いた競合ELISAによって試験された。先天タイプV多糖は、タイプV - TTワクチンを生じさせるウサギ抗体の結合を効果的に抑制した(図5)。GBSタイプIa、タイプIb、タイプII、タイプIII及びタイプVIは、タイプV - TTワクチンを生じさせる血清の結合を効果的に抑制しなかった(図5)。これらの結果は、標的抗原に対するタイプV - TTワクチン誘発された抗体の特異性を示している。

GBSワクチン誘発された抗体のインビトロ活性。インビトロにおける人間の末梢血白血球による死滅のためのGBSをオプソニン化するための免疫血清の能力は、動物防御実験(27、33)におけるGBSに対する防御効果と関連があった。II - TTワクチンを用いてワクチン接種された3羽のウサギに生じた抗体は、 $1.8 \log_{10}$ 以上にまでGBSタイプII菌株18RS21の死滅を促進した(表4)。前もって免疫化したウサギの血清又は、先天GBSタイプII多糖又は結合していないTTを用いてワクチン接種されたウサギからの血清は、インビトロにおけるGBSの死滅を促進しなかった(表4)。ワクチン誘発されたウサギ抗体は、2つのGBSタイプII臨床隔離集団(菌株S16及びS20)の人間の血液白血球による死滅を、前免疫化ウサギ血清に比べて、 $1.8 \log_{10}$ 以上にまで促進した(表5)。タイプII - TTワクチンに対するウサギ血清は、異種(タイプIa及びIII)GBS菌株のインビトロにおける死滅を促進することがないので、血清タイプ特異性であることがわかった(表5)。

10

20

30

表4. 先天タイプII多糖、II-TTワクチン、又はTTを生じさせるウサギ抗血清による、GBSタイプII菌株18RS21のインビトロオプソノ食作用死滅

血清源 (採取の日)	CFU ^a :		死滅した GBS (log ₁₀)
	0分時	60分時	
タイプII多糖(70) ^b	4.3 x 10 ⁶	6.6 x 10 ⁶	-0.19
II-TT ワクチン(0)	6.0 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	-0.03
II-TT ワクチン(70)			
ウサギ1	4.0 x 10 ⁶	5.7 x 10 ⁴	1.85
ウサギ2	4.3 x 10 ⁶	2.7 x 10 ⁴	2.20
ウサギ3	3.9 x 10 ⁶	4.3 x 10 ⁴	1.96
TT (70)	4.2 x 10 ⁶	6.9 x 10 ⁶	-0.21
なし	3.9 x 10 ⁶	7.1 x 10 ⁶	-0.26

10

20

- ^a 反応混合物は、試験される血清（1%の最終アッセイ濃度で）、補体源としてのタイプII GBS吸収ヒト血清、ヒト末梢血白血球、及びタイプII GBS 18RS21を含有していた。値は二回の測定の平均値である。
- ^b ウサギ血清は、完全フロインドアジュバントにおける先天タイプII多糖の初期投薬の後に採取した。

表5. 前免疫及び、II-TTワクチンを生じさせる免疫ウサギ血清による、GBS菌株のインビトロオプソノ食作用死滅

GBSタイプ及び菌株	死滅したGBS(log ₁₀) [*]	
	前免疫 (0日)	免疫II-TT ワクチン (70日)
II		
18RS21	-0.36	1.98
S16	0.96	2.78
S20	-0.01	1.84
Ia 090	ND	-0.51
III M781	ND	-0.54

10

^{*}60分でのCFU(log₁₀) - 0分でのCFU(log₁₀)。反応混合物は、試験される血清、補体源としてのタイプII GBS吸収ヒト血清、ヒト末梢血白血球、及びタイプII GBS 18RS21を含有していた。値は二回の測定の平均値である。ND、行われなかった。

20

蛋白質A親和性 - 精製されたIgG及びIgMは、タイプII-TTワクチンを生じさせるプールされた血清から得られた(28)。各Igフラクションの特異性は、クラス特異性二次抗体を用いたELISAによって確認された。IgM及びIgGフラクションのA₄₀₅S(1/100に希釈)は、μ鎖特異性接合体を伴い、それぞれ0.384及び0.009であり、ヤギ抗ウサギIgG(及び軽鎖特異性)を伴い、それぞれ0.086及び2.367であった。分離されたIgM及びIgGは、人間の血液白血球によるタイプII GBSのオプソニン死滅を促進させる能力について試験された。タイプII-TTワクチンを生じさせる分画されていない血清を1:100に希釈し、同様の血清からのIgGフラクションの等量1:100希釈は、タイプII GBSの死滅を、それぞれ1.65±0.22及び0.95±0.09 log₁₀まで促進した。対照的に、タイプII GBSは死滅されることはなく、オプソノ食作用アッセイにおいて、前免疫血清(-0.39±0.13 log₁₀)及び、タイプII-TTワクチンを生じさせる血清からの、IgMを多く含むフラクションの存在下で成長した。

30

人間の血液白血球によるGBSタイプV菌株(CJB 111)の死滅を促進するための、GBSタイプV-TTワクチン誘発されたウサギ抗血清の能力もまた、インビトロにおけるオプソノ食作用アッセイによって評価された(8)。図6に示されるように、10%の濃度でのGBSタイプV-TT抗血清は、コントロールに対応するGBSタイプV菌株CJB 111を効果的に最適化した。制御反応条件は、抗血清のない補体(10%)、補体のない抗血清(10%)、抗血清(1%)及び補体であった。

40

マウス防御アッセイ. ワクチン誘発された抗体のインビボでの防御能力を試験するために、タイプII GBS 18RS21を用いて誘発する前に、マウスは、プールされたII-TTワクチン血清(70日)24時間を用いて受動的に免疫化された。前もって、誘発投薬量は、試験されたマウスの90~100%が致死するように決定した。完全(100%)な防御は、GBS II-TTワクチンを生じさせる血清を与えられたマウスのグループに生じる一方、事前にワクチン血清を与えた5匹のマウスの1匹しか生存しなかった(表6)。結合していないタイプII多糖又は結合していないTTのいずれかを用いてワクチン

50

接種されたウサギからの血清を受けたマウスの中では生き残ったものはなかった（表6）。

表6. 先天タイプII多糖II-TTワクチン、又はTT^aを用いてワクチン接種されたウサギからの血清を含むGBSタイプII菌株18RS21に対するSwiss-Webster非近交マウスの受動的防御

ウサギ血清 ^b (採取の日)	生存したものの数/ マウスの総数 ^c	生存割合%
II-TTワクチン(70)	10/10	100 ^d
II-TTワクチン(0)	1/5	20
タイプII多糖(70)	0/10	0
TT(70)	0/5	0

^a マウスは、GBSの90%致死量 (1.5×10^5 CFU/マウス) が投与された。

^b 3羽のウサギからの血清サンプルはプールされた。

^c 生存したものは、誘発後72時間で測定した。

^d $P=0.0037$ は、前免疫化(0日)の値と比較した。

最初に髄膜炎菌性多糖(18)を生ずるGBSタイプIII多糖を用いた結合したストラテジー(strategy)は、全てのGBS莢膜多糖抗原に適用できる。なぜならば、これらは全てシアル酸を含むからである。しかしながら、ジ又はトリサッカライド側鎖の末端サッカライドとしてのシアル酸を有する、他のGBS多糖類に類似せず、GBSタイプII多糖は、2つのモノサッカライド側鎖(9、20)の一つに唯一の糖としてシアル酸を有する繰り返しユニットを持っている。GBSタイプII接合ワクチンを構成する際、我々は、タイプII多糖上のシアル酸残基の7%を酸化し、多糖がTTに結合するための位置として、これらを使用した。精製されたII-TTワクチンは、スーパーローズ6カラム(10^6 以上の分子量に一致する)の空隙容量で溶出し、68%(wt/wt)炭水化物及び32%(wt/wt)蛋白質からなっていた。

アジュバントを用いて乳化されたタイプII-TTワクチンは、タイプII多糖特異抗体をもたらすことのない、結合していない先天タイプII多糖とは対照的に、ウサギにおいて免疫性があつた。免疫化された3羽のウサギのうちの2羽は、II-TTワクチンの単一投薬後3週間、強く応答した。最適タイプ特異抗体は、II-TTワクチンのブースター投与後3週間、全ての3羽のウサギにおいて達成された。タイプII特異抗体価の更なる増加は、II-TTワクチンの3回目投薬後には観察されなかった。インビトロ及びインビボ実験からの結果は、II-TTワクチンを生じさせる抗体が、タイプIIGBSに対して機能的に活性であることを示していた。II-TTワクチンを用いてワクチン接種された3羽のウサギのそれぞれからの血清は、人間の末梢白血球によるタイプIIGBSのインビトロでの死滅を促進し、タイプIIGBSの致死量に対して完全(100%)保護を有した非近交マウスをもたらした。II-TTワクチン抗血清は、同種GBS菌株(18RS21、S16、及びS20)に対してはオプソニ的に活性であったが、異種GBS血清タイプ(タイプ1a及びIII)は試験されていない。

先天タイプII多糖が、タイプII多糖コートELISAウエルへのII-TTワクチン抗血清の結合を抑制する一方、たとえ200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で使用されたとしても、脱シアル化されたタイプII多糖と共に40%以下の抑制が得られた。この結果は、タイプII多糖の

10

20

30

40

50

重要な抗原決定基が、シアル酸残基の存在に依存していることを示している。この結果は、これらが全てのタイプII生物を生じさせるウサギ抗血清を共に得られることを証明している(21)。しかしながら、抑制剤として - O - メチルガラクトピラノースを用いた E L I S A 抑制実験は、II - T T ワクチンを生じさせるウサギ抗血清が、ガラクトース特異抗体を含まないことを示していた。タイプII先天多糖へのII - T T ワクチン抗血清の結合の抑制は、10 mg / ml の濃度で - O - メチルガラクトピラノースを用いた場合にも得られなかった。それゆえ、側鎖ガラクトースは、多糖が T T に結合された際に、タイプII多糖の免疫優性エピトープであるとは思われない。これらの結果は、免疫化学研究とは対照的に、全てのタイプII G B S 生物(12、21)を生じさせるウサギ血清を用いて実施され、この生物においては、ガラクトース側鎖が、シアル酸依存エピトープと共に、タイプII多糖の2つの免疫優性位置の一つになっているものと思われる。以前の研究(12、21)において使用され、しかも pH 調整条件にて培養されていない全てのタイプII G B S 細胞は、ある程度、シアル酸が欠けた多糖を有しているかも知れない。これらの状況の下では、側鎖ガラクトースは、主な抗原性エピトープであるように思われる。II - T T ワクチンを合成するために使用したタイプII多糖の原料は、pH 7.0 に維持されたタイプII G B S 培地であった。最終分析から、シアル酸が ~ 20% (w t / w t) の多糖から構成されていることが確認された。我々は、T T への結合タイプII多糖は、多糖の立体配座を変え、これによって、宿主免疫系による確認に利用できないガラクトースエピトープを与える可能性を否定することができない。II - T T ワクチン誘発されたウサギ抗血清は、ガラクトース特異抗体が欠けていたが、タイプII G B S 生物に対してインビトロ及びインビボにて十分に機能した。シアル酸残基のいくつかの化学的修飾も、引き続いて起こるこれらの位置への T T の結合もどちらも、官能タイプII特異抗体をもたらすのに必要な臨界抗原エピトープを変化させない。II - T T ワクチンを生じさせるウサギ血清からの精製された I g G が、人間の白血球によるタイプII G B S のインビトロにおける死滅を促進させることは、タイプII多糖の免疫原性が T T への接合により増加するというだけでなく、機能 I g G 抗体がもたらされることを示唆している。

G B S タイプV 莢膜多糖は、隣接した糖残基上の2つの異なる側鎖を含むトリサッカライド骨格からなる繰り返しユニット構造を有している。(参考文献35; 図4)。G B S タイプV - T T 接合ワクチン調合物の一つでは、タイプV多糖における長い側鎖(即ち3糖残基)上のシアル酸残基の25%が酸化された。この酸化されたシアル酸残基は、T T にタイプV多糖が結合するための位置として使用された。この精製されたタイプV - T T ワクチンは、38% (w t / w t) の T T と 62% (w t / w t) の炭水化物からなっていた。ミョウバンと混合された V - T T ワクチンは、ウサギにおいて免疫原性であることが示された。タイプV - T T ワクチンの最初の投与及びブースター投与の後に、強い作用が観察された。又、第2のブースター投与では、タイプV多糖 I g G 価における更なる増加が生じた。タイプV - T T 誘発アッセイの血清特異性は、競合 E L I S A によって示された。V - T T ワクチンに対する生じたウサギ抗血清は、ヒト白血球及び補体の存在下でインビトロにてタイプV G B S を死滅させる能力により証明されるものとして機能的に活性である。

III - T T ワクチンと同様に、II - T T ワクチンは、活性多糖と比較してウサギにおいて改良された免疫原性を示し、多糖の構造、T T が結合される多糖上のシアル酸の位置及びワクチン組成物が違っているにもかかわらず、ウサギにおいてオプソニ的に活性な I g G をもたらす。又、タイプV - T T ワクチンは、ウサギにおいて免疫原性であること、及び、インビボにて抗体を機能的に誘導可能であることが明らかとなった。我々は、この計画の G B S 多糖 - 蛋白質接合体が究極的に、人間の病気に最もしばしば関連のある G B S 血清タイプに対して保護をもたらし得る多価 G B S ワクチンの成分を構成していると推察している。

更に、我々は、ワクチンが、製薬学的に受容可能なキャリアーに接合分子を添加することによって、本発明の接合分子から製造できると考えている。恐らく、本発明の抗原分子における架橋の程度は、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌することのできるワ

10

20

30

40

50

クチンを提供するのに十分な範囲に制御される。このようなワクチンは可溶性であることが好ましい。免疫法は、受容株哺乳類にワクチンを注入することによって行うことができ、必要であれば一度、それに引き続いてブースター注入を行う。投与されるべきワクチンの十分な投薬量は、存在する多糖の量に基づくことができる。接合ワクチンの多糖成分の3 ~ 80 μ g の範囲を投与することができる。

参考文献

1. Adams, W.G. J. Kinney, A. Schuchat, C. Collier, C. Papasian, H. Kilbride, F. Riedo, and C. Broome, 1991, Program Abstr. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Agent Chemother., abstr. 1056
2. Avey, O.T., and W.F. Goebel, 1931. 接合炭水化物 - 蛋白質に関する化学免疫学研究 V, タイプIII pneumococcusの莢膜多糖と異種蛋白質との結合により製造された抗原の免疫学的特異性, J. Exp. Med. 54: 437-447 10
3. Baker, C.J., and M.S. Edwards, 1990, グループB連鎖球菌性感染, p. 742-811, In J.S. Remington and J.O. Klein(ed.), 胎児及び新生児の感染性疾患, The W.B. Saunders Co., Philadelphia
4. Baker, C.J., and M.S. Edwards, and D.L. Kasper, 1981, 乳児感染におけるグループB Streptococcusの先天タイプIII多糖に対する抗体の役割, Pediatrics 68:544-549
5. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1976, 新生児グループB連鎖球菌感染に対する感受性と材料抗体欠乏との相関関係, N. Engl. J. Med. 294:753-756
6. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1985, グループB連鎖球菌ワクチン, Rev. Infect. Dis. 7:458-467 20
7. Baker, C.J., M.A. Rench, M.S. Edwards, R.J. Carpenter, B.M. Hays, and D.L. Kasper, 1988, グループB Streptococcusの多糖ワクチンを用いた妊娠した女性の免疫, N. Engl. J. Med. 319:1180-1220
8. Baltimore, R.S., D.L. Kasper, C.J. Baker, and D.K. Goroff, 1977 グループB Streptococciに対するウサギ抗血清におけるオプソノ食作用抗体の抗原特異性, J. Immunol. 118:673-678.
9. De Cueninck, B.J., T.F. Grebar, T.K. Eisenstein, R.M. Swenson, and G.D. Schockman, 1983, グループB Streptococciの細胞外タイプII及びIa多糖類の分離、化学組成物、及び分子サイズ, Infect. Immun. 41:527-534 30
10. Dillon, H.C., S. Khare, and B.M. Gray, 1987, グループB連鎖球菌キャリアッジ及び疾患: 6年間の回想的研究, J. Pediatr. 110:31-36
11. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebars, and F. Smith. 1956, 糖類及び関連物質を決定するための比色方法, Anal. Chem. 28:350-356
12. Freimer, E.H. 1967 グループB Streptococciのタイプ特異性多糖抗原, J. Exp. Med. 125:381-392
13. Gelfand, H.M., J.P. Fox, D.R. LeBlanc, and L. Elveback, 1960 ルイジアナにおけるポリオへの天然免疫の発生に関する研究 V, 母親から胎児へのポリオ抗体の受動的移行、及び乳児における抗体の自然衰弱及び消失, J. Immunol. 85:46-55 40
14. Goebel, W.F., and O.T. Avery, 1931, 接合した炭水化物 - 蛋白質に関する化学免疫学的研究 I V. タイプIII pneumococcusの可溶性特異物質のp - アミノベンジルエーテル及び、その蛋白質との結合体の合成, J. Exp. Med. 54:431-436
15. Gray, B.M. 1979, 多糖抗原についてのE L I S A方法学: プラスチック管への吸収のための多糖類の蛋白質結合, J. Immunol. Methods 28:187-192
16. Hobbs, J.R., and J.A. Davis, 1967, 胎児における血清ガンマGグロブリンレベル及び妊娠期間, Lancet 493:757-759
17. Insel, R.A., and P.W. Anderson, 1986, オリゴ多糖 - 蛋白質接合ワクチンが、ヒト乳児におけるHaemophilus Influenzae b莢膜多糖に対するオリゴクローナルIg G抗体応答を誘導し、初回免疫する, J. Exp. Med. 163:262-269
18. Jennings, H.J., and C. Lugowski, 1981, グループA, B, 及びC髄膜炎菌性多糖 50

破傷風トキソイド接合体の免疫化学、J. Immunol. 127:1011:1018

19. Jennings, H.J., C. Lugowski, and F.E. Ashton, 1984, グループ B Neisseria meningitidis に対する強力ワクチンとするための経路としての、破傷風トキソイドへの髄膜炎菌性リポ多糖 R - タイプ オリゴ糖類の接合、Infect. Immun. 43:407-412

20. Jennings, H.J., K.G. Rosell, E. Katzenellenbogen, and D.L. Kasper, 1983, タイプIIグループ B Streptococcus の莢膜多糖抗原の構造決定、J. Biol. Chem. 258:1793-1798

21. Kasper, D.L., C.J. Baker, B. Galdes, E. Katzenellenbogen, and H.J. Jennings, 1983, タイプIIグループ B 連鎖球菌莢膜多糖の免疫化学分析及び免疫原性、J. Clin. Invest. 72:260-269

10

22. Lagergard, T., J. Shiloach, J.B. Robbins, and R. Schneerson, 1990 破傷風トキソイドに共有結合的に結合したグループ B Streptococcus タイプIII 莢膜多糖からなる接合体の合成、及び免疫学的特性、Infect. Immun. 58:687-694

23. Lancefield, R.C. 1972, グループ B streptococci の細胞抗原、p. 57-65 In L.W. Wannamaker and J.M. Matson(ed.), Streptococci 及び連鎖球菌疾患、認定、理解及び管理、Academic Press, Inc. New York

24. Lancefield, R.C., M. McCarty, and W.N. Everly 1975, グループ B Streptococci に対して向けられた多重マウス防御抗体、J. Exp. Med. 142:165-179

25. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall 1951 フォリンフェノール試薬を用いた蛋白質測定、J. Biol. Chem. 193:265-275

20

26. Michon, F., E. Katzenellenbogen, and D.L. Kasper, and H.L. Jennings, 1987 グループ B Streptococcus の錯体グループ特異性多糖の構造、Biochemistry 26:476-486

27. Paoletti, L.C., D.L. Kasper, F. Michon, J. DiFabio, K. Holme, H.J. Jennings, and M.R. Wessels, 1990 タイプIIIグループ B Streptococcus に対するオリゴ多糖 - 破傷風トキソイド接合ワクチン、J. Biol. Chem. 265:18278-18283

28. Paoletti, L.C., D.L. Kasper, F. Michon, H.J. Jennings, T.D. Tosteson, and M.R. Wessels, 1992, グループ B Streptococcus タイプIIIオリゴ多糖 - 破傷風トキソイド接合体の、ウサギにおける免疫原性に関する鎖の長さの効果、J. Clin. Invest. 89:203-209

29. Schneerson, R., O. Barrera, A. Sutton, and J.B. Robbins, 1980 Haemophilus Influenzae タイプ b 多糖 - 蛋白質接合体の調製、特性及び免疫原性、J. Exp. Med. 152:361-376

30

30. Svenson, S.B. and A.A. Lindberg, 1979, 巨大分子キャリアーに対する酸不安定サルモネラ特異性オリゴ糖類の結合、J. Immunol. Methods 25:323-335

31. Walsh, J.A., and S. Hutchins, 1989, グループ B 連鎖球菌疾患：ワクチンを用いた予防についての開発世界と予想における、その重要性、Pediatr. Infect. Dis. J. 8:271-276

32. Warren, L. 1959, シアル酸のチオバルピツール酸アッセイ、J. Biol. Chem. 234::1971-1975

33. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, D.L. Kasper, J.L. DiFabio, F. Michon, K. Holme, and H.J. Jennings, 1990, タイプIIIグループ B Streptococcus に対する多糖 - 蛋白質接合ワクチンの動物における免疫原性、J. Clin. Invest. 86::1428-1433

40

34. Zigterman, J.W.J., J.E.G. van Dam, H. Snippe, F.T.M. Rottveel, M. Jansze, J.M.N. Willers, J.P. Kamerling, and J.F.G. Vliegthart, 1985, Klebsiella 血清タイプII 莢膜多糖から誘導されたオクタ多糖 - 蛋白質接合体の免疫原性特性、Infect. Immun. 47::421-428

35. Wessels, M.R., J.L.D. Fabio, V.J. Benedi, D.L. Kasper, F. Michon, J-R. Brisson, J. Jelinkova and H.J. Jennings, 1991 タイプVグループ B Streptococcus 莢膜多糖の構造決定及び免疫化学特性、Journal of Biological Chemistry 266:8714-8719

我々は、これまで、本発明の多くの具体例を述べてきたが、基本構想は、本発明の方法を

50

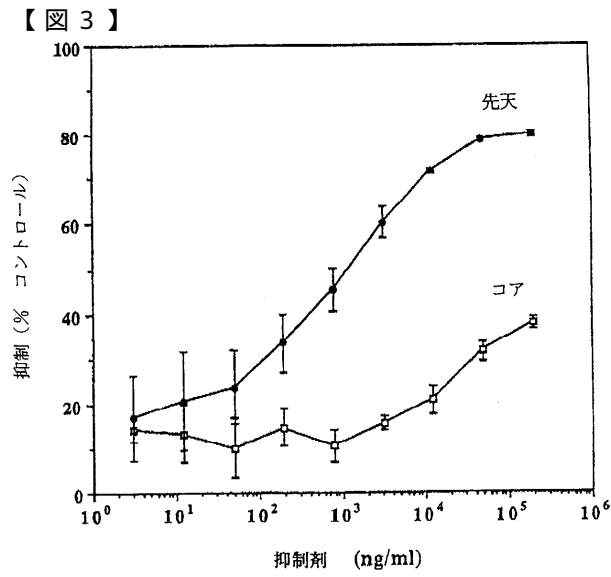


FIG. 3

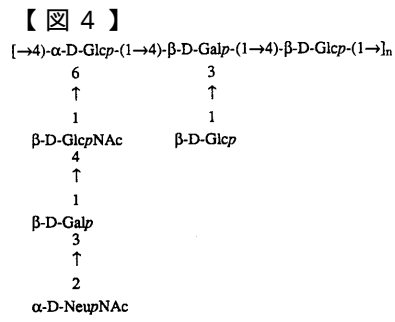


FIG. 4

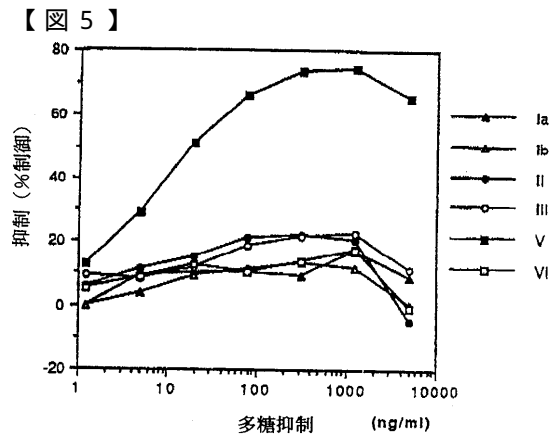


FIG. 5

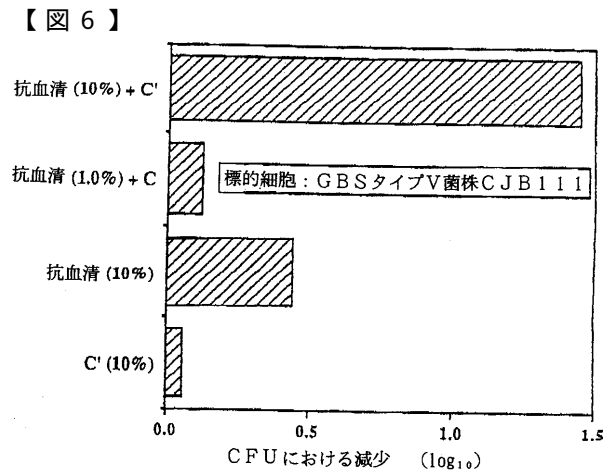


FIG. 6

フロントページの続き

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(72)発明者 ジェニングズ, ハロルド, ジェイ.

カナダ国、オンタリオ ケー1ジェイ 6ジー6、グロスター、クレセント、ウッドグレン 20
49

(72)発明者 カスパー, デニス, エル.

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02159、ニュートンセンター、ウォード ストリート
544

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 光本 美奈子

審判官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 J. Clin. Invest., vol. 86, p. 1428 - 1433 (1990)

J. Biol. Chem., vol. 266, p. 6714 - 6719 (1991)

J. Clin. Invest., Vol. 72, p. 260 - 269 (1983)

Infect. Immun., vol. 60, p. 4009 - 4014 (1992)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K39/09, A61K39/116, C12P21/00, C07K14/195