

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3927233号

(P3927233)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月9日(2007.3.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C O 7 K 14/315 (2006.01)	C O 7 K 14/315

請求項の数 9 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願平8-508142	(73) 特許権者	ワイス・ホールディングズ・コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成7年8月10日(1995.8.10)		アメリカ合衆国ニュージャージー州07940マディソン・ファイブジラルダファームス(番地なし)
(65) 公表番号	特表平10-504717	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉
(43) 公表日	平成10年5月12日(1998.5.12)	(72) 発明者	クオ, ジョセフ・エスーシー
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/010227		アメリカ合衆国ニューヨーク州10983
(87) 国際公開番号	W01996/005859		タツパン・コンステイチューションドライブ67
(87) 国際公開日	平成8年2月29日(1996.2.29)		
審査請求日	平成14年7月11日(2002.7.11)		
(31) 優先権主張番号	08/295,305		
(32) 優先日	平成6年8月24日(1994.8.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
微生物の受託番号	ATCC 69654		
微生物の受託番号	ATCC 69655		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺炎双球菌感染症に対する免疫化のための肺炎双球菌多糖-組み換えニューモリシン結合体ワクチン類

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) ストレプトコッカル ニューモニエ(*Streptococcal pneumoniae*; *S. pneumoniae*)の莢膜多糖由来の酸化された多糖と、(b) 組み換え的に発現されるストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)のニューモリシタンパク質であって、前記酸化された多糖との結合に先立ちトキシド化されておらず、もしくは部位特異的突然変異誘発により産生されていないニューモリシタンパク質とを含んで成る、多糖とタンパク質の免疫原性結合体。

【請求項2】

ストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖がタイプ14もしくはタイプ18C由来である請求項1記載の結合体。

【請求項3】

組み換え的に発現されるニューモリシンが大腸菌(*E. coli*)において発現される請求項1記載の結合体。

【請求項4】

組み換え的に発現されるニューモリシンが、大腸菌のSCS1株であって、pGEX-PL18Cと命名されるプラスミド(ATCC 69654)およびpGEX-PL18C/20と命名されるプラスミド(ATCC 69655)よりなる群から選択されるプラスミドを宿主SCS1株において発現される請求項3記載の結合体。

【請求項5】

組み換え的に発現されるニューモリシンが、ストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖由来の酸化された多糖との結合に先立ち、まずあるスパーサーに連結されている請求項1記載の結合体。

【請求項6】

スパーサーがアジピン酸ジヒドラジド(ADH)および6-アミノヘキサン酸よりなる群から選択される、請求項5記載の結合体。

【請求項7】

請求項1記載の免疫原性結合体を含むワクチン。

【請求項8】

免疫学的に許容され得る希釈剤、担体もしくは補助剤の一種以上をさらに含む請求項7記載のワクチン。 10

【請求項9】

ストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の多糖とストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)のニューモリシタンパク質の免疫原性結合体の少なくとも2種の混合物を含むワクチンであって、当該各多糖が異なるタイプのストレプトコッカル ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖由来の酸化された多糖であることを特徴とするワクチン。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

この発明は、ストレプトコッカル ニューモニエ(*Streptococcal pneumoniae*)の莢膜多糖由来のある酸化された多糖および組み換え的に発現されるS. ニューモニエ(*S. pneumoniae*)のニューモリシタンパク質を含む、免疫原性の多糖-タンパク質の結合体に関する。ここで、前述のニューモリシンは、前述の酸化された多糖との結合に先立ちトキシド化されず、もしくは部位特異的突然変異誘発により産生されていない。 20

発明の背景

ストレプトコッカル ニューモニエ(*Streptococcal pneumoniae*; *S. pneumoniae*)は細菌性肺炎の最も普遍的な病因であり、かつまた細菌性の中耳炎(中耳の感染症)、髄膜炎および菌血症の主要原因のひとつでもある。少なくとも83タイプの肺炎双球菌生物体があり、それぞれが莢膜多糖の異なる化学構造をもつ。莢膜多糖は肺炎双球菌の重要な毒性因子であり、また成人において抗体応答を誘導する。現在、23価の多糖ワクチン(ニューイミューン〔PnuImune〕(商標)など、アメリカン シアナミド カンパニー(American Cyanamid Company)、ウェイ(Wayne)、ニュージャージー州(NJ))が、成人および2歳以上の小児に対して利用し得る。この精製された肺炎双球菌多糖ワクチンの調製法は、米国特許第4,242,501号、同4,221,906号および同4,686,102号(引用文献番号1、2、3)に開示される。しかしながら、2歳未満の幼児はこのタイプのワクチンに対する良好な免疫応答を誘導しない。 30

免疫学的特徴を修飾しかつ2歳未満の幼児において当該多糖の免疫原性を強化するために、当該多糖は、多糖-タンパク質に結合体を形成するためにあるタンパク質担体に共有結合的に結合されている。この多糖-タンパク質結合体ワクチンの調製法は米国特許第6,473,574号(4)に開示される。当該特許は、還元性基(一種もしくは複数)含有するS. ニューモニエ(*S. pneumoniae*)もしくはヘモフィラス インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)タイプbの莢膜ポリマー由来のある多糖断片およびタンパク質担体としてのある細菌性毒素もしくはトキシド、とりわけ非毒性のジフテリアトキシン(CRM₁₉₇など)を含む免疫原性結合体類の調製に関する。 40

ある多糖の免疫原性を強化するための一つの試みが報告されており、そこでは部位特異的突然変異誘発がS. ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の毒性タンパク質、ニューモリシンの非毒性トキシド類を創製するために使用された。得られる変異ニューモリシントキシド類は、リンカーもしくはスパーサー、6-アミノヘキサン酸の使用によりタイプ19F肺炎双球菌莢膜多糖に結合された。当該結合体は、結合されない多糖の免疫原性に比較してタイプ19F多糖部分の免疫原性を強化した(5、6)。ある追跡調査は、トキシド 50

化されない天然のニューモリシンはその毒性のためにワクチン中へ含めるのに適さないことを指摘した(7)。

しかしながら、これらおよび他の試みにもかかわらず、2歳未満の幼児のためのS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)に対する効率的なワクチンはない。したがって、かかるワクチンに対するニーズがある。

発明の要約

S・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖由来のある酸化された多糖、およびタンパク質担体すなわち組み換え的に発現されるS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)のニューモリシンタンパク質を含む、免疫原性の多糖-タンパク質結合体類を提供することがこの発明のひとつの目的である。ここで、前述のニューモリシンは、前述の酸化された多糖との結合に先立ちトキシド化されず、もしくは部位特異的突然変異誘発により産生されない。当該ニューモリシンはトキシド化されないが、それにもかかわらず得られる結合体は大きく低減された毒性を有する。

10

この発明のひとつの態様においては、その酸化された多糖はニューモリシンタンパク質に直接結合される。この発明の他の態様においては、当該ニューモリシンタンパク質はまずあるスペーサーに連結され、そしてその後この酸化された多糖に結合される。

これらの結合体類をワクチンとして使用することがこの発明のさらなる目的である。これらのワクチンは温血動物においてS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖に対する抗体応答を導き出すのに有用である。

これらのワクチンを筋肉内もしくは皮下注入により免疫原性の量において投与することにより、温血動物においてS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)が原因の疾患に対して免疫化するためにこれらのワクチンを使用することが、この発明のさらにもうひとつの目的である。

20

この発明の付加的な態様においては、当該ワクチンは異なるタイプのS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)の莢膜多糖由来の酸化された多糖との免疫原性結合体に最低2個の混合物を含む。

この発明のさらなる局面においては、S・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)のタイプ18C多糖は、組み換えニューモリシン(「rPL」)との結合がうまく実施されることができるようにするために、酸化に先立ち弱酸で処理され、当該多糖が部分的に解重合される。この発明の結合体ワクチン類は温血動物において高度に免疫原性である。当該ワクチン類は、当該多糖および当該タンパク質すなわち組み換えニューモリシンの双方に対する抗体を導き出す。

30

この発明の結合体類は先に記述されたそれらに優る特徴的な利点を有する。当該結合体類においてはタンパク質担体はニューモリシン由来であり、ニューモリシンは肺炎双球菌感染症における1種の毒性因子であると報告されている(8)。この発明の結合体ワクチン類は、当該多糖および当該ニューモリシンの双方(これらの双方とも毒性因子である)に対する抗体を導き出し、そしてS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)により引き起こされる疾患に対する免疫を賦与する。当該結合体類は、先に記述されたあるスペーサーもしくはあるリンカー(5、6)が使用されることができるとはいえ、こうしたスペーサー類に対する要求なしに当該毒素の溶血性および細胞毒性の活性を中和することができる、ニューモリシンに対する抗体を誘導する。当該組み換えニューモリシンは非毒性にされているがその立体配座を保持する。

40

当該ワクチン類が2歳未満の幼児において免疫を賦与することを許容するのに加え、当該担体タンパク質、rPLはそれ自身免疫を賦与することができ、かつ、単に酸化された多糖のための担体として作用しない。最後に、当該結合体ワクチン類は完全なS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)生物体の使用を包含しないため、当該ワクチン類の投与はS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)が原因の疾患を誘発しない。

【図面の簡単な説明】

第1図はS・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)タイプ18Cおよび20からのニューモリシン遺伝子(ply)を包含するクローン類の物理的地図を図示する。制限酵素切断部位は

50

以下のように略記される。すなわち、B s = BstYI、S l = Sall、H d = HindIII、E V = EcoRV。

第2図は p G E X - P L 1 8 C - 3 1 を創製するための、発現ベクター p G E X - 2 T 中への S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) タイプ 1 8 C からの p l y 遺伝子のサブクローニングのための計画を図示する。制限酵素切断部位は以下のように略記される。すなわち、E I = EcoRI、B s = BstYI、H d = HindIII、E V = EcoRV、B H = BamHI。

第3図は組み換え的に発現される r P L を精製するために使用される方法を図示する。

第4A図は精製の各段階における r P L 調製物の S D S - P A G E (クマシーブルーで染色された 8 ~ 16% のアクリルアミド) を図示する。レーンは以下のものである。すなわち、1 . I P T G 誘導前の E . コリ (*E. coli*) 細胞、2 . I P T G 誘導 45 分後の E . コリ (*E. coli*) 細胞、3 . I P T G 誘導 2 時間後の E . コリ (*E. coli*) 細胞、4 . 誘導された E . コリ (*E. coli*) 細胞ライセート全体、5 . アフィニティーゲルカラム (G S T - r P L がカラムに結合する) により結合されない E . コリ (*E. coli*) タンパク質類、6 . 溶出後の精製された融合タンパク質 G S T - r P L、7 . 融合タンパク質のトロンピン切断後の G S T および r P L の混合物、8 . 精製された r P L (G S T およびトロンピンを含まない)、9 . 以下のような分子量マーカー類 (それぞれ kD で表す) : 97.4 - ホスホリラーゼ B、66 - ウシ血清アルブミン、45 - 卵白アルブミン、31 - 炭酸デヒドラーゼ、21.5 - トリプシンインヒビター、14.5 - リゾチーム。

第4B図は精製の各段階における r P L 調製物のイムノプロットを図示する。天然のニューモリシンに対するウサギ抗血清がイムノプロットにおいて使用される。レーン 1 ~ 8 は第4A図のレーン 1 ~ 8 に対応する。

発明の詳細な記述

長さが 471 残基でスルフヒドリル基が活性化された溶血性毒素ニューモリシンは、S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) のあらゆるタイプにより産生され、かつ、肺炎双球菌感染症における推定の毒性因子と考えられる。この毒素はおよそ 53,000 ダルトン (53kD) の分子量を有する。不活性化されたニューモリシンを注入されたマウスおよびラットは、S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 生菌で攻撃される場合に強化された生存を表す (9、10)。従って、ニューモリシンは潜在的なワクチン候補のひとつであり、また、この発明において示されるように、ある結合体ワクチンの調製のための有用なタンパク質担体のひとつである。天然のニューモリシンは S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) において低濃度で産生されるため、r P L を過発現する組み換え E . コリ (*E. coli*) の構築が企てられる。ニューモリシン遺伝子は、すでに S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) タイプ 1 (1 1)、2 (1 2) および 1 9 F (1 3) からクローニングされ、配列が決定され、そして E . コリ (*E. coli*) においてならびにパチルス スプチリス (*Bacillus subtilis*) (1 3 A) において発現されている。ニューモリシンは S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 細菌により分泌されないが、見たところシグナル配列の欠如のためであるらしい (1 2)。

この発明の局面のうち、以下に例示されるのは、S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) からのニューモリシン遺伝子のクローニングおよびグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) 遺伝子融合システムを使用する融合タンパク質としての E . コリ (*E. coli*) におけるニューモリシンの数倍の過発現、ならびに、グルタチオン - アガロースカラムでのアフィニティークロマトグラフィー、および部位特異的タンパク質分解酵素トロンピンを使用することによる G S T - r P L を含有する当該融合タンパク質における G S T の切断、を使用する 53 キロダルトン (kD) の r P L の精製、を包含する工程である。当該 r P L のアミノ酸組成、末端アミノ酸配列および免疫学的反応性が決定される。この様式において得られる r P L は、融合タンパク質の G S T が切断分離された後に r P L のアミノ末端に 2 個の付加的なアミノ酸が存在することを除いては、天然のタンパク質と同様である。

以下の実施例 1 において詳述されるように、タイプ 1 8 C からのニューモリシン遺伝子もしくはタイプ 1 8 C およびタイプ 2 0 からの当該遺伝子の一部の融合からの 1 個のハイブリッドニューモリシン遺伝子を含有する発現ベクター類が調製され、そして E . コリ (*E. coli*) 宿主内に挿入される。他のタイプの S . ニューモニエ (*S. pneumoniae*) もまたニュー

10

20

30

40

50

モリシン遺伝子の適切な供給源である。他の従来からの宿主細胞が当該 r P L の発現に適する。

組み換えプラスミド p G E X - P L 1 8 C を有する E . コリ (E. coli) 株 S C S 1 の試料は、出願人によりアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection)、12301 パークローン ドライヴ (Parklawn Drive)、ロックヴィル (Rockville)、メリーランド (Maryland) 20852、U S A に寄託され、そして A T C C 受託番号 6 9 6 5 4 を指定されている。

組み換えプラスミド p G E X - P L 1 8 C / 2 0 を有する E . コリ (E. coli) 株 S C S 1 の試料は、出願人によりアメリカン タイプ カルチャー コレクション、12301 パークローン ドライヴ、ロックヴィル、メリーランド 20852、U S A に寄託され、そして A T C C 受託番号 6 9 6 5 5 を指定されている。

A T C C に寄託された材料はまた、従来からの遺伝子工学技術とともに天然のニューモリシタンパク質を創製するために使用されることもできる。天然のニューモリシタンパク質は、トロンピン切断後に N 末端に残存する付加的なグリシンおよびセリン残基を欠く。

この発明において使用される様々な肺炎双球菌のタイプの莢膜多糖類は、共通に譲渡された米国特許第 4,242,501 号および 4,686,102 号 (1、3) において記述されており、これらは引用することにより組み込まれる。このように得られる精製された肺炎双球菌多糖類は相対的に大きな分子サイズを有し、50% 以上がセファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B (ファルマシア L K B バイオテクノロジー (PharmaciaLKB Biotechnology) 、ピスカタウェイ (Piscataway)、ニュージャージー州 (NJ)) のカラム上で 0.3 未満の溶出係数 (K_{av}) 値をもつ。この値は 6×10^5 ダルトンより大きな分子量に対応する。

その天然の形態においては、肺炎双球菌生物体からの多糖類は反応性の還元性基を含有しない。還元性基を含有するそれぞれの反応性の多糖を創出するために、当該多糖は調節された量の過ヨウ素酸ナトリウムで部分的に加水分解され、過ヨウ素酸塩で酸化することによる当該多糖の cis-βシナルのヒドロキシル基の切断により還元性基が生成し、パルク (Parihk) ら (1 4) の工程に従いアルデヒド官能基が創製される。精製された肺炎双球菌多糖類は、4 もしくは室温にて、様々な時間、暗黒下に 0.2 ~ 50mM の過ヨウ素酸ナトリウムで処理される。好ましい態様においては、当該多糖は pH4.0 ~ 5.0 で処理される。過ヨウ素酸ナトリウムの使用が好ましい。

この発明のもうひとつの局面は、過ヨウ素酸塩を使用する弱酸のもしくは酸化的な切断により酸化されたタイプ 6 B、1 4 および 1 8 C のような肺炎双球菌多糖 ([O] 6 B、[O] 1 4 および [O] 1 8 C) の反応性の基を創出する、当該多糖類の調製のための工程である。

酸化の後、この酸化された多糖 (「 [O] P S 」) を、それから発熱物質を含まない水に対して広範囲に (extensively) 透析し、低分子サイズの素材を除去する。あるいは、セファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B のようなゲル濾過カラムが当該 [O] P S の精製のために使用されることが可能である。ゲル濾過カラムが使用される場合は、そのフラクションを、精製された対応する多糖を標準品として使用するフェノール硫酸比色法 (1 5) により [O] P S の存在についてアッセイする。精製された生成物はその後、濃縮および凍結乾燥することにより回収される。得られる [O] P S は約 15 ~ 800 モノマー単位の鎖長を有する。

ある新規の方法がタイプ 1 8 C において反応性の基を創出するために使用される。すなわち、当該多糖を部分的に解重合し、中間の大きさの分子を産生するよう切断し、そしてその後酸化する。

この酸化が部分的解重合の非存在下に実施される場合は使用できないゲル様素材が得られる。この問題を克服するため、当該タイプ 1 8 C 多糖をまず、酢酸処理のような弱酸により部分的に解重合し、多糖をおよそ 10,000 ~ 600,000 の分子サイズ (セファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B カラム上で 0.3 ~ 0.7 の K_{av}) に縮小する。その後のみ、当該タイプ 1 8 C 多糖は上述されるような過ヨウ素酸酸化を受け、機能を有する還元性基を創

10

20

30

40

50

出する。以下に記述されるように r P L に結合される場合、当該生成物はワクチンの使用に適する形態にある。

当該 [O] P S は直接的もしくは間接的のいずれかの結合を使用してタンパク質担体としての r P L に結合される。直接的結合のためには、当該 [O] P S は、従来的手段による還元的アミノ化のためにシアノトリヒドロホウ酸塩を使用して当該 r P L に結合される。当該 [O] P S 中の機能を有するアルデヒド基類は r P L と反応される。この r P L はシッフ塩基を形成するアミノ基類（とりわけリジン基）を含有する。あるシアノトリヒドロホウ酸塩のような穏やかな選択的還元剤の存在下においては、安定な、共有結合的に結合される結合体が形成される。当該反応は好ましくは pH5 ないし 9 で実施される。ヒドロホウ酸塩を使用するタンパク質への [O] P S の結合についての方法論はパリクラ（14）およびシュヴァルツ (Schwarz) とグレイ (Gray)（16）により記述されている。

肺炎双球菌タイプ 6 B、14 もしくは 18 C の [O] P S（濃度 1 ~ 10mg/ml）を、室温もしくは 37 °C にて、0.2M リン酸カリウム緩衝液もしくはリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0 ~ 8.0）中の r P L（濃度 1 ~ 10mg/ml）と混合する。

穏やかに混合しながらの 30 分のインキュベーションの後、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム 0.1 ~ 2.0mM を添加する。この混合物を 25 ~ 37 °C にて穏やかに混合しながら 1 ~ 8 日間インキュベートし、[O] P S - r P L 結合体を形成する。当該結合体をセファロース (Sepharese)（商標）CL - 4 B のようなゲル濾過カラム上で精製する。フラクションを、ウシ血清アルブミンを標準品として使用するバイオラド (Bio-Rad) タンパク質アッセイ試薬でのブラッドフォード (Bradford) 法（17）によりタンパク質についてアッセイし、かつ、先に記述されたように [O] P S についてアッセイする（15）。当該結合体を含有するフラクションを合わせ、透析しそして透析濾過および/もしくは凍結乾燥する。あるいは、当該 r P L を、当該 [O] P S との結合に先立ちまずあるスペーサーに連結する。こうしたスペーサーの例はアジピン酸ジヒドラジド (ADH) および 6 - アミノヘキサ酸である。ADH は好ましいスペーサーである。

この発明に従い処理された結合体類は、S . ニューモニエ (S. pneumoniae) が引き起こす疾患に対する温血動物の保護を賦与するワクチン類の調製において好ましく使用される。当該 r P L の溶血活性（毒性）は、それが [O] P S に結合される場合（単独でもしくはスペーサーとともに）には、単独で投与されるニューモリシンに比較して大きく低減される。

当該結合体類は、従来からの様式で免疫学的に許容しうる希釈剤もしくは担体に添加され、注入可能な液体の溶液もしくは懸濁液を調製することができる。加えて、当該結合体類は、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム (alum)、もしくは、QS - 21（18）、モノホスホルリピド A および 3 - O - デアクリルモノホスホルリピド A（3 DMPL）のような製薬学的に許容しうる他の補助剤に結合されることができる。

例えば、[O] P S および r P L を含有するある結合体ワクチン、もしくは、それぞれが r P L および異なるタイプの 1 個の [O] P S を含有するいくつかの結合体の混合物を含有するあるワクチンを調製するためには、当該結合体調製物（一種もしくは複数）が、1 ml あたりの多糖が 1 ~ 100 μg の濃度でリン酸ナトリウムで緩衝化された生理的食塩水（「PBS」）（pH7.0 ~ 8.0）に懸濁される。

この発明の結合体ワクチン類は、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注入のような従来からの様式における温血動物体内への注入により投与され、病原体 S . ニューモニエ (S. pneumoniae) により引き起こされる全身性感染症に対する保護のための活性の免疫応答を誘導する。投与されるべき投与量は当業者に既知の手段により決定される。保護はワクチンの一回用量により賦与されることができ、もしくは数回の追加抗原刺激用量の投与を必要とすることがある。

r P L はそれ自身保護的ではないとはいえ、r P L を単独で投与される (receiving) マウスは [O] 18 C 多糖を単独で投与されるマウスより長期間生存することは注目すべきである。かように、当該結合体の保護効果は、[O] P S のための担体として作用する r P L および r P L それ自身の機能としての r P L の双方のためであるようにみえる。

10

20

30

40

50

この発明がよりよく理解されるために以下の実施例が述べられる。当該実施例は具体的な説明の目的のためのみであり、かつ、本発明の範囲を制限するように解釈されるものではない。

実施例

実施例 1

r P L 遺伝子のクローニングおよび発現

1 個のタイプ 1 8 C / 2 0 r P L ハイブリッド遺伝子を含む発現ベクターの構築ある融合 p l y 遺伝子がタイプ 1 8 C および 2 0 から構築され、適切な発現ベクター中にサブクローニングされ、そしてハイブリッド r P L が発現される。当該遺伝子の 3 ' 末端はタイプ 2 0 から得られ、一方、当該遺伝子の 5 ' 末端はタイプ 1 8 C から得られる。

タイプ 2 0 の p l y 遺伝子のクローニングのための適切な制限酵素切断部位を決定するために、3 ' 末端をラベルしたオリゴヌクレオチドプローブ (P L 2 0 と命名される) を使用するサザンブロット法を実施する。このプローブは、スルフヒドリル基が活性化されたヘモリシン類中の高度に保存された領域 (第 1484 - 1503 ヌクレオチド ; 1 2) とハイブリッド形成する。当該プローブはピオチンもしくはジゴキシゲニンのいずれかでラベルされる。1.3kb の S a l I - E c o R V 断片が、当該遺伝子の 5 ' 末端を除いて p l y 遺伝子の大部分を含むと同定される。この 1.3kb の断片を、p B R 3 2 2 (ベーリンガー マンハイム カンパニー (Boehringer Mannheim Co.)、インジアナポリス (Indianapolis)、インジアナ州 (IN)) 中の S a l I および E c o R V 切断部位に挿入する。E . コリ (E. coli) 株 S C S 1 (ストラタジーン (Stratagene)、ラホヤ (La Jolla)、カリフォルニア州 (CA)) のコンピテント細胞を宿主として使用する。アンピシリン耐性かつテトラサイクリン感受性の形質転換細胞を P L 2 0 プローブを使用するコロニーハイブリッド形成法によりスクリーニングする。p S E 2 - 2、3 および 2 8 と命名される 3 個の同一の組み換え体が単離される (第 1 図)

p S E 2 の S a l I - E c o R V 断片を取り出し、そして p U C 1 9 (ニューイングランド バイオラブス (New England Biolabs)、ビバリー (Beverly)、マサチューセッツ州 (MA)) の S a l I および S m a I 切断部位に挿入する。アンピシリン耐性でラクトース陰性 (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (「 I P T G 」)) により誘導される場合に X - g a l (5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド) を含有するプレート上で無色のコロニー) の形質転換細胞を制限酵素分析によりスクリーニングする。陽性の組み換え体のひとつが p S E 3 - 5 と命名される。

タイプ 2 0 からの p l y 遺伝子の 5 ' 末端のクローニングに適した制限酵素切断部位がないため、サザンブロット法をタイプ 1 8 C からのゲノム D N A で実行する。混合プライマーラベル法によりラベルされる p S E 2 - 2 からの 1.3kb の S a l I - E c o R V 断片をプローブとして使用する。2.8kb の B s t Y I 断片が 5 ' および 3 ' のフランキング領域と一緒に完全な p l y 遺伝子を含むと同定される。この B s t Y I 断片を H i n d I I I で切断し、そしてプロモーター選択ベクター、p K K 2 3 2 - 8 (1 9 ; ファルマシア) の B a m H I および H i n d I I I 切断部位に挿入する。E . コリ (E. coli) 株 S C S 1 を宿主として使用する。

p l y 遺伝子のプロモーターを含有する形質転換細胞を選択するために、アンピシリン耐性 (100 μ g / m l) かつクロラムフェニコール耐性 (5 μ g / m l) の形質転換細胞を制限酵素分析およびサザンブロット法によりスクリーニングする。p B H 1 - 3 2、3 5、3 6、3 7、3 8 および 3 9 と命名される 6 個の同一の組み換え体が、タイプ 1 8 C からの p l y 遺伝子の 5 ' 上流の非翻訳領域および 5 ' 領域にわたる 1 kb の B s t Y I - H i n d I I I 断片を含有することが見出される (第 1 図) 。

その後、機能を有する組み換えタンパク質を産生するために、上述されるタイプ 1 8 C および 2 0 からクローニングされた肺炎双球菌の D N A 断片を融合し、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ融合タンパク質システム (2 0) を使用してプラスミド p G E X - 2 T (ファルマシア) 中にハイブリッド p l y 遺伝子を構築する。

ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を当該遺伝子の 5 ' 末端のサブクローニングを容易にするために実行する。2 種のプライマーが合成される。すなわち、クローニングを容易にす

10

20

30

40

50

るよう開始コドンのすぐ上流に導入されたBamHI切断部位をもつコード配列のはじめのセンスプライマー（第208-231ヌクレオチド；12）、および当該遺伝子中の唯一のEcoRI切断部位を包含する領域とハイブリッド形成するアンチセンスプライマー（第709-733ヌクレオチド；12）である。pBH1-37（タイプ18C）からの0.7kbのBstYI-EcoRI断片がベント〔Vent〕^{T M} DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラプス、ピバリー、マサチューセッツ州）により増幅されるべき鋳型としてはたらき、それにより0.5kbの断片を創製する。

PCR実験は以下のように実行される。すなわち、ベント〔Vent〕（商標）DNAポリメラーゼの添加に先立ちDNAを95にて5分間変性し、そして30サイクルの変性（95にて30秒間）、アニーリング（50にて30秒間）および複製（72にて1.5分間）を実施する。

10

増幅されたDNA断片をBamHIおよびEcoRIで切断し、そしてその後pGEX-2T中のBamHIおよびEcoRI切断部位に挿入する。ランダムに拾い上げたアンピシリン耐性の形質転換細胞を制限酵素分析により望まれる挿入物の存在について試験する。pBE0.514と命名される1個の組み換え体が陽性と同定される（第2図）。次に、pSE3-5（タイプ20）からの1.0kbのEcoRI（当該遺伝子内の唯一の切断部位）-EcoRI（pUC19ベクター（ニューイングランドバイオラプス）由来）断片を、pBE0.514中の増幅されたDNAの下流に挿入する。

陽性の組み換え体をウサギ赤血球オーバーレイ（overlay）法（12）により同定する。

これは以下のように遂行する。LBアガープレート上のアンピシリン耐性の形質転換細胞上に2.5%ウサギ血球（1mM IPTGおよび1mM DTTを含有するPBS中の0.7%溶融アガー中）5mlを広げ、そして37にて3時間インキュベートする。組み換えプラスミドを有するコロニーは溶血の円形の帯を示す。

20

4個の個々のコロニー（pGEX-PL18C/20-1、2、3および11）が溶血の円形の帯を示す。制限酵素分析がgst遺伝子の3'末端に融合される完全なply遺伝子の存在を確かにする。

1個のタイプ18CrPL遺伝子を含有する発現ベクターの構築

上述されるように、タイプ18Cの染色体DNAの2.8kbのBstYI断片のHindIIIでの切断は、タイプ18Cからのply遺伝子の5'上流の非翻訳領域および5'領域にわたる1kbの断片を産生する。この切断はまた、コロニーハイブリッド形成法により同定されるように、ply遺伝子の3'領域および3'非翻訳領域にわたる1.8kbの断片も産生する（第1図）。アンピシリン耐性かつクロラムフェニコール感受性の形質転換細胞のスクリーニングが、pHB2-1、26および32と命名される3個の同一の組み換え体を同定する。

30

pGEX-2Tにおけるタイプ18Cからの完全なply遺伝子の構築は3個の断片の連結を必要とする。サブクローニングにおいて用いられるべき制限酵素部位の不足のため、一連のクローニング段階が実行される。

最初に、pHB2-32をHindIIIおよびEcoRVで切断し0.7kbの断片を産生する。この断片をpUC19中に挿入し、pHV3-2、4および6と命名される3個の組み換え体を創製する。二番目に、pBH1-35をEcoRIで切断して0.5kbの断片を産生し、この断片をpUC19中に挿入してpII3-1、2、3、4および5と命名される5個の組み換え体を創製する。三番目に、pII3-1およびpHV3-2もしくは6のいずれかをHindIIIで切断する。四番目に、pII3-1からの0.3kbのHindIII断片のpHV3-2もしくは6のいずれかのHindIII切断部位へのクローニングを実施し、pHHV3-31、54および55と命名される3個の組み換え体を創製する。五番目に、pHHV3-31およびpBE0.514をEcoRIで切断する。最後、六番目に、pHHV3-31からの1.0kbのEcoRI断片をpBE0.514のEcoRI切断部位に挿入する。pGEX-PL18C-31ないし39と命名される9個の同一の組み換え体がウサギ赤血球オーバーレイ法により単離される。

40

さらに特定しては、上述されるS.ニューモニエ（S. pneumoniae）タイプ18Cからの

50

染色体DNAの2.8kbのBstYI断片をHindIIIで切断し、そして記述されるように(21) pKK232-8(19)のBamHIおよびHindIII切断部位に連結する(第2図はHindIII切断部位を指す)。E. コリ(E. coli)XL1-ブルー(Blue)(22)のコンピテント細胞(ストラタジーン クローニング システムズ(Stratagene Cloning Systems)、ラホヤ、カリフォルニア州)を形質転換し、そして、クロラムフェニコール(10 μ g/ml)の存在もしくは非存在下にアンピシリン(50 μ g/ml)を含有するルリア・ベルタニ(Luria-Bertani)(LB)アガープレート(21)上に植え付ける。アンピシリン耐性の形質転換細胞をクロラムフェニコール耐性、およびプローブすなわち0.9kbのEcoRI-EcoRV断片でのコロニーハイブリッド形成(21)によりスクリーニングする。この断片はタイプ20のply遺伝子(23)由来である。正しい断片を含有することが同定されるいくつかの組み換え体のうち、pBH1-35およびpHB2-32と命名される2個がサブクローニングのために使用されるべきものとして選択される。

10

完全なply遺伝子をその後、従来からのクローニング法(21)およびベント〔Vent〕(商標)DNAポリメラーゼ(ニュー イングランド バイオラプス、ピバリー、マサチューセッツ州)でのポリメラーゼ連鎖反応により、pGEX-2T(20;ファルマシア LKB バイオテクノロジー、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、から入手できる)中、gst遺伝子の3'末端に同じ読み枠で構築する。E. コリ(E. coli)SCS1(24)のコンピテント細胞(ストラタジーン)を使用する。アンピシリン耐性の形質転換細胞をウサギ赤血球オーバーレイ法(21)によりスクリーニングする。すなわち、組み換えプラスミドを有するコロニーは溶血の円形の帯を示す。pGEX-PL 18C-31と命名される、類似の性質の9個の単離物のうちのひとつがさらなる特徴づけのために選択される(第2図)。

20

rPLの発現、精製および特徴づけ

タイプ18C/20もしくは18Cからのply遺伝子をクローニングし、そしてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質(20)としてE. コリ(E. coli)において過発現する。得られる融合タンパク質は水性溶液に可溶であり、かつ、非変性条件下で粗細菌ライセートから精製される。これらの条件は精製後のrPLの抗原性を保存する。当該GST-rPL融合タンパク質はアフィニティークロマトグラフィーのような簡単な手段により精製されることができる。

rPLの十分量を精製するために、以下のアフィニティークロマトグラフィー処置を実施する。rPLの精製のための作業工程図を第3図に示す。アンピシリン(100 μ g/ml)を含有する50mlの1 \times ルリア培地もしくは1 \times テリフィック(Terrific)培地(25)中のpGEX-PL 18CもしくはpGEX-PL 18C/20のいずれかを含有するE. コリ(E. coli)SCS1の一夜培養系を同培地1lに添加する。組み換えE. コリ(E. coli)をその後、活発に振盪しながら、600nmでの1の吸収に到達するまで37 $^{\circ}$ Cにて増殖させる。IPTGを誘導物質として培養系に添加(1mMの濃度まで)し、そしてE. コリ(E. coli)細胞を継続して2時間増殖させる。非常に少量の当該GST-rPL融合タンパク質が誘導前に産生されるが(第4B図のレーン1を参照)、IPTGは短時間のうちに(30分ないし2時間)大量での融合タンパク質の発現を誘導する。当該融合タンパク質、GST-rPLは過発現され、かつ、クマシーブルーで染色されるSDS-PAGE上の総細菌性タンパク質の10%以上を構成する(第4図)。

30

40

細胞を4 $^{\circ}$ Cにて10,000 \times gで5もしくは10分間遠心分離し、リン酸ナトリウムで緩衝化された生理的食塩水(PBS:150mM塩化ナトリウム、16mMリン酸二水素カリウム、4mMリン酸水素二カリウム、pH7.3)で1回洗浄し、そして1/50体積量のPBSに再懸濁する。トリトンX-100を1%の最終濃度まで添加し、そして細胞を穏やかな音波処理もしくはフレンチプレス(12,000ポンド)の2回通過により溶解する。当該ライセートを4 $^{\circ}$ Cにて10,000 \times gで10分間遠心分離し、そして細胞破片をTPBS(PBS中1%トリトンX-100)で1回洗浄する。上清を合わせ、そして透明な細胞ライセート200mlをTPBSで平衡化した10もしくは50mlのグルタチオン-アガロースゲル(シグマ ケミカル カンパニー(Sigma Chemical Co.)、セントルイス(St. Louis)、ミズーリ州(MO))カ

50

ラムに負荷する (apply)。当該カラムをカラム床体積の5倍量のTPBS、カラム床体積の2倍量のPBSおよびカラム床体積の1倍量の50mMトリス塩酸、pH8.0で洗浄し、不必要な素材を除去する。当該融合タンパク質、GST-rPLを5もしくは10mMグルタチオン/50mMトリス塩酸、pH8.0で溶出する。溶血性アッセイおよびタンパク質アッセイにより示されるような溶血活性を示すフラクションを合わせる。フラクションは溶血性であることを以下のように同定する。すなわち、各フラクション1 μ lを10mM DTT/TPBS 50 μ lに添加し、そしてその後マイクロタイタープレート上で5%ウサギ赤血球25 μ lと混合し、そして室温にて15分間インキュベートする。溶血は目視により同定する。GST-rPLをその後タンパク質分解酵素トロンピンにより切断する。トロンピンはGSTとrPLの間に唯一の認識部位を有する(20)。

10

当該融合タンパク質をウシ血漿トロンピン(シグマ)(タンパク質1mgあたり5単位)と混合し、そしてその後トロンピン切断緩衝液(50mMトリス塩酸、pH8.3、150mM塩化ナトリウム、2.5mM塩化カルシウム)に対し室温にて一夜透析する(分子量カットオフ:12,000~14,000)。GST、rPLおよび若干量の未切断のGST-rPLの混合物を、アミコン(Amicon)セントリプレップ〔Centriprep〕(商標)-10(ピバリー、マサチューセッツ州)(分子量カットオフ:10,000)を使用して20 $^{\circ}$ Cにて3,000 \times gで遠心分離して濃縮し、そして緩衝液をPBSに交換し、そしてその後グルタチオン-アガロースカラム上に負荷する(apply)。GSTおよびいかなる未切断のGST-rPLも特異的に当該カラムに結合するため、rPLは自由に当該カラムを通過しそしてPBS溶出液中に収集される。rPLを含有する溶血性フラクションを合わせる。緩衝液をセントリプレップ〔Centriprep〕(商標)-10を使用して10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に交換する。トロンピンを、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化した1mlのヘパリン-セファロース〔Sephacrose〕(商標)ゲル(ファルマシア)のカラムを通過することによりrPLから除去する(26)。精製されたrPLを4 $^{\circ}$ Cにて保存する。この精製からの収量は培養液1lあたりおよそ6~10mgである。

20

精製されたrPLは、SDS-PAGE/クマシーブルー染色により示されるように、ゲル上に53,000ダルトンの分子量の単一のバンドを表す。当該ゲルのデンシトメトリーのスキャンはrPLの純度が95%より高いことを明らかにする。

上述される方法は95%より高い純度のrPLを産生するとはいえ、ヒドロキシアパタイト(HA)クロマトグラフィーの最終段階を添加することにより、より高い純度さえ得られることができる。この段階はHA-ファストフロー(Fast Flow)の1.6 \times 8.0mmのカラム(カルバイオケムコーポレーション(Calbiochem. Corp.)、ラホヤ、カリフォルニア州)を使用して実行される。当該カラムを10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で平衡化する。rPLの10ml(およそ10mg)の部分をHAカラムに添加し、そして、タンパク質を10mMないし200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)の直線濃度勾配100mlで溶出する。カラム溶出液はおよそ1.5ml/minの流速にて2.0mlのフラクションずつ収集する。フラクションは先に記述されたように(11)アッセイする。rPLを含有するフラクションを合わせ、そしてタンパク質濃度、溶血活性およびSDS-PAGEによる純度について分析する。当該rPLはおよそ85~115mMのリン酸緩衝液で単一ピークとして溶出される。溶出されたタンパク質はSDS-PAGEにより示されるようにほぼ均一であり、また、

30

40

実際には汚染するリポ多糖(エンドトキシン)を含まない。rPLの分子質量は、SDS-PAGEおよびマトリックス補助(matrix assisted)UV-レーザーディソープション/イオン化質量分析計により決定されるように、53,000ダルトンである。

精製されたrPLはウサギ赤血球に対しタンパク質1mgあたり 3×10^5 溶血単位の特異的活性を有する(27)。これは天然のPL1mgあたりおよそ 10^6 溶血単位に匹敵する(9、27)。当該特異的溶血活性はペイトン(Paton)ら(9)の方法のわずかな修飾により測定される。試料は1.7%ウサギ赤血球と混合する前に10mM DTTで活性化する。上清の吸光度は550nmで測定する。

化学ルミネセンス検出のためのルミフォス〔Lumi-Phos〕(商標)530(ペーリンガー

50

マンハイム カンパニー、インジアナポリス、インジアナ州) を使用するイムノプロットにおいて、GST-rPL融合タンパク質およびrPLの双方が天然のPLに対する抗体を含有する抗血清と反応する(第4B図)。見たところ、より分子量の大きい融合タンパク質は、rPLおよび当該抗体によりなお認識されることができる分解生成物に比較して、ナイトラン(Nytran)メンブレン(シュライヒャー アンド シュエル インク(Schleicher & Schuell Inc.)、キーン(Keene)、ニューハンプシャー州(NH))に非効率的に転写されるようである。オクタロニー免疫拡散法は、rPLが抗PL抗体および抗rPL抗体と全く同じに反応することを明らかにする。このことは、rPLが天然のPLと同じ抗原決定基を有することを示唆する。アミノ酸分析およびN末端配列の決定(40残基まで)が精製されたrPLで実行される。rPLのN末端配列は、2個の付加的残基(グリシンおよびセリン)を除いては、天然のPLのそれ、およびタイプ2のply遺伝子のヌクレオチド配列から推論される予想配列(11、12)と同一である。この付加的残基はトロンピン切断後にrPL上のN末端に残存する(20)。rPLのアミノ酸組成はタイプ2のply遺伝子のヌクレオチド配列から推論されるそれとよく一致する(12)。

10

実施例 2

S. ニューモニエ(S. pneumoniae) 莢膜多糖の調製

この発明において使用される様々な肺炎双球菌のタイプの莢膜多糖は共通に譲渡された米国特許第4,242,501号(1)および第4,686,102号(3)において記述されている。これらは引用することにより組み込まれる。こうして得られる精製された肺炎双球菌多糖類は比較的大きな分子サイズを有し、50%以上がセファロース〔Sephacrose〕(商標)CL-4B(ファルマシア LKB バイオテクノロジー、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)のカラム上で0.3未満の溶出係数(K_{av})値を有する。この値は 6×10^5 ダルトンより大きな分子量に対応する。

20

実施例 3

還元性基を含有する反応性の酸化されたタイプ14多糖の調製

肺炎双球菌タイプ14多糖の100mgの試料を0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)20mlに溶解する。過ヨウ素酸ナトリウムの4mgの部分(1mMの最終濃度まで)を暗黒下に添加し、そして当該混合物をアルミ箔で包んだふたをした三角フラスコ中で室温にて10分間穏やかに攪拌する。過剰の過ヨウ素酸ナトリウムは0.5Mエチレングリコール1mlとの室温での10分間の反応により破壊する。得られる酸化されたタイプ14(「[O]14」)多糖を含有する反応混合物を、室温にて、3,500ダルトンのカットオフのメンブレンのアミコン(ピパリー、マサチューセッツ州)濃縮器で広範囲にわたって(extensively)透析濾過し、そして濃縮する。透析濾過された[O]14多糖を凍結乾燥し、そして使用するまで-20にて保存する。

30

実施例 4

還元性基を含有する反応性の酸化されたタイプ18C多糖の調製

実施例3において記述されるタイプ14多糖を酸化するための処置を、過ヨウ素酸酸化に先立ち当該タイプ18C多糖を1M酢酸により部分的に解重合してrPLに結合される場合に当該多糖のゲル化することを防ぐことを除き、タイプ18Cについて繰り返す。タイプ18C多糖の500mgの試料を50mlの酢酸(最終のpH2.5)に懸濁し、そして60にて40時間インキュベートする。その後、2M酢酸ナトリウム6mlを添加する(最終のpH4.0)。当該混合物をアミコン攪拌セル(YM10)を使用しておよそ12mlまで濃縮する。当該濃縮物を、セファロース〔Sephacrose〕(商標)CL-4Bカラム上におきかつ10mMPBSおよび0.01%アジ化ナトリウムで溶出することによるカラムクロマトグラフィーにかける。4mlずつフラクションを収集し、そしてKdが0.3~0.7(10~60kD)のフラクションを合わせる。当該フラクションを、12~14kDの分子量カットオフで水に対して透析し、水は毎日変える。過ヨウ素酸酸化の段階をその後実行し、酸化されたタイプ18C(「[O]18C」)多糖を生成する。実施例5

40

[O]14多糖-rPL結合体の調製

実施例3において作成される[O]14多糖を6mg/mlの濃度で0.2Mリン酸カリウム緩衝

50

液 (pH8.0) に溶解する。実施例 1 に従い作成される r P L (E . コリ (E . coli) において A T C C 6 9 6 5 4 もしくは A T C C 6 9 6 5 5 のいずれかから発現される) もまた、別個の容器中において約 2 mg/ml の濃度で同緩衝液に溶解する。[O] 1 4 多糖溶液 (0.5ml) および r P L 溶液 (0.5ml) を室温にて混合する。30分後、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム (2.5mg) を添加し、そして反応混合物を室温にて 5 日間インキュベートする。当該混合物をセファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B のカラム上でクロマトグラフィーを行う。このカラムは最初に 10mM P B S (pH7.0) で平衡化される。当該結合体材料を濃度勾配なしに同緩衝液で溶出する。当該結合体を含有するピークのフラクションを多糖およびタンパク質についてアッセイする (1 5 、 1 7) 。当該結合体を含有するフラクションを合わせ、特徴づけし、そしてワクチンの調製のために使用する。当該 [O] 1 4 多糖 - r P L 結合体は、約 7 : 1 の炭水化物 / タンパク質の重量 / 重量比を有する。当該結合体ワクチン調製物は使用するまで 4 にて保存する。

10

実施例 6

スパーサーアジピン酸ジヒドラジド (A D H) を含む [O] 1 4 多糖 - r P L 結合体の調製

r P L - A D H 誘導体の調製

実施例 1 に従い作成される r P L (タイプ 1 8 C もしくはタイプ 1 8 C / 2 0 のいずれか) の 3 ml (9 mg) を 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH5.5) 中におく。緩衝液で処理した r P L を A D H (20mg) およびカルボジイミド (20mg) と混合し、そして室温にて 3 時間インキュベートする。反応混合物を、3,500ダルトンのカットオフのメンブランを用いスペクトラポール (Spectorapor) メンブランチュービング (tubing) 中で 4 にて 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に対して透析することにより、pH を 7.0 に変える。当該 r P L - A D H 誘導体を含有する透析された材料をセファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B のカラム上でのクロマトグラフィーにより特徴づけする。タンパク質の含有量をブラッドフォード法 (1 7) によりアッセイし、また、A D H を、標準品として A D H を用いる 2 , 4 , 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸の反応 (2 8) により測定する。当該 r P L - A D H 誘導体 (液体) は使用するまで 4 にて保存する。

20

[O] 1 4 多糖 - A D H - r P L 結合体の調製

実施例 3 に従い作成される [O] 1 4 多糖を 6 mg/ml の濃度で 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) に溶解し、そして当該 r P L - A D H 誘導体もまた別個の容器中において 3 mg/ml の濃度で同緩衝液に溶解する。当該 [O] 1 4 多糖の 2.5ml の試料および当該 r P L - A D H 誘導体の 2.5ml の試料を室温にて混合する。2 時間後、水中のシアノトリヒドロホウ酸ナトリウム (12.5mg) を添加し、そして反応混合物を 37 にて穏やかに混合しながら 4 日間インキュベートする。当該混合物をセファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B のカラム上でクロマトグラフィーを行う。このカラムは最初に 10mM P B S (pH7.0) で平衡化される。当該結合体材料を同緩衝液で溶出する。当該結合体を含有するピークのフラクションを上述されるように同定し、そしてその後合わせ、特徴づけし、そしてワクチンの調製に使用する。銀染色した S D S - P A G E は大きな分子量の素材が当該結合体中に存在することを示す。プール 1 と命名される合わせたフラクションの最初のグループ (セファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B から) の結合体は 0.08 ~ 0.20 の K_{av} を有する。一方、プール 2 と命名される合わせたフラクションの二番目のグループは 0.21 ~ 0.34 の K_{av} の素材を含有する。結合体プール 1 の炭水化物 : タンパク質の比率は 11 : 1 であり、結合体プール 2 の比率は 13 : 1 である。当該結合体調製物類はワクチン類の調製のために使用される。当該結合体調製物類は 4 にて保存する。

30

40

実施例 7

[O] 1 8 C 多糖 - r P L 結合体の調製

結合体の使用に適したこの多糖の中間的長さを調製するために、実施例 4 の方法の小さな修飾が使用される。タイプ 1 8 C 多糖の 500mg 分を 1 M 酢酸 (pH2.3) 50ml に溶解しそして 60 にて 40 時間インキュベートする。処理された多糖を 2 M 酢酸ナトリウムで pH4.5 に調整する。当該試料をセファロース [Sepharose] (商標) C L - 4 B のカラム上で分子量で

50

分類する。0.3ないし0.7の K_{av} で溶出する多糖（分子量15,000～600,000）を合わせる。合わせたフラクションを4にて発熱物質を含まない水に対して広範囲に（extensively）透析し、そしてその後凍結乾燥する。当該材料は[O]18C多糖の調製のための使用まで-20にて保存する。タイプ18C多糖の中間的サイズの50mg分を0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）10mlに溶解し、そして、暗黒下、室温にて10分間、過ヨウ素酸ナトリウム4mg（最終濃度2mM）で酸化する。過剰の過ヨウ素酸ナトリウムは0.5Mエチレングリコール50 μ l（最終濃度25mM）との10分間の反応により破壊する。[O]18C多糖を含有する反応混合物を広範囲に（extensively）透析し、そしてその後凍結乾燥する。当該材料を-20にて保存し、そしてrPLとの結合体の調製のために使用する。

当該[O]18C多糖を6mg/mlの濃度で0.2Mリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）に溶解する。実施例1に従い作成されるrPL（E.コリ（E. coli）においてATCC 6965 4もしくはATCC 69655のいずれかから発現される）もまた、別個の容器中において3mg/mlの濃度で同緩衝液に溶解する。[O]18C多糖溶液1mlおよび当該rPL溶液0.5mlを室温にて混合する。1時間後、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム（3mg）を添加し、そして反応混合物を37にて8日間インキュベートする。当該混合物をセファロース〔Sepharose〕（商標）CL-4Bのカラム上でクロマトグラフィーを行う。このカラムは最初に10mM PBS（pH7.0）で平衡化され、そしてその後同緩衝液で溶出される。当該結合体を含有するピークのフラクションを上述されるように同定し、合わせそして特徴づけを行う。当該[O]18C多糖-rPL結合体は、約0.76：1の炭水化物/タンパク質比を有する。銀染色したSDS-PAGEは大きな分子量の素材が存在することを示す。当該結合体はワクチンの調製のために使用するまで4にて保存する。

実施例8

スパーサーADHを含む[O]18C多糖-rPL結合体の調製 [O]18C多糖の調製
当該[O]18C多糖は実施例7に従い調製し、-20にて保存しそしてrPL-ADH誘導体との結合体の調製のために使用する。

rPL-ADH誘導体の調製

実施例1に従い作成されるrPL（タイプ18Cもしくはタイプ18C/20のいずれか）の10ml分（12mg）を0.1Mリン酸カリウム緩衝液（pH5.4）中におく。緩衝液で処理したrPLを0.3mlのADH（30mg）およびカルボジイミド0.1ml（30mg）と混合し、そして穏やかに混合しながら室温にて3時間インキュベートする。反応混合物を、3,500ダルトンのカットオフのメンブランを用いスペクトラポールメンブランチュービング中で4にて2日間0.1Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）に対して透析することにより、pHを7.0に変える。当該rPL-ADH誘導体を含有する透析された材料を、アミコン セントリプレップ〔Centriprep〕（商標）（10,000ダルトンのカットオフ）で約4mlにまで濃縮し、そしてセファロース〔Sepharose〕（商標）CL-4Bのカラム上でクロマトグラフィーを行う。タンパク質およびADHの含有量を先に記述されたようにアッセイする。当該rPL-ADH誘導体は使用するまで4にて保存する。

[O]18C多糖-ADH-rPL結合体の調製

当該[O]18C多糖を6mg/mlの濃度で0.2Mリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）に溶解し、また、rPL-ADH誘導体もまた別個の容器中において約2.7mg/mlの濃度で同緩衝液に溶解する。[O]18C多糖の2.5ml部分および当該rPL-ADH誘導体の2.5mlを室温にて混合する。2時間後、水中のシアノトリヒドロホウ酸ナトリウム（12.5mg）を添加し、そして反応混合物を37にて穏やかに混合しながら4日間インキュベートする。当該混合物を最初に10mM PBS（pH7.0）で平衡化されるセファロース〔Sepharose〕（商標）CL-4Bのカラム上でクロマトグラフィーを行う。当該結合体材料を同緩衝液で溶出する。当該結合体を含有するピークのフラクションを上述されるように同定し、合わせ、特徴づけし、そしてワクチンの調製のために使用する。銀染色したSDS-PAGEは大きな分子量の素材が結合体中に存在することを明らかにする。当該結合体におけるrPLに対する当該[O]18C多糖の比は約1.8：1である。当該結合体材料は4にて保存する。

実施例 9

当該結合体ワクチン類に対する抗体応答

上記の実施例の処置により調製される結合体類はアメリカ食品医薬品局 (21 C.F.R. § 610.11; 1993年4月1日) により要求されるマウスおよびモルモットにおける一般安全性試験に合格する。当該結合体類はその後、マウスにおいて抗体を生じるその能力について試験される。当該結合体類を、0.2mlの用量が多糖1もしくは5 µgを含有するように0.01%チメロサルを含有する無菌のPBS (pH7.0) で希釈する。当該結合ワクチン類を0.2 µのゲルマン (Gelman) フィルターでのメンブレン濾過により滅菌する。当該無菌ワクチンは使用するまで4にて保存する。

CD-1 (スイス (Swiss)) マウス (8週齢) に、補助剤としてのリン酸アルミニウム上に吸収させた (1 mg/ml) ワクチン0.2ml (1回用量当たり1 ~ 5 µg) を腹腔内に注入する。2週間の間隔で、マウスに当該ワクチンの2回の付加的注入を与える。血液試料を各注入後2週間に眼窩静脈穿刺により収集する。7匹のマウスをELISA法により当該多糖およびrPLに対する抗体価についてアッセイする。アッセイの結果は第1表 ([O] 14 / rPL結合体について) ならびに第2表および第3表 ([O] 18C / rPL結合体に対する2個の別個の実験) に示される。

第1表

マウスにおける [O] 14 / r P L 結合体ワクチンに対する抗体応答^a
 S-14 に対する抗体価^b
 r P L に対する抗体価^c

ワクチン	S-14		週		r P L		週		
	用量 (μg)	2	4	6	用量 (μg)	2	4	6	
r P L	-	<100	<100	<100	<100	5	413	21085	182621
[O] 14	5	<100	-	<100	<100	-	<50	<50	75
[O] 14-ADH	5	<100	<100	<100	<100	-	<50	<50	<50
[O] 14-r P L	1	<100	1232	2123	0.14	149	19854	41143	96794
[O] 14-r P L	5	<100	4290	8320	0.71	1097	37578	19757	18407
[O] 14-ADH-r P L (プール 1) ^d	1	4761	>24300	343150	0.09	<50	19757	127916	18407
[O] 14-ADH-r P L (プール 1)	5	3875	166466	146560	0.46	<50	7673	114360	135534
[O] 14-ADH-r P L (プール 2) ^d	1	>8100	575601	373790	0.08	<50	14958	114360	135534
[O] 14-ADH-r P L (プール 2)	5	8597	425520	301492	0.39	<50	30397	135534	135534

- ^a 5匹の Swiss マウス (CD-1) のグループが当該ワクチンで3回 (2週間隔で) 免疫化される。
^b E L I S A 法により分析された血清。抗体価はエンドポイント=0.1を表す。
^c E L I S A 法にアッセイされた。試験された個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。
^d 結合体ワクチン [O] 14 / (ADH) r P L : プール1の K d = 0.08 から 0.20。プール2の K d = 0.21 から 0.34 (セファロース™ C L - 4 B)。

第2表

マウスにおける [O] 18C / rPL 結合体ワクチンに対する抗体応答

S-18C に対する抗体価

rPL に対する抗体価

ワクチン	S-18C* 用量 (μg)		週		rPL** 用量 (μg)		週	
	2	4	2	4	2	4	2	4
rPL	-	<100	<100	<100	1	207	87997	244285
rPL	-	<100	<100	<100	5	2308	113104	409597
[O]18C	5	<100	<100	<100	-	<50	<50	<50
[O]18C-rPL	1	<100	<100	<100	1.39	366	7669	38792
[O]18C-rPL	5	~127	10417	13733	6.95	720	42072	83976
[O]18C-ADH-rPL	1	<100	407	8004	0.69	747	34462	72881
[O]18C-ADH-rPL	5	~100	~157	2372	3.45	6353	232879	215029

5匹の Swiss マウスのグループが当該ワクチンで3回(2週間隔で)免疫化される。

* ELISA法により分析された。合わされた血清。抗体価はエンドポイント=0.1を表す。

** ELISA法にアッセイされた個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。

第3表

マウスにおける [O] 18C / rPL 結合体ワクチンに対する抗体応答

S-18C に対する抗体価 rPL に対する抗体価

ワクチン	S-18C* 用量 (μg)		週		rPL** 用量 (μg)		週	
	1	5	2	4	2	6	4	6
rPL								
[O]18C	-	5	<100	<100	1	<100	725	374502
			<100	<100	-	<100	<50	142
[O]18C-rPL	1	5	<100	2432	0.68	9585	2506	146113
[O]18C-rPL	5	5	<100	240	3.4	1519	1447	85675
[O]18C-ADH-rPL	1	5	168	8236	0.49	66763	552	35478
[O]18C-ADH-rPL	5	5	<100	2166	2.43	7420	621	172614

5匹の Swiss マウスのグループが当該ワクチンで3回 (2週間隔) 免疫化される。
 * ELISA法により分析された。合わされた血清。抗体価はエンドポイント=0.1を表す。
 ** ELISA法にアッセイされた個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。

実施例 10

中和抗体に対する溶血性アッセイ

中和抗体に対する溶血性アッセイは以下のように遂行する (9、12、29)。すなわち、96穴 (U型) マイクロタイタープレート中で、rPL に対する抗体を含有する動物 (マウスもしくはウサギ) からの血清の希釈物を rPL 1 μg と混合する。37 °C にて15分間イ

ンキュベートした後、10mMジチオスレイトールを添加する。37 にて15分間インキュベートした後、ウサギ赤血球（1.7%の最終濃度）を添加し、そして同じ様式でさらに30分間インキュベートする。150×gで5分間遠心分離した後、ペレットの有無に注意する。赤血球の50%溶解を表す希釈物を視覚的に決定する。中和抗体が存在する場合はペレットが見られるが、抗体が存在しない場合には赤血球が溶解される。2回の溶血性アッセイの結果が第4表および第5表に示される。

第4表

抗rPL抗体を含有するマウス血清による溶血活性の阻害

抗血清 (免疫化された ワクチン)	[O]PS の用量 (μ g)	多糖に対する 抗体価*	rPL 用量 (μ g)	rPLに対する 抗体価**	中和活性
[O]18C	5	<100	-	<50	-
rPL	-	<100	1	244285	+ 1:16
	-	<100	5	409597	+ 1:16-32
[O]18C-rPL	1	3909	1.39	72881	+ 1:8
	5	13733	6.95	215029	+ 1:16
[O]18C-ADH-rPL	1	8004	0.69	38792	+ 1:8
	5	2372	3.45	83976	+ 1:8

* 合わされた血清。抗体価はエンドポイント=0.1を表す。
** 個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。

10

20

30

40

第5表

抗rPL抗体を含有するマウス血清による溶血活性の阻害

抗血清 (免疫化された ワクチン)	[O]PS の用量 (μ g)	多糖に対する 抗体価*	rPL 用量 (μ g)	rPLに対する 抗体価**	中和活性
[O]18C	1	<100	-	-	-
rPL	-	<100	1	140025	+ 1:32
[O]18C-rPL, Pool 1***	0.2 1.0	163775 73919	0.08 0.42	755 53781	+ 1:4 + 1:16
[O]18C-rPL, Pool 2***	0.2 1.0	60479 246599	0.05 0.25	2385 34042	+ 1:2-4 + 1:16
[O]18C-rPL	0.2 1.0	136897 133575	0.09 0.42	13100 26205	+ 1:4 + 1:8

* 合わされた血清。抗体価はエンドポイント=0.1を表す。
 ** 個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。
 *** プール1のKd=0.00から0.30、プール2のKd=0.30から0.60。

実施例 1 1

内皮細胞の細胞毒性のアッセイ

内皮細胞の細胞毒性のアッセイはルビンスら(30)の方法に従い実行する。無傷の細胞を放射性ラベルするために、細胞が集密状態に到達した後培地を除去し、PBSで2回洗浄し、トリプシン処理し、新鮮な培養培地で2回洗浄し、200 μ lのPBSおよび300 μ lの⁵¹Cr(300 μ Ci)に再懸濁し、そして37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて90分間インキュベートする。細胞を5%BSAおよび2%D-グルコースを含有するPBSで2回洗浄し、そして0.

10

20

30

40

50

5% B S A および 0.2% D - グルコースを含有する P B S に再懸濁する。細胞を 1 ml あたり 2×10^5 個に調整する。96 穴 (U 型) マイクロタイタープレート中で、r P L に対する抗体を含有する動物 (マウスもしくはウサギ) からの血清の希釈物を r P L 5 ng と混合する。37、5% C O₂ にて 15 分間インキュベートした後、10mM ジチオスレイトールを添加する。37、5% C O₂ にて 30 分間インキュベートした後、細胞 (2×10^4 個) を添加し、そして同じ様式でさらに 2 時間インキュベートする。150 × g で 3 分間遠心分離した後、上清のアリコート中の放射活性を液体シンチレーション法によりカウントし遊離された ⁵¹ C r のパーセントを測定する。残存する細胞性の ⁵¹ C r を測定するため、1 N 水酸化ナトリウムを添加し、当該溶液を混合し、そしてアリコート中の放射活性をカウントする。遊離された ⁵¹ C r のパーセントは、溶媒中の 1 分あたりの総カウントを溶媒および細胞層中の 1 分あたりの総カウントで割ったパーセントとして決定される。当該アッセイの結果は第 6 表に表される。ここでは値は 1 穴あたり 2×10^4 個の細胞の 3 穴の ⁵¹ C r 細胞培養系 (24,000cpm / 200 μl) 由来の平均値および標準偏差を指す。当該細胞は 10mM ジチオスレイトール存在下に、示されるような物質の存在または非存在下で 37 にて 2 時間インキュベートする。遊離の ⁵¹ C r のパーセント = $100 \times (2A / (A + B))$; ここで A = 上清 100 μl 中の cpm、B = 100 μl の水酸化ナトリウムが添加されるペレット 100 μl 中の cpm。

第 6 表

実験条件	⁵¹ C r 遊離パーセント	
全カウント	97 ± 2.3	20
自発的遊離	9 ± 0.6	
r P L (5 n g)	57 ± 0.6	
r P L + 抗 r P L 抗血清 (1:1000)	11 ± 1.2	
r P L + 抗 r P L 抗血清 (1:2000)	11 ± 1.0	
r P L + 抗 [O] 1 8 C 抗血清 (1:1000)	38 ± 1.2	30
r P L + 抗 [O] 1 8 C 抗血清 (1:2000)	43 ± 1.5	
r P L + 抗 [O] 1 8 C r P L 抗血清 (1:1000)	11 ± 0.0	
r P L + 抗 [O] 1 8 C r P L 抗血清 (1:2000)	11 ± 0.6	
r P L + 抗 [O] 1 8 C - A D H - r P L 抗血清 (1:1000)	11 ± 0.0	
r P L + 抗 [O] 1 8 C - A D H - r P L 抗血清 (1:2000)	11 ± 0.6	40

実施例 1 2

r P L もしくは結合されたワクチン類でワクチン接種したマウスにおける S . ニューモニエ (S. pneumoniae) 生菌での攻撃に対する保護

10 匹のグループの雌性の 8 週齢 C D - 1 マウスに 2 週間隔で様々なワクチン 0.2ml を腹腔内に注入する。これらのワクチン類は r P L、[O] 1 8 C - r P L および [O] 1 8 C - A D H - r P L を包含する。コントロールのワクチン、[O] 1 8 C はこれらのマウスにおいて抗体応答を誘導しない。各マウスに、多糖 1 μg、もしくは r P L のみを含有するワクチンの場合にはタンパク質 1 μg を含有するワクチン 1 回用量を注入する。すべてのワクチン類はまた 1 mg/ml のリン酸アルミニウムも含有する。代表するマウスからの血

清を、最初のワクチン接種に先立ち、ならびに最初のワクチン接種の2および4週間後に収集する。全マウスからの血清は最後のワクチン接種の11日後に収集する。当該血清はr P Lおよび[O] 1 8 Cに対する抗体を測定するために使用する。最後のワクチン接種の2週間後に、マウスに異なる用量のタイプ1 8 CのS . ニューモニエ (S . pneumoniae) (A T C C 6 3 1 8) を注入する。当該細菌は5 %ヒツジ血小板を含むトリプティケース [Trypticase] (商標) 大豆アガー (B B L 、 コッキースヴィル (Cockeysville) 、 メリーランド州 (MD) ; ベクトン ディッキンソン アンド カンパニー (Becton, Dickinson and Co.) の登録商標) 上で37 にて一夜培養し、その後、5 %脱線維ヒツジ血および1 %グルコースを含有するトリプティケース [Trypticase] (商標) 大豆培地 (T S B) (B B L ; ベクトン ディッキンソン アンド カンパニーの登録商標) に接種し、そして振盪せずに37 にて6時間インキュベートする。生育物をT S Bで適切に希釈する。1 mlあたりのC F U数はプレートのカウントにより測定する。復腔内に注入される細菌の用量はおよそ0、5、25、125および625× L D₅₀となるように計算する。ここでL D₅₀は1回用量あたり3 C F Uより少ないかもしくは等しい。従って、細菌の用量は1回用量あたり0、23、115、575および2875 C F Uである。動物は1日に2回チェックしそしていかなる死亡も記録する。

当該結果は第7表に示される。T S Bのみで細菌を投与されない、ネガティブコントロールとしてはたらくすべてのマウスは、14日後も健在である。抗体応答を誘導しないポジティブコントロールの[O] 1 8 Cでワクチン接種されたすべてのマウスは、S . ニューモニエ (S . pneumoniae) の4種の用量のいずれかでの攻撃後4日以内に死亡する。r P L に対しかなりの抗体応答を誘導する、r P Lワクチンを単独で投与されるマウスは、ポジティブコントロールよりもより長期間生存する。[O] 1 8 Cおよびスペーサーとともにもしくはスペーサーなしかのいずれかのr P Lを含有するこの発明の結合体ワクチン類は、細菌の攻撃前に与えられる場合には、タイプ1 8 C肺炎双球菌による致死感染症に対し、 2.9×10^3 C F U (625 × L D₅₀) の最も大きい攻撃用量であっても、マウスを保護することにおいて最も有効である。

これらの結合体ワクチン類はまた、タイプ1 8 C多糖およびr P Lの双方に対しかなりの抗体応答も導き出す (第2表および第3表を参照) 。

10

20

第7表

S. ニューモニーエ (S. pneumoniae) で攻撃されたマウスの生存に対する rPL および
結合体ワクチンでのワクチン接種の効果

死亡したマウスの数 (マウス総数=1グループ当たり10匹)
(日)

ワクチン*	生存生物体 ^b	LD ₅₀	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	最終結果
rPL (1 μg rPL/用量)	OX	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5X	(23)	0	1	4	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	-	10
	25X	(115)	0	1	4	2	1	0	0	2	-	-	-	-	-	-	10
	125X	(575)	0	4	3	0	0	1	0	2	-	-	-	-	-	-	10
	625X	(2875)	0	1	2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	1	-	10
[O]18C-rPL (1 μg [O]18C/用量)	OX	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5X	(23)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	25X	(115)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	125X	(575)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	625X	(2875)	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
[O]18C-ADH-rPL (1 μg [O]18C/用量)	OX	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5X	(23)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25X	(115)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	125X	(575)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	625X	(2875)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

第7表 (続き)

死亡したマウスの数 (マウス総数=1グループ当たり10匹)
(日)

ワクチン ^a	生存生物体 ^b		死亡したマウスの数 (マウス総数=1グループ当たり10匹)														最終結果
	LD ₅₀	(CFU/用量)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
[O]18C (1 μg [O]18C/用量)	0X	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5X	(23)	0	7	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25X	(115)	1	5	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	125X	(575)	2	2	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	625X	(2875)	0	3	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a 結合体については多糖1 μg、もしくはrPL調整物についてはrPL1 μgの用量のワクチンが3回、1、14、および28日に投与される。

^b 生きた生物体、すなわち様々な用量のタイプ18CS、ニューモニエ (S. pneumoniae) が42日目に腹腔内に接種される。

^c マウスは攻撃後14日まで観察される。

各種のアジュバンドを含む結合体ワクチン類に対する抗体応答

実施例 9 のアッセイが、アジュバンドとして (1) リン酸アルミニウム $200 \mu\text{g}$ (1 mg/ml)、(2) 3 D M P L $25 \mu\text{g}$ 、(3) 3 D M P L $100 \mu\text{g}$ 、もしくは (4) リン酸アルミニウム $200 \mu\text{g}$ と 3 D M P L $25 \mu\text{g}$ の配合剤、のいずれかを使用して繰り返された。アッセイの結果は第 8 表に示される。

第8表

マウスにおける [O] 18C / rPL 結合体ワクチンへの抗体応答に対するアジュバント AlPO₄ および 3DMPL の効果

S-18C に対する抗体価¹ rPL に対する抗体価²

ワクチン	S-18C				rPL			
	用量 (μg)	2	4	6	用量 (μg)	2	4	6
rPL +								
200 μg AlPO ₄	-	-	-	-	1	50	5393	186908
25 μg 3DMPL	-	-	-	-	1	156	164526	437388
100 μg 3DMPL	-	-	-	-	1	78	122652	1045726
200 μg AlPO ₄ +								
25 μg 3DMPL	-	-	-	-	1	154	520226	3538241
[O]18C +								
200 μg AlPO ₄	1	100	100	100	-	-	-	-
25 μg 3DMPL	1	100	238	375	-	-	-	-
100 μg 3DMPL	1	100	162	692	-	-	-	-
200 μg AlPO ₄ +								
25 μg 3DMPL	1	100	1045	4765	-	-	-	-
[O]18C-rPL +								
200 μg AlPO ₄	1	133	1212	13480	0.326	87	593	65117
25 μg 3DMPL	1	241	47466	194363	0.326	2943	38301	599062
100 μg 3DMPL	1	1751	193668	1343883	0.326	4409	64846	512936
200 μg AlPO ₄ +								
25 μg 3DMPL	1	751	235151	6800186	0.326	20690	667478	644047

第8表 (続き)

ワクチン	S-18Cに対する抗体価 ¹				rPLに対する抗体価 ²			
	用量 (μg)	2	4	6	rPL用量 (μg)	2	4	6
[O]18C-ADH-rPL +								
200 μg ALPO ₄	1	205	5476	31853	0.619	154	1979	47017
25 μg 3DMPL	1	1019	88270	206460	0.619	31339	53300	462441
100 μg 3DMPL	1	8083	132129	622186	0.619	4541	44970	467283
200 μg ALPO ₄ +								
25 μg 3DMPL	1	492	94892	1045816	0.619	5622	829785	947806

5匹のSwissマウスのグループが当該ワクチンで3回(2週間隔で)免疫化される。
¹ ELISA法により分析された個々の血清。GMTはエンドポイント=0.1を表す。
² ELISA法により分析された個々の血清。GMTはエンドポイント=0.3を表す。

引用文献

1. 米国特許第4,242,501号
2. 米国特許第4,221,906号
3. 米国特許第4,686,102号
4. 米国特許第4,673,574号

5. 国際公開第WO 90/06951号
patent application no. WO 90/06951.

6. Paton, J. C., Infect. Immun., 59,
2297-2304 (1991).

7. Lee, C.-J., et al., Vaccine, 12, 875-
878 (1994).

8. Boulnois, G. J., J. Gen. Microbiol.,
138, 249-259 (1992).

9. Paton, J. C., et al., Infect. Immun.,
40, 548-552 (1983).

10. Bailey, et al., Program Abstr. 1987
Intersci. Conf., Antimicrob. Agents Chemother., Abstr.
895 (1987).

11. Paton, J. C., et al., Infect. Immun.,
54, 50-55 (1986).

12. Walker, J. A., et al., Infect. Immun.,
55, 1184-1189 (1987).

13. Li, J.P., et al., Immunochemical
characterization of group 19 pneumolysins and
molecular cloning of 19F pneumolysin gene, Presented
at the 3rd Intl. Am. Microbiol. Conf. on Streptococcal
Genetics, A/43, Minneapolis, MN (1989).

13A. Taira, S., et al., Gene, 77, 211-218
(1989).

14. Parikh, I., et al., Methods Enzymol.,
34, 77-102 (1974).

15. DuBois, M., et al., Anal. Chem., 28,
350-356 (1956).

16. Schwartz, B. A., and Gray, G. R., Arch.

10

20

30

- Biochem. Biophys., 181, 542-549 (1977).
17. Bradford, M. M., Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976).
 18. U.S. Patent No. 5,057,540.
 19. Brosius, J., Gene, 27, 151-160 (1984).
 20. Smith, D.B., and Johnson, K.S., Gene, 67, 31-40 (1988).
 21. Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989). 10
 22. Bullock, W.O., et al., Biotechniques, 5, 376-378 (1987).
 23. Ree, H.K., et al., Cloning of the pneumolysin gene from *Streptococcus pneumoniae*; Over-expression in *Escherichia coli* as a fusion protein for simple purification, Presented at ASM 93rd General Meeting. Atlanta, GA (1993). 20
 24. Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557-580 (1983).
 25. Tartof, K.D., and Hobbs, C.A., Bethesda Res. Lab. Focus, 9, 12 (1987).
 26. Bajaj, S.P., et al., Prep. Biochem., 11, 397-412 (1981).
 27. Kanclerski, K., and Mollby, R., J. Clinical Microbiol., 25, 222-225 (1987). 30
 28. Inman, J. K., et al., Biochemistry, 8, 4074-4080 (1969).
 29. Difco Manual, Streptolysin O Reagents, p. 889 (Difco Labs).
 30. Rubins, J. B., et al., Infection and Immunity, 60, 1740-1746 (1992).

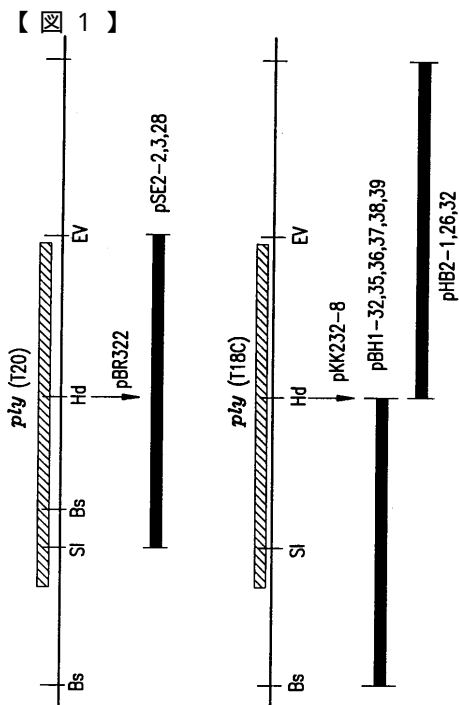


FIG.1

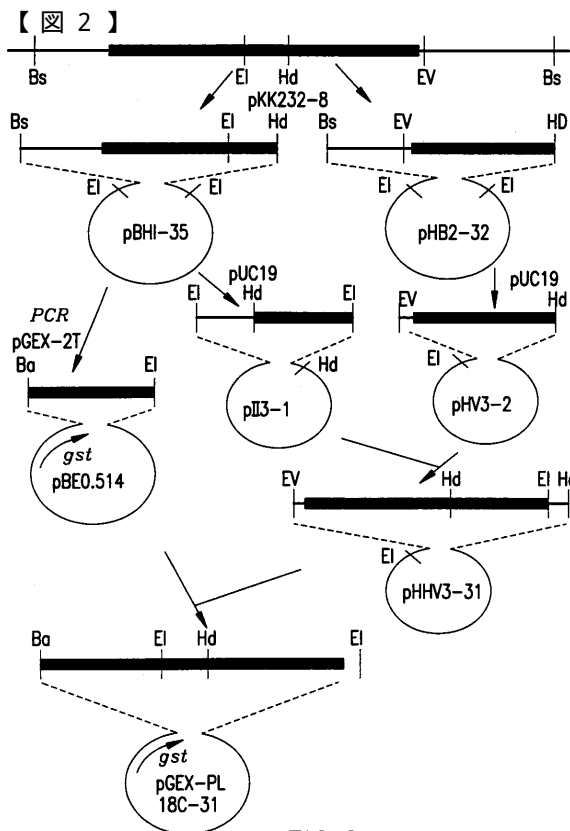


FIG.2

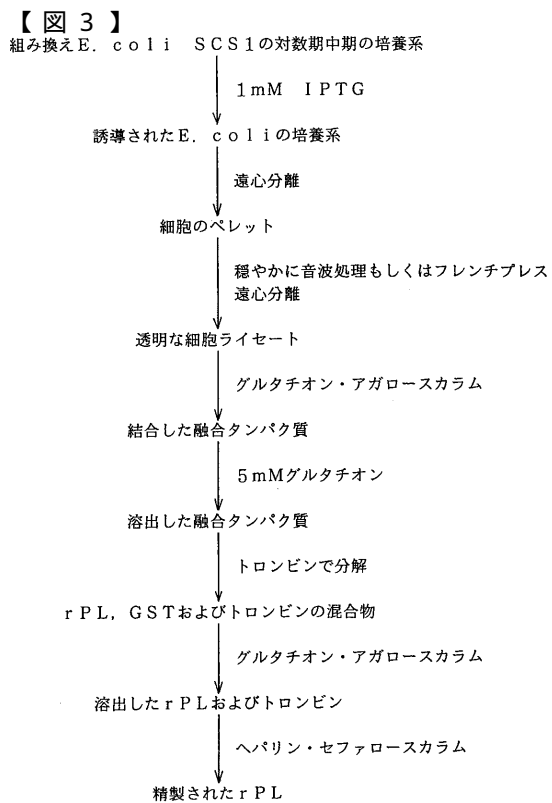


FIG. 3

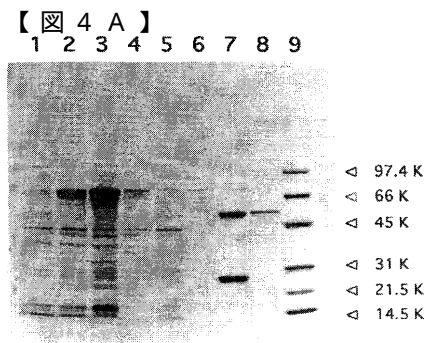


FIG.4A

【 4 B】

1 2 3 4 5 6 7 8

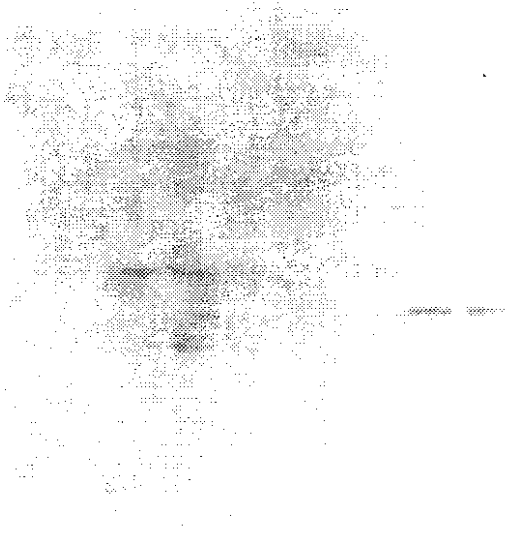


FIG.4B

フロントページの続き

(72)発明者 リー , ヘーソー・ケイ
大韓民国キョングブク790 - 390・ポハング・ジゴク - ドング 756・プロフエツサーアパ
ートメンツ9 - 1903

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 特表昭64 - 500036 (JP, A)
INFECTION AND IMMUNITY, 1991年, Vol.59, No.7, p.2297-2304
Carbohydr. Res. (1983), Vol.121, p.243-255

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 14/00 - 16/46
BIOSIS/WPI (DIALOG)
PubMed