(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3917172号
(P3917172)
(45)発行日　平成19年5月23日(2007.5.23)　(24)登録日　平成19年2月16日(2007.2.16)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/385	(2006.01)	A61K	39/385	
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	49/00	A
G01N 33/531	(2006.01)	G01N	33/531	A

請求項の数 18　(全 32 頁)

(21)出願番号	特願平5-514343
(86)(22)出願日	平成5年2月10日(1993.2.10)
(65)公表番号	特表平7-506811
(43)公表日	平成7年7月27日(1995.7.27)
(86)国際出願番号	PCT/US1993/001424
(87)国際公開番号	WO1993/015760
(87)国際公開日	平成5年8月19日(1993.8.19)
審査請求日	平成12年2月10日(2000.2.10)
審判番号	不服2004-18914(P2004-18914/J1)
審判請求日	平成16年9月13日(2004.9.13)
(31)優先権主張番号	834,067
(32)優先日	平成4年2月11日(1992.2.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ヘンリー　エム. ジャクソン　ファウンデーション　フォー　ザ　アドバンスメント　オブ　ミリタリー　メディスン
アメリカ合衆国, メリーランド　２０８５２, ロックビル, スウィート　６００, ロックビル　パイク　１４０１
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　吉田　維夫
(74)代理人
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二重担体の免疫原性構成体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

300kDaに等しいか又はそれより大きい大分子量分子から成りそしてＴ－非依存性抗原特性を有する少なくとも１種の均質な一次担体、及び該一次担体に結合したＴ－依存性抗原を含んで成る少なくとも１種の二次担体を含んで成り、前記少なくとも１種の一次担体は微生物性ポリサッカライドであり、そして該一次担体と二次担体の両者に対する抗体応答を増強する、二重担体免疫原性組成物。

【請求項２】

前記少なくとも１つの一次担体が2000kDaより大きい分子量を有する、請求項１に記載の二重担体免疫原性組成物。

【請求項３】

ハプテン、抗原及びこれらの組合せから成る群から選択された少なくとも１つの成分をさらに含んで成り、該成分は、前記の一次担体又は二次担体とは異り、該一次担体又は二次担体に直接的又は間接的に結合しており、そして該担体組成物は前記一次担体、前記二次担体及び前記成分に対する抗体応答を増強する、ことを特徴とする請求項１又は２に記載の二重担体免疫原性組成物。

【請求項４】

300kDaに等しいか又はそれより大きい大分子量分子から成りそしてＴ－非依存性抗原特性を有する少なくとも１種の均質な微生物性ポリサッカライドの一次担体；

上記の一次担体に結合したＴ－依存性抗原を含んで成る少なくとも１種の二次担体；及び

ハプテン、抗原及びこれらの組合せから成る群から選択された少なくとも１つの成分；
を含んで成る二重担体免疫原性組成物であって、前記成分は前記の一次担体又は前記の二次担体とは異り、前記の一次担体又は二次担体に直接的又は間接的に結合しており、そして該組成物は一次担体、二次担体及び前記成分に対する抗体応答を増強する、二重担体免疫原性組成物。
【請求項５】
前記少なくとも１種の一次担体がデキストランである請求項１～４のいずれか１項に記載の二重担体組成物。
【請求項６】
前記微生物性ポリサッカライドが、Ｈ．インフルエンザｂ型ポリリボシルーリビトールーホスフェートである、請求項１～４のいずれか1項に記載の二重担体免疫原性組成物。
【請求項７】
前記少なくとも１つの二次担体が蛋白質又はペプチドである、請求項１～６のいずれか１項に記載の二重担体組成物。
【請求項８】
前記蛋白質又はペプチドが、ウイルス性、細菌性、寄生体性、動物性又は真菌性蛋白質又はペプチドから成る群から選択される、請求項７に記載の二重担体組成物。
【請求項９】
前記蛋白質又はペプチドが、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日咳トキソイド、細菌外膜蛋白質、ウイルス蛋白質、及びこれらの組合せから成る群から選択される、請求項８に記載の二重担体組成物。
【請求項１０】
前記少なくとも１つの一次担体が、１又は複数の二次担体に化学的に結合している、請求項１～９のいずれか１項に記載の二重担体免疫原性組成物。
【請求項１１】
アジュバントをさらに含んで成る、請求項１～10のいずれか１項に記載の二重担体組成物。
【請求項１２】
免疫刺激量の少なくとも１種の請求項１～10のいずれか１項に記載の二重担体免疫原性組成物、及び医薬として許容される担体、を含んで成るワクチン。
【請求項１３】
静脈内、筋肉内又は皮下に投与される、請求項12に記載のワクチン。
【請求項１４】
細菌、リケッチャ、ウイルス、寄生生物、真菌類又は化学物質により惹起される疾患に対する抗体の製造方法において、
（１）請求項１～11のいずれか１項に記載の二重担体組成物を選択し；
（２）該組成物によりヒト以外の宿主を免疫して一次担体及び二次担体に対する抗体を生成せしめ；そして
（３）ドナーから前記抗体又はＢ細胞を単離する；
ことを含んで成る方法。
【請求項１５】
請求項14に記載の方法により製造される抗体を含んで成る、免疫療法組成物。
【請求項１６】
請求項14に記載の方法により製造される抗体を含んで成る診断剤。
【請求項１７】
請求項14に記載の方法により製造される抗体を含んで成る研究用試薬。
【請求項１８】
モノクローナル抗体の生成のために前記Ｂ細胞を使用する、請求項15～17のいずれか１項に記載の組成物又は試薬。
【発明の詳細な説明】

Ｉ．政府の権利

ここに記載する本発明は、その特許権使用料を払わないで政府の目的のために生産し、実施許諾され、そして使用することができる。

II．発明の分野

本発明は動物およびヒトのための活性な免疫化の有効性を増強し、そして受動的免疫予防および治療のためにおよび科学的または診断的試薬として使用すべき抗体を発生するための二重担体の免疫原性構成体に関する。

III．発明の背景

ワクチン接種の方法において、医療科学は、疾患を引き起こさないが、疾患に対して保護する抗体の形成を刺激する抗原で体を免疫化することによって、侵入性因子に対して体自身を保護する体の先天の能力を使用する。例えば、死亡した微生物を注射して細菌の疾患、例えば、腸チフスおよび百日咳に対して保護し、トキシンを注射して破傷風およびボツリスムに対して保護し、そして弱毒化した微生物を注射してウイルスの疾患、例えば、ポリオおよび麻疹に対して保護する。

しかしながら、単に外来因子を注射することによって抗体の形成を刺激することは常に可能であるというわけではない。ワクチン調製物は免疫原性でなくてはならない、すなわち、免疫応答を誘発しなくてはならない。ある種の因子、例えば、破傷風トキソイドは先天的に免疫原性であり、そして変性しないでワクチンの中に投与することができる、しかしながら、他の重要な因子は免疫原性ではなく、そして免疫応答を誘発することができる前には、免疫原性分子に変換しなくてはならない。

免疫応答は、一般に次のように記載することができる複雑な反応の系列である：

１．抗原は体の中に入り、そして抗原提示細胞に直面し、これらの抗原提示細胞は抗原をプロセシングしそしてそれらの表面上に抗原の断片を保持する；

２．抗原提示細胞上に保持された抗原断片は、Ｂ細胞を助けるＴ細胞により認識される；そして

３．Ｂ細胞は刺激されて増殖し、そして抗体形成細胞に分割し、これらの細胞は抗原に対して抗体を分泌する。

大部分の抗原Ｔ細胞からの助け借りてのみ抗体を誘発し、それゆえ、Ｔ依存性（TD）として知られている。これらの抗原、例えば、タンパク質は抗原提示細胞によりプロセシングされ、こうして前述のプロセスにおいてＴ細胞を活性化することができる。このようなＴ依存性抗原の例は破傷風トキソイドおよびジフテリアトキソイドである。

いくつかの抗原、例えば、多糖類は抗原提示細胞により適切にプロセシングされ、そしてＴ細胞により認識されない。これらの抗原は抗体形成の誘発のためにＴ細胞の助けを必要としないが、Ｂ細胞を直接活性化し、それゆえ、Ｔ独立性抗原（TI）として知られている。このようなＴ独立性抗原は、インフルエンザ菌（II．influenzae）ｂ型ポリリボシルーリチトールーホスフェートおよび肺炎球菌莢膜多糖類を包含する。

Ｔ依存性抗原はある数の方法でＴ独立性抗原から変化する。最も顕著には、抗原はアジュバント、すなわち、免疫応答を非特異的に増強する化合物についてのそれらの必要性が変化する。溶解性Ｔ依存性抗原の大部分は、それらをアジュバントとともに投与しないかぎり、わずかに低いレベルの抗体の応答を誘発する。標準のDPTワクチン（ジフテリア、百日咳、破傷風）をアジュバントの明礬とともに投与するのは、この理由のためである。TD抗原を凝集物の形態に不溶性化すると、また、アジュバントの不存在下においてさえ、それらの免疫原性は増強される。（Golub ESおよびWO Weigle，J．Immunol．102：389，1969）。対照的に、Ｔ独立性抗原は、アジュバントの不存在下に投与したとき、抗体の応答を刺激することができるが、応答は一般に大きさが小さくそして期間は短い。

Ｔ独立性抗原とＴ依存性抗原との間の４つの他の差は、次の通りである：

ａ）Ｔ依存性抗原は免疫応答をプライミングするので、同一の抗原で二次的に対抗すると、メモリーの応答を誘発することができる。メモリーまたは二次的の応答は非常に急速に刺激され、そして一次的応答において見られるものより有意に高い抗体力価を獲得する。Ｔ独立性抗原は、二次的応答のための免疫系をプライミングすることができない。

ｂ）抗原のための抗体の親和性は、Ｔ依存性抗原で免疫化に経時的に増加するが、Ｔ独立性抗原では増加しない。
ｃ）Ｔ依存性抗原は、Ｔ独立性抗原よりもいっそう効果的に、未成熟または新生児の免疫系を刺激する。
ｄ）Ｔ依存性抗原は、通常、IgM，IgG1，IgG2a，およびIgE抗体を刺激するが、Ｔ独立性抗原はIgM，IgG1，IgG2b，およびIgG3を刺激する。
Ｔ依存性抗原／Ｔ独立性抗原のこれらの特性は、有効なワクチンとして使用するとき、明確な利点および欠点の両者を提供する。Ｔ依存性抗原は、大人および新生児の両者の免疫系において長く生きる一次的および二次的応答を刺激することができるが、アジュバントとともに頻繁に投与しなくてはならない。こうして、ワクチンは抗原、例えば、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイドのみを使用して調製されてきているが、このようなワクチンは最適な応答を刺激するためにはアジュバント、例えば、明礬の使用を必要とする。アジュバントは毒性に関連し、そして免疫系を非特異的に刺激し、こうして望ましくないことがある特異性をもつ抗体を誘発することが示された。
Ｔ依存性抗原に関連する他の欠点は、非常に小さいタンパク質、例えば、ペプチドは、アジュバントとともに投与したときでさえ、めったに免疫原性ではない。これはことに不都合である。なぜなら、種々の病原体の一次的抗原決定基を提示するように、そうでなければ非常に特異的でありかつ高度に有効であるワクチンを作るように、注意して合成された多数の合成ペプチドが、今日、入手可能であるからである。
対照的に、Ｔ独立性抗原、例えば、多糖類はアジュバントの不存在下に免疫応答を刺激することができる。不都合なことには、しかしながら、このようなＴ独立性抗原は高いレベルまたは延長した抗体の応答を刺激することができる。なおいっそう大きい欠点は、未成熟またはＢ細胞を欠如する免疫系を刺激することができないことである（Mond Ｊ. Ｊ., Immunological Reviews 64：99，1982）（Mosier DEら、Ｊ. Immunol. 119：1874，1977）。こうして、Ｔ独立性抗原およびＴ依存性抗原の両者に対する免疫系は多数の応用について満足すべきものではない。
Ｔ独立性抗原に関すると、このような抗原、ことに多糖類、例えば、インフルエンザ菌（H. influenzae）および肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）に対する保護的免疫性を子供に提供することは重要である。Ｔ依存性抗原に関すると、種々の病原体の一次的抗原決定基を提示する合成ペプチドに基づくワクチンを開発することは重要である。
Ｔ独立性抗原に対する免疫応答を増強する１つのアプローチは、多糖類、例えば、インフルエンザ菌（H. influenzae）PRP（Cruse Ｊ. Ｍ., Lewis R. E. Jr.編、Conjugate vaccines in Contributions to Microbiology and Immunology, Vol. 10，1989）またはオリゴ糖類の抗原（Anderson PWら、Ｊ. Immunol. 142：2464，1989）を単一のＴ依存性抗原、例えば、破傷風トキソイドまたはジフテリアトキソイドに接合することを含む。この方法におけるＴ細胞の助けの漸増は、免疫化された多数の乳児に増強された免疫性を提供することが示された。不都合なことには、わずかに低いレベルの抗体力価が誘発され、そしてわずかの乳児のみが免疫化に対して応答する。こうして、いくつかの免疫化を必要とし、そして保護的免疫性は数カ月間しばしば遅延する。そのうえ、免疫化を受けるために多数回訪れることは、また、医学的設備から遠くに住んでいる家族にとって困難であることがある（ことに発展途上国において）。最後に、２カ月以下の年令の赤ん坊は、反復した免疫化後、抗体の応答をほとんど、あるいは具備することができない。
タンパク質またはペプチドのＴ依存性抗原のための現在の解決法は同様に欠点を有する。Ｔ依存性抗原は、しばしば、アジュバントまたは他の放出系の中に組み込まれる。しかしながら、このようなアプローチは毒性であるか、あるいは抗体の応答の非特異的増強を誘発することがある（Dancey GFら、Ｊ. Immunol. 122：638，1979）。
そのうえ、Ｔ依存性抗原およびＴ独立性抗原の両者を使用するこれらのアプローチは、単一のＴ依存性抗原のみを組み込んで免疫応答を増強する。このようなアプローチはＴ細胞の助けの漸増を最大としない。そのうえ、これらの方法は１つの担体上に多数の抗原を投与することができないことによって、異常に制限および拘束され、こうして多数の注射を

必要とする。
他のアプローチにおいて、研究者らはハプテン、例えば、トリニトロフェニル（TNP）をＴ依存性担体、例えば、分子量500kDaのフィコール（Ficoll^{R}）（不活性の合成非イオン化高分子量ポリマー）に接合した。このような接合体はアジュバントの不存在下にマウスにおいてＴ依存性応答を刺激することが示された（Mosier DEら、J. Exp. Med. 139：1354（1974））。しかしながら、この接合体単独は新生児のマウスまたはＢ細胞免疫欠損マウスにおいて免疫応答を刺激することができなかった（Mosier Deら、J. Immunol. 119：1874, 1977）。この接合体に対する免疫欠損マウスの応答は、特定のアジュバントの存在下においてのみ誘発することができる（Ahmad A およびMond JJ, J. Immunol. 136：1223, 1986）。これは前述の理由で欠点を有する。
他の研究において、TNPを不溶性粒子上に接合し、そして新生児のマウスおよび免疫欠損マウスのための有効な生体外免疫原であるが、それはマウスの匹数当たり非常に高い密度のハプテンにおいてのみであることが発見された（Mond JJら、J. Immunol. 123：239, 1979）。他の実験室、Dintzisらは、ハプテン／担体の比、ならびに担体の分子量はが、Ｔ依存性接合体の免疫原性およびそれが刺激する抗体の応答に強く影響を与えることを証明した（Dintzis RZら、J. Immunol. 143：1239, 1989）。
他の試みみた接合体は、抗免疫グロブリン抗体（抗Ig）を高分子量（２×10^{6}ダルトン）のデキスラン（グルコースポリマー）に接合して形成された「抗Igデキスラン」接合体を含んだ。この接合体は、非常に低い濃度において、新生児のおよび成熟Ｂ細胞ならびに免疫欠損マウスからのＢ細胞を活性化することが発見された（Brunswick M. ら、J. Immunol. 140：3364, 1988）。しかしながら、抗IgデキスランはＴ細胞誘導の助けをほとんどあるいはまったく刺激せず、そしてそれは特異性に無関係にすべてのＢ細胞を活性化するので、ワクチンのための有効な賦形剤を提供することができなかった。
構成体は免疫応答の１つの型のみを最適化したので、これらのアプローチのいずれもこの問題を解決しなかった。例えば、Ｔ依存性担体上に接合された低分子量のハプテンは抗ハプテンの応答のＴ依存性成分のみを最適化し、そしてＴ依存性担体上に接合された低い免疫原性のＴ依存性分子はＴ依存性免疫性の刺激に頼らなくてはならず、そしてその溶解性の形態で、この複合体はＴ細胞を活性化するとき非常に制限を受けることがある。こうして、この分野において両者の成分を最適化する構成体が要求されている。このような構成体はＴ依存性成分を最適化して抗原特異的Ｂ細胞において高いレベルの活性化を刺激し、ならびにＴ依存性成分を最適化してＴ細胞の助けを同時に漸増する。さらに、このような二次構成体は新生児、大人および免疫欠損の動物およびヒトにおいてＴ依存性抗原およびＴ独立性抗原の両者に対する抗体を高いレベルで急速に誘発するであろう。
また、この分野において、多数の抗原を取り付け、こうしてある数の抗原を１回の注射で提供することができる構成体が要求されている。単一の構成体上の多数の抗原で個体を免疫化することができるワクチンは、極めて価値があるであろう。
要約すると、この分野において、（ａ）Ｔ依存性成分およびＴ依存性成分の両者を最適化して、子供および大人の両者において、ならびに免疫欠損を有する個体において、長期間にわたって接続する、非常に急速なかつ大きい抗体の応答を刺激する構成体；（ｂ）多数の抗原または他の免疫増強アジュバントを取り付けることができる構成体；および（ｃ）受動免疫予防または治療のためにおよび診断のために、あるいは研究の目的で使用できる、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を急速に刺激するであろう構成体が要求されている。

IV. 発明の要約

本発明は、免疫原性を改良する二重担体の免疫原性構成体により、先行技術の構成体の問題および欠点を克服する。二重担体の免疫原性構成体は、Ｔ依存性抗原である少なくとも１種の二次担体に接合された高分子量の少なくとも１種の一次担体からなる。このような一次担体は、Ｔ細胞およびＢ細胞の両者に対して比較的高い抗原密度で二次担体の多数のコピーを提示することができる。さらに、このような大きいバックボーンのマトリックスは多数かつ異なる二次担体のための効率よい担体として作用するので、単一の構成体は多

数の抗原特異性を含有することができる。好ましい実施態様において、一次担体はそれ自体直接的にかつ潜在的に活性なＢ細胞であることができ、そして多数の二次担体を支持する大きいが比較的非分解的バックボーンとして働くすることができる、高分子量のＴ独立性抗原である。

二次担体はＴ依存性抗原である。Ｔ依存性抗原として、二次担体はＴ細胞を活性化しかつ漸増して、それ自体に対する抗体、ならびにそれ自体または一次担体に接合することができる他の決定基に対する抗体の生産を増大する。二次担体の多数のコピーを一次担体に接合してＴ細胞の活性化を有意に増強し、これにより二次担体に対する抗体の生産を増大することができる。

好ましい実施態様において、本発明は、また、一次担体および／または二次担体に接合された少なくとも１種の部分、例えば、ハプテンおよび抗原を含む。接合は前記部分が二次担体により発生したＴ細胞の助けから利益を得るようにさせる。

本発明の二重担体の免疫原性構成体は、また、非免疫原性または低い免疫原性の分子を前記二重担体の構成体上に接合することによって、前記分子を強く免疫原性の分子に変換させる。さらに、免疫増強アジュバントを担体のいずれかに接合して免疫原性をさらに増強することが可能である。好ましくは、このような二重担体の免疫原性構成体は無毒の成分から調製される。さらに、このような二重担体の免疫原性構成体は抗原性部位の変更を減少することができる。なぜなら、一次担体、例えば、デキスランへのタンパク質の接合は担体に対する最小の変更を含むからである。

最後に、本発明の二重担体の免疫原性構成体は、治療、予防、診断、および研究に適用することができる。

本発明の追加の利点および面は、以下の詳細な説明に記載されており、詳細な説明から誘導されるか、あるいは本発明の実施により知ることができる。

本発明の利点を達成するためにかつ本発明の目的に従い、この明細書の中に具体化されかつ広く記載されているように、本発明は、Ｔ依存性抗原である少なくとも１種の二次担体に接合された7KDの分子量より大きい高分子量の分子である少なくとも１種の一次担体から構成された二重担体の免疫原性構成体からなる。この構成体の免疫原性は少なくとも１種の担体単独より大きい。好ましい実施態様において、一次担体はＴ独立性抗原であり、そして二次担体はタンパク質である。他の好ましい実施態様において、少なくとも１種の部分は構成体の少なくとも１種の担体に接合されている。接合された部分の免疫原性は接合されない部分より大きい。

本発明の他の面は、少なくとも１種の二重担体の免疫原性構成体および製剤学的に許容されうる担体からなるワクチンに関する。本発明のなお他の面は、免疫刺激量のワクチンを投与することによって患者を処置する方法に関する。本発明の他の面において、二重担体の免疫原性構成体は当業者に知られているアジュバント、例えば、ヒトにおける使用が承認されているアルミニウム塩類とともに投与する。

本発明の他の面は、宿主をワクチンで免疫化し、こうして免疫原に対して向けられた抗体を生産し、次いで抗体またはモノクローナル抗体を生産するために使用できるＢ細胞を単離することによって、抗体を生産する方法に関する。なお他の面において、本発明は治療的に有効量の免疫治療用組成物を投与することによって患者を処置する方法に関する。他の面において、本発明はこのような抗体からなる診断および研究の試薬に関する。

この明細書の中に加えられそしてその一部分を構成する添付図面は、本発明のいくつかの例示的態様を示しそして、説明と一緒に、本発明の原理を説明する働きをする。

本発明の上の目的および種々の他の目的、特徴および付随する利点の多くは、添付図面と組み合わせて考慮して、次の詳細な説明を読むと、いっそうよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

第１図は、それらのＴ細胞の要件に基づく抗原の２つの古典的タイプの描写を示す。Ｔ独立性抗原（およびハプテン化されたTI抗原）はＴ細胞の不存在下に応答を刺激し、そしてＴ依存性抗原（およびハプテン化TD抗原）は最適な抗体の応答の誘発のためにＴ細胞の参加を必要とする。

第２図は、二重担体の免疫原性構成体の１つの態様を概略的表示である：
－　一次担体は高分子量ポリマー（HMWP）、例えば、デキストラン（Dex）；
－　Dexに接合された二次担体は、高いレベルのＴ細胞の活性化を刺激する任意の物質であることができる；
－　ハプテンは任意の低分子量分子、例えば、オリゴ糖類、多糖類、ペプチド、薬物などであり、これらは二次担体に接合されている；
第３図は、BSA-Dex接合体に対する投与量の応答のグラフの表示である。10～500μｇ／マウスの投与量の範囲でPBS接合体中のBSA-Dexで静脈内免疫化されたマウスにおいて、血清IgG1抗体力価／ウシ血清アルブミン（BSA）を測定した。マウスを免疫化後14日に採血し、そして抗体力価をELISAにより決定した。接合されないBSAはマウスにおいて免疫原性ではない。この図面は、Dexへの接合がBSAを高度に効力のある免疫原に変換することを示す。
第４図は、Dexに接合し、そして示した投与量でマウスに静脈内（IV）注射した種々の大きさのタンパク質を描写する。血清IgG1抗体力価をELISAにより決定した。接合されたタンパク質と対照的に、Dexにカップリングされなかった抗原によるマウスの免疫化は、コレラトキシンの免疫化を除外して検出可能な抗体の形成を与えず（力価は10より低い）、コレラトキシンの免疫化は、Dex接合体より有意に低いにもかかわらず、検出可能な力価を与えた。この図面は、Dexへの異なるタンパク質の接合がタンパク質を有効な免疫原に変換することを示す。
第５図は、ハプテン化BSAに対する応答のグラフの表示である。マウスをトリニトロフェニル化BSA（TNP-BSA）（50μｇ）またはDexに接合されたTNP-BSA（TNP-BSA Dex）（50μｇ）で免疫化し、そして21日後に採血した。抗TNP力価をELISAにより測定した。この図面は、一次担体としてDexおよび二次担体としてBSAを使用することによって、BSAおよびTNPの両者に対するすぐれた抗体の応答が誘発されることを証明する。こうして、TNPの二次タンパク質担体分子への接合とこの複合体の一次担体への接合との組み合わせは、TNPを有効な免疫原に変換した。
第６図は、抗ペプチドの応答のグラフの表示である。この研究は第５図に示す前の研究を支持する。これが示すように、マラリア誘導ペプチドP74の二次担体BSAへの接合、およびこの複合体のDex一次担体への接合は、非免疫原性ペプチド（P74）を有効な免疫原に変換する。これはとくに合成ペプチドのためのこの構成体の利用を証明するとき関係する。
第７図は、デキストランに接合された多数の抗原のグラフの表示である。この研究は、３つの抗原的に異なる分子をDexに接合することによって調製されたDex複合体に対して抗体の応答を評価する。この研究において、オバルブミン（OVA）とカップリングしたTNP、＋リゾチーム（LYS）をDexに接合し、そして50μｇのこの接合体を混合物にIV注射した。９日後、マウスを採血し、そして血清をELISAにより抗OVA、抗TNPおよび抗LYS抗体力価について決定した。この研究は、多数の無関係の抗原を一次Dex担体上に接合することによって、ワクチン調製物をつくることができることを証明する。
第８図は、ハプテン化BSA-Dexのブースティングのグラフの表示である。マウスを（TNP-BSA）Dex（50μｇ）で免疫化し、次いでTNP-BSA単独であるいはDexに接合されたPNP-BSAの第２回の注射でブースティングした。14日後にマウスから採血し、そして血清を抗TNPおよび抗BSA抗体について力価決定した。この図面が示すように、いったんマウスがDex接合体（一次担体および二次担体の両者から成る構成体）で免疫化されると、すぐれたブースターの応答が達成され、そして抗体のブースティングは完全なワクチン構成接合体の使用と同様に接合されないTNP-BSA（二次担体のみ）で効果的に達成することができる。これが証明するように、いったん一次的応答が接合体で刺激されると、接合されないまたは天然の抗原により、大きい二次的応答を誘発することができる。
第９図は、BSAでブースティングしたBSA-Dexの反応速度論のグラフの表示である。マウスを50μｇのBSA-Dex（一次担体および二次担体）で免疫化し、そして５週後50μｇのBSA（二次担体のみ）でブースティングした。マウスを種々の時間に採血し、そして血清をELISAによりBSA、二次担体に対する抗体力価について決定した。この図面が示すように、二次

的抗体の応答はBSAのみ、デキストランに接合されていない二次担体により誘発することができ、そしてこの応答は非常に長く生き、そして11週より長く持続する。
第10図は、担体に対する抗体の応答のグラフの表示である。Dexに対して応答しない正常または免疫欠損のマウスに、BSA-Dex（50μｇ）を注射した。マウスを11，20および29日後に採血し、そして血清の抗BSA力価をELISAにより測定した。この研究が証明するように、Dex担体は多価の配列で細胞に抗原を提示すうマトリックスを単に提供することができ、Dex接合体に対する抗体の応答はデキストラン担体に対する抗体の応答をマウントするマウスの能力に依存せず、免疫系の細胞はDexを有効な担体として機能する免疫原として必ずしも認識せず、そして重要なことにはBSA-Dex接合体は免疫欠損マウスにおいて応答を刺激することができる。
第11図は、子供のマウスにおけるBSA-Dexの免疫原性のグラフの表示である。２週齢のマウスおよび大人のマウスの両者に50μｇのBSA-Dexを腹腔内注射し、そして12日後に採血した。血清の抗BSA力価をELISAにより測定した。この研究が示すように、免疫学的に未成熟であるマウスでさえ、このDexタンパク質－担体接合体で免疫化し、そして二次担体（BSA）に対するすぐれた抗体の応答を誘発することができる。
第12図は、分子量の効果のグラフの表示である。分子量70Ｋ、500kDa、または700Ｋの大きさで分離したDexを使用して、BSA-Dex接合体を作った。マウスに50μｇの種々の接合体をIV注射し、そして14日後に採血した。血清の抗体力価をELISAにより決定した。この図面が示すように、有効な担体分子を提供するためにはDexは＞70Ｋの大きさでなくてはならず、そして500kDaはすぐれた応答を誘発するが、より大きい分子量の担体はなおいっそう有効である。
第13図は、注射のモードの効果のグラフの表示である。マウスを３つの異なるルートを経てBSA-Dexで免疫化した：静脈内（IV）、皮下（SC）、または筋肉内（IM）。マウスを14日後に採血し、そして血清の力価をELISAにより決定した。この研究が示すように、Dexタンパク質－担体接合体（一次担体および二次担体の複合体）は、IV，SCまたはIMのいずれで与えても、匹敵する応答を刺激する。
第14図は、多数のかつ異なる二次担体（破傷風トキソイド、髄膜炎菌外膜タンパク質、およびウイルスタンパク質）を少なくとも１種の一次担体に接合した、二重担体の免疫原性構成体の略図である。二次担体はさらにハプテン化するか、あるいはしないことができる。
第15図は、百日咳トキソイドのデキストランへの接合の成功のグラフの表示である。このプロフィルは、生理食塩水およびアジドと平衡化したS400SFゲル濾過カラムに適用したPT-dexである。流速は0.2ml／分、25滴／管であった。矢印は接合しないトキソイドの位置を示す。OD280はタンパク質の測度であり、そしてCPM/50μｌは50μｌのアリコートの中に存在する計数／分、すなわち、存在するトリチウム化デキストランの量の測定を意味する。
第16図は、破傷風トキソイド－デキストラン、ジフテリアトキソイド－ジフテリアトキソイド、または百日咳トキソイドの単一の投与量を流体として、あるいはアジュバントのリン酸アルミニウム上に吸収させて注射したマウスの抗デキストランの応答を描写する図表である。この図表が示すように、マウスは抗体、主としてIgG1，IgG2、およびIgMを２週までに発生し、そして抗体は少なくとも８週間持続した。（下の実施例９を参照。）
第17図は、高分子量のデキストランに接合したときの二次担体、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドに対する抗体の応答の３つの部分のグラフの表示である。抗デキストラン抗体と同様に、これらのタンパク質に対する抗体は少なくとも２週までに誘発され、そして少なくとも８週間持続した。第15図および第16図が一緒に証明するように、二重のかつ逆の増強は本発明の接合体を使用して達成された。（詳細については実施例９を参照。）
第18図は、破傷風トキソイドの中和の影響のグラフの表示であり、接合体が保護的レベルの抗トキシン抗体を発生したことを示す。
第19図は、第19ａ図に従い投与した２つの投与量の接合体で達成された二重および逆の免

疫増強の２つの部分のグラフの表示である。部分（ａ）は二次担体により誘発された抗タンパク質抗体のレベルを記載する。部分（ｂ）はアイソタイプによりカテゴリー化される抗デキストラン抗体のレベルを記載する。
第20図は、PRPに対するジフテリアトキソイドの接合のグラフの描写である。このプロフィルは、PBSと平衡化したS300SFゲル濾過カラムに適用したDT-PRPのものである。流速は0.25ml／分、25滴／管であった。矢印は接合しないトキソイドの位置を示す。OD280はタンパク質の測度であり、そしてOD430はレゾルシノール炭水化物のアッセイにおいて生成した吸収を意味し（Dubois, Hら、Anal. Chem. 28：350（1956））そしてPRPの相対量の測度である。

VI. 好ましい態様の詳細な説明

本発明の現在好ましい態様をここで詳細に説明し、その例は添付図面に示されている。
本発明は、第２図に示すように、少なくとも２つの担体、すなわち、70kDaの分子量より大きい高分子量の少なくとも１種の一次担体およびそれに接合されたＴ依存性抗原である二次担体から構成された免疫原性構成体に関する。担体は、取り付けられあた物質の免疫原性が増強されるように、他の物質を取り付けることができる物質である。
好ましい態様において、構成体の免疫原性は少なくとも１種の担体単独の免疫原性より大きい。免疫原性の測定方法は当業者によく知られており、そして構成体の注射後の種々の時間における量、適合活性およびアイソタイプの分布の測定を包含する血清抗体の測定を主として包含する。より大きい免疫原性は、抗体の応答のより高い力価および／または持続性により反映されることができる。免疫原性は、また、無毒の物質または微生物と対抗する保護を誘発する能力により測定することができる。免疫原性は、また、新生児のマウスおよび／または免疫欠損マウスを免疫化する能力により測定することができる。免疫原性は、処置すべき患者の集団において、あるいは患者の集団の免疫応答をまねる集団において測定することができる。
両者のタイプの担体の寄与の結果、二重担体の構成体は、メカニズム、例えば、Ｂ細胞、マクロファージまたは他の抗原提示細胞により増強された抗原の提示を経るＴ細胞の助けの極端に効力のあるアクチベーターである。このような構成体は、大人、子供、および未成熟または免疫欠損の免疫系をもつものにおいて、非常に急速かつ長く生きる抗体の形成を誘発するであろう。
本発明の構成体は好ましくは水溶性であるか、あるいは水性媒質の中に維持することができる。溶解性は構成体の合成の間に可溶化試薬を使用して誘導することができる。さらに、本発明の構成体は可溶化試薬の使用により水性媒質の中に維持することができる。
本発明の構成体を合成する方法は、最終生成物の物理的および化学的性質の有利なコントロールを可能とする。コントロールすることができる性質は一次担体および二次担体の電荷の変更（カチオン化タンパク質がいっそう免疫原性であることができるという証拠に照らして有利である）、一次担体の大きさの変化による構成体の大きさの変化、構成体の架橋度の選択（循環における大きさおよび半減期の変動を得るために）、一次担体に接合する二次担体のコピー数の選択、および選択した細胞集団に対する（例えば、マクロファージに対する、抗原提示を増強するために）ターゲッティングを包含する。
本発明の構成体の免疫応答は、免疫調節剤および／または細胞ターゲッティング部分の添加によりさらに増強することができる。これらの実在物は、例えば、（１）解毒したリポ多糖または誘導体、（２）ムラミルジペプチド、（３）免疫学的に関係する細胞に構成体をターゲッティングする細胞表面の決定基と相互作用することができる炭水化物、脂質、およびペプチド、（４）インターロイキン、および（５）細胞表面の成分と相互作用することができる抗体を包含する。
第２図に表すように、本発明の構成体は二次担体の１または２以上のコピーを接合することができる大きいバックボーンのマトリックスを提供する少なくとも１種の一次担体から構成される。さらに、下に説明するように、１または２以上の一次担体または二次担体は部分にさらに接合することができる。接合方法は当業者によく知られており、そしてBrunswick M.ら、J. Immunol. 140：3364（1988）およびMongini P. K.ら、J. Immunol. 148

：3892（1992）（両者を特別に引用によってここに加える）のヘテロライゲイションの技術を包含する。また、Wong, S. S.,タンパク質の接合体および架橋の化学（Chemistry of Protein Conjugate and Crosslinking）、CRC Prcss、ボストン（1991）（これを特別に引用によってここに加える）を参照のこと。しかしながら、われわれは、これらの方法は、タンパク質のためにこの分野においてよく知られているが、接合体のワクチンの合成へのそれらの適用を最適化するために多少の変更を必要とすることを発見した。

当業者は理解するように、接合体のワクチンの調製において使用する抗原は価値がある。したがって、生産物の高い収率を与えかつ重要なエピトープの修飾を最小とする化学的手順を使用することが望ましい。炭水化物にタンパク質を接合する多数のプロトコールはカーボジイミドを使用してアミド結合を形成する（Cruse J. M., Lewis R. E. Jr. 編、Conjugate vaccines in Cotributions to Microbiology and Immunology, Vol. 10, 1989）。この試薬は非選択的であり、タンパク質の広範な修飾および潜在的に望ましくない重合を引き起こす。収率はしばしば低い。他の方法はジサルファイド結合を生じ、これらの結合はチオーエーテル植物誘導より安定性に劣る（Cruse J. M., Lewis R. E. Jr.編、Conjugate vaccines in Cotributions to Microbiology and Immunology, Vol. 10, 1989）。

対照的に、本発明の化学はこれらの困難性を排除するようである。好ましいプロトコールの要素は次の通りである：（１）チオールによる二次担体（例えば、トキシンタンパク質）の誘導、（２）チオール反応性試薬、例えば、マレイミド、ヨードアセテートによる一次担体ポリマーの誘導、（３）チオーエーテル結合の形成および（４）接合しないポリマーおよびタンパク質からの接合体の分離。

タンパク質および炭水化物の誘導に引き続いて、通常、カラムの脱塩工程および濃度を実施する。首尾よく使用された別法は、適当な分子量カットオフ・フィルターを使用して限外濾過装置〔例えば、アミコン（Amicon）圧力フィルター〕によりすべての工程、好ましくは工程１～３を実施することである。これは取り扱いおよび転移を最小にする。

試薬の群の数および成分の濃度および他の細部をコントロールすることによって、この化学は鎖間の架橋度、重合度および凝集の比較的円滑なコントロールを可能として、主要なエピトープの高い収率および最小の修飾を達成する迅速な方法を生ずる。

当業者は認識するように、特定の接合方法は個々の一次担体および二次担体に依存して変化することができるが、ここにおいて教示が与えられそして当業者が知ると、他の方法およびここにおいて提示した方法の必要な変更は当業者の技量の範囲内である。しかしながら、当業者の助けとなるために、特定の一次担体のための代表的な接合をここに記載する。これらの技術は一次担体のデキストラン（「方法」と題する節を参照）およびインフルエンザ菌（Haemophilusinfluenzae）の多糖類（PRP）（実施例11参照）に向けられるが、これらの技術は後述する他の一次担体とともに使用することができる。当業者に知られているように、他の化学的技術をデキストランまたはPRPおよび他の一次担体とともに使用することができる。

本発明の範囲内の担体の接合は、担体上の重要なエピトープの最小の崩壊を提供する。なぜなら、一次担体、例えば、デキストランへのタンパク質の接合はデキストランに対する最小の変更を含むからである。さらに、本発明の範囲内の一次担体は、また、官能基を含むことができるか、あるいは化学的に操作して官能基を有するようにすることができる。デキストランおよびPRPを使用するときのように、官能基の存在は１または２以上の二次担体への一次担体の共有結合の接合を促進することができる。このような官能基は次のものを包含するが、これらに限定されない：アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド、ヒドラジド、エポキシド、およびチオール。

各一次担体の大きいバックボーンは多数の異なる二次担体のための理想的なマトリックスを提供するので、１つのワクチンは多数の抗原特異性を含有することができる。そのうえ、一次担体は、二次担体の多数のコピーを比較的高い抗原密度でＢ細胞およびＴ細胞の両者に提示することによって、抗体の生産を刺激することができる。また、それはマクロファージまたは他の細胞のタイプに構成体をターゲッティングして抗原のプロセシングを増強できることを含む他の利点を提供することができる。

好ましい態様において、少なくとも１種の一次担体の分子量は70,000～2,000,000Da以上の範囲である。第12図に記載するように、より好ましい分子量は500,000Da以上であり、なおいっそう好ましい分子量は2,000,000Daである。少なくとも１種の二次担体への一次担体の接合は一次担体の架橋を生ずることがある。このような架橋は、最終構成体がより高い分子量をもつかぎり、より低い分子量の担体（例えば、70,000Da）の使用を可能とする。ここに含有される教示およびこの分野における通常の技術に基づいて、当業者は所望の特定の構成体のために最適な分子量を選択することができる。

他の好ましい態様において、少なくとも１種の一次担体はＴ独立性抗原であり、これによりＴ独立性抗原およびＴ依存性抗原の利点を組み合わせる。このような担体はそれ自体直接にかつ潜在的にＢ細胞を活性化し、そして大きいが比較的非分解性のバックボーンとして働いて多数の二次担体を運ぶことができる。しかしながら、下に詳しく説明するように、本発明はそれ自体免疫原性でない一次担体を使用して実施することができる。

一次担体は天然に存在する、半合成であるか、あるいは完全に合成の高分子量の分子であることができる。好ましい態様において、少なくとも１種の一次担体はデキストラン、カルボキシメチルセルロース、アガロース、フィコール、ポリアクリルアミド、の多糖類、およびそれらの組み合わせから成る群より選択されるポリマーである。

１つの好ましい態様において、一次担体はデキストランである。ここにおいて使用するとき、デキストラン（「dex」）は単一の糖から構成された多糖を呼び、そしてファーマシア（Pharmacia）を包含するある数の源から入手可能である。フィコールは、半合成ポリマーの１例であり、不活性の合成の非イオン化高分子量ポリマーである。合成ポリマーはポリアクリルアミド（アクリル樹脂の水溶性高分子量ポリマー）、ポリビニルアルコール、部分的に加水分解されたポリ酢酸ビニル、およびポリビニルピロリドンを包含する。他の好ましい態様において、一次担体は微生物の多糖である。なお他の好ましい態様において、微生物の多糖類は病原性微生物から誘導される。なおさらに他の好ましい態様において、一次担体は肺炎球菌莢膜多糖類（III型を包含する）、Ｂ群の連鎖球菌属（Streptococcus）血清型、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）のムコエキソ多糖類、緑膿菌（P. aeruginosa）の莢膜多糖類（フィッシャー１型株を包含する）、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）の多糖（PRPを包含する）、およびそれらの組み合わせから成る群より選択される。なおさらに他の好ましい態様において、一次担体はインフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）の多糖（PRP）である。

この構成体の二次担体は、また、すぐれた抗体の応答を誘発するために特定の利点を提供する。Ｔ依存性抗原のように、二次担体はＴ細胞を活性化しかつ漸増し、これによりＴ細胞依存性抗体の生産を増大する。しかしながら、二重担体の免疫原性構成体はそれ自体強く免疫原性である必要はないが、強く免疫原性の担体は本発明の範囲内である。一次担体への二次担体の多数のコピーのカップリングは、アジュバントの不存在下でさえ二次担体に対する抗体の生産を有意に増大する。

好ましい態様において、二次担体はタンパク質、ペプチド、Ｔ細胞アジュバントまたはＴ細胞の助けを活性化しかつ漸増することができる他の化合物である。二次担体はウイルス、細菌、寄生生物、動物および真菌の構成成分から成る群より選択されるが、これらに限定されない。より好ましい態様において、二次担体はタンパク質、例えば、アルブミン（例えば、ウシ血清アルブミン）、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日咳トキソイドまたは細菌の外膜タンパク質であり、これらは生化学的または製剤学的供給会社から入手するか、あるいは標準の方法により生産することができる（Crusc, J. M.およびLewis, R. E., Jr.（編）Conjugative Vaccincsin Contributions to Microbiology and Immunology, Vol. 10（1989））（特別に引用によってここに加える）。二次担体として機能する他の成分は、免疫学における当業者に知られているであろう。本発明の二次担体は、少なくとも１種の一次担体に接合することができる。二次担体は一次担体と反応することができる官能基を含有するか、あるいは二次担体は前述の一次担体と反応できるように操作することができる。

前述したように、特定の二次担体の多数のコピーならびに種々の二次担体を一次担体に接

合することができる。一次担体への二次担体の多数のコピーのカップリングは、二次担体に対する抗体の生産を有意に増大する。
本発明の二次担体は、接合されているか、あるいはされていないか、あるいは後述する免疫原にカップリングされているかどうかにかかわらず、好ましくは水溶性である。
他の態様において、第２図に表すように、部分を１または２以上の一次担体および／または二次担体に接合することができる。このような接合はその部分に対する増強された抗体の応答を促進する。一次担体および／または二次担体へこのような部分を接合する技術は当業者によく知られており、そして、一部分、入手可能な官能基（例えば、アミノ、カルボキシル、チオおよびアルデヒド基）を通したカップリングを包含する。参照、S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugate and Crosslinking, CRC Press（1991））、およびBrenkeleyら、Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates With Dyes, Haptens and Cross-linking Agents, Bioconjugate Chemistry 3#1（Jan. 1992）、特別に引用によってここに加える。本発明のハプテンをまず二次担体（これはＴ依存性成分であることができる）に接合し、次いで一次担体（これはＴ依存性成分であることができる）にカップリングし、その後これをカップリングする。あるいは、二次担体をまず一次担体に接合し、次いでハプテンをこの接合体に接合することができる。この第２の方法は対応するハプテン、例えば、アミノ基を含有するペプチドのハプテンの修飾を最小とすることを促進することができる。
ここにおいて使用するとき、部分は、それ自体またはいったんカップリングされると、免疫系を刺激することができる物質である。これらの部分は、ハプテン、抗原、またはそれらの組み合わせを包含する。ハプテンは小さい分子、例えば、化学物質、ほこり、およびアレルゲンを呼び、それらはそれら自体抗体の応答を誘発することができるが、いったん担体にカップリングされると、誘発することができる。抗原は、正しい循環下に、抗体の形成を誘発することができる分子である。これらのハプテンおよび抗原は、細菌、リケッチア、真菌、ウイルス、寄生生物、薬物、または化学物質から誘導することができるが、これらに限定されない。それらは、例えば、小さい分子、例えば、ペプチド、糖類、オリゴ糖類（例えば、インフルエンザ菌（H. influenzae）のポリリボシルーリビトールーホスフェート）、トキシン、エンドトキシンなおどを包含することができる。
他の態様において、本発明は二重担体の免疫原性構成体および製剤学的に許容されうる担体から構成されたワクチンに関する。このようなワクチンは、有効治療量の二重担体の免疫原性構成体および患者への適切な投与のための形態を提供するために適当な量の担体を含有するであろう。
製剤学的に許容されうる担体は、無菌の液体、例えば、水および油であることができ、石油、動物、植物および合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを包含する。製剤組成物を静脈内に投与するとき、水は好ましい担体である。生理食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液を、また、液体の担体として、とくに注射可能な溶液のために使用することができる。適当な製剤学的担体は、Martin E. W., Remington's Pharmaceutical Scicnces（特別に引用によってここに加える）に記載されている。
本発明の二重担体の免疫原性構成体から構成することができるワクチンは、図表１に記載されているワクチンを包含するが、これらに限定されない。

図表１

ジフテリアワクチン

百日咳（サブユニット）ワクチン

破傷風ワクチン

インフルエンザ菌（H. influenzae）ｂ型（リン酸ポリリボース）

肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）、すべての血清型

大腸菌（E. coli）、エンドトキシンまたはJ5抗原（LPS 、脂質Ａおよびゲンタビオース）

大腸菌（E. coli）、Ｏ多糖類（血清型特異的）

クレブシエラ属（Klebsiella）、多糖類（血清型特異的）

黄色ブドウ球菌（S. aureus）、５および８型（血清型特異的および普通の保護的抗原）

表皮ブドウ球菌（S. epidermimidis）、血清型多糖Ⅰ，ⅡおよびⅢ（および普通の保護的抗原）

髄膜炎菌（N. meningitidis）、血清型特異的またはタンパク質抗原

ポリオワクチン

おたふくかぜ、麻疹、風疹ワクチン

RSウイルス

狂犬病

肝炎Ａ，Ｂ，Ｃ、など

ヒト免疫欠損ウイルスＩおよびⅡ（GP120，GP41，GP160，p24 など）

単純ヘルペス１型および２型

CMV

EBV

水痘／帯状疱疹

マラリア

結核

カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、他のカンジダ

ニューモシスティス・アリニイイ（Pneumocystis carinii）

マイコプラズマ

インフルエンザウイルスＡおよびＢ

アデノウイルス

群Ａ連鎖球菌属（streptococcus）

群Ｂ連鎖球菌属（streptococcus）、血清型Ｉａ，Ｉｂ，ⅡおよびⅢ

シュードモナス・アエリノサ（Pscudomonas aeryinosa）（血清型特異的）

ライノウイルス

パラインフルエンザエ（Parainflucnzae）、１型、２型および３型

コロナウイルス

サルモネラ属（Salmoncl1a）

赤痢菌属（Shigella）

ロタウイルス

エンテロウイルス

トラコーマクラミジアおよびニューモニアエ（Chlamydia trachomatis & pneumoniae）（TWAR）

本発明は、また、患者に免疫刺激量のワクチンを投与することによって患者を処置することに関する。患者は処置が有益である被検体を呼び、そして哺乳動物、ことにヒト、ウマ、ウシ、イヌ、およびネコならびに他の動物、例えば、ニワトリを包含する。患者に免疫刺激量は、疾患の予防、軽減、または処置のために患者の免疫応答を刺激することができるワクチンの量を呼ぶ。本発明のワクチンは任意のルートで投与することができるが、好

ましくは静脈内、筋肉内、および皮下の注射により投与される。
本発明は、また、前述のワクチンで宿主を免疫化し、こうしてドナーがワクチンに対して向けられた抗体を生産するようにすることによって、細菌、ウイルス、寄生生物、真菌、または化学物質により引き起こされる感染に対する免疫治療剤を調製する方法に関する。抗体を単離するか、あるいは後に骨髄腫細胞と融合してモノクローナル抗体をつくるためにＢ細胞を得ることができる。モノクローナル抗体をつくる方法はこの分野においてよく知られており、KohlerおよびMilstein, Nature 256：495（1975）（特別に引用によってここに加える）そしてそれ以上ここで説明することは必要ではない。ここにおいて使用するとき、免疫治療済は患者の受動的処置においてに使用するための特定の免疫原に対して向けられた抗体の組成物を呼ぶ。血漿のドナーは、ワクチンの中に含有させる免疫原に対する抗体の生産のためにワクチンを注射する被検体である。
本発明は、また、保護量の免疫治療剤を投与することによって患者を処置する方法に関する。このような処置は、免疫原に対する抗体を患者に生産させず、むしろ血漿ドナーにより生産された免疫原に対する抗体を使用することにおいて受動的である。治療用抗体の量は、免疫原により引き起こされる疾患を予防し、軽減するか、あるいは処置することができる抗体の十分な数を表す場合、保護的である。このような量は当業者により決定されることができ、そして患者および疾患のプロフィルの特性に基づいて変化する。
本発明は、また、細菌、ウイルス、寄生生物、真菌、または化学物質により引き起こされる疾患の特徴を示す因子に対する抗体（またはＢ細胞）を生産するように、前述のワクチンで宿主を免疫化することによって、前記因子を検出するための診断試薬および／または研究試薬を生産する方法に関する。抗体および／またはＢ細胞は前述したように単離することができる。ここにおいて使用するとき、診断試薬は、疾患の特徴を示す因子を検出するために使用できる抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）の組成物を呼ぶ。ここにおいて使用するとき、研究試薬は、実験室において使用できる抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）の組成物を呼ぶ。
ここにおいて提供する実施例は、能動的または受動的予防または治療のために、および診断、または研究の目的で使用できるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生産するワクチンの製造における本発明の実施を、限定を意味しないで、例示する方法を提供する。
代表的な実験のプロフィルを選択して、新規な二重担体の免疫原性構成体の製造方法および機能の概念を例示する。
方法
Ｉ．特記しない限り、マウス（DBA/2J）を８週齢で使用し、そして0.1mlの種々の抗原の生理食塩水溶液で静脈内的、皮下的または筋肉内的に免疫化した。すべての実験において、５匹のマウス／群を使用した。採血は尾の静脈によった。
II．アミノエチルカルバルDex（AECM Dex）
アミノ－エチルカルバルDex（AECM Dex）は、本質的にBunswickら、J．Immunol．140：3363（1988）（特別に引用によってここに加える）に記載されているようにして調製した。AECM T2000デキストラン〔ファーマシア（Pharmacia）〕をゲル透過カラム（CL2Bカラム2.5×105cm）上に通過させた。カラムの最初の１／３からの物質をプールし、そして2,000,000ダルトンの平均分子量を有することが決定された。この物質をここでHMW AECMデキストランと呼ぶ。また、デキストランをT70およびT500デキストラン（ファーマシア）から調製しそして、それぞれ、CL6B中止CL4Bカラムで分画した。中央のカットを取り、濃縮し、そして戻して比較的均質な調製物を得た。トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）を使用して、デキストラン分子当たりのアミノ基の平均数を決定した。高分子量のデキストラン調製物は150～200アミノ基／2,000,000ダルトンを有した。AECM T500調製物は150アミノ基／500,000ダルトンを有し、そしてAECM T70調製物は35アミノ基／70,000ダルトンを有した。デキストラン濃度の決定を促進するために、AECMデキストランを少量のＮ－スクシニミジル〔3H－２，３〕プロピオネート〔アマーシャム（Amersham）〔3H－NSP〕との反応により日常的に放射線標識化した。10,000個の分子当たりほぼ１個が修飾された。（

3H－AECM Dex）を次のようにして軽度にトリニトロフェニル化した：0.01Mのホウ酸ナトリウムpH9.3中の0.01Mの新しく調製したTNBSの50μｌを、２mlのHEPES緩衝液〔0.01M HEPES，２mM EDTA，0.02%アジド、pH7.5〕＋0.5mlの0.1Mのホウ酸ナトリウム緩衝液pH9.3中の20mgのHMW AECMデキストランの撹拌した溶液に添加した。室温において暗所で２時間後、試薬をP6DG脱塩カラム〔バイオラド（BioRad）〕上で除去し、そして標識化したデキストランをセントリコン（Centricon）30（ファーマシア）を使用する限外濾過により濃縮した。366nmにおける11,000のモル吸光係数を使用して、TNP/HMWデキストランの比は40：１であると決定された。これはそれ以上の反応のためにほぼ100～150の遊離アミノ基が残った。

この方法の変法は他の一次担体のための通常であることがある。例えば、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）のムコエキソ多糖（MEP）は、カルボキシルを含有する500 kDaの分子であり、まずエチレンジアミンおよび水溶性カーボジイミドで部分的に誘導することができる。対照的に、アミノ基を含有する緑膿菌（P. aeruginosa）フィッシャー１型多糖は標準のプロトコールでよく応答することができるが、高い塩の存在により促進することができる。

III. AECM Dexへのタンパク質の接合

ヘテロライゲイション技術（Brunswick M.ら、J. Immunol. 140：3364，1988、特別に引用によってここに加える）を使用して、AECMデキストランにタンパク質を接合した。タンパク質をアセチルチオール化し、そしてデキストランを試薬SIAP（Brunswick M.ら、J. Immunol. 140：3364，1988、特別に引用によってここに加える）でヨードアセチル化したが、他の試薬、例えば、ヨード酢酸Ｎ－ヒドロキシルスクシンイミドエステル（IANHS）を使用することができる。

タンパク質は典型的には４～８倍モル過剰の試薬SATA〔カルビオケム（Calbiochem）〕と１～２時間反応させた。活性化されたデキストランおよびタンパク質の各々を脱塩してアセテート緩衝液（10mM酢酸ナトリウム、0.1 M HCl，2mM EDTA，0.02%アジ化ナトリウム、pH5.0）に入れて過剰の試薬を除去し、そしてセントリコン30を使用して濃縮した。典型的にはタンパク質およびデキストランを30～60：１のモル比で混合し、pHを濃HEPES緩衝液＋ヒドロキシルアミンでpH7.5に上昇させた。最終濃度は75mM HEPES，２mM EDTA，0.02%アジドおよび50mMヒドロキシルアミンであった。４℃において一夜の反応後、接合体を0.2mMメルカプトエタノールで１時間処置し（残留するヨードアセチル基を消費するため）、次いで10mMヨードアセトアミドで処置し（すべてのチオール基を消費するため）、次いで必要に応じて濃縮し（例えば、遠心装置または圧力限外濾過により）、そしてPBSと平衡化し、タンパク質の分子量に依存してS200SF，S300SFまたはS400SF（ファーマシア）を含有する１×58cmのゲル濾過カラム上に濾過させた。放射活性空隙カラムのピークをプールし、そして必要に応じて濃縮した。溶液をミレックス（Millex）GVまたはHVフィルター〔ミリポア（Millipore）に通過させることによって滅菌した。

P74ペプチド（CNIGKVPNVQDQNK、単一文字のアミノ酸コード）を次のようにしてBSAに接合した。400μｌのHEPES緩衝液中の11.6mgのBSA〔ペンテックス（Pentex）〕をヨードアセトアミド中で10mMにした。これはヘテロ２官能性試薬と反応しそして重合を引き起こしうる元のチオール基をブロックすることであった。10分間インキュベーションした後、タンパク質を12倍モル過剰のSIAPの添加によりヨードアセチル化した。１時間後、この溶液を脱塩してアセテート緩衝液の中に入れ、そして39mg／mlに濃縮した。

チオールペプチドを放射線標識化して、BSAに接合したペプチドの量を推定した。ペプチドをHEPES緩衝液中に溶解し、そして1.5倍モル過剰のエルマンズ試薬を添加してチオールをブロックした。30分後、10倍モル過剰のＮ－エチルマレイミドを添加して、解放した半分のエルマンズ試薬のチオールを消費する。１時間後、チオ保護されたペプチドをＮ－スクシニミジル〔^{3}Ｈ－２，３〕－プロピオネート（^{3}Ｈ－NSP）（アマーシャム）で放射線標識化した。接合直前に、ポリペプチド溶液を50mMのジチオスレイトールにし、そしてすべての試薬を１×38cmＧ－10カラム（ファーマシア）で除去した。空隙体積中を流れる放射能のピークをプールした。ペプチドの比活性は約2.5×10^{11}であった。放射線標識化した

チオールペプチドを4.5mgのBSAに15：１のモル比で添加し、そしてpH５×HEPESの添加により7.5に上昇させた。最終体積は1.2mlであった。一夜反応させた後、この溶液を0.2mMのメルカプトエタノールで１時間処置し、そして未反応のペプチドをPBSで平衡化した１×15cmのP6DGカラムで除去した。最終のペプチドBSA比は６：１であると決定された。次いで、BSAについて記載したように、このペプチド-タンパク質接合体をデキストランカップリングした。

βーラクトグロブリンB、アプロチニン、オバルブミン（OVA）およびリゾチームをシグマ（Sigma）から入手した。ウシ血清アルブミン（BSA）をペンテックス（Pcntex）またはアムレスコ（Amresco）から入手した（生物技術等級）。ワクシニアタンパク質はイサベラ・クアーキイ（Isabella Quarkyi）博士（ジョージストーン大学メディカル・スクール）から提供された。

0.1Mのホウ酸ナトリウム、0.2M HCl，0.02%アジ化ナトリウム、pH9.1）中のTNBSの４～12倍モル過剰（0.25M原溶液から）を、同一の緩衝液中のそれぞれOVAまたはBSAの50mg／ml溶液に添加することによって、TNP-OVAおよびTNP-BSAを調製した。４℃において一夜反応させた後、タンパク質をHEPES緩衝液の中に透析した。比を366nmにおけるODから決定し、そして280nmにおいてハプテンの寄与を補正した。（OD280＝0.32×OD366）。

IV. 血清IgG1、およびIgM抗TNP力価をELISAにより決定した。このアッセイはわれわれの前述のアッセイと同様に実施したが、ただしこの場合において、アルカリ性リン酸塩接合抗体を使用し、そしてマイクロタイターウェルを抗TNPP抗体の測定のために10μｇ／mlのTNPフィコールで、あるいは抗BSA抗体の測定のために10μｇ／mlのBSAで２時間コーティングした。また、他の被験タンパク質を10μｇ／mlでコーティングした。アルカリ性リン酸塩接合抗体で処置した後、マイクロタイタープレートのウェルに200μｌのｐ－ニトロフェニルホスフェート（１Mトリスph9.8中の１mg／ml）を充填し、室温において0.5～１時間インキュベーションし、そして各ウェル中の溶液のA_{405}をタイターテク・マルチスカン（Titertek Multiskan）分光光度計〔フロー・ラボラトリーズ（Flow Laboratories）、マクリーン、バージニア州〕で決定した。ELISAについての力価を従来記載されたように計算した（参照、Current Protocols in Immunology, Vol. I、編J. Coligan, A. Kruisbeck, D. Margulies, E. ShevachおよびW. Strober。J. Wiley & Sons, 1991、特別に引用によってここに加える）。

実施例１

現在のワクチンは、劣った免疫原性、各抗原について別々のワクチン構成体およびすぐれた抗体の生産を誘発するために多数のブースター注射の必要性を包含する多数の欠点を有する。高分子量ポリマー（HMWP）を一次抗原として使用してワクチンのバックボーンを準備した。任意のHMWPを使用することができるが、Dexをこれらの研究のために選択した。Dex HMWPをを使用してＴ細胞およびＢ細胞に高い密度の二次担体を提示し、そして多数の他の異なる抗原のための担体を準備した（第１図および第２図）。

抗原をHMWP一次担体にカップリングしたとき、これらの抗原に対する抗体の応答が増強される（第３図および第４図）。接合しないBSAの単一の注射は検出可能な抗体の応答を誘発しないが、Dexに接合されたBSAは10～500μｇ／投与においてすぐれた抗体の応答を誘発する（第３図）。一次担体のDexへの異なるタンパク質の接合は、それらのタンパク質を強く免疫原性とする（第４図）。これらの研究は、ウイルスの抗原（ワクシニアーDex）、細菌の抗原およびトキシン（コレラトキシンーDex）および免疫原性に劣った他の物質を包含した。したがって、二次タンパク質担体は広範な種類のタンパク質、例えば、BSAまたはトキシン／トキソイド、例えば、コレラ、破傷風またはジフテリアを包含することができるであろう。Dex一次担体の方法は変化することができるが、＞70kDaでなくてはならず、そして大きさが約500～2000kDa）において最も有効な分子である（第12図）。しかしながら、HMWPの最適な大きさは利用する特定の一次担体に依存して変化することができる。Dex HMWPは多糖であり、そして免疫欠損マウスはそれに対する抗体の応答をマウントしない。しかしながら、正常マウスおよび免疫欠損マウスの両者はDexにカップリングされたBSAに対して等しくすぐれた抗体の応答を生成する（第10図）。これが証明するよ

うに、一次担体としてDexは単に１種または２種以上の抗原を細胞の多価の配列で提示するマトリックスを提供し、そしてそれ自体免疫原性である必要がない。また、これらの研究が示すように、種々のタンパク質を二次担体として使用することができ、そして二次担体くちワクチン抗原および非免疫原性抗原の両者として働くことができる。

実施例２

二重担体のワクチン構成体がTNPを使用して完全に証明される（第５図）。マウスをTNPで免疫化して二次担体BSA（TNP-BSA）にカップリングさせ、そしてTNP-BSAをまたHMWP一次担体（Dex）にカップリングさせる。二次担体BSA単独へのTNPの接合はTNPへの抗体の応答を増強しなかった。しかしながら、二次担体／TNP複合体を一次担体にカップリングすると、〔（TNP-BSA）－Dex〕はTNPの免疫原性を増強した。さらに、BSA（二次担体）は、Dex単独と、あるいはDexおよびTNPとカップリングしたとき、免疫原性であった。したがって、二重担体のワクチン構成体を使用すると、HMWPは二次担体を有することができ、そして他の抗原を二次担体にカップリングすることができる。抗体は二次担体に対して誘発され、ならびにそれおよび非免疫原性ハプテン分子に接合された抗原は免疫原性とされるであろう。二次担体が抗体がそれに対して保護的免疫性を提供する抗原、例えば、破傷風トキソイドまたはジフテリアトキソイドである場合、これはとくに重要である。このワクチン構成体は、また、多数の無関係の抗原の一次担体へのカップリングを可能とする（第７図）。TNPをOVA（二次担体）にカップリングし、次いでDex（一次担体）に接合した。また、LYSをDexに独立に接合した。抗体は抗原の各々に対して誘発された。こうして、このワクチン構成体のHMWPバックボーンは、二次担体のタンパク質の配列および／または二次担体にカップリングされた多数の異なる抗原をもつ多価ワクチンの生産に適当である。（多担体／多抗原のワクチン）

実施例３

前の実施例において、二重担体のワクチン構成体が種々の抗原で有効であることを示した。このデータは寄生生物（マラリア）誘導ペプチド抗原（p74）を使用して支持され、そして拡張される。二重担体のワクチン構成体は、ペプチド抗原単独または二次担体BSAに接合されたペプチドより有意にすぐれていることが示された（第６図）。P74-BSA接合体をHMWP一次担体（Dex）にカップリングした後にのみ、この小さい抗原に対してすぐれた抗体の応答が誘発された。しかしながら、HMWP担体は抗原を細胞に提示スラリーマトリックスを単に提供し、そして免疫原性である必要がない（第10図）。

実施例４

ワクチンが長期間にわたって免疫性を効果的に増強するためには、すぐれたブースターの応答が重要である。二重担体のワクチンで一次免疫化後、ブースター抗体の応答を接合しない二次担体でさえ誘発することができる（第８図）。さらに、ハプテン化担体を使用したとき、ブースターの応答はTNPおよびBSA二次担体の両者に対して観察された。それ以上の分析において、BSA二次担体に対する一次および二次抗体の応答は長く続く（第９図）。

実施例５

BSA-Dex接合体を分析して、宿主の免疫状態の効果および抗体の応答への免疫化のルートを評価した。免疫学的に成熟した大人および免疫学的に未成熟の子供の両者のマウスは一次担体および二次担体の複合体で効果的に免疫化され、二重担体のワクチンが未成熟の免疫性をもつ子供および若い乳児においてさえ抗体の応答を誘発するであろうことを証明する（第11図）。BSA（二次担体）に対する抗体の応答は、大人および子供の両者のマウスにおいて類似する。さらに、IV，IM、およびSCルートのすべてはBSAに対するすぐれた抗体の応答を誘発した（第13図）。したがって、ワクチン投与のルートは接種のいかなる単一の型にも限定されず、そしてワクチン受容体の年令または免疫学的状態により限定されない。しかしながら、HMWPの大きさは有効なワクチン構成体を得るためには重要である。例えば、HMWP Dexについて、大きさは＞70,000Da、好ましくは＞500,000Daでなくてはならない（第12図）。

実施例６

多数の担体のワクチンの調製は第14図に図解されている。３の二次担体をこの系において使用し、それらの２つはさらに他の部分に接合される。インフルエンザ菌（H. influenzae）PRPを破傷風トキソイドの二次担体にカップリングさせ、マラリア誘導ペプチドを髄膜炎菌外膜タンパク質にカップリングさせ、そしてウイルスのタンパク質（例えば、RSV-Fタンパク質）を接合しないままにする。次いで、各二次担体の１または２以上を高分子量のポリマーのバックボーンに接合する。

実施例７

次の４つのアプローチのいずれかにより、多数の特異性を有するようにワクチンを設計することができる：

（１）２またはそれ以上の構成体、各々は同一の一次担体に接合された異なる二次担体から成る；

（２）２またはそれ以上の異なる構成体、各々は同一の一次担体および二次担体から成るが、異なる部分を有する；

（３）２またはそれ以上の異なる構成体、各々は異なる一次担体、同一の二次担体および異なる部分から成る；および

（４）２またはそれ以上の異なる構成体、各々は異なる一次担体、異なる二次担体および異なる部分から成る。

実施例８

下の図表２および３に記載するように、TNP-BSAに接合されたデキストランを使用する免疫化は、応答の大きさ、持続性などを包含する、抗体の応答の多数のパラメーターを大きく増強した（図表２）。同様に、BSA-デキストランまたはTNP-BSAデキストランを使用する免疫化は、抗体の応答の多数のパラメーターを大きく増強した（図表３）。

図表２

TNP-デキストラン、BSA-デキストランまたはTNP-BSA デキストランにより誘発された抗体の応答の比較

	免疫化	
	TNP-BSA(アジバンドなし)	TNP-BSA デキストラン
	抗－TNP 力価	
A．応答の大きさ	－	＋＋＋＋
B．応答の持続性	－	＋＋＋＋
C．二次応答についてのブースト能力	－	＋＋＋＋
D．新生児の免疫化能力	－	＋＋＋＋
E．B細胞欠損マウスを免疫化する能力	－	＋＋＋＋
F．抗体の活性	－	＋＋＋＋
G．皮下的免疫化能力	－	＋＋＋＋

図表３

TNP-デキストラン、BSA-デキストランまたはTNP-BSA デキストランにより誘発された抗体の応答の比較

	免疫化	
	TNP-Dex	BSA-Dex または TNP-BSA Dex
	抗TNP 力価	抗TNP またはBSA 力価
A．応答の大きさ	＋	＋＋＋＋
B．応答の持続性	７～10日	40～60日
C．二次応答についてのブースト能力	－	＋＋＋＋
D．新生児の免疫化能力	－	＋＋＋＋
E．Ｂ細胞欠損マウスを免疫化する能力	－	＋＋＋＋
F．抗体の活性	低い	高い
G．皮下的免疫化能力	－	＋＋＋＋

実施例９

一次担体としてデキストランおよび二次担体としてジフテリアトキソイド（DT）、百日咳トキソイド（PT）、および破傷風トキソイド（TT）を使用して、３つの二重担体の構成体を調製した。これらの接合体をまずデキストランおよびタンパク質の濃度について分析して、接合の成功を評価した。その後、接合体をマウスの２つの群に注射して、二重担体の免疫原性構成体に対する免疫応答を決定した。

Ａ．材料および方法

１．動物

雌の異系交配マウス（CD－１）、４週齢、を、ャールス・リバー（Charles River）、ウィルミントン、マサチュセッツ州から購入した。

２．試薬

超免疫化抗TTマウスの血清をS. C. Szu博士（Laboratory of Development and Molecular Immunity, NIN, Bethesda）から受け取った。精製したIgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3およびIgMならびにヤギ抗マウスIgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgMのアルカリ性ホスファターゼ接合体をフィッシャー・バイオテクノロジー（Fisher Biotechnology）、スピングフィールド、ニュージャージイ州、から入手した。精製したマウスIgG、精製したヤギ抗マウスIgG（Fab特異的）、ウシ血清アルブミン（BSA）、卵からのアビジン、Brij－35およびホスファターゼ基質をシグマ・ケミカル・カンパニー（Sigma Chemical Co., ミゾリー州セントルイス）から購入した。クロマトグラフィー的に精製された破傷風トキソイド（TT）、百日咳トキソイド（PT）およびジフテリアトキソイド（DT）を、後述するように二次担体の調製のためにならびにELISAをコーティングするために、マサチュセッツ・パブリック・ヘルス・バイオロジカル・ラボラトリーズ（Massachusetts Public Health Biol

ogical Laboratories）（MPHBL）により提供された。
マウスにデキストラン－百日咳トキソイド（PT）接合体（後述するように調製した）を31日の間隔で２回注射し、そして第２回の注射後２週にマウスを採血することによって、抗デキストラン参照マウス血清を調製した。種々のマウスの血清を等しい体積でプールした。同様に、マウスにリン酸アルミニウム吸着（後述する吸着法）DTまたはPTを注射することによって、抗DT参照マウス血清および抗PT参照マウス血清を調製した。
Ｂ．二次担体タンパク質の調製
次の精製および解毒技術により、MPHBLは二次担体タンパク質、DT，PT、およびTTを調製した：
まず破傷風トキソイドを硫酸アンモニウム分画およびセファデックス（Sephadex）G-50およびDEAEカラムクロマトグラフィーにより精製することによって、破傷風トキソイドを調製した。次いで、精製された破傷風トキソイドをホルマリンで解毒した。まずジフテリアトキソイドをホルマリンで解毒し、次いで硫酸アンモニウム分画およびDEAEカラムクロマトグラフィーにより精製することによって、ジフテリアトキソイドを調製した。百日咳トキソイドをアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、次いで百日咳トキソイドをテトラニトロメタンで解毒することによって、百日咳トキソイドを調製した。
セントリコン（Centolicon）30装置（アミコンから）を使用して、ジフテリアトキソイドを10mg／mlに濃縮し、そして破傷風トキソイドを4.7mg／mlに濃縮し、そして百日咳トキソイドを2.8mg／mlに濃縮した。
１／９体積のHEPES緩衝液濃厚物（0.75M HEPES，10mM EDTA，pH7.5）を各トキソイド溶液に添加し、そして12～14モル比のSATA（カルビオケム）をジメチルホルムアミド（DMF）中の25mMまたは0.1Mの原溶液からゆっくり添加した。多分多数の容易にアクセス可能なアミノ基が解毒の間にブロックされたために、方法の下に前述したより高い比の試薬／タンパク質が接合体のすぐれた収率を得るために必要であった。室温において１時間後、誘導トキソイドをP6DGカラム（バイオラド）で酢酸塩緩衝液の中に交換し、そしてセントリコン30を使用して空隙体積中のタンパク質を濃縮した。百日咳トキソイドが濃縮することができる前に、１／９体積のHEPES緩衝液を添加してpHを上昇させることによって、百日咳トキソイドの曇りを最初に除去した。引き続く調製において、調製をHEPES緩衝液pH7.5の中に交換した。この溶液は透明に止まった。
Ｂ．一次担体の調製
一次担体は方法において前述したように調製した。簡単に述べると、高分子量のアミノエチルカルバミルデキストラン（約２×10^6ダルトン）（トリチウムで軽度に放射線標識化された）をSIAPでヨードアセチル化し、そして酢酸塩緩衝液（10mM酢酸ナトリウム、２mM EDTA，0.1M NaCl，0.02%アジ化ナトリウム）の中に交換し、そして濃縮した。
Ｃ．デキストランへのトキソイドの接合
接合体は前述のヘテロライゲイション化学の変法を使用して調製した（Brunswickら、Monginiら）。簡単に述べると、アセチル－チオレート化トキソイドをヨードアセチル化デキストランのおだやかに撹拌した溶液に添加した。pHを上昇させ、そしてほぼ１／９体積の0.5Mのヒドロキシルアミンを含有する濃HEPES緩衝液の添加によりチオールを脱保護した。この溶液は重量基準でほぼ等しい量の毒性およびデキストランを含有した。最終トキソイド濃度は５mg／ml（DT）、1.1mg／ml（PT）および5.9mg／ml（TT）であった。
４℃において一夜反応させた後、接合体を0.2mMのメルカプトエタノールで１時間処置し、次いで10mMのヨードアセトアミドで10分間処置した。次いで、接合体をPBSと平衡化したS300SFまたはS400SFの１×58cmのカラム（ファーマシア）のゲル濾過により分画した。次いで、接合体を含有する空隙体積のピークをプールし、そしてミレックス（Millex）HV（0.45μｍ）のフィルター（ミリポア）を使用して滅菌濾過した。
３種類のトキソイドのうちで、百日咳は接合のプロトコールに対してとくによく応答した。第15図に記載するように、高い百分率の百日咳トキソイドはデキストランとの高分子量の接合体に変換した。最大の15アミノ基、および多分多数のこれより少ないアミノ基がトキソイド上で修飾されたと、推定される。

D．接合の成功の決定
３種類の接合体の各々のタンパク質濃度をOD280により決定し、そしてミクロBCAアッセイ〔ピアース（Pierce）〕により標準としてMPHBLから入手した精製されたトキソイドを使用して確証した。デキストラン濃度をトリチウム化AECMデキストランの比活性から決定した。これらの結果を後述する：

	タンパク質（mg／ml）	タンパク質/dex（モル）	タンパク質/dex（W/W）
1．DTxd-dex	0.34	12	0.6
2．PTxd-dex	0.73	14	0.7
3．TTxd-dex	0.43	22	1.1

タンパク質／デキストランの重量／重量は、接合法がトキソイドをデキストランに首尾よくカップリングしたことを示す。これらの結果はオークタロニーのプレート上の分析により確証された。
D．リン酸アルミニウム上への接合体の吸着
各トキソイドに対応する流体の接合体に加えて、各接合体の試料をアジュバントのリン酸アルミニウム上に吸着させた。塩化アルミニウムおよびリン酸４ナトリウムの沈澱によりつくった新しく調製したリン酸アルミニウムゲル（pH6.0）の４mg／ml上に、各試料を吸着させた。チメロサルを0.01%（ｗ／ｖ）の最終濃度で添加した。調製物を室温において一夜震盪した。
E．マウスの免疫化
１．最初の実験のために、５匹のマウスの群に流体として、あるいはアジュバントのリン酸アルミニウム上に吸着された種々の接合体を注射した。マウスについての種々の接合体の投与量は、マウスにおいてタンパク質に対する抗体の応答を生成するタンパク質の投与量に基づいて選択した。第16図はマウスに注射された種々の接合体の投与量を示す。同一の投与量を流体の接合体およびリン酸アルミニウム吸着接合体について使用した。吸着された調製物について、各マウスについてリン酸アルミニウムの投与量は0.4mg／mlであり、これは吸着された破傷風トキソイドについてMPHBLから入手したアジュバントのヒト投与量の１／５である。各マウスに0.1mlの適当な濃度に希釈された流体または吸着された接合体を皮下注射した。
マウスを２，４および８週に採血し、そして血清を分離した。１つの群についての血清を等しい体積でプールした。
２．第２実験を実施して種々の接合体の中に存在するデキストランの同一の投与量に対するマウスの免疫応答を研究し、そして接合体のブースターの投与量を評価した。第19ａ図に記載するように、10匹のマウスの群に、種々の接合体中のデキストランまたは遊離デキストランの２μｇ／マウスを31日の間隔で２回皮下注射した。マウスを第１回の注射後４週および第２回の注射後２週に採血した。血清を分離し、そして個々のマウスの血清を抗デキストランまたは抗タンパク質抗体について、後述するように、ELISAにより評価した。
F．酵素結合免疫吸着アッセイ
抗デキストラン参照マウスの血清を、それぞれ、抗原特異的IgG，IgMおよびIgGアイソタイプについて標準化した。超免疫化抗破傷風トキソイド参照マウス血清、抗ジフテリアトキソイド参照マウス血清および抗百日咳トキソイド参照マウス血清を、次の文献に記載されている方法により、それぞれの抗原特異的IgGについて標準化した：W．D．BollingerおよびJ．W．Nosleg、クラス特異的抗体の定量についての固相イムノアッセイの標準化に対する一般的アプローチ、J．Immunol．Methods 1981，46，129-140、変更を加えた。
100μｌのリン酸塩緩衝液（PBS）pH7.2中で５μｇ／mlに希釈した特定の抗原、ここでTT，PTまたはDTで室温において一夜コーティングした、高い結合性の洗浄容易なマイクロタ

イタープレート〔コーニング・グラス・ワークス（Cornig Glass Works）、コーニング、ニューヨーク州〕上でELISAを実施した。プレートをすべてのステップの間において0.05％ツイーン20を含有するPBSで洗浄した。0.1％Brij35および0.5％BSA（PBB）を含有するPBS中の参照血清および被験血清の系統的２倍希釈をプレートの中で実施した。プレートを室温に２時間保持し、そして洗浄した。PBS中で希釈したアルカリ性ホスファターゼ標識化ヤギ抗マウスIgG，IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG3またはIgMをそれぞれのプレートを添加した。プレートを再び室温において２時間保持し、そして洗浄した。最後に、１Ｍジエタノールアミン－0.5mM塩化マグネシウム緩衝液pH9.8中で１mg／mlに希釈した100mlのホスファターゼ基質を各ウェルに添加した。プレートをELISAリーダー（Titertek Multiskan Plus、フロー・ラボラトリーズ）で405nmの波長で読んだ。抗原特異的抗体（μｇ／ml）を標準曲線からロドバード（Rodbard）変換を使用して外挿した。抗デキストランELISAについて、最初にプレートをアビジンで一夜コーティングし、次いでPBS中のビオチニル化デキストランの１μｇ／mlの溶液を室温において１時間の間添加した。このELISAは、プレートをデキストランで直接コーティングしたときのものに対する30の血清血漿について抗デキストランIgGの非常に類似する結果を与えた。したがって、大部分の実験はプレートをデキストランで直接コーティングすることによって実施した。

Ｇ．結果

１．単一の注射

前の実施例において使用したマウスと異なり、この実験は若いマウスに集中した。これらのマウスは、序論および第11図に記載するように、接合しないデキストランおよび他のＴ独立性抗原に対してよく応答しない。当業者は知るように、２才以下の若い子供は、また、２型のＴ独立性抗原に対してよく応答しない。したがって、これらの結果は若い子供にいっそう直接に適用可能である。

これらのマウスは２週で抗体を誘発し、そして高度にレベルで少なくとも８週間持続した。第16図に記載するように、誘発された主要なアイソタイプはIgG1，IgG3、およびIgGMであった。さらに、PT-dexは低いレベルのIgG2aおよびIgG2bを誘発した。また、第16図が証明するように、リン酸アルミニウム吸収接合体を注射したマウスは流体の調製物を注射したものより高いレベルのIgGおよびIgMを示した。

さらに、二次担体のDT，TT、およびPTに対する抗体の応答を評価し、そして第17図の（ａ），（ｂ）、および（ｃ）に記載する。各場合において、接合体を注射したマウスは少なくとも２週までにタンパク質成分に対する抗体を示し、そしてそれらの抗体の持続は少なくとも８週であった。同様に、リン酸アルミニウムへの吸収は免疫応答を増強した。

そのうえ、これらのデータは二重担体の各成分についての既往応答を明瞭に証明する。

免疫原性破傷風トキソイドで期待されるように、接合した形態および接合しない形態の両者に対する抗体の応答が存在した。しかしながら、劣った免疫原性のジフテリアトキソイドおよび百日咳トキソイドでは、接合した形態に対して免疫応答の顕著な増強が存在した。

第16図および第17図は、一緒に、本発明の接合体を使用して達成された二重および逆の免疫増強証明する。

さらに詳しくは、破傷風トキソイドの中和活性を第18図に記載するように評価した。0.01抗トキシン単位（Au）またはそれより大きい血液レベルは、破傷風トキソイドに対する保護を提供すると考えられる。こうして、接合体は、流体の接合体について４週以内にそしてリン酸アルミニウムのアジュバント上に吸収された接合体について２週以内に、0.1および1.0μｇの投与量で破傷風トキソイドに対して保護的レベルの抗体を誘発した。

２．ブースターの注射

第19ａ図に記載するように、変化する量のタンパク質に対して一定量のデキストランをマウスに注射した。また、この図表が証明するように、各接合体は二次担体（トキソイド）に対する免疫応答を誘発した。第９（ｂ）図が示すように、接合しないデキストラン単独は、２回の投与後、種々の接合体により誘発された抗デキストラン抗体レベルと比較して非常に低いレベルのIgG3およびIgMを誘発する。第１実験において観察されるように、デ

キストラン－PT接合体は他の接合体より比較的大きいレベルのIgG2aおよびIgG2bを誘発した。
第19図の部分（ａ）および（ｂ）は、一緒に、本発明の接合体を使用して達成された二重および逆の免疫増強を証明する、すなわち、二次担体の接合は一次担体に対する応答を増強し、そして逆が成り立った。
実施例10
高分子量の一次担体のインフルエンザ菌ｂ型の炭水化物（ポリリボシルリビトールホスフェート「PRP」）（これはまた臨床的に関係する）に接合された、ジフテリアトキソイド、百日咳トキソイド、破傷風トキソイドを有する二重担体の免疫原性構成体（これらは臨床的に関係するタンパク質の二次担体である）の合成を下に説明する。すべての個々の成分はヒトにおける使用について既に承認されてきていることに注意すべきである。
Ａ．二次担体の調製
トキソイドをセントリコン30を使用して構成した。ジフテリアトキソイド（DT）を5.25mg／mlに、百日咳トキソイド（PT）を2.6mg／mlに、そして破傷風トキソイド（TT）を3.2mg／mlに、それぞれ、濃縮した。１／９体積の濃HEPES緩衝液を添加した。SPDP（シグマまたはカルビオケムから入手可能である）をDTのおだやかに撹拌した溶液に16：１のモル過剰量でそしてTTに20：１モル過剰量で添加した。PTについて、試薬SATAを11：１の比（DMF中の原溶液）をおだやかに撹拌した溶液に添加した。
２つの試薬SATAおよびSPDPは、当業者に知られている異なる利点をもって、異なるように保護されたチオールを生成した。簡単に述べると、SATAの生成物はアセチルチオールであり、これはヒドロキシルアミンでゆっくり脱保護されるが、SPDPの生成物はチオ－ピリジル基である。後者はDTTで急速に除去されて生成物を豊富に生成し、チオール基の数の容易な定量を可能とする。SATAは炭水化物をヨードアセチル化するとき選択する試薬であることができる。なぜなら、チオール脱保護試薬のヒドロキシルアミンは適合性であるからである。炭水化物をマレイミドで誘導し、そして脱保護試薬を接合の前に除去しなくてはならないとき、SPDPは好ましいことがある。
１～２時間後、DTおよびTTの溶液をP6DGカラム上で酢酸塩緩衝液の中に交換し、濃縮し、そして20分間ジチオスレイトール（DTT）中で50mMにした。PT溶液を30分間ヒドロキシルアミン中で50mMにし、次いで、PTは低いpHで沈澱することがあるので、HEPES緩衝液と平衡化したP6DGカラム上で脱塩した。チオール化トキソイドをセントリコン30で濃縮した。チオール／トキソイドのモル比はDTについて6.5であり、そしてTTについて4.7であった。それはPTについて決定しなかった。
Ｂ．一次担体の調製
高分子量のインフルエンザ菌ｂ型の炭水化物（ポリリボシルリビトールホスフェート＝PRP）を臭化シアン法を使用してアジピン酸ジヒドラジドで誘導し（PRP-AP）次いでゲル濾過により大きさで分画した。（Cruse J. M., Lewis R. E. Jr.編、Conjugate vaccines in Contributions to Microbiology and Immunology, Vol. 10, 1989）。最終生成物は300kDaみら平均分子量およびほぼ16ヒドラジド基／300kDaの炭水化物を有した。PRP-AHは、マサチュセッツ・パブリック・ヘルス・バイオロジカル・ラボラトリーズ（Massachusetts Public Health Biological Laboratories）（MPHBL）、ボストン、マサチュセッツ州、から提供された。
PRP-AHを次の方法に従いさらに誘導した。より高い濃度の架橋剤および／またはより長いインキュベーション時間を使用して、AECM－デキストランのアミノ部分のそれと比較して、減少したヒドラジド基の反応性を補償した。
大部分の調製物について、PRP-AHをヨードアセイル比（SIAPを使用する）の代わりに試薬GMBS（カルビオケム）でマレイル化することによってチオール反応性とした。なぜなら、マレイミド濃度は304nmにおけるその吸収から容易決定することができるからである（吸光係数－620 M^{-1}（Kitagawa, T.ら、J. Biochem. 94：1160（1983））。さらに、マレイミド基は（１）ヨードアセチル基よりいっそう反応性であり、反応時間をより短くし、そして（２）加水分解しそしてそれゆえ必然的にメルカプトエタノールによるクェンチング

を必要としない、チオール感受性タンパク質についての１つの利点。マレイミド基の欠点は比較的かさ高いことであり、これは追加のエピトープを導入することがあり、そして加水分解が活性基の数を減少することであり、これは架橋の程度を減少する。しかしながら、特定の試薬および条件を選択して安定性改良した（例えば、アルキルマレイミド、高い試薬濃度および短い反応時間およびpH５の脱塩工程）。また、デキストランの接合体とともに使用したように、ヨードアセチル化試薬を使用してPRP-AHを調製した。

マレイミド－PRPの１例は次の通りである。40μｌのマレイミド試薬GMBS（DMF中の0.1 Ｍ）（カルビオケム）を、157μｌ HEPES緩衝液中の２mgのPRP-AHの撹拌した溶液に添加した（最終濃度：75mM HEPES，１mM EDTA，0.02%アジド、pH7.5）。室温において２時間後、この溶液を酢酸塩緩衝液（10mM 酢酸ナトリウム、0.1 Ｍ NaCl，２mM EDTA，0.02%アジ化ナトリウム）と平衡化したP6DG（バイオラド）で脱塩し、そして空隙体積をセントリコン30（アミコン）で0.47mlに濃縮した。304nmにおける620 M^{-1}の吸光係数を使用して、マレイミドの濃度は225μＭであると推定された。残留ヒドラジド含量はTNBSアッセイ（吸光係数＝17400 M^{-1}、498nmにおいて、ヒドラジドについて）を使用して４μＭより少ないと推定された。こうして、誘導は本質的に完結したと判定された。百日咳トキソイドを有する接合体の調製において、誘導されたPRPを酢酸塩緩衝液の代わりにHEPES緩衝液pH7.5と平衡化されたカラムで脱塩した。

Ｃ．PRPへの二次担体の接合

チオール化DTおよびTTを窒素雰囲気下に脱酸素したPRP-マレイミドの撹拌した溶液に添加し、そして１／９体積の濃HEPES緩衝液の添加によりpHを上昇させ、そして室温において一夜した。チオール化PTをPRP-マレイミドの撹拌した溶液に添加し、そして４℃において一夜放置した。一夜反応させた後、この溶液を１時間0.2mMのメルカプトエタノールとし（加水分解しないマレイミドを完全に除去し）次いで10mMのヨードアセトアミドの中に10分間放置した（すべての遊離のチオールを消費した）。溶液をS300SFまたはS400SFカラムのゲル濾過により分画して、接合しないPRPおよびトキソイドを除去した。高分子量の接合体をセントリコン30で濃縮し、そして滅菌濾過した。

第20図に記載するように、ジフテリアトキソイドは非常に首尾よく高分子量のPRPとの接合体に変換した。７より少ないアミノ基がトキソイド上で修飾されたことが推定される。

最終生成物の組成は次の通りであった：

トキソイド	キソイド／PRP(モル) (PRP ＝300 kDa)	トキソイド (w/w)
DT	4.5	0.8
PT	5.4	2.9
TT	3.9	1.9

これらのデータ、とくに重量／重量の測定値は接合の成功を証明している。

この方法は、（１）化学の詳細、とくにチオーエーテル結合の使用および（２）高分子量のPRPの使用、（３）クロマトグラフィーにより精製したトキソイドの使用および（４）とくにアクセルラー（accellular）百日咳トキソイドの使用において、他の既知の接合と異なるとわれわれは信ずる。

本発明の他の態様は、この明細書およびここに開示した本発明の実施を考慮すると当業者にとって明らかであろう。明細書および実施例は例示として考慮され、本発明の真の範囲および精神は次の請求の範囲により示されることを意図する。

【図１】

古典的抗原構成体

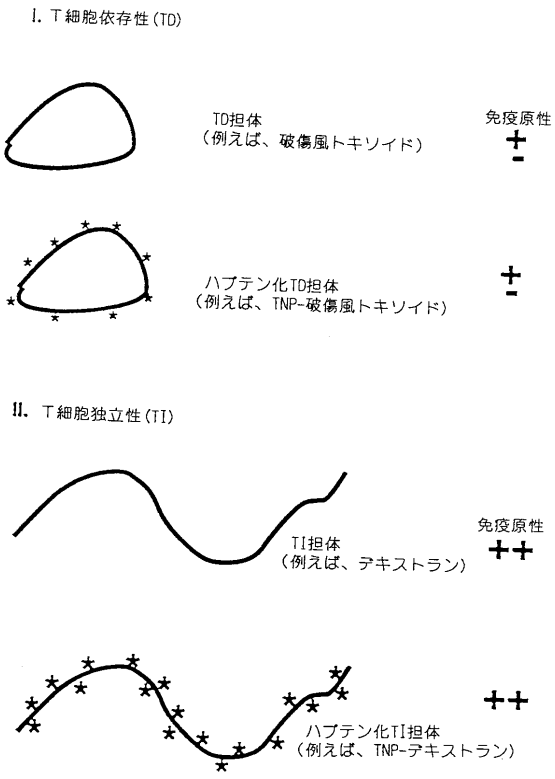


Fig.1

【図２】

二重担体ワクチンのモデル

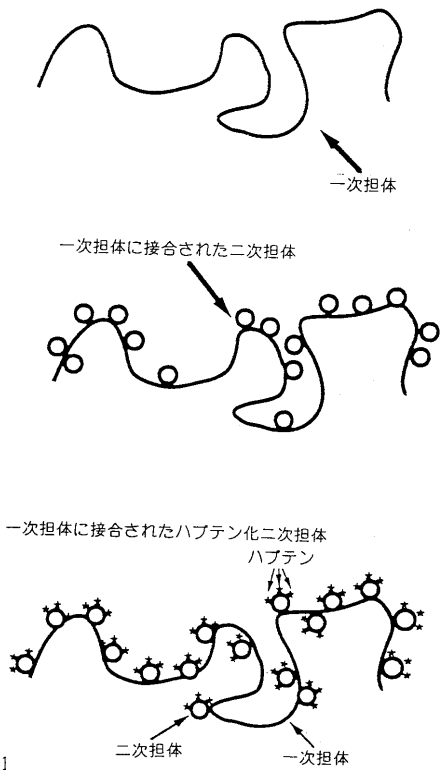


Fig.2

【図３】

BSA-Dexに対する投与量の応答

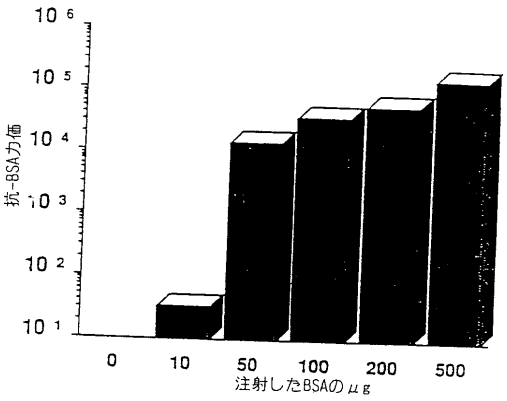


Fig.3

【図４】

デキストランへの接合は多数のタンパク質の免疫原性を増強することができる

抗原	比力価
1. オバルブミン-DEX	364
2. βラクトグロブリンB-DEX	337
3. リゾチーム-DEX	1666
4. アプロチニン-DEX	261
5. ワクシニア-DEX	12,800
6. コレラトキシン	794
7. コレラトキシン-DEX	12,433
8. 破傷風トキソイド-DEX	1,761
9. 上記非接合Agのすべて（コレラトキシンを除外する）	< 10

Fig.4

【図５】

ハプテン化BSAに対する応答

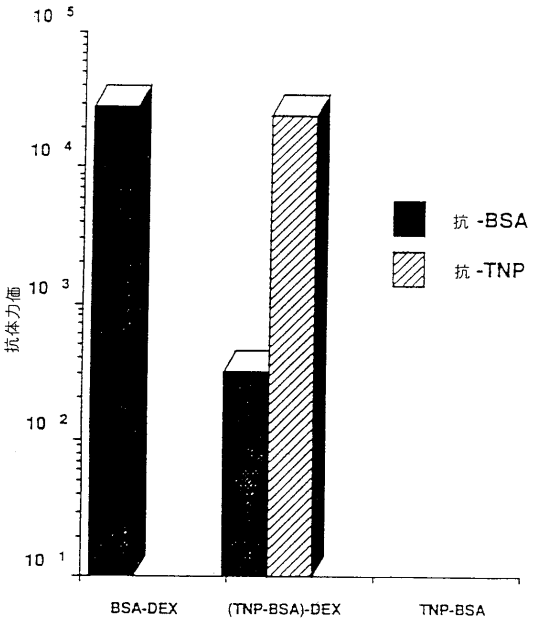


Fig.5

【図６】

抗ペプチドの応答

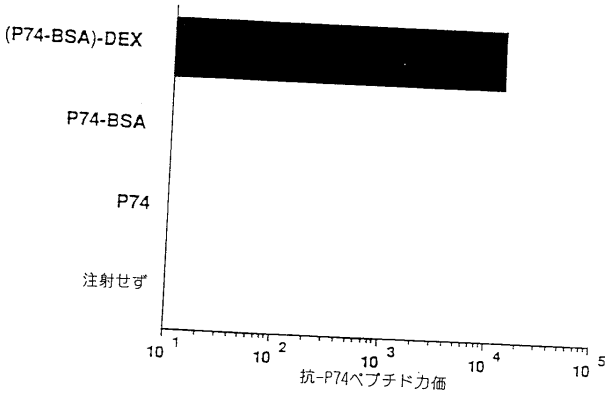


Fig.6

【図７】

デキストランの多数の抗原

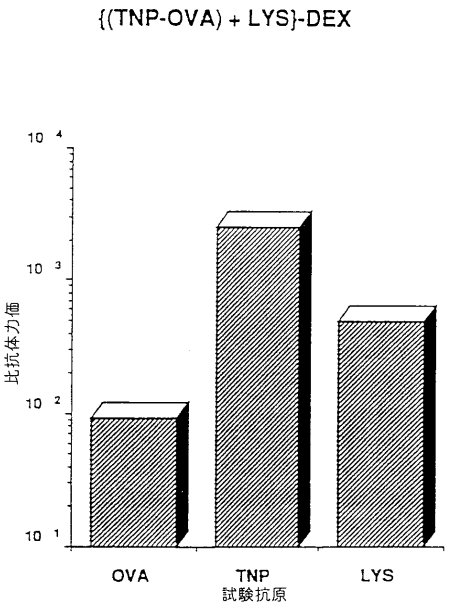


Fig.7

【図８】

ハプテン化BSA-Dexのブースティング

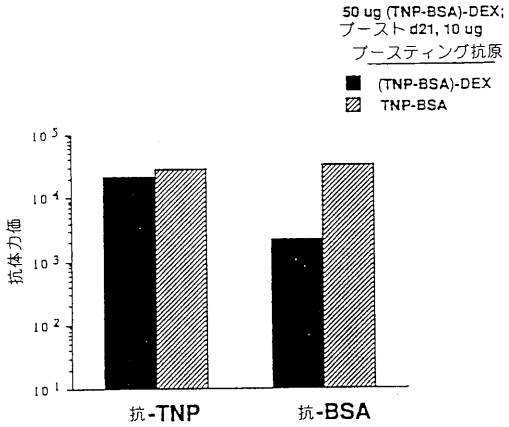


Fig.8

【図９】
BSAでブースティングしたBSA-Dexの反応速度論

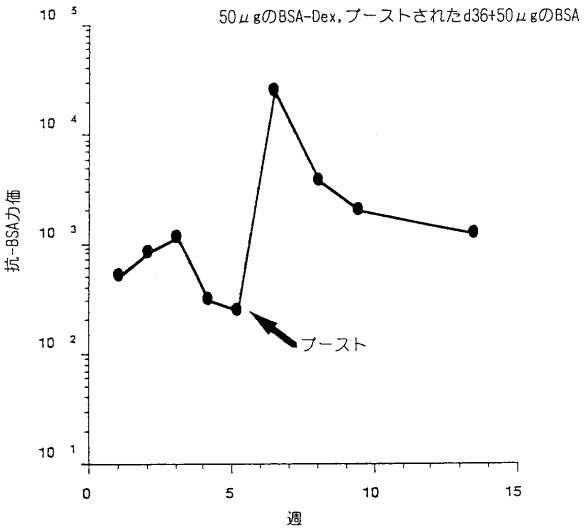


Fig.9

【図１０】
抗体の応答はデキストラン担体の認識に依存しない

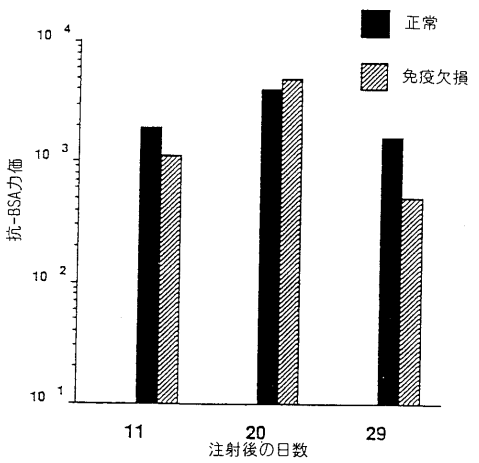


Fig.10

【図１１】
BSA-Dexは子供のマウスにおいて免疫原性である

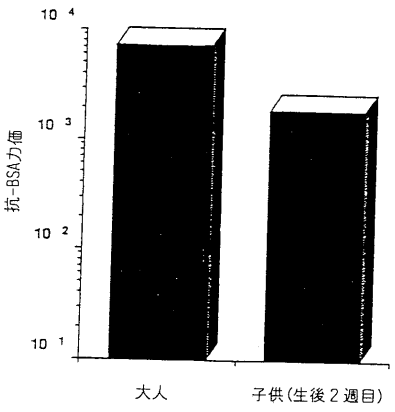


Fig.11

【図１２】

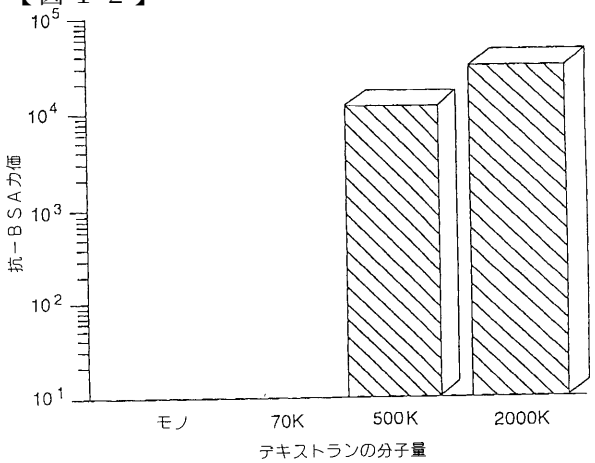


FIG. 12

【図１３】

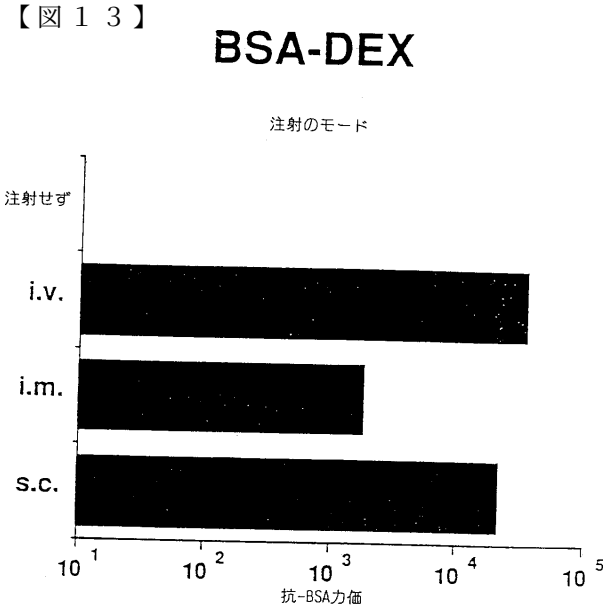


Fig.13

【図１４】

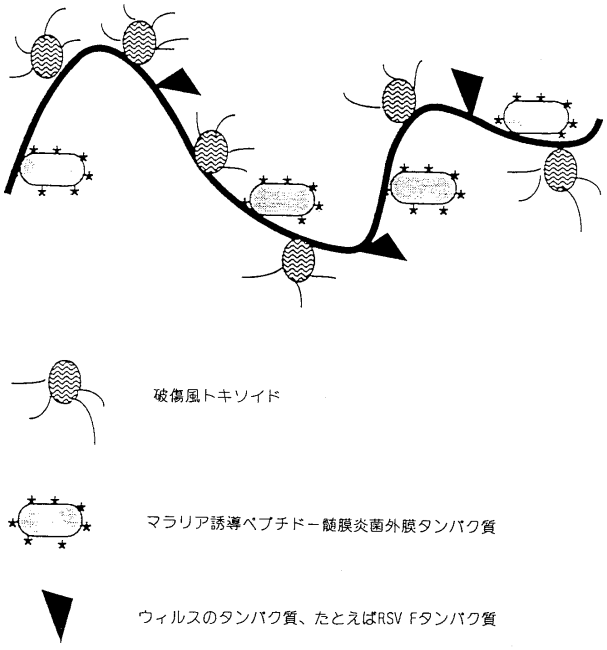


Fig.14

【図１５】

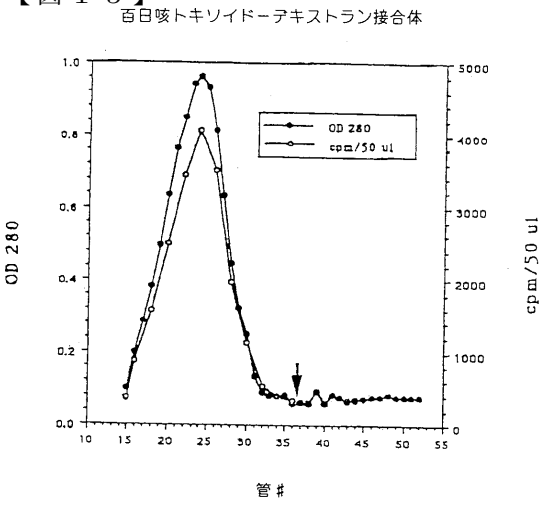


Fig.15

【図１６】

テキストラン－破傷風トキソイド、テキストラン－ジフテリアトキソイド又は
テキストラン－タンパク質を流体として、あるいはリン酸アルミニウム上に
吸収させて注射したマウスの抗テキストランサブクラスIgG及びIgMの応答

抗テキストランサブクラスIgG及びIgM(μg/ml)

接合体	投与量(μg)/マウス	デキストラン	タンパク質	2週 IgG	2週 IgG1	2週 IgG2a	2週 IgG2b	2週 IgG3	2週 IgM	4週 IgG	4週 IgG1	4週 IgG2a	4週 IgG2b	4週 IgG3	4週 IgM	8週 IgG	8週 IgG1	8週 IgG2a	8週 IgG2b	8週 IgG3	8週 IgM
破傷風ｱｷｿｲﾄﾞ	0.9			0.53	0.26	<0.05	0.09	0.51	14.63	0.33	3.88	<0.05	0.31	4.98	17.51	16.72	15.22	<0.05	0.60	8.71	18.11
破傷風ｱｷｿ流体	0.09		0.1	0.54	0.29	<0.05	0.13	0.52	15.32	5.41	5.00	<0.05	0.37	5.75	16.82	17.56	14.38	<0.05	0.57	11.56	17.80
ｼﾞﾌﾃﾘｱﾄｷｿﾎﾞ	0.9		1	0.16	0.17	<0.05	0.11	<0.1	7.89	1.93	1.45	<0.05	0.09	1.97	11.04	5.10	5.62	<0.05	0.25	4.29	11.83
ｼﾞﾌﾃﾘｱﾄｷｽ流体	0.09		0.1	0.29	0.21	<0.05	0.08	0.24	4.46	1.46	0.70	<0.05	0.13	3.21	4.42	1.65	1.24	<0.05	0.26	3.57	4.66
破傷風ｱｷｿﾎﾞ	16.9		10	0.32	0.16	<0.05	0.09	0.23	12.31	1.55	0.99	<0.05	0.29	0.60	11.45	3.18	3.21	<0.05	0.42	0.72	10.41
破傷風ｱｷｿ流体	1.69		1	1.05	1.41	<0.05	0.08	1.08	21.81	4.89	3.92	<0.05	0.16	1.20	25.45	10.45	13.69	<0.05	0.30	8.01	27.19
ｼﾞﾌﾃﾘｱﾄｷｿﾎﾞ	16.9		10	1.15	0.36	<0.05	0.16	1.68	18.05	8.60	5.92	<0.05	0.48	11.90	19.18	11.06	10.73	<0.05	0.84	24.90	10.17
ｼﾞﾌﾃﾘｱﾄｷｽ流体	1.69		1	0.07	<0.1	<0.05	0.05	0.10	4.75	0.77	0.83	<0.05	0.11	0.29	4.67	1.95	3.03	<0.05	0.23	0.08	5.08
百日咳ｱｷｿﾎﾞ	2.07		2	6.74	2.21	.09	0.59	9.82	67.50	38.78	23.40	0.10	2.40	45.65	76.50	70.80	51.43	0.21	2.40	99.60	54.00
百日咳ｱｷｿ流体	2.07		2	6.71	5.37	<0.05	0.16	2.62	61.00	75.22	75.63	<0.05	0.49	24.90	85.50	37.06	40.40	0.17	0.65	31.13	58.50

Fig.16

【図１７】

FIGURE 17

流体としてあるいはリン酸アルミニウム上に吸収させた
トキソイドーデキストラン[2]に対するマウス[1]のプールした
血清中の抗体の応答

A. 破傷風トキソイドーデキストラン接合体

調製物	投与量 μg	2週	4週	8週
破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞ流体	1	33.3	60.4	35.9
破傷風ｱｷｽﾄ流体	1	5.5	24.8	28.3
破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞAlPO	1	129.2	275.2	172.0
破傷風ｱｷｽAlPO	1	77.6	193.4	130.6
破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞ流体	0.1	9.9	8.4	1.9
破傷風ｱｷｽﾄ流体	0.1	1.9	11.9	13.8
破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞAlPO	0.1	39.4	73.0	94.8
破傷風ｱｷｽﾄAlPO	0.1	40.1	163.6	99.0
生理食塩水対照		<0.04	<0.04	<0.04

B. ジフテリアトキソイドーデキストラン接合体

調製物	投与量 μg	2週	4週	8週
ｼﾞﾌﾃﾘｱDCP-52流体	10	<0.1	0.2	0.3
ｼﾞﾌﾃﾘｱｰｱｷｽ流体	10	3.2	11.5	13.7
ｼﾞﾌﾃﾘｱDCP-52AlPO	10	15.0	42.9	190.0
ｼﾞﾌﾃﾘｱｰｱｷｽ流体	10	50.4	140.0	150.0
ｼﾞﾌﾃﾘｱDCP-52流体	1	<0.1	<0.1	<0.1
ｼﾞﾌﾃﾘｱｰｱｷｽ流体	1	1.8	5.3	8.8
ｼﾞﾌﾃﾘｱDCP-52AlPO	1	9.9	36.9	39.9
ｼﾞﾌﾃﾘｱｰｱｷｽAlPO	1	12.2	72.8	83.9

C. 百日咳トキソイドーデキストラン接合体

調製物	投与量 μg	2週	4週	8週
百日咳ﾌﾟﾙC.流体	2	0.6	1.2	1.4
百日咳ｱｷｽ流体	2	1.7	23.0	64.7
百日咳ﾌﾟﾙC.AlPO	2	24.7	115.5	306.0
ﾌﾟﾙｰｱｷｽAlPO	2	61	45.2	136.0
対照		<0.04	<0.04	<0.04

1/ 5匹のCD-1雌4週齢マウスの群

2/ クロマトグラフィー精製した破傷風トキソイドのロットCP-49

【図１８】

Fig. 18

破傷風トキソイドーデキストラン接合体、流体としてあるいはリン酸アルミニウムに接合した破傷風トキソイドに対するマウスの抗体の応答

中和力価（AU/mℓ）

調製物	投与量 (μg)	2週 プールした血清	4週 プールした血清	8週 プールした血清
破傷風トキソイド流体	1	0.037	0.24	0.5
破傷風-アキス流体	1	<0.01	0.12	0.4
破傷風トキソイドAlPO$_4$	1	0.05	0.75	4.0
破傷風-アキスAlPO$_4$	1	0.06	0.6	3.2
破傷風トキソイド流体	0.1	<0.01	<0.025	0.0125
破傷風-アキス流体	0.1	<0.01	0.05	0.2
破傷風トキソイドAlPO$_4$	0.1	0.02	0.13	0.6
破傷風-アキスAlPO$_4$	0.1	0.037	0.3	1.0
生理食塩水対照		<0.01	<0.01	<0.01

【図１９ａ】

表４：デキストラン－タンパク質接合体で注射した
マウス(CD-1,雌４週齢、10匹/群)の血清中の
抗タンパク質抗体レベル

接合体	タンパク質の投与量	幾何平均IgG[a]（μg/mℓ） 1投与後	2投与後
ｱｷｽﾄﾗﾝ-TT	2.2 μg	25.01	66.65
ｱｷｽﾄﾗﾝ-DT	1.2 μg	2.63	44.03
ｱｷｽﾄﾗﾝ-PT	1.4 μg	6.23	193.29

各マウスに第０日及び31日にデキストラン－タンパク質接合体を
注射した。マウスを第１回の投与後及び第２回の投与後２週に
採血した。

a:接合体の中に使用したそれぞれのタンパク質に対する
ELISAによる抗体のレベル。

【図１９ｂ】

Fig. 19a

デキストラン－タンパク質接合体で注射したマウス(CD-1,雌４週齢、10匹/群)
の血清中の抗タンパク質抗体レベル

抗体（幾何平均μg/mℓ）

調製物	1投与後 IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	2投与後 IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
破傷風-ｱｷｽ	1.16 a	1.39 c	0.05	0.34 l	1.74 m	11.36 q	23.07 A	14.89 G	0.05 I	0.90 L	11.05 P	24.61 T
ｼﾞﾌﾃﾘｱ-ｱｷｽ	1.07 b	0.41 f	0.05	0.29 j	0.76 n	8.31 r	8.12 n	4.82 F	0.05 J	0.29 N	3.06 O	19.99 U
百日咳-ｱｷｽ	3.16 c	2.27 E	0.06	0.39 k	1.75 o	17.44 t	67.59 C	49.70 G	0.14 K	2.06 N	16.12 R	76.36 V
ｱｷｽﾄﾗﾝ	0.05 d	0.05 h	<0.05	0.14 l	0.08 p	2.55 l	0.08 D	0.09 H	<0.05	0.14 O	0.32 S	6.07 W

各マウスに第０日及び31日に２μgの遊離デキストラン又はデキストランの
接合体を注射した。マウスを第１回の投与後４週及び第２回の投与後２週に
採血した。

Fig. 19b

【図２０】

ジフテリアトキソイドPRP接合体

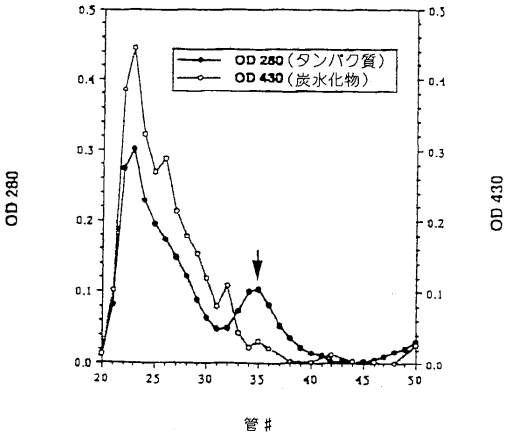


Fig.20

フロントページの続き

(72)発明者 モンド，ジェームス ジェイ.
アメリカ合衆国，メリーランド ２０８５４，ポトマック，グリーンリーフ アベニュ １１８０４
(72)発明者 リース，アンドリュー
アメリカ合衆国，メリーランド ２１２１８，ボルチモア，ビークウッド プレイス３０２

合議体
審判長 塚中 哲雄
審判官 谷口 博
審判官 弘實 謙二

(56)参考文献 特開昭５９－５０１３６０（ＪＰ，Ａ）
米国特許第４６４４０５９（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ３９／３８５
Ａ６１Ｋ４９／００
Ｇ０１Ｎ３３／５３１