

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6273200号
(P6273200)

(45) 発行日 平成30年1月31日(2018.1.31)

(24) 登録日 平成30年1月12日(2018.1.12)

(51) Int.Cl.		F I			
CO8B	37/00	(2006.01)	CO8B	37/00	P
A61K	31/739	(2006.01)	A61K	31/739	
A61P	37/06	(2006.01)	A61P	37/06	

請求項の数 36 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2014-520302 (P2014-520302)	(73) 特許権者	501368643
(86) (22) 出願日	平成24年7月12日(2012.7.12)		ザ・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2014-520932 (P2014-520932A)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ボストン, フランシス・ストリート 75
(43) 公表日	平成26年8月25日(2014.8.25)	(74) 代理人	100102842
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/046384		弁理士 葛和 清司
(87) 国際公開番号	W02013/009945	(72) 発明者	カスパー, デニス, エル.
(87) 国際公開日	平成25年1月17日(2013.1.17)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2445, ブルックライン, ハイスロップ ロード 15
審査請求日	平成27年7月9日(2015.7.9)		
(31) 優先権主張番号	61/507,074		
(32) 優先日	平成23年7月12日(2011.7.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

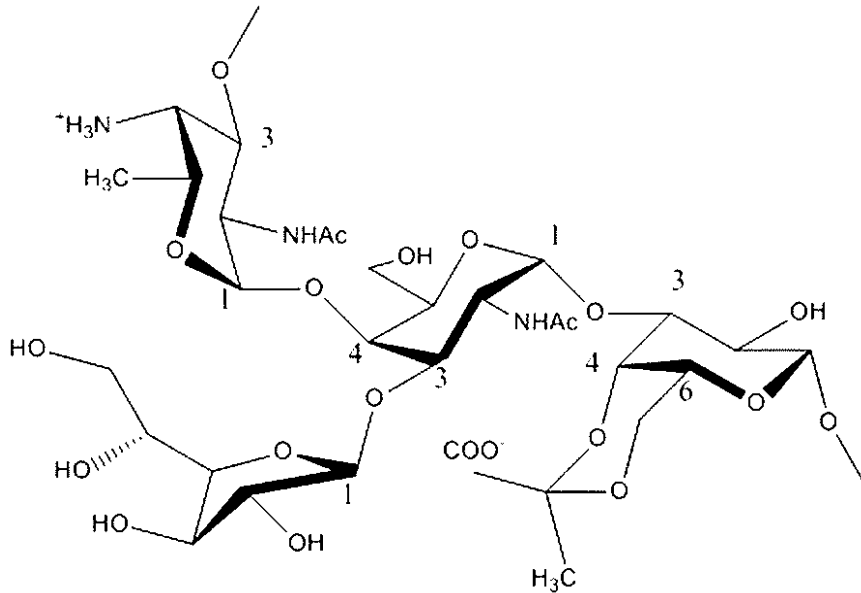
(54) 【発明の名称】 脂質含有P S A 組成物、その単離の方法および使用の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂質に共有結合した多糖 A (P S A) を含む 単離された 脂質付加 P S A、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、医薬組成物であって、
P S A が、

【化 1】



10

で表される反復四糖単位によって特徴付けられる構造を有する、前記医薬組成物。

【請求項 2】

ヒトに投与するための、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 3】

脂質が、単離された脂質付加 P S A の 0 . 1 ~ 2 % (w / w) である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

脂質が、単離された脂質付加 P S A の 0 . 1 ~ 1 % (w / w) である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

0 . 5 % (w / w) またはそれより少ない L P S を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

薬学的に受容可能なキャリアが経口投与可能であって、経口投与用処方物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 7】

経口投与用処方物が、カプセル、錠剤またはロゼンジである、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

非経口投与用処方物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

薬学的に受容可能なキャリアが、緩衝化剤および / または保存剤を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 10】

穏和な加水分解の後、16.5%の T r i s - トリシン SDS - P A G E ゲル上で流れ、硫酸亜鉛およびイミダゾールを用いてリバー染色された場合に、単離された脂質付加 P S A が、60 k D より上における P S A のバンドおよび約 5 k D における非 L P S 脂質のバンドを示す、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

脂質および P S A が、ヘビ毒ホスホジエステラーゼによる切断に対して感受性ではない結合によって共有結合した、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

単離された脂質付加 P S A が、99% (w / w) の P S A および 0 . 5 % (w / w) の

50

脂質を含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

単位投与形態で提供される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

緩衝化剤を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

単離された脂質付加 P S A の無菌の水性調製物を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

血液と等張である、請求項 1 5 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 7】

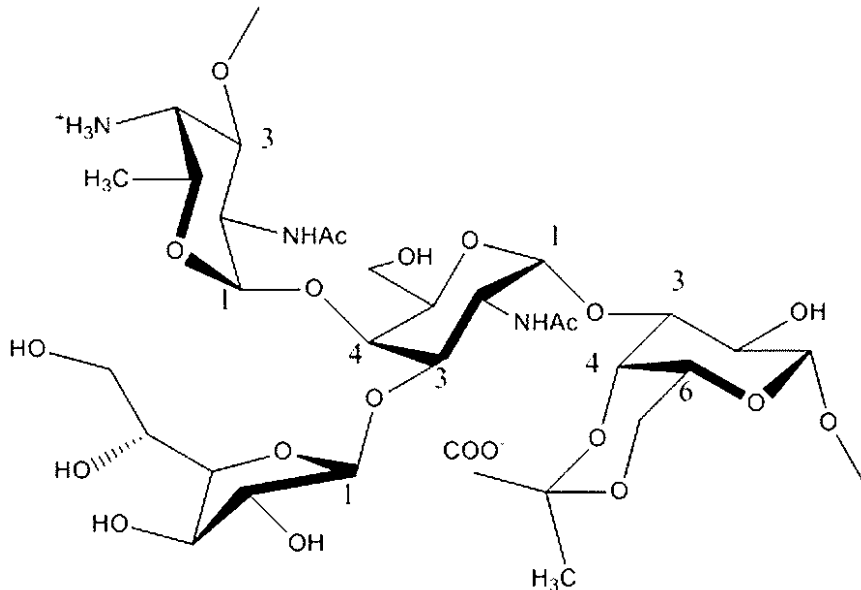
5 0 ~ 1 0 0 マイクログラムの単離された脂質付加 P S A を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

脂質に共有結合した単離された多糖 A (P S A) を含む凍結乾燥形態の脂質付加 P S A を含む、医薬組成物であって、

P S A が、

【化 2】



20

30

で表される反復四糖単位によって特徴付けられる構造を有する、前記医薬組成物。

【請求項 1 9】

組成物が別の化合物と組み合わせてヒトに投与するためのものであり、該別の化合物が、多糖調製物以外の免疫調節因子である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

40

組成物が免疫応答を調節するためのものである、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

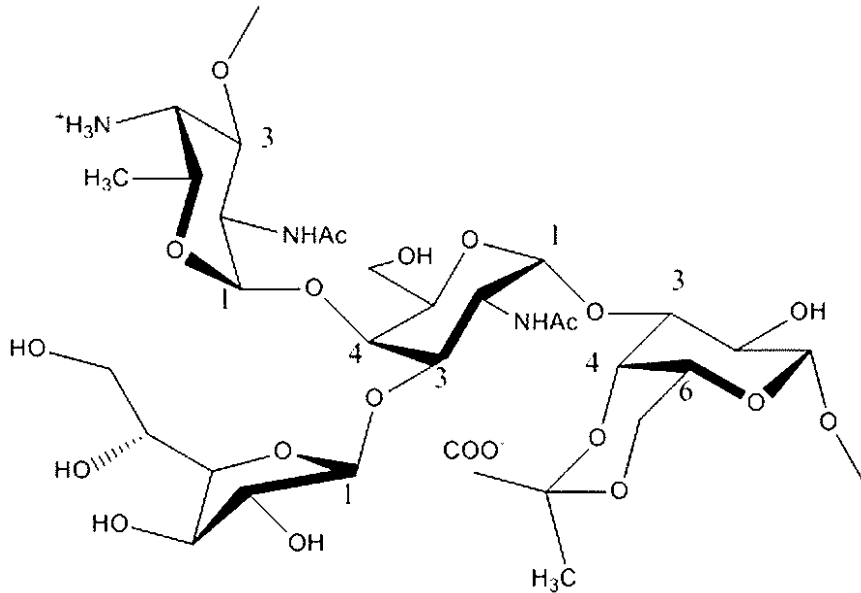
【請求項 2 1】

脂質付加多糖 A (P S A) を製造する方法であって、
P S A を過剰発現する *Bacteroides fragilis* から、P S A に結合した脂質を維持する条件下で、脂質付加 P S A 細胞を単離することを含み、ここで、脂質付加 P S A が、脂質に共有結合した P S A を含み、
ここで単離するステップが、デオキシコール酸ナトリウムの不在下において行われ、および

ここで P S A が、

50

【化 3】



10

で表される反復四糖単位によって特徴付けられる構造を有する、前記方法。

【請求項 2 2】

単離するステップが、9 と等しいかまたはこれより低い pH で行われる、請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 3】

単離するステップが、細胞の莢膜画分から脂質付加 P S A を沈降させることを含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

沈降させるステップが、エタノール沈殿を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

さらに、穏和な酸による沈殿の処理のステップを含む、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

沈殿が、4 ~ 5 の範囲の pH、80 ~ 100 、1 ~ 3 時間までの間で処理される、請求項 2 5 に記載の方法。

30

【請求項 2 7】

さらに、サイズ排除により脂質付加 P S A を沈殿から生成することを含む、請求項 2 3 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

サイズ排除が、中性の緩衝液中で行われる、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

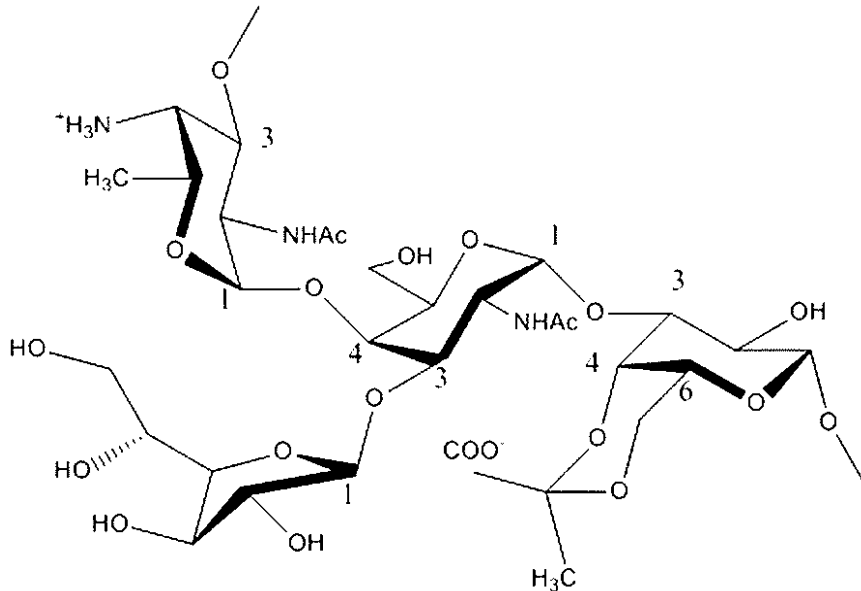
サイズ排除が、分子ふるいクロマトグラフィーを用いて行われる、請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

40

【請求項 3 0】

脂質に共有結合した多糖 A (P S A) を含む脂質付加 P S A と薬学的に受容可能なキャリアとを組み合わせ、医薬組成物を形成することを含む、医薬組成物の製造方法であって、
P S A が、

【化 4】



10

で表される反復四糖単位によって特徴付けられる構造を有する、前記方法。

【請求項 3 1】

医薬組成物がヒトに投与するためのものである、請求項 3 0 に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

組成物が別の化合物と組み合わせてヒトに投与するためのものであり、別の化合物が多糖調製物以外の免疫調節因子である、請求項 3 1 に記載の方法。

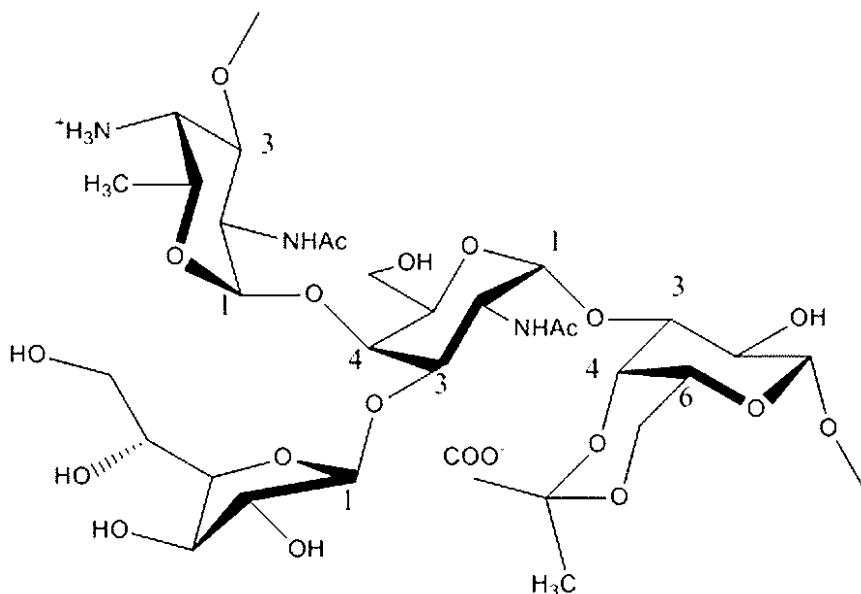
【請求項 3 3】

組成物が免疫応答を調節するためのものである、請求項 3 1 または 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

脂質に共有結合した多糖 A (P S A) を含む脂質付加 P S A であって、P S A が、

【化 5】



30

40

で表される反復四糖単位によって特徴付けられる構造を有する、脂質付加 P S A 。

【請求項 3 5】

組成物が別の化合物と組み合わせてヒトに投与するためのものであり、該別の化合物が多糖調製物以外の免疫調節因子である、請求項 3 4 または 3 5 に記載の脂

50

質付加 P S A。

【請求項 3 6】

免疫応答を調節するためのものである、請求項 3 4 に記載の脂質付加 P S A。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2011年7月12日に出願された米国仮出願第61/507074号、表題「LIPID-CONTAINING PSA COMPOSITIONS, METHODS OF ISOLATION AND METHODS OF USE THEREOF」の利益を主張し、その全内容は、本明細書において参照として援用される。

10

発明の分野

本発明は、*B. fragilis*から単離される莢膜多糖 A (PSA) の組成物、ならびにその単離および精製の方法ならびに / または使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Bacteroides fragilis (*B. fragilis*) NCTC9343の莢膜多糖 A (PSA) は、治療的および予防的適用を有する免疫調節物質であることが報告されている。米国特許第5,679,654号および同第5,700,787号 ; Tzianabos AO et al. (2000) *J Biol Chem* 275:6733-40。

20

【発明の概要】

【0003】

発明の要旨

細菌 *Bacterioides fragilis* (*B. fragilis*) の多糖である多糖 A (PSA) は、少なくとも部分的にその CD4 + 制御性 T 細胞を活性化してサイトカイン IL - 10 を産生させる能力により媒介される、強力な抗炎症能力を有する。

本発明は、*B. fragilis*により生成される、脂質を含む、著しくより強力な形態の PSA の発見に基づく。この脂質は、微生物により、その外膜において PSA を固定するために用いられる可能性がある。これまでに用いられている抽出技術は、この脂質抱合 PSA をもたらさない。脂質は、典型的には、ネイティブな PSA-LT 分子の 2 % (w / w) 未満を含む。プロトン NMR 分析は、脂質付加形態と非脂質付加形態とを区別しない。むしろ、本発明により、脂質付加形態の存在は、特定のゲル染色技術を用いてのみ可視化することができることを見出された。

30

【0004】

本発明により、脂質は、穏和な加水分解 (例えば希酢酸により)、およびその後の有機溶媒 (例えばクロロホルム) による抽出を用いて、PSA-LT から取り除くことができることが示された。この PSA の加水分解形態は、PSA の脂質付加形態 (すなわち PSA-LT) と比較して、著しく低下した活性を有し、その活性は、先に記載された PSA (すなわち、PSA の非脂質付加形態) に匹敵するレベルである。したがって、本発明は、特に、増強された IL - 10 誘導活性および T r e g 成熟化活性を有する、PSA のより強力な形態 (すなわち PSA-LT) を提供する。また、本発明により、PSA-LT は、限定されないが多発性硬化症 (すなわち EAE 動物モデル) および炎症性腸疾患などの炎症状態の動物モデルにおいて、元々記載される PSA の非脂質付加形態よりも、著しくより保護的および治療的であることが見出された。

40

本発明は、したがって、特に、PSA の脂質付加形態を含む組成物、その単離および精製のための方法、ならびに *in vitro* および *in vivo* におけるその使用の方法を提供する。

【0005】

したがって、一側面において、本発明は、高温においてフェノールと水との混合物を用いて *B. fragilis* からの莢膜複合体を水相中に抽出すること、エタノールを用いて多糖 A (PSA) を水相から沈降させること、高温において 2 % 酢酸を用いて沈澱を酸処理することを含む方法を提供し、ここで該方法は、約 9 と等しいかまたはこれより低い pH におい

50

て行われる。いくつかの態様において、pHは、約4～約9、または約4～約9未満の範囲である。

【0006】

別の側面において、本発明は、高温においてフェノールと水との混合物を用いて*B. fragilis*からの莢膜複合体を水相中に抽出すること、エタノールを用いて多糖A (PSA)を水相から沈降させること、高温において2%酢酸を用いて沈澱を酸処理することを含む方法を提供し、ここで該方法は、デオキシコール酸ナトリウムの不在下において行われる。

【0007】

いくつかの態様において、各々の方法は、酸処理の後で、界面活性剤フリーの緩衝液中でのサイズ排除 (size exclusion) によりPSAを精製する工程を、さらに含んでもよい。いくつかの態様において、各々の方法は、サイズ排除されたPSAの透析を、さらに含んでもよい。

いくつかの態様において、抽出は、60～75において起こる。いくつかの態様において、抽出は、約68において起こる。

いくつかの態様において、酸処理は、約90において約3時間起こる。

いくつかの態様において、各々の方法は、デオキシコール酸ナトリウムの不在下において行われる。いくつかの態様において、各々の方法は、界面活性剤の不在下において行われる。

いくつかの態様において、*B. fragilis*は、限定されないが、株9343などの*B. fragilis*のPSA過剰発現株である。

【0008】

別の側面において、本発明は、前述の方法のいずれかにより生成される単離された脂質含有多糖A (PSA-LT)を含む組成物を提供する。単離された脂質抱合多糖Aは、1または2以上の非LPS脂質を含む。いくつかの態様において、組成物は、対象への経口投与のために処方される。

【0009】

別の側面において、本発明は、単離された*B. fragilis*の非LPS脂質抱合多糖A (PSA)を含む組成物を提供する。非LPS脂質は、PSAに共有的に抱合していてもよい。いくつかの態様において、単離された*B. fragilis*の非LPS脂質抱合PSAは、1%未満、0.5%未満、0.1%未満、0.05%未満、または0.01% (w/w) 未満の、PSAに抱合した非LPS脂質を含む。いくつかの態様において、単離された*B. fragilis*の非LPS脂質抱合PSAは、約0.1%～2% (w/w) または約0.1%～1% (w/w) の範囲の (約0.5% (w/w) を含む) 非LPS脂質を含む。単離された脂質抱合多糖Aは、1または2以上の非LPS脂質を含む。いくつかの態様において、組成物は、対象への経口投与のために処方される。

【0010】

別の側面において、本発明は、単離された*B. fragilis*脂質抱合多糖A (PSA)、および約0.5% (w/w) またはそれより少ないLPSを含む、組成物を提供し、該組成物は、2%酢酸で処置され、16.5%のTris-トリシンSDS-PAGEゲル上で流され、硫酸亜鉛およびイミダゾールを用いてリバー染色された場合に、単離された*B. fragilis*脂質抱合多糖Aを含み、60kDより上におけるバンド (PSA-LT) および約5kDにおけるバンドを示す。単離された*B. fragilis*脂質抱合多糖Aは、1または2以上の非LPS脂質を含む。脂質は、PSA-LTの炭水化物部分に共有的に抱合していてもよい。いくつかの状況下において、PSA-LTの脂質と炭水化物部分との間の結合は、ヘビ毒ホスホジエステラーゼによる切断に対して感受性ではない。いくつかの態様において、組成物は、6および8kDにおいて、約5kDにおけるバンドよりも低い強度のLPSのバンドを示す。いくつかの態様において、組成物は、対象への経口投与のために処方される。

【0011】

別の側面において、本発明は、単離された*B. fragilis*脂質抱合多糖Aを含む組成物を提供し、該組成物は、約99%のPSA、約0.5%の非LPS脂質、および約0.5%のLPS

10

20

30

40

50

を含む。

別の側面において、本発明は、単離された*B. fragilis*脂質抱合多糖 A を含む組成物を提供し、該組成物は、約 97% ~ 99% の PSA、約 0.5% ~ 2% の非LPS脂質、および約 0.5% の LPS を含む。

【0012】

別の側面において、本発明は、単離された PSA-LT を含む組成物を提供し、該単離された PSA-LT は、該組成物の約 99.5% (w/w) を含み、LPS は、該組成物の約 0.5% (w/w) を表わす。

前述の側面の多様な態様において、組成物は、本質的に、核酸、タンパク質および/または他の細菌の混入物を含まない。

【0013】

別の側面において、本発明は、炎症に関連する状態を有する対象に、前述の PSA-LT 含有組成物のいずれかの有効量を投与することを含む方法を提供する。別の側面において、本発明は、炎症に関連する状態の再発の危険がある対象に、前述の PSA-LT 含有組成物のいずれかの有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0014】

いくつかの態様において、方法は、状態の再発の可能性を減少させるか、または将来的な再発の頻度を減少させる方法である。いくつかの態様において、方法は、かかる症状が、第 1 の兆候において存在するか、再発において存在するか、または慢性的に存在するかに関わらず、状態に関連する症状の重篤度を軽減する方法である。

【0015】

いくつかの態様において、状態は自己免疫疾患である。自己免疫疾患は、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチまたは I 型糖尿病であってもよい、

いくつかの態様において、状態は喘息である。いくつかの態様において、状態は肥満である。

いくつかの態様において、組成物は、吸入（例えば噴霧）により、経口投与により、または注射により、対象に投与することができる。いくつかの態様において、組成物は、対象に経口で投与される。

【0016】

別の側面において、本発明は、手術後癒着を発症する危険がある対象に、前述の PSA-LT 含有組成物のいずれかの有効量を投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様において、PSA-LT 含有組成物は、手術の前、手術の間、手術の後、またはそれらの任意の組み合わせ（限定されないが、手術の前および手術の間を含む）により、投与される。

【0017】

別の側面において、本発明は、膿瘍を有するか、またはこれを発症する危険がある対象に、前述の PSA-LT 含有組成物のいずれかの有効量を投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象はまた、抗生物質などの抗菌剤を投与される。いくつかの態様において、PSA-LT 含有組成物は、膿瘍の発症の前、および/または膿瘍に関連する症状の顕在化の前に投与される。いくつかの態様において、PSA-LT 含有組成物は、膿瘍が検出または診断された後、および/または膿瘍に関連する症状が顕在化した後で、投与される。

【0018】

なお別の側面において、本発明は、PSA-LT を含むことが疑われる組成物を、硫酸亜鉛およびイミダゾールでリバー染色される Tris - トリシン SDS-PAGE ゲルを用いて分析することを含む方法を提供する。いくつかの態様において、ゲルは、16.5% の Tris - トリシン SDS-PAGE ゲルである。いくつかの態様において、組成物は、*B. fragilis* の画分などの細菌の画分である。いくつかの態様において、細菌の画分を、高温 (hot) フェノール/水抽出、エタノール沈澱、穏和な酸処理（例えば 4 またはそれより高い、典型的には 4 ~ 5 の範囲の酸性の pH において）、および/またはサイズ排除に供した。いくつかの態様において、細菌の画分を含む組成物は、デオキシコール酸ナトリウムと接触させられな

10

20

30

40

50

った。いくつかの態様において、細菌の画分を含む組成物は、界面活性剤と接触させられなかった。いくつかの態様において、方法は、組成物中の非LPS脂質の存在を検出する方法である。いくつかの態様において、方法は、組成物中のPSA-LTを検出する方法である。PSA、LPSおよび/または非LPS脂質の存在は、当該方法を用いて検出してもよい。PSA、LPSおよび/または非LPS脂質の量は、当該方法を用いて測定してもよい。

【0019】

前述の概念および以下により詳細に議論されるさらなる概念の全ての組み合わせ（かかる概念は相互に相反しないことを前提とする）が、本明細書において開示される本発明の主題の一部であるものとして企図されることが理解されるべきである。特に、本開示の最後において現れる請求の範囲の主題の全ての組み合わせは、本明細書において開示される本発明の主題の一部であるものとして企図される。また、本明細書において明示的に使用される用語であって、参照として援用される任意の開示においても現れ得るものは、本明細書において開示される特定の概念に最も一致する意味を付与されるべきであることが、理解されるべきである。

10

図面は、必ずしも一定の縮尺に対するものではなく、むしろ、本明細書において議論される多様な概念を一般的に説明することに重きを置くことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、S400カラムの溶離プロフィールである。

【図2】図2は、精製されたPSA-LTのプロトン核磁気共鳴分光プロフィールである。

20

【図3】図3は、PSAの脂質付加（PSA24）および非脂質付加（PSA23）形態を用いる脾臓樹状細胞（DC）T細胞共培養系におけるIL-10産生のヒストグラムである。

【0021】

【図4】図4は、PSAの脂質付加（PSA24）および非脂質付加（PSA23）形態、ならびにPSAの非脂質付加（PSA23）形態とそれに添加されたLPS（PSA23+LPS）を用いる、脾臓樹状細胞（DC）T細胞共培養系におけるIL-10産生のヒストグラムである。

【図5】図5は、PSA-LT含有組成物の酸処理時間経過の結果を示すゲルの写真である。

【図6】図6は、脂質付加PSA（PSA24）と比較した、*B. fragilis*のLPSに対する酸処理の効果を示すゲルの写真である。

【0022】

30

【図7】図7は、PSA-LT調製物（PSA26）における脂質の存在（矢印）を示すゲルの写真である。より高い分子量のPSA（ボックス内に示す）を、ゲルから切り出し、5%トリエチルアミンを用いて溶離させた。ゲルから抽出されたPSAは、脂質のバンドを示す（矢印でラベルしたもの）。

【図8】図8は、PSA-LT調製プロトコル、酸による加水分解、および/または有機溶媒溶解の関数としてのIL-10産生を示すヒストグラムである。

【図9】図9は、PSA-LT調製の間のIL-10産生に対するデオキシコール酸ナトリウムの効果を示すヒストグラムである。

【0023】

【図10】図10は、デオキシコール酸ナトリウムに基づく抽出の後での脂質のバンド（バンド3）の喪失を示すゲルの写真である。他の図におけるもののように、この図におけるゲルは、硫酸亜鉛およびイミダゾールでリバー染色される16.5%のTris-トリシン-SDS-PAGEゲルである。

40

【図11】図11は、実験的自己免疫性脳炎（EAE）動物モデル系における予後に対するPSAの非脂質付加（PSA）および脂質付加（PSA-LT）形態の効果を示すグラフである。

【図12】図12は、*B. fragilis*の外膜へのPSA-LTの付着の態様を説明する模式図である。

【0024】

【図13】図13は、先行技術の単離方法を用いて生成されたPSA含有組成物（PSA23）およびPSA-LT含有組成物（PSA24）の酸処理の時間経過の結果を示すゲルの写真である。特

50

記すべきことに、PSA23の酸処理の後で、バンド3は存在しない。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

本発明は、本明細書においてPSA-LTとして言及される、*B. fragilis*からの多糖A (PSA)の脂質付加形態の、驚くべきかつ予想外の発見に基づく。本発明により、*B. fragilis*からPSAを単離および精製するための先行技術の方法は、不注意にかつ知らずに、ネイティブなPSAに抱合している脂質成分を取り除いたことが見出された。ネイティブなPSAの脂質付加形態は、*in vitro*および*in vivo*アッセイの両方により示されるように、先に単離および精製された非脂質付加形態よりも強力である。例において示されるように、PSAの脂質付加形態は、より良好にIL-10産生を誘導することができ(およびしたがって、Treg細胞とより良好に相互作用することができ)、実験的に誘導されたマウスの多発性硬化症の形態(すなわち実験的自己免疫脳炎、EAE)を、より良好に予防することができる。

10

【0026】

したがって、本発明は、単離されたPSAの脂質付加形態(PSA-LT)を含む組成物、*B. fragilis*からPSA-LTを単離および精製する方法、ならびに*in vitro*および*in vivo*において単離されたPSA-LTを用いる方法を提供する。本発明は、単離されたPSA-LTが、完全に(または十分に)脂質付加され得ること、またはそれが部分的に脂質付加され得ることを企図する。脂質付加の程度は、単離方法(例えば酸による加水分解の程度を含む)に依存するであろう。また、本発明の組成物が、典型的には、複数のPSA-LT分子を含み、複数の脂質付加の程度のバリエーションを示し得ることが、理解されるべきである。したがって、幾つかの場合において、本明細書において提供される特徴は、単一のPSA-LT分子ではなく、むしろ複数のPSA-LTを含む組成物に関する。

20

【0027】

PSAおよびPSA-LTの構造

本発明は、部分的に、新たに発見された*B. fragilis*からのPSAの脂質付加形態に関する。脂質付加形態は、PSA-LTとして言及される。この脂質付加形態は、多糖および1または2以上の脂質鎖(またはテイル)からなる。新たに発見された分子の炭水化物部分は、PSAとして言及される。これはまた、先に単離され分析されている多糖の形態である。この多糖が自然界において脂質抱合形態において存在することは、本発明の前には知られていなかった。

30

【0028】

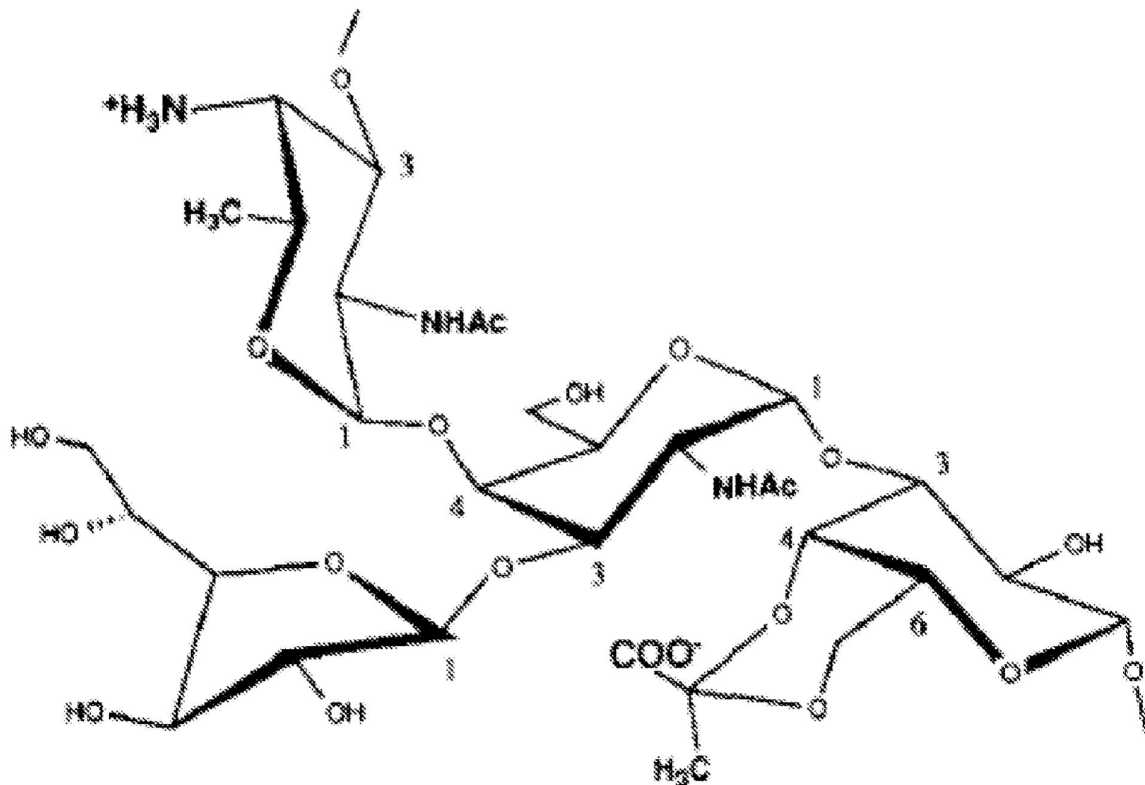
多糖A (PSA)は、四糖の反復単位、すなわち、 $(-3) - D - \text{AAT Galp} - (1, 4) - [- D - \text{Gal} - (1, 3) - D - \text{GalpNAc} - (1, 3) - [4, 6 - \text{ピルビン酸}] - - D - \text{Galp} - (1, 4)]_n$ を含む。それは、その遊離アミン基に対する正の電荷、およびその遊離カルボニル基に対する負の電荷により付与されるものとして、双性イオンの挙動を有する(反復する四糖単位一つごと)。その天然に存在する状態は、60個を超える四糖反復単位からなり(例えば、いくつかの例においては、平均約100、または約200、または約300個までの反復単位またはこれを含む)、それは、約150 kDの平均分子サイズ(約60 kD ~ 2000 kDの範囲)を有する。

40

【0029】

PSAの反復四糖単位は、以下の構造を有する：

【化1】



10

20

【0030】

本発明は、部分的に、PSAに抱合された脂質を維持する単離および精製方法を用いての、*B. fragilis*からのPSAの脂質付加形態の単離に基づく。本明細書においてPSA-LTとして言及されるPSAの脂質付加形態は、1または2以上の脂質鎖（または、本明細書において交換可能に用いられるように、テイルもしくは部分）に共有的に抱合したPSAの四糖反復単位構造を含む。脂質とPSAとの間の結合は、ヘビ毒から抽出されたホスホジエステラーゼを用いる切断に対して感受性ではない。脂質部分は、エステルまたはアミド架橋を介して、PSAに抱合していてもよい。PSA分子1つあたり、1または2以上の脂質鎖（またはテイル）が存在してもよい。

30

【0031】

本発明はさらに、単離されたPSA-LTを含む組成物を提供する。本明細書においてPSA-LTに関して用いられる場合、用語「単離された」とは、PSA-LTが、その天然の環境（すなわち*B. fragilis*細胞）から物理的に分離されることを意図する。単離されたPSA-LTを含む組成物は、LPSおよび/または非脂質付加PSAを含む、他の成分を含んでもよい。いくつかの態様において、かかる組成物中に存在するLPSの量は、約0.5%（w/w）またはそれより少ない。

【0032】

いくつかの態様において、本発明の組成物は、約99%のPSA、0.5%の非LPS脂質、および約0.5%のLPSを含む。いくつかの例において、組成物は、かかる組成物の特徴づけが、PSAからの脂質の切断を必要とし得るにも関わらず（例えば、本明細書において記載されるゲル系において）、その脂質に抱合したPSA（すなわちPSA-LT）を含むことが理解されるべきである。当該分野においては理解されることであろうが、LPSは、リポ多糖を指す。本明細書において用いられる場合、非LPS脂質は、LPSではない脂質である。PSA、LPSおよび非LPS脂質の量は、本明細書において記載されるもののようなゲル系を用いて決定することができる。いくつかの態様において、組成物は、DNAおよびRNAおよびタンパク質などの核酸などの混入物を本質的に含まない。本明細書において用いられる場合、本質的に含まないとは、それらの混入物が、組成物の約0.1%（w/w）またはそれより少ないものを表わすことを意図する。いくつかの例において、かかる混入物は、検出不

40

50

能であってもよい。

【0033】

本発明は、in vitroおよびin vivoでの使用のための組成物を提供する。in vitroでは、組成物は、分析ツールまたはアッセイ標準として用いてもよい。in vivoでは、組成物は、免疫制御を必要とするヒトまたは他の対象において、用いても、または動物モデルなどのヒトの疾患の実験モデルにおいて用いてもよい。in vivoで用いられる場合、組成物は、薬学的に受容可能であり、これは、それらが対象中への投与のために好適であることを意図する。それらは、かかる対象において予防的または治療的に用いても、用いられなくともよい。

【0034】

PSA-LT単離方法

方法は、*B. fragilis*からのPSA-LTを単離および精製するための、一般的なおよび特定の方法を提供する。これらの方法は、それがPSAを産生することを前提として、*B. fragilis*の任意の株に対して行うことができることが理解されるべきである。かかる株として、天然に存在する株または過剰発現株9343などの変異株が挙げられる。

【0035】

PSAを単離および精製するために用いられる先行技術の方法は、多糖から脂質テイルを取り除くことが見出されている。本発明は、脂質テイルを残し、それにより、その先に単離された非脂質付加形態よりも機能的により強力なPSAの脂質付加形態を生じる方法を提供する。本発明の単離方法は、先行技術の単離方法と、多数の点において異なる。第1に、本発明の方法は、先行技術において行われたように後工程ではなく、精製プロセスの初期の工程において、穏和な酸（例えば、約4、または4～5の範囲のpH）により加水分解を行う。第2に、本発明の方法は、中性溶液（Tris）中で、先行技術の方法において用いられたデオキシコール酸ナトリウム（DOC）の不在下において、分子ふるいクロマトグラフィーを行う。第3に、単離全体を通して、pHは9またはそれより低く（例えば約4～約9またはそれより低い）、殆どの工程において中性の範囲に維持される。

【0036】

簡単に述べると、PSA-LTの単離および精製は、以下を含む：（1）嫌気条件下における*B. fragilis*（野生型またはPSAを産生する変異株であって、PSAを過剰発現する株を含むもの）の増殖、（2）*B. fragilis*からの莢膜複合体の単離、および（3）PSA-LTのエタノール沈澱、（4）穏和な酸処理。莢膜複合体は、例えば高温フェノール/水抽出を用いて単離することができる。PSA-LTのエタノール沈澱の前に、DNase、RNaseおよび/またはプロナーゼによる処理を行ってもよい。酸処理は、希酸（例えば2%酢酸）を用いて、高い温度において行ってもよい。高い温度は、80～100、85～95の範囲であってよく、いくつかの例においては、約90である。処理は、1時間、2時間、3時間またはそれより長く続いてもよい。いくつかの例において、酸処理は、2%酢酸を用いて、90で3時間行われる。

【0037】

PSA-LTはさらに、沈澱からサイズ排除により精製される。例えば、沈澱を、限定されないがPBSなどの中性の緩衝液中に溶解して、S-400サイズ排除カラム上に適用してもよい。このサイズ排除の工程は、デオキシコール酸ナトリウムの不在下において行われ、いくつかの例においては、任意の界面活性剤の不在下において行う。PSA-LT含有画分を、次いでプールし、随意に分析し、透析する。最終透析物を、凍結乾燥してもよい。

純度は、本明細書においてより詳細に記載されるように、核NMRおよび/またはSDS PAGEゲルにより、評価することができる。

【0038】

PSA-LTの分析および特徴づけ、ならびにPSAとの比較

A. PSA-LTの構造的な特徴づけ

図1は、280nmにおける吸光度によりモニタリングされる、Tris緩衝化食塩水中でのS400カラムの溶離プロファイルを示す。上記のとおり、画分を、PSA-LTに対する抗体に

10

20

30

40

50

よる寒天中での二重拡散法により試験する。

【 0 0 3 9 】

図 2 は、6 0 0 m H z での NMR において行われた精製 PSA-LT のプロトン核磁気共鳴分光プロファイルである。この分子の炭水化物構造は、PSA についての公開されたスペクトルと正確に一致する。このことは、PSA-LT の炭水化物部分が PSA と同一であることを示す。脂質に起因する PSA-LT の非常に小さなパーセンテージ (m / m) は、この高分解能技術により観察されない。

【 0 0 4 0 】

図 5 は、硫酸亜鉛 / イミダゾール染色によりリバー染色された 1 6 . 5 % の Tris - トリシン SDS-PAGE ゲルを用いての、PSA-LT の酸処理の時間経過の結果を示す。この染色プロトコルは、同じゲル系における PSA-LT の炭水化物 (すなわち PSA) 部分および脂質部分の両方を観察することを可能にする。5 m g / m l の PSA-LT (Lot 26) 4 m g を、2 % 酢酸で、9 0 において、多様な期間にわたり処置し、その後、N a O H で中和し、透析した。生じた生成物のうち 1 0 0 マイクログラムを、上記のように、1 6 . 5 % の Tris - トリシン SDS-PAGE ゲル上に流し、リバー染色した。図は、加水分解時間が増大するとともに、LPS のバンド (約 6 および 8 k D におけるもの) の消失、ならびに約 5 k D における脂質のバンド (バンド 3 とラベルされるもの) の出現を明らかに示す。

【 0 0 4 1 】

バンド 3 が、PSA-LT の加水分解生成物 (ゲルの一番上) として発したものであるのか、LPS (約 8 k D a および 6 k D a におけるバンド) として発したものであるのかを決定するために、本発明者らは、精製された *B. fragilis* の LPS を採取し、本発明者らが PSA-LT を加水分解したのと同じ条件下において加水分解した。重要なことに、LPS の加水分解の後で、バンド 3 は現れなかったが、PSA-LT の加水分解の後では明確に存在した (Lot 24) (図 6)

【 0 0 4 2 】

さらに、バンド 3 は、先行技術の単離方法を用いて調製された PSA 含有組成物、例えば Lot 23 などにおいては観察されなかった (PSA23、図 1 3) 。図は、水中で 1 . 3 m g / m l の PSA23 の 1 m g に対する酸処理 (2 % 酢酸により 9 0 におけるもの、および N a O H による中和) の結果を示す。処理された画分のうち 1 0 0 u g を、1 6 . 5 % の Tris - トリシン SDS-PAGE ゲル上に流し、硫酸亜鉛 / イミダゾールでリバー染色した。PSA-LT を含む PSA24 調製物を、比較物として流した。

【 0 0 4 3 】

バンド 3 が PSA-LT の加水分解生成物であることを確認するために、図 7 中の左におけるゲルにおいて観察されたような高分子量 PSA-LT を、さらに分析した。ボックスは、さらなる分析のためにゲルから切り出されたバンドを示す。図 7 の右側の列において観察されるように、ゲルから溶離した生成物を、次いで加水分解し、それを同じゲル系に流すことにより再び研究した。バンド 3 は、矢印により示すように、高分子量 PSA-LT の加水分解の後で観察することができる。

【 0 0 4 4 】

B . PSA-LT の機能的特徴づけ

次いで、PSA-LT の免疫学的活性が、加水分解が起こる可能性がある先の精製プロセスにおける工程により影響を及ぼされたかを決定するために、実験を行った。PSA-LT (Lot 24) を、精製プロセス中の非常に初期に、最初のフェノール / 水抽出工程からの水相の分離の直後の時点において、加水分解した。

【 0 0 4 5 】

PSA-LT を、その脾臓樹状細胞と T 細胞との共培養中で I L 1 0 産生を誘導する能力について試験した。このアッセイは、以下のように行った： (1) マウス抗 C D 1 1 c マイクロビーズ (Miltenyi Biotec cat#130-052-001) を用いて脾臓 DC を単離する； (2) マウス T 細胞 C D 4 サブセットカラムキット (R&D systems cat#MCD4C-1000) を用いて C D 4 + T 細胞を単離する； (3) 2×10^4 の C D 1 1 c + DC と 10^5 の C D 4 + T 細

10

20

30

40

50

胞とを混合し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD3 (BD Pharmingen cat#553057)を添加する；(4)培養物を次いで、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のPSAで刺激し、細胞を5日間インキュベートする；ならびに(5)上清を収集し、IL-10の存在についてELISAにより分析する。

【0046】

図3は、この共培養系におけるIL-10産生に関して、PSA-LT (PSA24として示す)は、先行技術の方法により製造されたPSA (PSA 23として示す)よりも約3倍強力であることを示す。

PSA24は、少量の混入LPS (約0.5%、w/w)を有するので、本発明者らは、精製した*B. fragilis* LPSをPSA Lot 23 (PSA23)に添加し、LPSを含有しないPSAのロットへのLPSの添加が、それが共培養系においてIL-10の産生を誘導する能力を増強しない(およびしたがってこれを再構成しない)ことを決定した。

【0047】

図8において示すように、PSA-LT 24は、DCとT細胞との共培養系におけるIL-10産生を誘導することにおいて、極めて活性であった。PSA-LT (Lot 26、およびこの図においてPSA26-PDとして示す)は、任意の加水分解の工程の前に、同様に活性であった。加水分解していないPSA-LT (Lot 26)のS400クロマトグラフィーによるさらなる精製の後で、この材料を、PSA-LT (Lot 24)の初期の加水分解と同じ条件下において加水分解した。精製プロセスにおいて初期に加水分解したPSA-LTと対照的に、プロセスの後期に加水分解されたPSA-LTは、共培養系においてIL-10を誘導するその能力の大部分を喪失した。加水分解されたPSA-LT (Lot 26)をクロロホルムで直接抽出した場合、統計学的に有意なIL-10誘導能力の喪失は存在しなかった。最後に、後期のPSA-LT (Lot 26)を加水分解してクロロホルム抽出した場合、全ての残りのIL-10誘導能力が失われた。したがって、PSA-LTの脂質画分は、加水分解により著しく取り除かれるが、有機溶媒によっては取り除かれない。しかし、加水分解の後で、材料は、有機溶媒中で可溶性であり、このことは、PSAと脂質との間に加水分解可能な共有結合が存在することを示す。PSA-LTが初めに加水分解されていない限り、PSA-LTに対する直接的なクロロホルム抽出がIL-10誘導能力を取り除かなかつたという事実は、脂質成分が共有的に付着していることを示す。脂質がNMRにおいて観察されないという事実は、PSA-LTの加水分解の後でのバンド3の発見と組み合わせると、脂質が、PSA-LTの全体的な質量のうちの極めて小さい割合であり、多糖の還元性の末端において共有的に架橋した脂質を表わす可能性が最も高いことを示す。かかる脂質は、グラム陰性細菌により、多糖の膜挿入物のために用いられる場合がある。

【0048】

PSAのための本発明者らの先の単離プロセスと比較した、PSA-LTのための本発明者らの精製プロトコルにおける別の主要な差異は、デオキシコール酸ナトリウム (DOC) 含有緩衝液中でのクロマトグラフィー工程の除去である。DOCとの接触の結果としての活性の差異を、図9において示す。Lot 24 PSA-LTを、DOC含有緩衝液中に、本発明者らのPSAの精製において用いられるpH9の条件下において懸濁した。DOCのpHは8.0であったが、pHを、NaOHにより速やかにpH9まで上げ、希HClにより再び戻した。大規模な透析の後で、Lot 24は、DCとT細胞との共培養系においてIL-10を誘導するその能力を喪失した。図10において、PSA-LT (Lot 24)の加水分解の後で観察されたバンド3は、DOC処置されたLot 24の加水分解の後ではもはや観察されなかった。DOCを含む工程の除去は、全ての先のプロトコルからの主要な解離を表わし、PSA-LTの調製のために現在用いられる方法を、PSAの調製のために用いられる方法と区別する。

【0049】

C. 多発性硬化症の動物モデル (EAE) においてPSAと比較したPSA-LTのin vivoでの効力上のデータは、PSAと比較した場合の、PSA-LTによる、DCとT細胞との共培養におけるIL-10の誘導の著しいin vitroでの増強を示す。このin vitroでのIL-10産生の増強が、in vivoでの潜在的な治療利益を表わすか否かを決定するために、本発明者らは、PSA-LT (Lot 24)をPSA (Lot 23)と比較した(図11)。6週齢のメスのナイーブなC57 BL/6マウスの群を、 $100 \mu\text{g}$ のPSA-LT、PSAまたはリン酸緩衝食塩水 (PBS) の

いずれかにより、EAE誘導の6日前に開始して3日毎に処置した。マウスを、200 µl のフロイント完全アジュバント (Sigma) 中の250 µgのMOG₃₃₋₅₅ (Peptides International) により、皮下でチャレンジした。チャレンジの後0日目および2日目において、マウスは、250 ngの百日咳菌毒素 (List Biological Laboratories) の腹腔内注射を受けた。疾患を、確立した0~5の尺度においてスコアづけし、5は進行した神経性疾患である。マウスを、疾患の進行について毎日モニタリングおよびスコアづけした。PBSで処置された対照と比較した場合、PSAを与えられた動物は、疾患の重篤度において統計学的に有意な軽減を有した；しかし、PSA-LTを与えられた動物は、疾患の重篤度のさらにより著しい軽減を有し、EAEの発症に対してほぼ完全な保護を有した。

これらの研究は、ヒト疾患の非常に重要な動物モデルにおいて、PSAと比較した場合に、PSA-LTの決定的な増強された保護能力を示す。

10

【0050】

検出の方法

本発明は、PSA-LTの存在を検出する、およびいくつかの例においては試料または組成物中のPSA-LTの量を定量するための方法を提供する。これらの方法は、本明細書において記載されるTris-トリシンSDS-PAGEゲル系を使用する。試料を、かかる16.5%のTris-トリシンSDS-PAGEゲル上に流し、次いで、硫酸亜鉛およびイミダゾールでリバーズ染色する。約5 kDにおけるバンドの存在により、PSA-LTの存在が示される。60 kDより上の主要なバンドは、PSA (脂質付加または非脂質付加バージョン) を表わす。

【0051】

20

この系を用いて分析される組成物は、本明細書において記載されるように、例えば、フェノール/水抽出、エタノール沈澱、穏和な酸加水分解、およびサイズ排除の後で得ても、または、それらは他の方法において得ても、および/または調製してもよい。

【0052】

使用の方法

本発明は、本明細書において提供される組成物のin vitroおよびin vivoでの使用の多様な方法を提供する。in vitroでの使用として、分析ツールとして (例えばB. fragilisの存在のマーカーとして)、およびアッセイ標準または対照として (例えばPSA-LTの陽性マーカーとして) の使用が挙げられる。

【0053】

30

in vivoでの使用として、限定されないが、ヒト対象を含むものが挙げられる。例えば、in vivoでの使用として、免疫応答を調節するための、本発明の組成物の非ヒト対象への投与が挙げられる。

【0054】

本発明は、一般に、異常な免疫応答を有するかまたはこれを発症する可能性がある対象において、免疫応答を調節する方法を提供する。典型的には、異常な免疫応答は、増強された免疫応答であり、組成物は、免疫応答を下方調節するように作用する。増強された免疫応答は、典型的には、限定されないが自己免疫疾患などの炎症状態である。

【0055】

従って、本発明の組成物は、自己免疫疾患を有するかまたはこれを発症する危険がある対象において免疫応答を調節 (および典型的には下方調節) するために用いることができる。当業者には理解されるであろうが、自己免疫疾患を有する対象は、典型的には、自己免疫疾患に関連する1または2以上の「イベント」または再発を経験する。例えば、炎症性腸疾患を有する対象は、症状の存在または増大した症状の重篤度により特徴づけられる時間的に分離した疾患の発作を経験する場合がある。本発明は、かかる対象において、かかる将来的な疾患の再発の可能性を減少させるため、または疾患に関連する症状 (例えば疼痛、熱、不快感、疲労など) の重篤度を軽減するために、組成物を用いてもよいことを企図する。したがって、組成物は、かかる再発の前に投与してもよく、この様式において、随意に規則的な頻度において、慢性的に投与してもよい。例として、1日1回、2、3、4、5もしくは6日に1回、または1週間に1回などが挙げられる。本発明はまた、か

40

50

かる対象に、再発の間に、症状の重篤度を軽減するか、または再発の時間を短縮するために、組成物を投与してもよいことを企図する。

【0056】

自己免疫疾患は、当該分野において公知である。自己免疫疾患の例として、限定されないが、以下が挙げられる：多発性硬化症、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、ブドウ膜炎、セリアック病、悪性貧血、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、グレーヴス病、全身エリテマトーデス、急性散在性脳脊髄炎、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、ギラン・バレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、天疱瘡、巨細胞性動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性肝炎、川崎病、混合性結合組織病、オード(Ord)甲状腺炎、多発性関節炎、原発性胆汁性硬化症、ライター症候群、高安動脈炎、白斑、温式自己免疫性溶血性貧血、ウェゲナー肉芽腫症、シャーガス病、慢性閉塞性肺疾患およびサルコイドーシス。

10

【0057】

重要な態様において、自己免疫疾患は多発性硬化症である。他の重要な態様において、自己免疫疾患は、限定されないが潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患である。

いくつかの例において、本発明の組成物は、まだ自己免疫疾患(その症状を含む)を顕在化していないが、既知の遺伝的または家族性の素因に基づいてかかる疾患を発症する危険がある対象に投与してもよい。かかる対象は、当該疾患に苦しむ1または2以上の家族のメンバーを有する場合がある。

20

【0058】

いくつかの例において、本発明の組成物は、移植片対宿主病を有するかまたはこれを発症する危険がある対象に投与される。投与は、器官または組織(血液または血液製剤を含む)の対象中への移植の前、その間および/またはその後起こってもよい。

なお他の例において、組成物は、炎症に関連する状態を有するかまたはこれを発症する危険がある対象に投与してもよい。

【0059】

例として、組成物は、喘息を有する対象に投与してもよい。当該分野においては理解されるであろうが、喘息を有する対象は、典型的には、呼吸障害により特徴づけられる喘息の発作またはイベントを経験する。本発明は、本明細書において記載される組成物を、急性に(例えば単回の大用量)、または慢性に(例えば繰り返しの小用量)、喘息の対象に投与してもよいことを企図する。したがって、いくつかの例において、発作の発生を予防するため、発作の頻度を減少させるため、および/または発作の重篤度を和らげるために、喘息の発作の前に組成物を投与してもよい。いくつかの例において、発作の間に、その重篤度を軽減するため、および/またはその持続期間を短縮するために、組成物を投与してもよい。

30

【0060】

別の炎症に関連する状態は、手術後癒着である。本発明は、手術後癒着を有するかまたはこれを発症する危険がある対象への本明細書において記載される組成物の投与を企図する。組成物は、かかる癒着の発生を予防するため、および/またはそれらの重篤度を軽減するために、手術の前、その間および/またはその直後に投与することができる。組成物は、手術の後に繰り返して投与してもよく、これは、例えば、手術の後1週間、2週間、3週間、1か月または数か月にわたり、毎日、2日に1回、3日に1回などを含む。

40

【0061】

別の炎症に関連する状態は、膿瘍であり、これは、限定されないが、腸内容物の腹膜中への漏出により起こり得るもののような腹部膿瘍を含む。これらの場合において、処置されている対象はまた、抗生物質などの抗菌剤を投与されてもよい。

【0062】

別の炎症に関連する状態は、肥満であり、したがって、本発明はまた、肥満である対象

50

における本明細書において記載される組成物の投与を企図する。かかる対象は、典型的には、30またはそれより高い肥満度指数（BMI）を有するものとして定義される。いくつかの例において、組成物は、20より高いまたは25より高いBMIを有する対象に投与してもよい。組成物は、かかる対象においてさらなる体重増加を予防すること、および/または体重減少を誘導することを意図される。

【0063】

対象は、本発明の組成物の投与から利益を受けるであろう、または本発明の組成物を投与され得る、任意の対象を意図する。重要な態様において、対象は、ヒト対象である。対象はまた、イヌもしくはネコなどの愛玩動物、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジなどの農業家畜、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの研究動物、または動物園において維持されているかもしくは他に捕われているものなどの動物であってもよい。

10

【0064】

多様な投与経路が利用可能である。選択される特定の様式は、無論、処置されている特定の状態、処置されている状態の重篤度、および治療効力のために必要とされる投与量に依存するであろう。本発明の方法は、一般的に言えば、医学的に受容可能な任意の投与の様式を用いて実施することができ、これは、臨床的に受容することができない有害効果を引き起こすことなく活性化化合物の有効レベルをもたらす任意の様式を意味する。かかる投与の様式として、経口、直腸、局所、鼻、吸入または非経口の経路が挙げられる。用語「非経口」は、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内または注入を含む。

【0065】

20

処方物

投与される場合、本発明の活性剤は、薬学的に受容可能な組成物または調製物として処方される。かかる組成物または調製物は、慣用的に、薬学的に受容可能なキャリア、塩の濃縮物、緩衝化剤、保存剤、他の免疫調節因子、および随意に他の治療成分を含んでもよい。本明細書において用いられる、および以下により完全に記載される用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、1または2以上の適合性の固体または液体の充填剤、希釈剤または封入物質であって、ヒトまたは他の動物への投与のために好適であるものを意味する。用語「キャリア」とは、天然または合成の、有機または無機の成分であって、適用を容易にするために活性成分が組み合わされるものを表わす。医薬組成物の成分はまた、所望の薬学的効力を実質的に損なう相互作用が存在しない様式において、本発明の活性剤と混合することができる。

30

【0066】

医薬組成物は、単位投与形態において便利に提示することができ、製薬の分野において周知の方法のいずれにより調製してもよい。全ての方法は、PSA-LT（および/またはPSA-LTを含む組成物）を、1または2以上の補助成分を構成するキャリアと組み合わせる工程を含む。一般に、組成物は、PSA-LT組成物を、液体のキャリア、微細に分割された固体のキャリア、または両方と、均質に、および緊密に組み合わせ、次いで、必要である場合は、製品を成形することにより調製される。経口投与のために好適な組成物は、カプセル、錠剤、ロゼンジなどの、各々が予め決定された量の活性成分を含む、別々の単位として提示してもよい。他の組成物として、シロップ、エリキシルまたは乳液などの、水性の液体または非水性の液体中の懸濁液が挙げられる。

40

【0067】

活性成分は、それ自体で（ニートで）投与しても、または薬学的に受容可能な塩の形態において投与してもよい。医薬中で用いられる場合、塩は、薬学的に受容可能なものであるが、薬学的に受容可能でない塩は、その薬学的に受容可能な塩を調製するために便利に用いることができ、したがって、本発明の範囲から除外されない。かかる薬理学的および薬学的に受容可能な塩として、限定されないが、以下の酸から調製されるものが挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、薬学的に受容可能な塩は

50

、カルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩などの、アルカリ金属またはアルカリ土類金属として調製してもよい。

【 0 0 6 8 】

好適な緩衝化剤として：酢酸および塩（ 1 ~ 2 % w / v ）；クエン酸および塩（ 1 ~ 3 % w / v ）；ホウ酸および塩（ 0 . 5 ~ 2 . 5 % w / v ）；ならびにリン酸および塩（ 0 . 8 ~ 2 % w / v ）が挙げられる。好適な保存剤として、塩化ベンザルコニウム（ 0 . 0 0 3 ~ 0 . 0 3 % w / v ）；クロロブタノール（ 0 . 3 ~ 0 . 9 % w / v ）；パラベン（ 0 . 0 1 ~ 0 . 2 5 % w / v ）およびチメロサル（ 0 . 0 0 4 ~ 0 . 0 2 % w / v ）が挙げられる。

【 0 0 6 9 】

非経口投与のために好適な組成物は、便利に、多糖の無菌の水溶性調製物を含み、これは、レシipientの血液と等張であってよい。使用することができる受容可能なビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー溶液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の、硬化油が、溶媒または懸濁媒として、慣用的に使用される。この目的のために、合成のモノ - またはジグリセリドを含む任意の無刺激性（bland）の硬化油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が、注射可能物の調製において用途を見出す。皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内などの投与のために好適なキャリア処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences（Mack Publishing Company, Easton, Pa.）において見出すことができる。

【 0 0 7 0 】

上記のような医薬調製物は、有効量において投与される。治療的適用のために、それは一般に、医学的に望ましい結果を達成するために十分な量である。一般に、治療有効量は、処置されている特定の状態の発症を遅延させるか、その進行を阻害するか、またはそれを完全に停止させる（状態の再発の可能性、頻度および/または重篤度を減少させることを含む）ために必要な量である。一例として、有効量は、処置または予防されている障害の症状（例えば疼痛、熱など）を軽減、緩和、またはその発症を遅延させるために役立つ量であってよい。有効量は、投与の様式、処置されている特定の状態、および所望される予後に依存するであろう。それはまた、状態のステージ、状態の重篤度、処置されている対象の年齢および身体的状態、併用治療がある場合はその性質、処置の持続期間、投与の具体的な経路、ならびに医師の知識および専門的意見内の同様の要因にも依存するであろう。予防的適用については、それは、予防されている特定の状態の発症を遅延させるか、その進行を阻害するか、またはそれを完全に停止させるために十分な量であって、症状の発症を予防するために必要とされる量により測定することができる。

【 0 0 7 1 】

一般に、本発明の活性化合物の用量は、約 0 . 0 1 m g / k g / 日 ~ 1 0 0 0 m g / k g / 日、好ましくは約 0 . 1 m g / k g ~ 2 0 0 m g / k g、および最も好ましくは約 0 . 2 m g / k g ~ 約 2 0 m g / k g の、1日に1回または2回以上の用量の投与において、1日または2日間以上にわたるものであってよい。1 ~ 5 0 0 m g / k g の範囲の用量、および好ましくは1 ~ 1 0 0 m g / k g の範囲の用量、さらにより好ましくは1 ~ 5 0 m g / k g の範囲の用量が好適であると期待される。好ましい量は、当業者により、剤の最適投与レベルを決定するための標準的な習慣に従って決定され得る。一般に、最大用量が、健全な医学的判断により用いられる最も高い安全用量であることが好ましい。

いくつかの例において、ヒト対象のための合計の日用量は、約 5 0 ~ 1 0 0 マイクログラムの範囲のPSA-LTであってよい。

【 0 0 7 2 】

医薬調製物は、単独で、または他の化合物と組み合わせて投与することができる。一態様において、医薬調製物は、以下からなる群より選択される抗生物質を含む1または2以上の抗菌剤との組合せにおいて与えられる：ペニシリンG、ペニシリンV、アンピシリン、アモキシシリン、バカンピシリン、シクラシリン、エピシリン、ヘタシリン、ピバンピシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、

10

20

30

40

50

フルクロキサシリン、カルベニシリン、チカルシリン、アプロシリン (avlocillin)、メズロシリン、ピペラシリン、アムジノシリン、セファレキシン、セフラジン、セファドロキシル、セファクロル、セファゾリン、セフロキシムアキセチル、セファマンドール、セフォニシド、セフォキシチン、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフメノキシム、セフトリアキソン、モキサラクタム、セフォテタン、セフォペラゾン、セフトジジム、イミペネム、クラブラン酸、チメンチン、スルバクタム、ネオマイシン、エリスロマイシン、メトロニダゾール、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、バンコマイシン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール、アミノグリコシド、キノロン、テトラサイクリンおよびリファンピン。

以下の例は、説明を目的として含まれるものであり、本発明の範囲を限定することを意図されない。

【0073】

例

例1 . PSA-LTの単離の要約 (Lot 24、PSA24)。

B. fragilisを、嫌気条件において増殖させた。B. fragilisからの莢膜複合体を、高温フェノール/水抽出により単離した。PSA-LTを、DNase、RNaseおよびプロナーゼ処理の後で、エタノールにより沈降させた。沈澱を、次いで、2%酢酸により90 において3時間、酸処理した。PSA-LTを、S-400サイズ排除カラムにおいてPBS中でさらに精製した。画分を、分析およびプールし、次いで透析および凍結乾燥した。PSAの純度を、本明細書において記載されるとおり、核磁気共鳴分光法およびSDS PAGEゲルにより評価した。

【0074】

例2 . PSA-LTの特異的単離 (Lot 24、PSA24)。

PSA-LTの単離および精製プロセスを、以下により詳細に提供する。

多糖A (PSA) を過剰発現するB. fragilis株9343を、血液寒天プレート上にプレーティングし、一晚37 で増殖させた。密にコロニー形成したプレートを、500 mlのペプトン酵母ブロスのスターター培養中に継代培養した。スターター培養物を、同じ培地の16リットルの培養中へ播種し、pHを5 MのNaOHで中性まで滴定した。嫌気ガス混合物を、密封した培養中にバブリングした。

【0075】

pH7に維持された一晚の培養の後で、細菌を、グラム染色によりチェックし、継代培養した。8,000 x gにおいて20分間の遠心分離により生物を収集した。細菌ペレットを、食塩水で2回洗浄し、約1リットルの細菌ペレットを得た。

【0076】

細菌ペレットを、68 の融解した結晶性フェノール中に、フェノールの最終濃度が約37% v/vとなるように懸濁し(フェノール/水調製物を生じる)、30分間68 において混合し、その後、4 で48時間攪拌した。フェノール/水調製物を、ガラスボトル中に分注し、これを次いで、1500 rpmにおいて遠心分離した。上の水層を採取した。採取した水相中に含有される残りのフェノールを全て、等容積のエチルエーテルで抽出した。エーテル相を、次いで、分液漏斗を用いて取り除き、水相中の残りのエーテルを全て蒸発させ、フェノール/水調製物からの最終の水相を得た。

【0077】

水相を、水に対して、5日間にわたり4 において、複数回の交換を行いながら透析し、その後、それがほぼ乾燥する(約5 mlの水が残る)まで凍結乾燥させた。マグネシウム、カルシウムおよびアジ化ナトリウムを含む0.05 MのTris(合計容積61 ml)を、凍結乾燥生成物に添加して、合計容積を約66 mlとした。

【0078】

溶解した生成物に、DNase(0.07 mg/ml)およびRNAase(0.33 mg/ml)を含む10 mlのTris緩衝液を添加した。全懸濁液を、0.45マイクロンのフィルターを通して濾過し、濾過物を37 で攪拌した。新しい酵素を同様の濃度において混合物に添加して2時間攪拌することにより、DNase/RNAase処理を繰り返した。

10

20

30

40

50

混合物のpHを、次いで、2MのNaOHで7.5まで上昇させ、10mlのTris/マグネシウム/カルシウム溶液中の25mgのプロナーゼを添加して、混合物を24時間37で撹拌した。この工程を繰り返した。

【0079】

混合物に4において5容積のエタノールを添加することにより、PSA-LTを沈降させた。溶液を、次いで、12,000×gで30分間遠心分離して、PSA-LTをペレットにした。上清を取り除き、ペレットを392mlのタイプ1のH₂O中に再懸濁した。

次いで、8mlの酢酸を溶液に添加し、それを3時間90で加熱することにより、酸処理を行った。溶液を、次いで少し冷却し、NaOHで中和し、4まで冷却した。

【0080】

繰り返しの遠心分離の後で、沈澱を廃棄し、上清を、2回の交換を行いながら、16リットルのタイプ1のH₂Oに対して4で透析した。凍結乾燥により容積を約50mlまで減少させた。20mlのアリコートをし、PBS中に懸濁した5×200cmのS400のカラム上でのクロマトグラフィーに供し、画分を収集した。画分を、寒天中での、脂質付加されたPSAおよび非脂質付加PSAの両方と反応する抗体による二重拡散法により試験し、PSA-LTがどこで溶離するかを決定した。PSA-LTは、図1において示されるように、画分46~88において見出された。これらのアリコートを、280nmにおけるUV吸収について試験し、PSA-LT含有画分が、UV吸収可能な材料を有さなかったことを決定した。

【0081】

PSA-LTを含有する画分を、次いでプールし、Minitan濃縮装置 (concentrator) (Millipore) において、10,000mwのカットオフ膜を用いて、100mlの伝導率が50μSより低くなるまで、タイプ1のH₂Oに対して濃縮および透析した。

PSA-LTを、次いで凍結乾燥した。合計のPSAの回収物は、739mgであった。

LPSの混入の程度は、SDS PAGEゲル系におけるPro Q LPS染色により決定し、約0.5%であることを決定した。多糖の純度および構造は、プロトン核磁気共鳴分光法により、600MHzの分光計において決定した。

【0082】

均等物

幾つかの本発明の態様が、本明細書において記載され説明されるが、当業者は、機能を実施するため、および/または結果を得るため、および/または本明細書において記載される利点の1または2以上のための多様な他の手段および/または構造を、容易に想起するであろうし、かかるバリエーションおよび/または改変の各々は、本明細書において記載される本発明の態様の範囲内であるものとみなされる。より一般的には、当業者は、本明細書において記載される全てのパラメーター、寸法、材料および配置は、例示であることを意味され、実際のパラメーター、寸法、材料および配置は、本発明の教示が用いられる特定の適用に依存するであろうことを、容易に理解するであろう。当業者は、本明細書において記載される特定の発明の態様に対する多くの均等物を、慣用的な実験のみを用いて、認識するか、または確認することができるであろう。したがって、前述の態様が単に例として表わされるものであること、および、添付の請求の範囲およびそれらに対する均等物の範囲内において、本発明の態様は、具体的に記載および請求されるものとは別の方法で実施してもよいことが、理解されるべきである。本開示の本発明の態様は、本明細書において記載される各々の個々の特徴、系、物品、材料、キットおよび/または方法に対して向けられる。さらに、2または3以上のかかる特徴、系、物品、材料、キットおよび/または方法の任意の組み合わせは、かかる特徴、系、物品、材料、キットおよび/または方法が互いに不一致でない場合は、本開示の本発明の範囲内に含まれる。

【0083】

本明細書において記載され用いられる全ての定義は、辞書による定義、参照として援用される文書における定義、および/または定義される用語の通常の意味に対して優先することが理解されるべきである。

本明細書において開示される全ての参照文献、特許および特許出願は、それについて各

10

20

30

40

50

々が引用される主題に関して、参照として援用され、これらは、いくつかの場合においては、当該文書の全体を包含してもよい。

本明細書において、および請求の範囲において用いられる不定冠詞「a」および「an」は、明らかに反対であることが示されない限りにおいて、「少なくとも1」を意味することが理解されるべきである。

【0084】

本明細書において、および請求の範囲において用いられる句「および/または」は、そのように抱合された要素、すなわち、いくつかの場合において接続語的に存在し、他の場合においては離接語的に存在する要素の「いずれかまたは両方」を意味することが、理解されるべきである。「および/または」により列記される複数の要素は、同じ様式において解釈されるべきであり、すなわち、そのように結合した「1または2以上の」要素である。「および/または」の節により具体的に同定される要素の他に、他の要素が随意に存在してもよく、これは、具体的に同定されたそれらの要素と関連していても関連していなくともよい。したがって、非限定的な例として、「Aおよび/またはB」についての言及は、「含む」などのオープンエンドの言語と結合して用いられる場合、一態様においては、Aのみ（随意にB以外の要素を含む）を指してもよく；別の態様においては、Bのみ（随意にA以外の要素を含む）を指してもよく；さらに別の態様においては、AおよびBの両方（随意に他の要素を含む）を指してもよい、など。

10

【0085】

本明細書において、および請求の範囲において用いられる場合「または」は、上で定義される「および/または」と同じ意味を有するものと理解されるべきである。例えば、列記中で項目を分離する場合、「または」または「および/または」は、包括的であるもの、すなわち、少なくとも1の包含として解釈されるべきであるが、また、1より多くの数の要素または要素の列記、および随意に、さらなる列記されない項目を含む。「~の1つのみ（only one of）」もしくは「~の正確に1つ（exactly one of）」、または請求の範囲において用いられる場合は「からなる（consisting of）」などの、逆であることを明らかに示される用語のみが、多数の要素または要素の列記のうちの正確に1つの要素の包含を指すであろう。一般的に、本明細書において用いられる用語「または」は、「いずれか（either）」、「~の1つ（one of）」、「~の1つのみ（only one of）」または「~の正確に1つ（exactly one of）」などの排他性の用語により先行される場合、排他的な代替物（すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない」）を示すものとしてのみ解釈されるべきである。「~から本質的になる（consisting essentially of）」は、請求の範囲において用いられる場合、特許法の分野において用いられるその通常の意味を有するべきである。

20

30

【0086】

本明細書において、および請求の範囲において用いられる場合、1または2以上の要素の列記への言及における句「少なくとも1」は、要素の列記中の要素の任意の1または2以上から選択される1または2以上の要素を意味するものと理解されるべきであるが、必ずしも、要素の列記中の具体的に列記される各々のおよび全ての要素の少なくとも1つを含まず、要素の列記中の要素の任意の組み合わせを除外しない。この定義はまた、句「少なくとも1」が言及する要素の列記中に具体的に同定される要素以外の要素が随意に存在してもよいことを可能にし、これは、具体的に同定されるこれらの要素に関連しても関連しなくてもよい。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1」（あるいは、同等に、「AまたはBの少なくとも1」、あるいは、同等に、「Aおよび/またはBの少なくとも1」）は、一態様において、少なくとも1の、随意に1より多くを含む、Aであって、Bが存在しない（および随意にB以外の要素を含む）ものを指してもよく；別の態様において、少なくとも1の、随意に1より多くを含む、Bであって、Aが存在しないもの（および随意にA以外の要素を含む）ものを指してもよく；さらに別の態様において、少なくとも1の、随意に1より多くを含む、A、および少なくとも1の、随意に1より多くを含む、B（および随意に他の要素を含む）を指してもよい、など。

40

50

【 0 0 8 7 】

また、明らかに逆であることが示されない限りにおいて、本明細書において請求される任意の方法であって、1より多くの工程または動作を含むものにおいて、当該方法の工程または動作は、必ずしも、当該方法の工程または動作が列挙される順序に限定されない。

【 0 0 8 8 】

請求の範囲において、ならびに上の明細書において、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「担持する (carrying)」、「有する (having)」、「含有する (containing)」、「含む (involving)」、「保持する (holding)」、「～からなる (composed of)」などの全ての移行句は、オープンエンドであるものと、すなわち、それを含むがそれに限定されないことを意味するものと理解されるべきである。米国特許庁の特許審査手続きの便覧、セクション2111.03において記載されるとおり、移行句「～からなる (consisting of)」および「～から本質的になる (consisting essentially of)」のみが、それぞれ、クローズド、またはセミクローズドの移行句であるべきである。

10

【 図 1 】

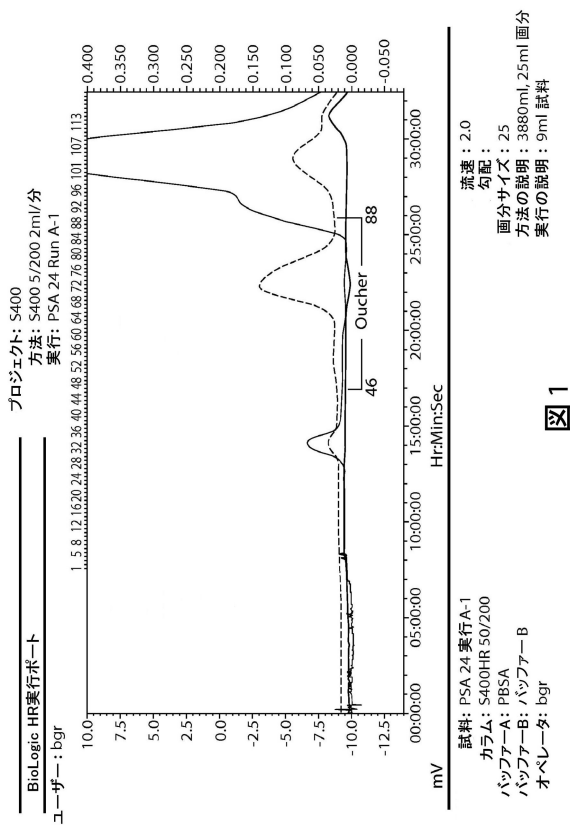


図 1

【 図 2 】

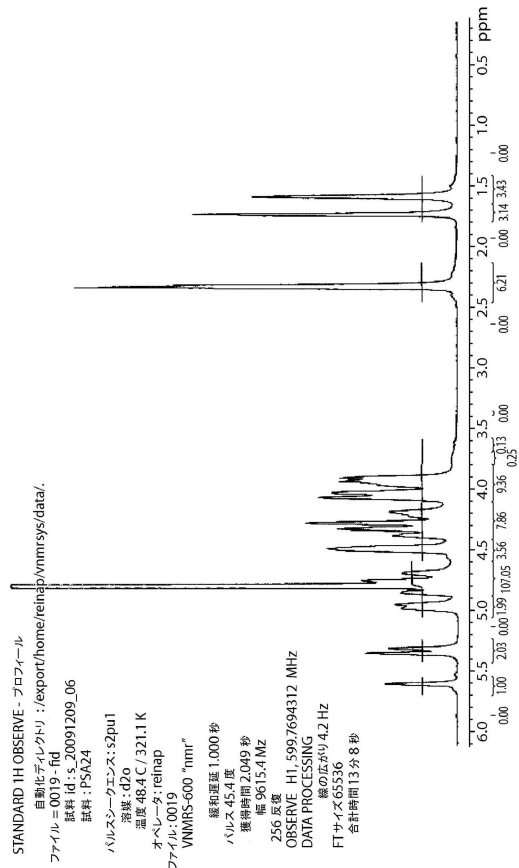


図 2

【 図 3 】

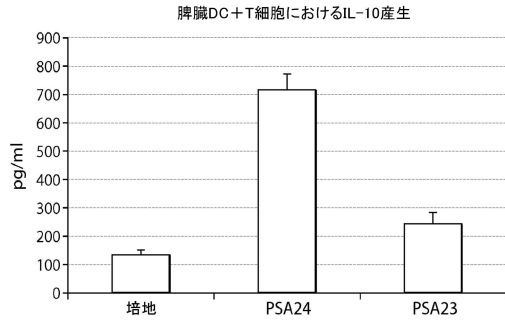


図 3

【 図 4 】

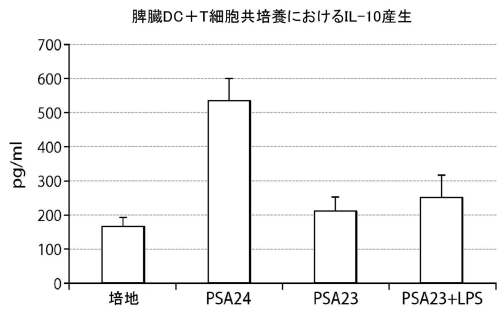


図 4

【 図 6 】

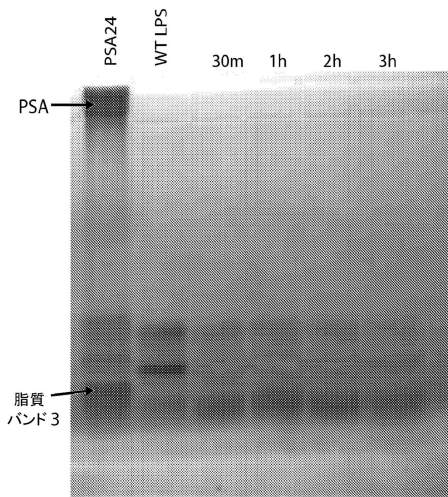


図 6

【 図 5 】

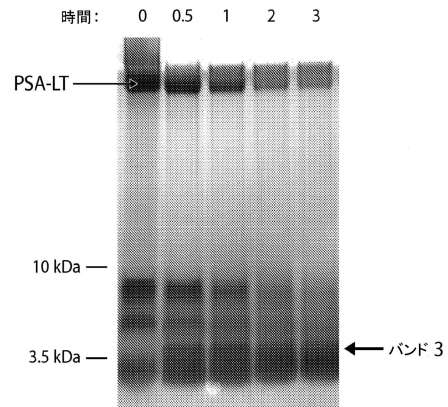


図 5

【 図 7 】

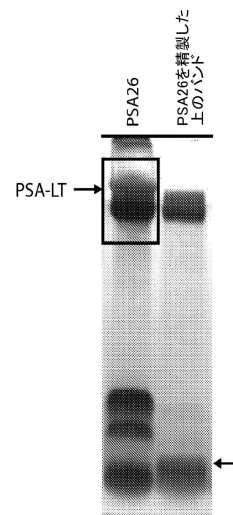
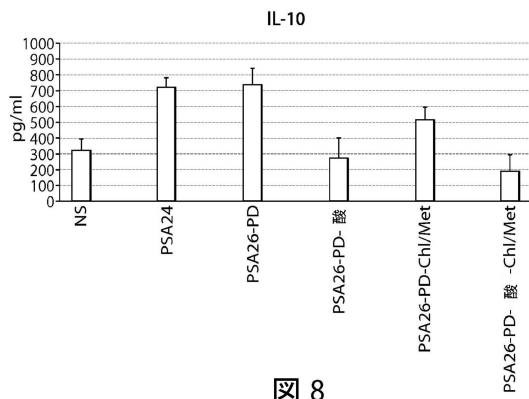
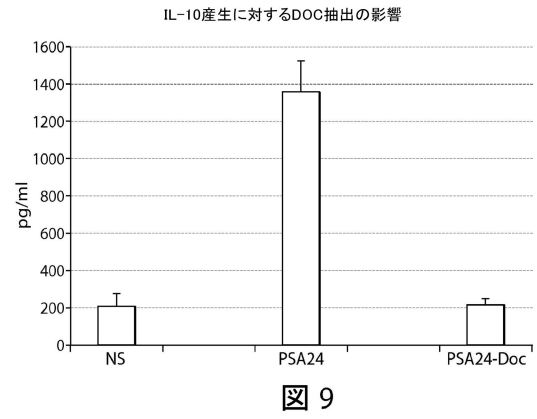


図 7

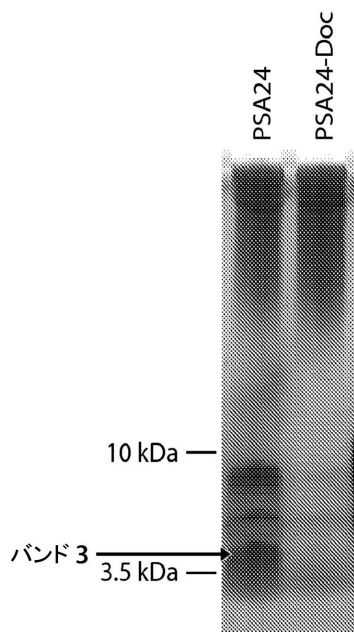
【 図 8 】



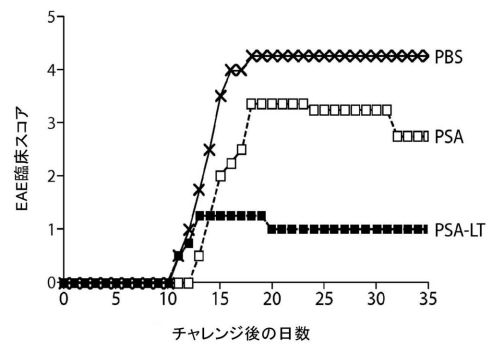
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【図 12】

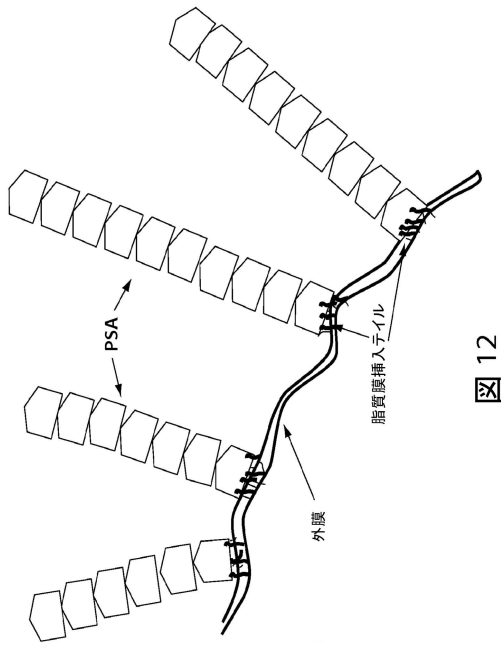


図 12

【図 13】

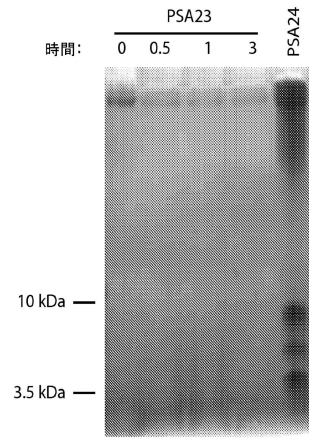


図 13

フロントページの続き

- (72)発明者 エルトウルク - ハスデミール, デニス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01606、ウースター、プロクター ストリート 59
、アパートメント 3
- (72)発明者 レйнаップ, バーバラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01721、アッシュランド、グリーン ストリート 1
11

審査官 吉田 佳代子

- (56)参考文献 国際公開第2010/124256(WO, A1)
特表2002-541113(JP, A)
国際公開第2007/092451(WO, A1)
米国特許出願公開第2010/0311686(US, A1)
PANTOSTI, A. et al, Infection and Immunity, 1991年, Vol.59, No.6, p.2075-2082
TZIANABOS, A. et al, Journal of Biological Chemistry, 1992年, Vol.267, No.25, p.182
30-18235

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/739

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)