

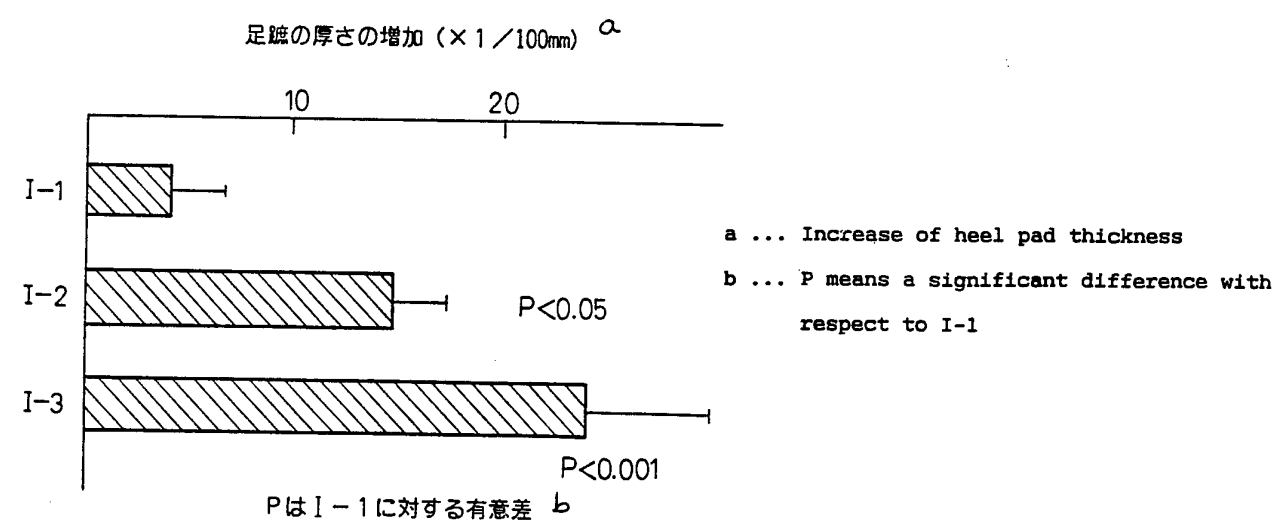


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類<sup>6</sup> <b>A61K 47/36</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO 95/11704</b></p> <p>(43) 国際公開日 1995年5月4日 (04.05.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01828 (22) 国際出願日 1994年10月28日 (28. 10. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/272693 1993年10月29日 (29. 10. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東燃株式会社 (TONEN CORPORATION) [JP/JP] 〒100 東京都千代田区一ツ橋一丁目1番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人: および</p> <p>(72) 発明者 畑中正一 (HATANAKA, Masakazu) [JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区高野東開町1-23 東大路高野第三住宅35-203 Kyoto, (JP) 水落次男 (MIZUOCHI, Tsuguo) [JP/JP] 〒145 東京都大田区田園調布南3-9-103 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 杉本正信 (SUGIMOTO, Masanobu) [JP/JP] 大石和恵 (OHISHI, Kazue) [JP/JP] 〒354 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社 総合研究所内 Saitama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : LIPOSOME HAVING OLIGOSACCHARIDE ON THE SURFACE

(54) 発明の名称 オリゴ糖を表面に有するリポソーム



(57) Abstract

A liposome as an adjuvant which is effective for somatic immunization and reduced in toxicity and antigenicity and can be administered to humans. The liposome comprises 2-11 saccharide residues and has on its surface an oligosaccharide which can combine with a lectin originating in an antigen-presenting cell, and a vaccine is prepared by enclosing an antigen in the liposome.

(57) 要約

体細胞免疫に効果的であり、且つ毒性及び抗原性が低くヒトに投与することができるアジュバントとしてのリポソームを提供する。

2～11個の糖残基から成り、抗原提示細胞由来のレクチンに結合することができるオリゴ糖を表面に有するリポソーム；及び該リポソームに抗原を封入して成るワクチン。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストラリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

## 明 細 書

オリゴ糖を表面に有するリポソーム

## 技術分野

本発明は細胞性免疫を効率良く誘導できるリポソーム製剤の製造方法に関するもので、このリポソームはワクチンや免疫療法剤のアジュバント（免疫促進補助剤）として広く使用できる。

## 背景技術

ワクチンや免疫療法剤では、抗原単独では一般に有効な免疫反応がでないために、アジュバントが免疫原性を高めるための補助剤として使用される。研究の上では、多数のアジュバント作用をもつ物質や製剤が報告されているが、毒性が強いといった理由によりほとんどのものが実用化されておらず、磷酸化アルミニウムアジュバントあるいは水酸化アルミニウムを主成分とするアラムアジュバントがヒトに適用されている唯一のものである。

これに代る方法として、特開平 2 - 188532には、抗原提示糖蛋白質をリポソームに再構成したリポソームワクチンが記載されている。免疫は液性免疫と細胞性免疫に大別され、アラムアジュバントは液性免疫を比較的効率良く誘導できるが、細胞性免疫誘導に関してはあまり有効ではない。しかし、最近エイズを初めとする持続感染型のウィルス性疾患では、細胞性免疫の役割が重要であることが次第に明らかになってきた（J. Salk et al., Science 260, 1270-1271, 1993; M. Sugimoto, K. Ohishi and Y. Ikawa, Immunol. Today 14, 190-191, 1993）。

したがって、強い細胞性免疫を誘導できるアジュバントの開発の

必要性がでてきた。マンナンのような高分子多糖体にて被覆したりリポソームには、強い細胞性免疫誘導能のあることが報告されている (Y. Noguchi et al., J. Immunol., 143, 3737-3742, 1989)。また、W092/04887 には、マンノースを含む多糖類で被覆されたりリポソームが記載されている。しかし、マンナンは異なる大きさのポリマンノースの混合物であり、また、生体に強い毒性を示すことが知られており (三上健 他、第15回糖質シンポジウム抄録、43-44、平成5年7月29, 30日、仙台) 医薬品としては不向きである。

すなわち、マンナンはマンノース残基が50~100個よりなる大きな多糖体で、分子量の点でも不均一であり、また糖の結合様式など構造的にも未知である。この多糖体は、動物に接種すると抗体を産生し (抗原性を有する)、また、上述したように強い毒性のあることも知られている。

#### 発明の開示

従って本発明は、細胞性免疫の誘導のために有効なアジュバント活性を有し、且つ毒性及び抗原性が低くて、ヒトに対して使用することができるリポソームを提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、2~11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームが、細胞性免疫の誘導のために有効なアジュバント活性を有し、しかも毒性及び抗原性が低く、ヒトに対して使用することができることを見出した。

従って、本発明は、2~11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームを提供する。

本発明はまた、上記のリポソーム中に抗原を封入して成るワクチ

ンを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は実験 I の結果を示すグラフである。

図 2 は実験 II の結果を示すグラフである。

図 3 は実験 III の結果を示すグラフである。

図 4 は実験 IV の結果を示すグラフである。

図中、斜線の棒は平均値を示し、1 本線は平均誤差を示す。

#### 具体的な説明

本発明のリポソームは細胞性免疫の誘導のためのアジュバント活性を有し、且つ毒性及びそれ自体の抗原性が低いので、ヒトに対して、ワクチン等の抗原のアジュバントとして使用することができる。特に該リポソームに目的とする抗原又は免疫原を封入した場合、強力なワクチンが得られる。

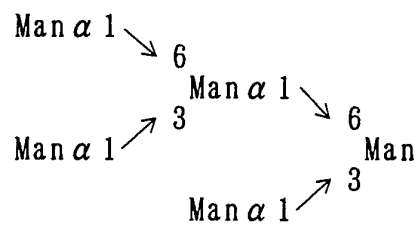
本発明のリポソームは、その表面に、抗原提示細胞由来のレクチンに結合することができ、且つ 2～11個の糖残基から成るオリゴ糖を有している。ここで、抗原提示細胞として、マクロファージ、 dendritic 細胞等を意味する。また、抗原提示細胞由来のレクチンとは、上記のごとき抗原提示細胞の表面に存在するマンノース・レセプター等を意味する。

前記オリゴ糖を構成する単糖としては、それ自体が、抗原提示細胞のレクチンに結合する性質を有するものが好ましく、例えばマクロファージのマンノース・レセプターが認識する糖をその認識の強さの順に挙げれば、D-マンノース (D-Man)、L-フコース (L-Fuc) > D-N-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc) > D-ガラクトース (D-Gal)、D-N-アセチルガラクトサミ

ン (D-GalNAc)、D-ラムノース(D-Rha)である (B. L. Largent et al., J. Biol. Chem. 259, 1764-1769, 1984)。しかしながら、オリゴ糖は、それ自体として抗原提示細胞のレクチンに結合できればよく、その構成糖として抗原提示細胞のレクチンに結合しないものを含んでいてもよい。

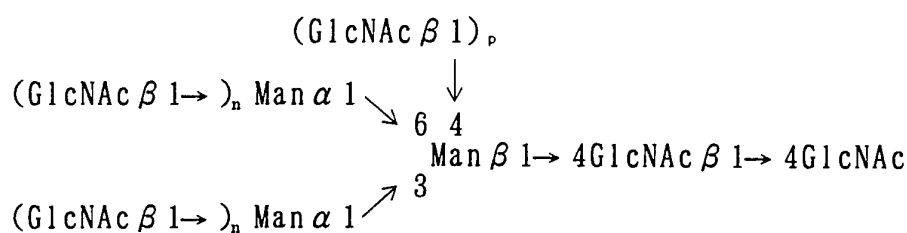
オリゴ糖中で、各構成糖は、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$  結合又は  $\beta 1 - 4$  結合等あるいはこれらの組合せにより結合している。例えば、マンノースは上記の結合により単鎖を構成してもよく、又は  $\alpha 1 \rightarrow 3$  結合と  $\alpha 1 \rightarrow 6$  結合との組合せにより分枝構造をとってもよい。オリゴ糖中の単糖の数は、好ましくは 2 ~ 11 個である。具体的なオリゴ糖として、例えばマンノビオース (Man 2)、マンノトリオース (Man 3)、マンノテトラオース (Man 4)、マンノペンタオース (Man 5)、マンノヘキサオース (Man 6)、マンノヘプタオース (Man 7)、種々の混合オリゴ糖、例えば下記に示す M 5 (化合物 1) 及び RN (化合物 2) 等を挙げることができる。

#### M 5 (化合物 1)



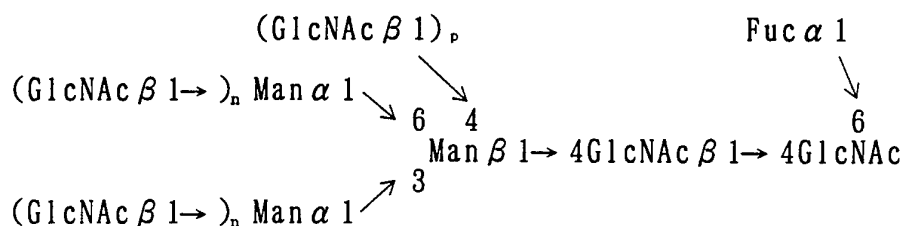


(化合物 4 - 2)



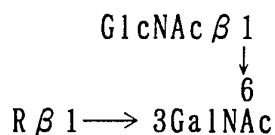
(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。式中右側の 4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

(化合物 4 - 3)



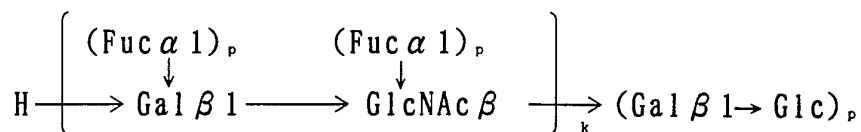
(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

(化合物 4 - 4)



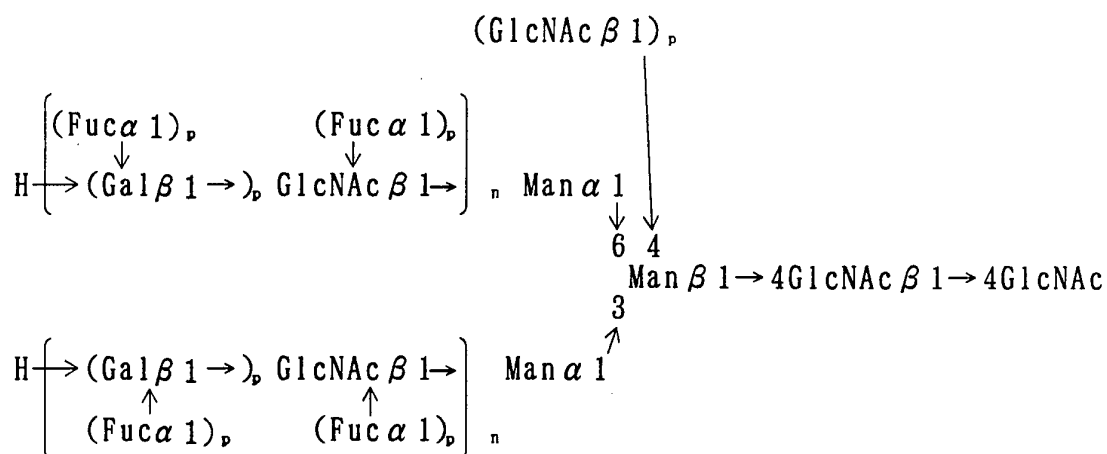
R は H, GlcNAc、又は (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  6)<sub>p</sub>, (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3)<sub>p</sub>, Gal (p は 0 又は 1 である。)

(化合物 5 - 1)



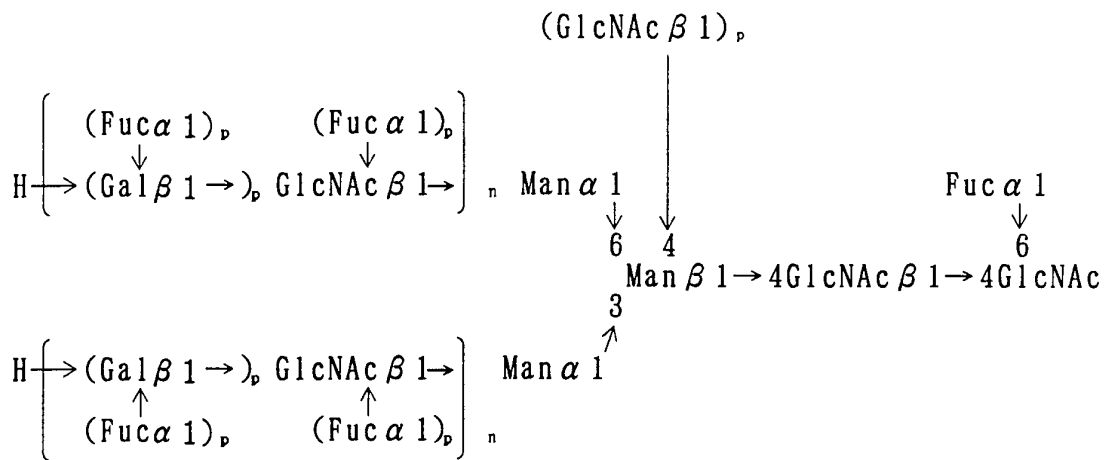
(k は 1 ~ 5 であり、p はそれぞれ独立に 0 又は 1 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

(化合物 5 - 2)



(p はそれぞれ独立に 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

(化合物 5 - 3)



(p はそれぞれ独立に 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

上記のオリゴ糖は、いずれも 1 個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するための手段として使用することができる。すなわち、このアルデヒドと、アミノ基を有する脂質との間に反応により Schiff 塩基を形成し、次にこの Schiff 塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる (水落次男、糖質工学、224 - 232 頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992)。

上記のアミノ基を有する脂質は、好ましくはアミノ基を有するリン脂質であり、例えばホスファチジルエタノールアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) 等を使用すること

ができる。

上記のようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組合わせて使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を修飾したもの、例えば水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類、例えばコレステロール (Chol) ; ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) ; ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) ; ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS) ; ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA)、等が挙げられる。

リポソームの作製自身は公知の方法を用いる [D. W. Deeamer, P. S. Uster, "Liposome" ed. by M. J. Ostro, Marcel Dekker Inc., N. Y. Basel, 1983, p27]。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。

例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。

次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリポソームが形成される。この際に、上記水性媒体にワクチン等の活性成分である所望の抗原又は免疫原を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、該抗原又は免疫原をリポソームに封入することができる。

オリゴ糖をリポソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のM5とDPPEとの結合物(M5-DPPE)、RNとDPPEとの結合物(RN-DPPE)を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたりポソームと混合して、例えば4℃ないし室温において24～120時間、例えば約72時間インキュベーションすればよい。

他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、該人工糖脂質を、リポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリポソームを形成すればよい。

リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする抗原の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質1mgに対して5 $\mu$ g～500 $\mu$ gである。

本発明のリポソームは、多重層タイプ(multilamella vesicle)であってもよく、また単層タイプ(unilamella vesicle)であってもよい。これらは既知の常法に従って調製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方のタイプに、例えば多重層タイプのリポソームを単層タイプのリポソームに転換することもできる。本発明のリポソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することに

より、粒径を整えることができる。

本発明のリポソームに封入する抗原としては、水溶性のあらゆる抗原を用いることができる。このような抗原として、例えば蛋白質又はペプチド抗原、特に合成蛋白質又はペプチド抗原、例えば分離源からの抽出により、遺伝子組換えにより、あるいは化学合成により製造された蛋白質、糖蛋白質、ペプチドおよび糖ペプチドが使用される。これらの抗原として、例えばヒト免疫不全症ウィルス(HIV)、インフルエンザウィルス、マラリア原虫、結核菌などの外被タンパク質やコアタンパク質あるいはその一部のペプチドなどが挙げられる。

リポソームの量に対する抗原の量は、非常に重要であり、抗原の種類やリポソームの組成や構造等により異なるが、一般にリポソームを構成する脂質1mg当り1 $\mu$ g $\sim$ 100 $\mu$ gである。

オリゴ糖が表面に結合していることは、次のようにして証明される。すなわち、糖に該当するレクチンを添加してリポソームの凝集反応で調べる。

糖の効果を評価するためには、モデル抗原を封入したリポソームを使用するが、抗原としては卵白アルブミン(OVA)のように実験例も多く、抗原性の高い標準的なタンパク質が好ましい。細胞性免疫の指標としてはマウスでの遅延型アレルギー(DTH)反応( $T_H$ 1細胞が担当)を採用することができる。

目的とするアジュバントは、実験例に示すようにDTH反応を誘導することができる。したがって、 $T_H$ 1細胞が関与するような病原体の感染防御ワクチン、その免疫療法剤、あるいは癌免疫療法剤のアジュバントとして使用できるであろう。

## 実施例

次に、実施例及び実験例により、本発明をさらに具体的に説明する。

### 実施例 1. 人工糖脂質の調製

$\alpha$  1  $\rightarrow$  3 結合したマンノビオース (Man 2)、Man  $\alpha$  1  $\rightarrow$  6 (Man  $\alpha$  1  $\rightarrow$  3) Man という構造を有するマンノトリオース (Man 3)、M 5 (化合物 1)、及び RN (化合物 2) 2.5 ~ 5 mg に 600  $\mu$  l の蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。

他方、クロロホルム/メタノール (1 : 1 体積比) 混合液に DPPE を 5 mg/ml の濃度で溶解して DPPE 溶液を調製した。また、メタノールに、 $N_3$  BH<sub>3</sub> CN を 10 mg/ml の濃度に溶解して  $N_3$  BH<sub>3</sub> CN 溶液を調製した。

前記オリゴ糖溶液 600  $\mu$  l に前記 DPPE 溶液 9.4 ml 及び前記  $N_3$  BH<sub>3</sub> CN 溶液 1 ml を加えて攪拌混合した。この反応混合液を 60°C にて 16 時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。この反応混合液をシリカゲルカラム及び C 18 逆相カラムにより精製することにより人工糖脂質を得た。尚、マンナンコレステロール (同仁化学) は市販品を使用した。

### 実施例 2. 抗原封入リポソームの調製

10 mM の DPPC のクロロホルム・メタノール (2 : 1、V/V) 溶液 (以下、C/M 溶液と略す) と 10 mM のコレステロール (Chol) の C/M 溶液を 2 : 1 (通常合計 3 ml) の割合に混ぜて、25 ml の梨型フラスコに取り、エバポレーターに梨型フラスコを接続させ、40°C で減圧下、C/M 溶液を蒸発除去した。なおこの際に、リポソーム表面に付加すべきオリゴ糖がマンノビオース (Man 2) 又はマンノトリオース (Man 3) の場合には、これから調製した人工糖脂質および比較のための DPPE をクロロホルムに溶解し、DPPC に対して 1/10 モル

の比率で加えた。

フラスコの底に薄い脂質膜ができるが、これにクロロホルムを加えて膜を一旦溶かした後に、再度溶媒を蒸発除去した。この操作をさらに2～3回繰り返すと、きれいな脂質の薄膜ができた。デシケーターにフラスコを1時間以上入れて完全に溶媒を除き、蒸留水を加え、vortexをかけて水和した。内容物を試験管に移し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で20分間予備冷却凍結した後、凍結乾燥機にかけて水分を除いた。

モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)の水溶液(通常 $10\text{mg}/\text{ml}$ )を加えてボルテックスをかけて水和し、OVAを封入したりポソームを形成した。このリポソーム懸濁液にPBS(リン酸緩衝液)を加え、 $15,000\text{rpm}$ にて遠心して、上清を除いた。この操作をもう一度繰り返した後に、沈殿物を目的のリポソームとして用いた。これは multilamella vesicle (多重層) タイプのリポソームである。

リポソームの表面に付加すべきオリゴ糖がM5又はRN、あるいはマンナン(Mn)(比較例)の場合には、これらから調製した人工糖脂質を $2\sim 10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度にPBSに溶解し、この溶液と上に調製したリポソームとを5:1の体積比で混合し、この混合物を室温で3日間インキュベートすることにより、オリゴ糖をリポソーム表面に吸着させた。未吸着の糖を測定することにより被覆された糖脂質の量を求めた。なお全てのリポソームの修飾は糖脂質で行ったが、簡便のため“M5”あるいは“マンナン”という具合に糖のみで記述してある。

出来上がったリポソームに含まれる、OVA、Cholおよび各種糖の定量は次のように行った。OVAは界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いてリポソームを溶かした後に、SDS-PAGE電気泳動にて分離し、クーマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)にて染色した。染色の程度をデンストメトリーで数値化し、標準検体の

OVA と比較することで蛋白質を算出した。Cholは、コレステロールオキシダーゼ・p-クロロフェノール法による臨床診断用キット（和光純薬工業株式会社）を用いて定量した。糖含量はアンスロン-硫酸法にて定量した。

以上のような操作により、表 1 に示すような OVA, Chol、および糖脂質含有（マウス 1 匹の投与量当たり）のリポソームを作製した。

表 1

実験	リポソーム	OVA( $\mu$ g)	Chol( $\mu$ g)	糖脂質( $\mu$ g)
I	1	5.0	80.2	0
	2	5.0	80.2	166.7(M5)
	3	5.0	80.2	237.5(Mn)
II	1	12.3	70	0
	2	12.3	70	185.8(M5)
	3	12.3	70	3.1(RN)
	4	12.3	70	68.0(Mn)
III	1	6.0	60	DPPE
	2	5.5	60	Man2-DPPE
	3	10.3	60	Man3-DPPE

注 (1) 数値 ( $\mu$ g) はマウス 1 匹当りの量を示す。

(2) 実験 III における糖脂質の量は DPPC に対して 1 / 10 のモル比である。

#### 実験 マウスにおける遅延型アレルギー (DTH) 反応誘導実験

一群 5 匹の Balb/c マウス（雌、6 週令）に、上記のリポソームを接種し、その細胞性免疫誘導能を DTH 反応で評価した。上記の各

種リポソームを、0.2mlのPBSに懸濁し、その0.1mlづつを後背部二箇所皮下接種した。接種後一週間後に、左の足蹠にアラムアジュバントにまぜたOVA 40 $\mu$ g / アラム22 $\mu$ g / 25 $\mu$ l PBSを右の足蹠に、アラム22 $\mu$ g / 25 $\mu$ l PBSを左の足蹠に対照として皮下注射し、その24時間後に、左右の足蹠の厚さを測定した。右足の厚さから左足の厚さを差し引いたものを、特異的なDTH反応とした。

図1に実験Iの結果を示す。M5で被覆したりポソームは被覆しないものに比較して統計的に有意に強いDTH反応を誘導した。Mnにも同様の促進効果があり、その程度はほぼM5と同じであった。すなわち、M5とMnのグループの間には統計的な有意差は無かった。

図2に実験IIの結果を示す。やはりM5あるいはMnで被覆したりポソームは糖で被覆しないリポソームに比べ有意に高いDTH反応を誘導した。また、RNにも弱いながら統計的に有意なDTH反応の増強効果があった。しかし、M5とMnの間にはやはり有意差はなかった。

以上の二つの実験を総合すると、被覆したりポソームのDTH反応誘導効果で見ると、M5はMnにほぼ匹敵する効果を有していることが分かった。

図3に実験IIIの結果を示す。OVAを封入したDPPEを含むリポソーム(対照)と、DPPEの代わりに各種オリゴ糖とDPPEの結合体を含むリポソームの活性を調べた。そのなかでマンノビオース(Man2)とマンノトリオース(Man3)の群のみ統計的に有意に強いDTH反応を誘導した。

なお、マンノース、ラクトース又はガラクトースとDPPEの結合体には有意な活性は認められなかった(データは示さず)。

以上の結果から、少なくとも2~11の糖残基よりなるオリゴマンノース等のオリゴ糖とDPPEの結合体には、リポソームに添加ないしリポソームを被覆することで、リポソームによるDTH反応誘導能を

促進する効果のあることが分かった。また、マンナンにも同様の効果のあることから、オリゴマンノースの長さは、これ以上長くても効果のあることが分かる。

図 4 に、実験 IV の結果を示す。対照として従来使用されているアラムアジュバントの効果との比較を示す。アジュバントとしてマンナン被覆リポソームを使用し抗原を使用しなかった対照 (IV-1)、抗原としての OVA を食塩水 (IV-2)、常用のアラムアジュバント (IV-3)、糖を被覆していないリポソーム (IV-4) 又はマンナン被覆リポソーム (IV-5) と共に投与した。マウス 1 匹当たり、OVA は  $12.5 \mu\text{g}$ 、アラムは  $15 \mu\text{g}$ 、リポソームはコレステロール量として  $40 \mu\text{g}$  を使用した。

その結果、この実験では、OVA を食塩水、アラムアジュバント又はマンナンを被覆していないリポソームで接種した群の間には、まったく差は認められなかった。むしろアラムアジュバントの接種群は DTH 誘導能において、この 3 群の中では最も低い傾向を示した。そしてマンナンを被覆したリポソームで接種した群が一番高い免疫原性を示した。この群の DTH 反応はアラムアジュバントの群のものに比較し統計的に有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

以上、図 1 ~ 4 の結果を総合すると、マンナンないしオリゴマンノースなどのオリゴ糖によって被覆されたリポソームは、アラムアジュバントに比較して DTH の誘導能において優れていることが結論される。

#### 産業上の利用可能性

本発明のリポソームは細胞性免疫の誘導のためのアジュバント活性を有し、且つ毒性及びそれ自体の抗原性が低いので、ヒトに対して、ワクチン等の抗原のアジュバントとして使用することができる。

特に該リポソームに目的とする抗原又は免疫原を封入した場合、強力なワクチンが得られる。

## 請 求 の 範 囲

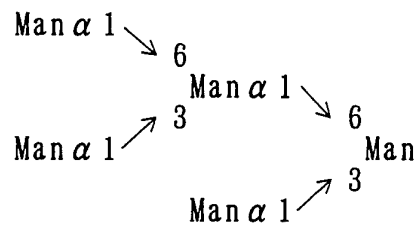
1. 2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソーム。

2. 前記オリゴ糖を構成する単糖が、D-マンノース (D-Man)、L-フコース (L-Fuc)、D-N-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc)、D-ガラクトース (D-Gal)、D-N-アセチルガラクトサミン (D-GalNAc)、及びD-ラムノース (D-Rha) から成る群から選択された1又は複数種の単糖である、請求項1に記載のリポソーム。

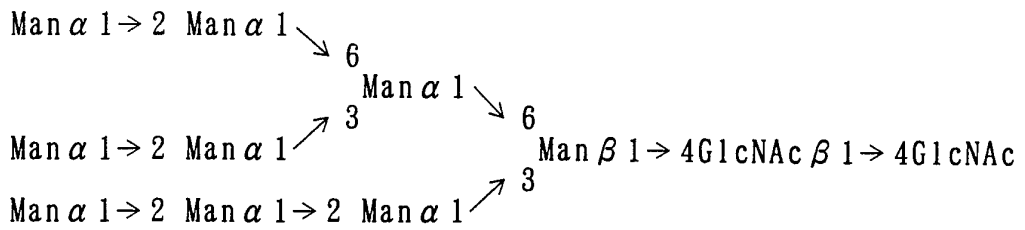
3. 前記オリゴ糖が、マンノースから成り、マンノビオース (Man 2)、マンノトリオース (Man 3)、マンノテトラオース (Man 4)、マンノペンタオース (Man 5)、マンノヘキサオース (Man 6)、マンノヘプタオース (Man 7) から成る群から選択されたものである、請求項1に記載のリポソーム。

4. 前記オリゴ糖が、下記構造式 M 5 又は RN :

(M 5)



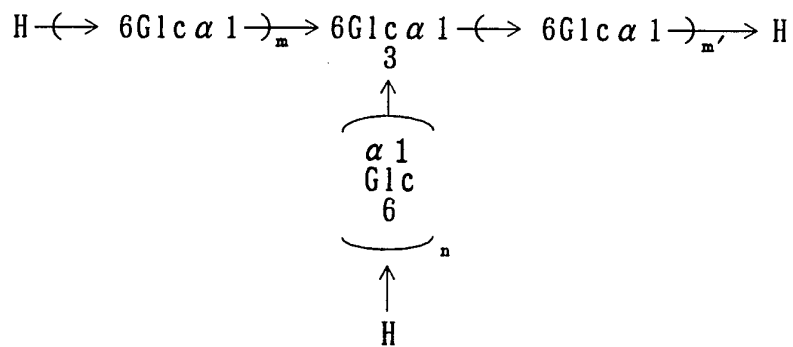
(RN)



(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合している Man は、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

により表わされるオリゴ糖である、請求項 1 に記載のリポソーム。

5. 前記オリゴ糖が、グルコースを含有するものであり、次の式 (3) :

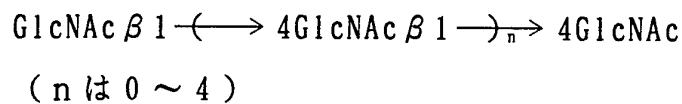


( $m + m' + n$  は 1 ~ 10)

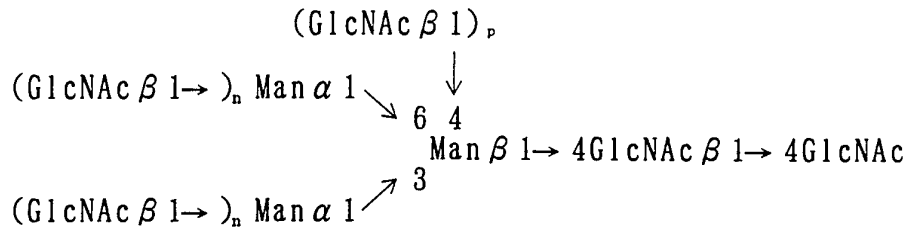
により表わされるオリゴ糖である、請求項 1 に記載のリポソーム。

6. 前記オリゴ糖が、N-アセチルグルコサミンを含有するものであり、次の式 (4-1) ~ (4-4) :

(4-1)

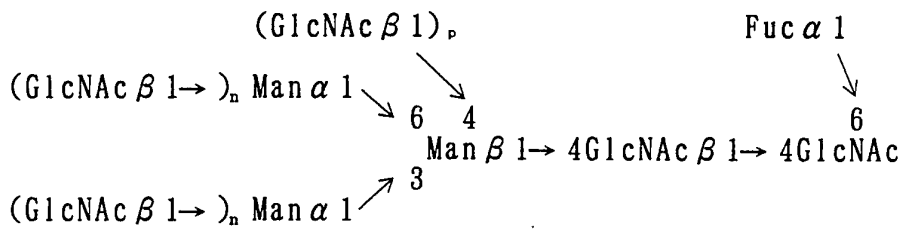


( 4 - 2 )



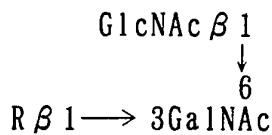
( p は 0 又は 1 であり、 n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。式中右側の 4 GlcNAc β 1 → 4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc β 1 →)<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

( 4 - 3 )



( p は 0 又は 1 であり、 n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。また、(GlcNAc β 1 →)<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

( 4 - 4 )



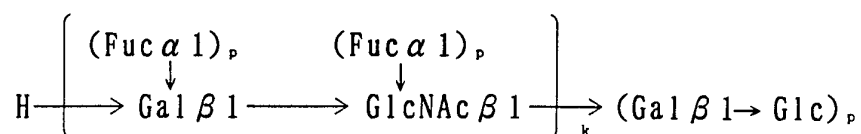
R は H、GlcNAc、又は (GlcNAc β 1 → 6)<sub>p</sub>、(GlcNAc β 1 → 3)<sub>p</sub>、Gal

(p は 0 又は 1 である。)

のいずれかにより表わされるオリゴ糖である、請求項 1 に記載のリポソーム。

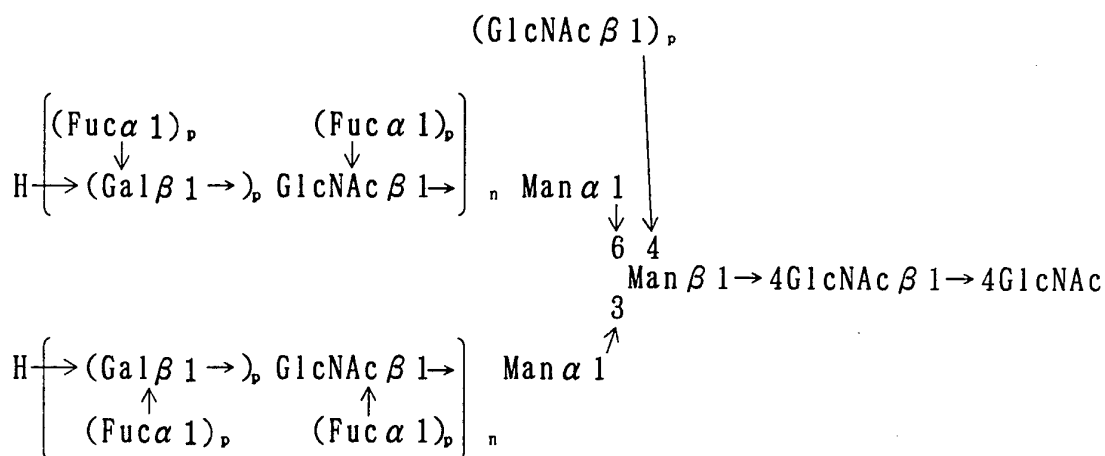
7. 前記リポソームが、フコースを含有するものであり、次の式 (5-1), (5-2) 又は (5-3) :

(5-1)



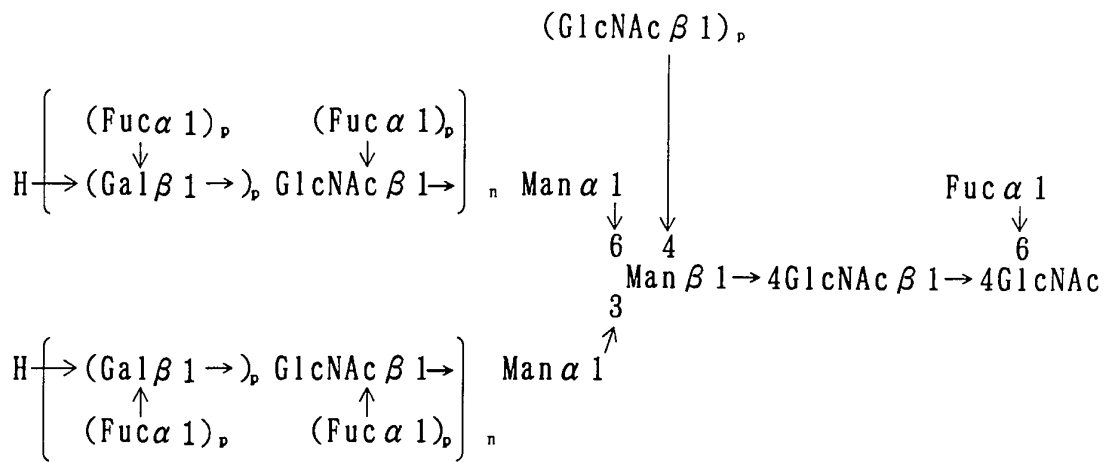
(k は 1 ~ 5 であり、p はそれぞれ独立に 0 又は 1 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

(5-2)



(p はそれぞれ独立に 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4 GlcNAc β 1 → 4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

( 5 - 3 )



( p はそれぞれ独立に 0 又は 1 であり、 n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4 GlcNAc β 1 → 4 GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

のいずれかにより表わされるオリゴ糖である、請求項 1 に記載のリポソーム。

8. 前記リポソームがステロール類、例えばコレステロール

(Chol) ; ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) ; ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) ; ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS) ; 並びにホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA) から成る群から選択される 1 種又は複数種

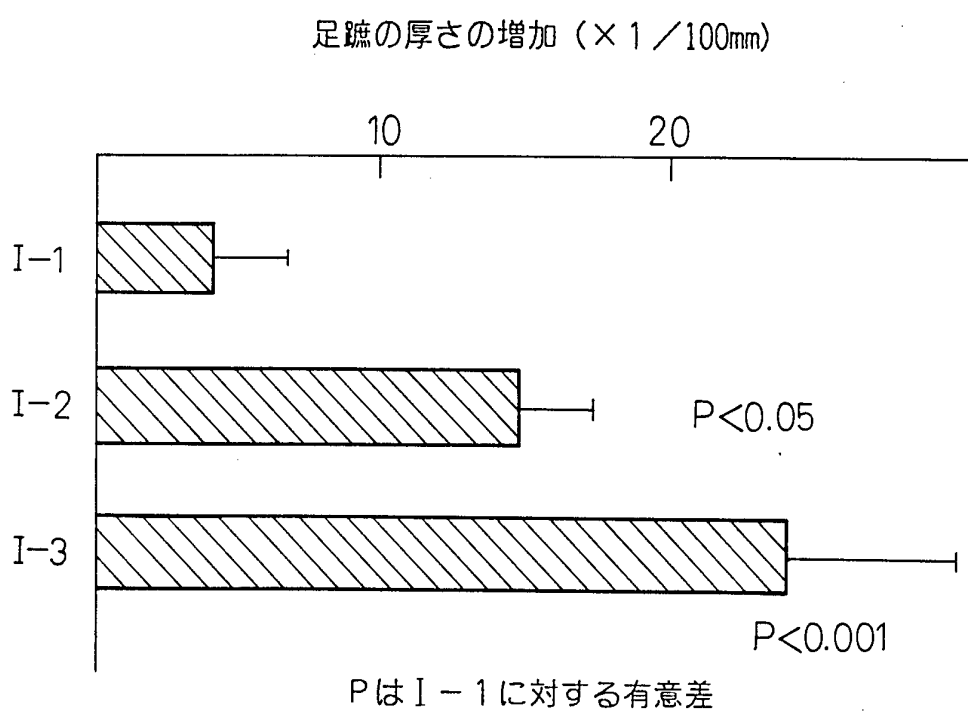
の脂質から構成されている、請求項 1 に記載のリポソーム。

9. 前記リポソームを構成する脂質がアミノ基を有する脂質であり、この脂質のアミノ基と、前記オリゴ糖のアルデヒドとの反応により、リポソームとオリゴ糖とが結合されている、請求項 1 に記載のリポソーム。

10. 前記アミノ基を有する脂質が、ホスファチジルエタノールアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) 又はジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) である、請求項 1 に記載のリポソーム。

11. 請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のリポソームに抗原を封入して成るワクチン。

# Fig.1



# Fig. 2

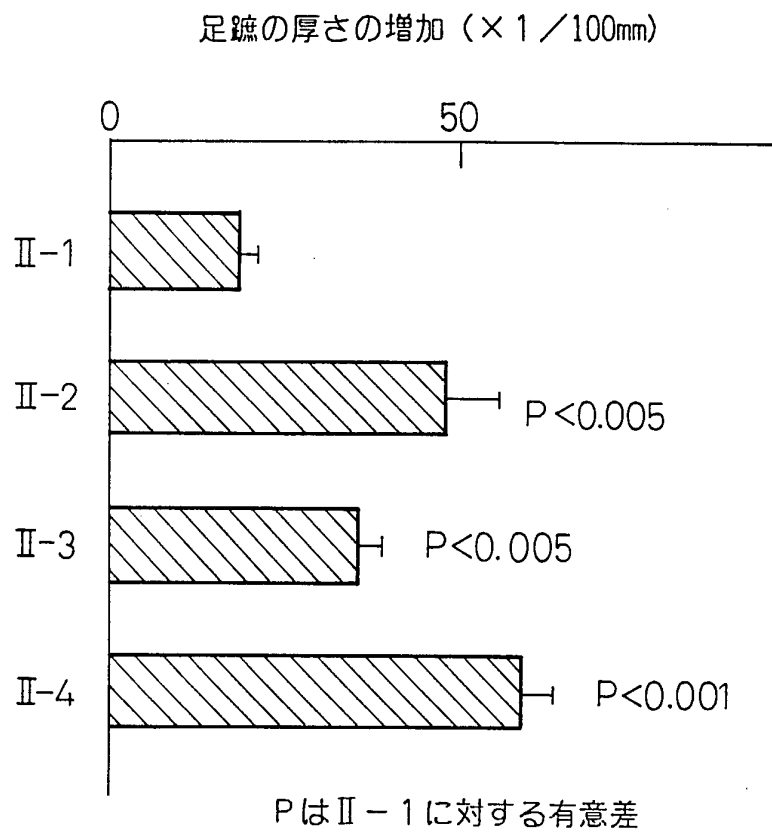
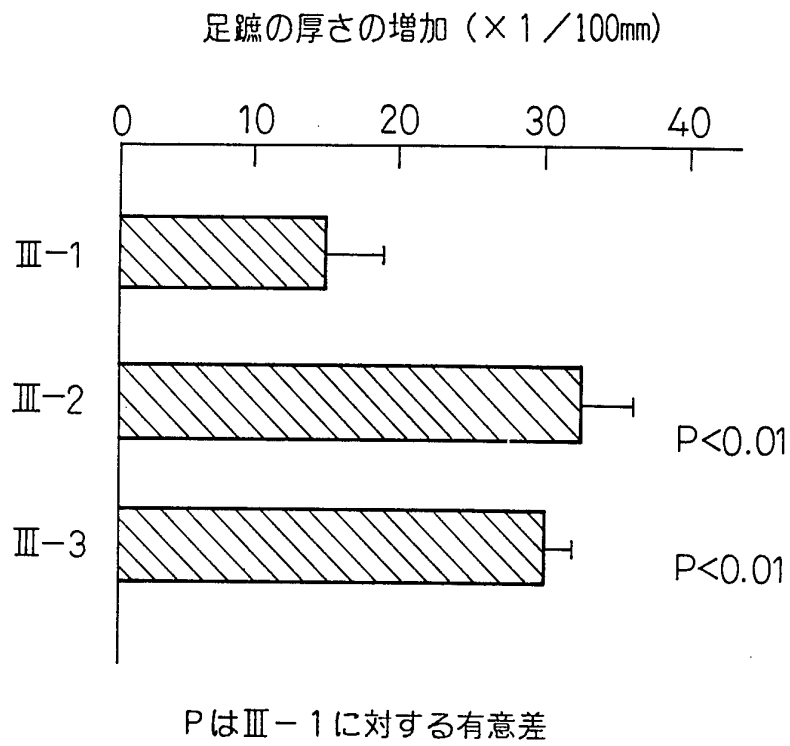
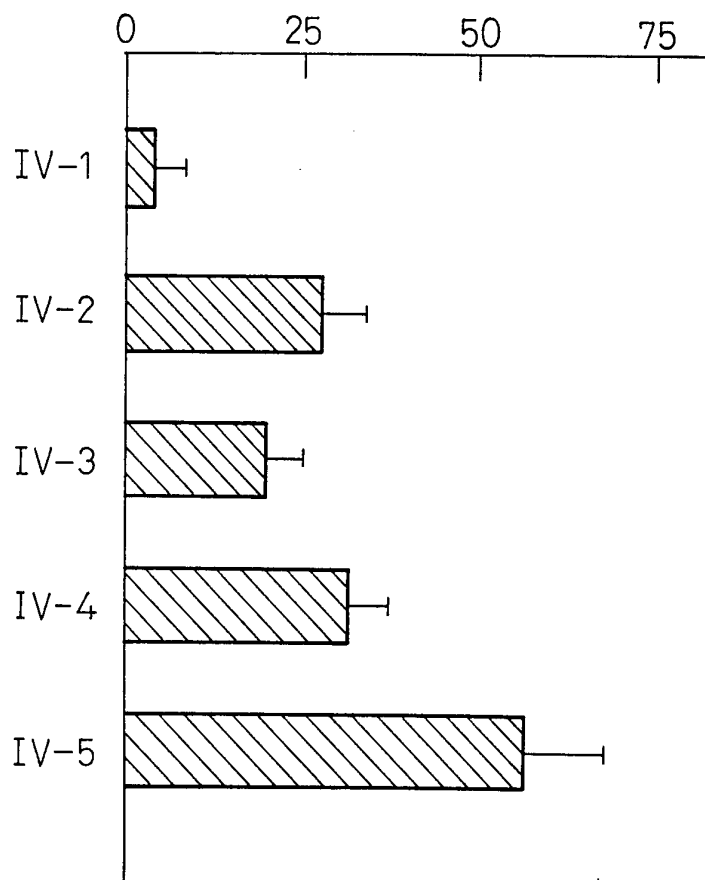


Fig. 3



# Fig. 4

足跡の厚さの増加 (× 1 / 100mm)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl <sup>6</sup> A61K47/36 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> A61K47/36, A61K39/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 63-159402 (Rikagaku Kenkyusho), July 2, 1988 (02. 07. 88), Line 5, lower left column, page 1 to line 7, lower left column, page 2, (Family: none)	1-11
A	JP, A, 60-45588 (Rikagaku Kenkyusho), March 12, 1985 (12. 03. 85), Line 5, lower left column to line 3, lower right column, page 1, (Family: none)	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search December 12, 1994 (12. 12. 94)		Date of mailing of the international search report January 10, 1995 (10. 01. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>8</sup> A 61 K 47 / 36		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>8</sup> A 61 K 47 / 36 , A 61 K 39 / 00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-159402 (理化学研究所), 2. 7月. 1988 (02. 07. 88), 第1頁, 左下欄, 第5行-第2頁, 左下欄, 第7行 (ファミリーなし)	1-11
A	JP, A, 60-45588 (理化学研究所), 12. 3月. 1985 (12. 03. 85), 第1頁, 左下欄, 第5行-右下欄, 第3行 (ファミリーなし)	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
12. 12. 94	10.01.95	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  弘 實 謙 二	4 C 7 4 3 3
	電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 5 4