(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-529881
(P2004-529881A)
(43)公表日　平成16年9月30日(2004.9.30)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 39/385	A61K 39/385		4C076
A61K 47/48	A61K 47/48		4C085
A61P 37/04	A61P 37/04		4H045
A61P 43/00	A61P 43/00	121	
// C07K 14/705	C07K 14/705		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 83 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-565614(P2002-565614)
(86)(22)出願日　平成14年2月19日(2002.2.19)
(85)翻訳文提出日　平成15年8月18日(2003.8.18)
(86)国際出願番号　PCT/DK2002/000112
(87)国際公開番号　WO2002/066056
(87)国際公開日　平成14年8月29日(2002.8.29)
(31)優先権主張番号　PCT/DK01/00113
(32)優先日　平成13年2月19日(2001.2.19)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号　09/785,215
(32)優先日　平成13年2月20日(2001.2.20)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PA 2001 01231
(32)優先日　平成13年8月20日(2001.8.20)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

(71)出願人　501023476
ファーメクサ　エイ／エス
デンマーク、ディーケー－２９７０　ホーショルム、コグレ　アレ　６
Ｋｏｇｌｅ　Ａｌｌｅ　６，ＤＫ－２９７０　Ｈｏｒｓｈｏｌｍ　ＤＥＮＭＡＲＫ
(74)代理人　100065248
弁理士　野河　信太郎
(72)発明者　ニールセン，クラウス，グレゴリウス
デンマーク、ディーケー－２９７０　ホーショルム、コグレ　アレ　６、シー／オー　エム　アンド　イー　バイオテック　エイ／エス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】合成ワクチン剤

(57)【要約】
この発明は、活性化ポリヒドロキシポリマー置換を２つの別の抗原決定基に付着してなる新規な免疫原を提供する。第１抗原決定基はB－細胞またはCTLエピトープを含み、第２抗原決定基は、T－ヘルパーエピトープを含む。好ましい具体例では、抗原決定基は、異なる分子と種から由来する。この発明の例示の免疫原は、線状のトレシル活性化デキストラン骨格に、抗原のB－細胞またはCTLエピトープが、またユニバーサルなT－ヘルパーエピトープが結合する。また免疫原からなる免疫原性組成物、免疫化方法と、発明の適する免疫原の同定方法が開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｃ）少なくとも１つのB－細胞エピトープおよび／または少なくとも１つのCTLエピトープを含む少なくとも１つの第１抗原決定基と
ｄ）T－ヘルパー細胞エピトープ（T_Hエピトープ）を含む少なくとも１つの第２抗原決定基とからなり、少なくとも１つの第１と第２抗原決定基のそれぞれが医薬上受容な活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーと結合している免疫原。
【請求項２】
少なくとも１つの第１抗原決定基が、アミノ酸配列で構成され、かつ／または少なくとも１つの第２抗原決定基がアミノ酸配列で構成されている、請求項１による免疫原。
【請求項３】
少なくとも第１抗原決定基と少なくとも第２抗原決定基が、ペプチダーゼで開裂しうる結合を介してポリヒドロキシポリマーキャリヤーと結合している請求項１または２による免疫原。
【請求項４】
少なくとも第１抗原決定基と少なくとも第２抗原決定基が、アミド結合またはペプチド結合を介して活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーと結合している請求項１～３の何れか１つによる免疫原。
【請求項５】
少なくとも第１抗原決定基と少なくとも第２抗原決定基が、それぞれ、それらのそれぞれの結合の窒素部位を提供する請求項４による免疫原。
【請求項６】
ポリヒドロキシポリマーキャリヤーが、実質上、アミノ酸残基がない前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項７】
少なくとも第１抗原決定基と少なくとも第２抗原決定基が、アミノ酸配列のN－末端の窒素原子を介して、活性化ポリヒドロキシポリマーに結合している請求項５または６による免疫原。
【請求項８】
ポリヒドロキシポリマーが水溶性である、前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項９】
ポリヒドロキシポリマーが、水不溶性である、請求項１～７の何れか１つによる免疫原。
【請求項１０】
ポリヒドロキシポリマーが、天然に存在するポリヒドロキシ化合物と合成ポリヒドロキシ化合物から選択される、前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項１１】
ポリヒドロキシポリマーが、アセタン、アミロペクチン、寒天ゴム、アガロース、アルギネート、アラビアゴム、カラギーナン、セルロース、サイクロデキストリン類、デキストラン、フルセララン、ガラクトマンナン、ゼラチン、ガッチィ、グルカン、グリコーゲン、グアヤ、カラヤ、コンキアク／Ａ、ローカストビーンガム、マンナン、ペクチン、プシリウム、プルラン、澱粉、タマリン、トラガント、キサンタンとキシログルカンから選択されたポリサッカライド類である、前記請求項の何れか１つに記載の免疫原。
【請求項１２】
ポリヒドロキシポリマーが、デキストランである請求項１１による免疫原。
【請求項１３】
ポリヒドロキシポリマーが、高度に分枝したポリ(エチレンイミン)(PEI)、テトラチエニレンビニレン、ケブラー(長鎖のポリ－パラフェニルテレフタルアミド)、ポリ(ウレタン)、ポリ(シロキサン)、ポリジメチルシロキサン、シリコン、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(２－ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(Ｎ－ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アク

リル酸)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレン－コ－ビニルアセテート)、ポリ(エチレングリコール)と誘導体、ポリ(メタクリル酸)、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコリッド(PGA)、ポリ(ラクチド－コ－グリコリッド)(PLGA)、ポリ無水物、ポリオルソエステルから選択される、請求項１～１０の何れか１つによる免疫原。

【請求項１４】

活性化前記ポリヒドロキシポリマーの平均分子量が、少なくとも500である前記請求項の何れかによる免疫原。

【請求項１５】

ポリヒドロキシポリマーが、トレシル(トリフルオロエチルスルホニル)、マレイミド、p－ニトロフェニルクロロホルメートとトシル(p－トルエンスルホニル)から選択された官能基で活性化される前記請求項の何れか１つによる免疫原。

【請求項１６】

少なくとも１つの部位が、免疫刺激部位または標的部位からなる群から選択され、ポリヒドロキシポリマーと結合してさらになる前記請求項の何れかによる免疫原。

【請求項１７】

少なくとも１つの部位が、ペプチドである請求項１６による免疫原。

【請求項１８】

抗原提示細胞(APC)で取込まれうる前記請求項の何れかによる免疫原。

【請求項１９】

APCで加工でき、それによりMHCクラスII分子に結合した表面でT_Hエピトープを提示する請求項１８による免疫原。

【請求項２０】

少なくとも１つの第１と第２抗原決定基が、同一の天然に存在する分子から由来しない前記請求項の何れか１つによる免疫原。

【請求項２１】

少なくとも１つの第１と少なくとも１つの第２抗原決定基が同一種中に天然に存在しない請求項２０による免疫原。

【請求項２２】

T_Hエピトープが、少なくとも１つのヒトMHCクラスII分子に強く結合する前記請求項の何れか１つによる免疫原。

【請求項２３】

T_Hエピトープが、ヒトの無差別T_Hエピトープである請求項２２による免疫原。

【請求項２４】

前記請求項の何れか１つによる免疫原と、薬理学的に免疫学上受容なキャリヤー、賦形剤または希釈剤と、任意にアジュバントとの混合でなる、ヒトを含む哺乳動物の抗原に対し免疫応答を惹起する免疫原性組成物。

【請求項２５】

アジュバントが、免疫標的アジュバント、トキシ、サイトカイン、マイコバクテリヤ誘導体のような免疫調整アジュバント、油性製剤、ポリマー、ミセル形成アジュバント、サポニン、免疫刺激コンプレックスマトリックス（ISCOM　マトリックス）、粒子、DDA、アルミニウムアジュバント、DNAアジュバント、γ－インシュリン、カプセル化アジュバントからなる群から選択される、請求項２４による免疫原性組成物。

【請求項２６】

請求項１～２３の何れかによる免疫原または請求項２４あるいは２５による免疫原性組成物の有効量を動物に投与することからなり、抗原が免疫原と少なくとも１つの抗原決定基と共有する、ヒトを含む動物を選択の抗原に対し免疫化する方法。

【請求項２７】

非経口ルート、例えば皮下、皮内と筋肉ルート、腹腔内ルート、経口ルート、バッカルルート、舌下ルート、硬膜下ルート、脊髄ルート、膣内ルートと頭蓋内ルートからなる群から選択されたルートから選択されたルートを介して投与される請求項２６による方法。

【請求項２８】
免疫原の有効量が0.5μgと2,000μgの間である請求項２６または２７による方法。
【請求項２９】
一年当たり少なくとも１回投与、例えば一年当たり少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも６と少なくとも１２回投与を含む請求項２６～２８の何れかによる方法。
【請求項３０】
免疫原または免疫原性組成物がバーチャルリンパ節(VLN)具に含まれている請求項２６～２９の何れか１つによる方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
この発明は、十分に定義されたペプチドについて異なる調節可能な分布を有し、これらペプチドをワクチン剤からペプチダーゼ開裂により脱着させる新規なワクチン剤を提供する。
【０００２】
発明の背景
動物を免疫化またはワクチン化する剤は、免疫化に伴う各種の問題に対して、多様な異なる解決を含むものである。
小さな抗原またはハプテンで免疫化した場合、１つの問題は、B－細胞またはCTLに対し十分な免疫応答をする必要な助けを与えるため$CD4^+$細胞をトリガーとすることができるペプチド配列が免疫原中に時として存在しないことである。この問題は、抗原が自己起源の場合に特に重要である。
【０００３】
従来の手法は、関心のある抗原を、大きな免疫原性キャリヤータンパク質に共有結合（結合）させていた。近年、この技術は、関連するキャリヤータンパク質または公知の普遍的なT－ヘルパーエピトープにも融合した短いペプチド抗原からなる免疫原を利用する風流になっている。
【０００４】
しかし、これら従来技術の両方は多くの欠点がかかえている。従来のキャリヤー手法を用いた場合、得られる製品を特徴付けることが難しく、その上、誘因される免疫応答がキャリヤー部位に指向されるが、ペプチド抗原に指向されない傾向を有する－この現象は“キャリヤーサプレション”として知られる－問題がある。
その上、さらに小さなペプチドを大きなキャリヤーに結合させる場合、キャリヤー部位がある程度ペプチドを隠蔽するために、通常、ペプチドの抗原決定基が免疫系に接近可能であるかどうかを予測することができない。
【０００５】
同様な問題は、キャリヤーのペプチドへの融合でも存在する。－この問題は、短いT－ヘルパーエピトープからなる“キャリヤー”を使用する場合、ある程度避けられる。にもかかわらず、このことは、また問題を生じるであろう。ペプチドとT－ヘルパーエピトープの両方のサイズが小さいため、T－ヘルパーエピトープと抗原決定基との比が、最も効果的な免疫反応をトリガーするのに最適であるある種の事柄がどちらにしてもないことである。
結論として、小さな抗原ペプチドまたは小さなハプテンをベースとしたワクチンを作る新規なストラテジを考える明白な必要性がある。
【０００６】
発明の目的
この発明の目的は、関心のある抗原と、しかしまたT－ヘルパーエピトープおよび／または他の免疫学的に適した部位の調節量との両方を結合できる多価カップリング剤として不活性キャリヤーを利用する新規な免疫原性剤を提供することである。さらに、この発明の

目的は、このような免疫原性剤を含む組成物を提供および新規な免疫の方法を提供することである。

【０００７】

発明の要旨

ペプチドの免疫学的に不活性なキャリヤーへの結合を達成する１つの知られた方法は、適当なポリヒドロキシポリマーを、トレシル（トリフルオロエチルスルホニル）基、またはマレイミド、p－ニトロフェニルクロロホルメート（OH基の活性化とペプチドとポリヒドロキシポリマーとのペプチド結合の形成のため）およびトシル（p－トルエンスルホニル）のような他の活性化基で活性化させることである。

【０００８】

それは、例えば、WO 00／05316号および米国特許第5,874,469号（ここに両者を引例として組み込む）に記載の活性化ポリサッカライドを作ることができ、これらを通常の固相または液相のペプチド合成技術で作られたペプチドに結合させる。得られる製品は、そのN－末端で、もしくは他の利用しうる窒素部位に付着したポリヒドロキシポリマー骨格（例、デキストラン骨格）からなる最適なペプチドである。

【０００９】

ペプチド（または他の適切な抗原決定基）を、例えばトレル化水溶性デキストランに結合させる既知の方法は、この発明者の知識の最良に従えば、以前は診断使用を単に企図したものであった。しかし、この発明者らは、そのようなペプチド－ポリヒドロキシポリマー結合体が免疫化剤として非常に適したものであることを、驚くべきことにここに見出した。このことを、その実験では、ボレリア（Borrelia）抗原OspCからのC－末端ペプチド（８ C－末端アミノ酸）と既知のT_Hエピトープペプチドの混合物がトシル活性化デキストランと結合させ、マウスで免疫剤として使用した一連の実験で例証した。

【００１０】

しかし、原理またはペプチド抗原をポリヒドロキシポリマーへの結合は、この発明者の見解では、一般に応用できる新規で発明的な手法である：分子をT－ヘルパーエピトープと、ビヒクルとして作用する非免疫原性ポリマー分子、例えば多価活性化ポリヒドロキシポリマーに共有結合したB－細胞エピトープを表すか含む分子（このタイプの分子は、抗原の免疫学的に関連する部分のみを含むワクチン分子として機能する）から得ることができる。無差別の、あるいはいわゆる普遍的なT－ヘルパーエピトープは、例えばワクチンのターゲットが、（自己抗原のような）ハプテン、または、さもなくば、さらにT_Hエピトープを添加することで、免疫原性にされた抗原の場合に使用できる。その上に、免疫学的な応答を増強する要素もビヒクルに共に結合でき、それによってアジュバントとして作用できる。このような要素は、マンノース、トフトシン、ムラミルジペプチド、CpGモチーフ等、下記参照でありうる。この場合、続くワクチン製品のアジュバンド製剤化は不必要であり、その製品は純水または食塩水中で投与できる。

【００１１】

細胞毒Ｔ細胞（CTL）エピトープがT－ヘルパーエピトープと結合することにより、CTLエピトープを由来した抗原に特異的なCTL'sを発生させることもできる。APC、例えばマクロファージについてサイトゾールへのその製品の摂取を促進する要素（例えばマンノース）は、ビヒクルにCTL－およびT－ヘルパーエピトープと共に結合させ、CTL応答を増強させることができる。

【００１２】

かくして、最も広くかつ一般的範囲で、この発明は、

ａ）少なくとも１つのB－細胞エピトープおよび／または少なくとも１つのCTLエピトープを含む少なくとも１つの第１抗原決定基と

ｂ）T－ヘルパー細胞エピトープ（T_Hエピトープ）を含む少なくとも１つの第２抗原決定基とからなり、少なくとも１つの第１と第２抗原決定基のそれぞれが医薬上受容な活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーと結合している、

新規な免疫原を提供する。

【００１３】
この発明の他の観点は、この発明の免疫原からなる免疫原性組成物に関する。
この発明の第３の観点は、免疫原と最適な抗原が同一の少なくとも１つの第１抗原決定基を共有するこの発明の免疫原または免疫原性組成物を投与し、最適な抗原に対して動物を免疫化またはワクチン化する方法に関する。
この発明の第４の観点は、この発明の有用な免疫原を作りかつ選択する方法に関する。
【００１４】
この発明の開示は、抗原ペプチド決定基の使用に焦点を合わせていることに注目すべきである－事実、第２抗原決定基はMHCクラスII結合ペプチド（T_Hエピトープ）からなるアミノ酸配列であるか、あるいは少なくとも含むことが必要である。しかし、第１決定基がB－細胞エピトープを含む場合、それは必ずしもペプチドである必要はない－すなわち、この開示が他の抗原決定基に適用できない第１決定基（例えば第１決定基がCTLエピトープである場合）の特性を特に議論しているのでなければ、第１抗原決定基に関する全ての開示は、他のB－細胞エピトープ含有分子の存在に関係していることを、技術的な読者は理解されるであろう。
【００１５】
図面の説明
図１：TADへのペプチド結合を例にした、この発明の免疫原の合成の概略図。ペプチドAとBの混合物を、トレシル活性化された水溶性デキストランと接触（本質的に実施例２に記載）させる。ペプチドAとBはTAD上で活性化基と反応し、精製後、免疫原を提供する。
【００１６】
発明の詳細な開示
次に、この明細書および特許請求の範囲で使用した多数の用語を、この発明の境界と範囲を明確にするため定義し、そして詳細に説明する。
用語“Ｔ－リンパ球”と“Ｔ－細胞”を、各種の細胞媒介免疫応答、ならびに抗原特異性免疫応答でヘルパー活性に応答できる胸腺源のリンパ球に対して同義的に使用するつもりである。同様に、用語“Ｂ－リンパ球”と“Ｂ－細胞”を、抗体産生リンパ球に対して同義的に使用するつもりである。用語“細胞毒Ｔ－細胞”、“細胞毒Ｔ－リンパ球”および用語“CTL”も、細胞の表面でMHCクラスＩ分子に結合したペプチド配列の認識に対する応答で細胞殺生を誘因するリンパ球に対し同義的に使用するつもりである。
“免疫原”は、ここで関心のある抗体に対する１つ以上の抗原決定基と免疫化される動物で認識される１つ以上のT_Hエピトープを含む単一分子を示すつもりである。
【００１７】
“抗原決定基”は、ここで、リンパ球の特定のクローンで特異的に認識される分子または分子の一部を示すつもりである。抗原決定基は、例えばB細胞エピトープであってもよく、その結果、B－細胞とその対応する抗体で認識される。B－細胞エピトープは、その3D形状で特徴付けられ、かつ本質的に抗体の抗原結合部位に適合できる分子の何れかの部分が、その分子の抗原決定基を構成してもよい。他の抗原決定基はCTLとT_Hエピトープであり、これらは常にペプチドであるか、ペプチドを含有し、その線状構造で特徴付けられる。
【００１８】
用語“ペプチド”は、この明細書で、2～10のアミノ酸残基の短いペプチド、11～100のアミノ酸残基のオリゴペプチド、および100より多くのアミノ酸残基のポリペプチドを共に意味する。さらに、この用語は、タンパク質、すなわち少なくとも１つのポリペプチドからなる官能性生体分子を含むことを意図ともしている。ペプチドはグリコシル化および脂質化されていてもよく、および／または置換基からなってもよい。
【００１９】
用語“サブシークエンス”は、天然に存在するアミノ酸配列または核酸配列からそれぞれ直接由来した少なくとも３つのアミノ酸、または関連する場合、少なくとも３つのヌクレオチドのあらゆる連続的な伸長を意味する。
用語“動物”は、この明細書で一般に、ホモサピエンス（Homo sapiens）、カニスドメス

ティカス（Canis domesticus）などのような動物種（好ましくは哺乳動物）で、１つの単一動物だけではないことを意味する。しかし、この用語は、この発明により免疫化された固体全てが、同じ免疫原で動物を免疫化をさせる実質的に同じ抗原を宿ることが主要であるから、このような動物種の集団も意味する。例えば抗原の遺伝的な変異が、異なるヒト集団に存在する場合、各集団で抗原に対する耐性を破壊できるため、これらの異なる集団に異なる免疫原を使用することを必要としてもよい。本文での動物は、免疫系を有する生体であることは当業者に明らかであろう。動物は、哺乳動物のような脊椎動物であるのが好ましい。

【００２０】

表現“免疫系へ……提示をもたらす”とは、動物の免疫系が、制御された様式で免疫原性感染に付されることを意図する。以下の開示から明らかなように、免疫系のこのような感染は、この発明のペプチド含有免疫原でワクチン化によって可能である。達成をもたらす重要な結果とは、動物で免疫応答能のある細胞が免疫学的に有効な方法で、抗原と直面することであり、それゆえ、この結果を達成する精密なモードは、この発明にある発明の概念に重要ではない。

用語“免疫学的に有効な量”は、当該技術での一般的な意味を有する－すなわち免疫原と免疫学的な特長を共有する剤（例えば病原性剤）に著しく関与する免疫応答を誘因しうる免疫原の量。

【００２１】

“オートロガス抗体に対する自己耐性”を議論する場合、関連する抗原は、ワクチン化される集団で自己分子であることから、集団での正常な個体はそれに対して免疫応答しない、とはいえども、動物集団で、まばらに存在する個体が、例えば自己免疫異常の部分として天然抗原に対して抗体を産生できるかもしれないことは除外することはできない。何らかの割合で、動物種は、通常、それ自体の抗原に対する自己耐性だけであろう、しかし、他の動物種または異なる表現型を有する集団からのアナログもその動物で耐性化されることを除くことはできない。その上、サイズまたは（普通はより関連の）T_Hエピトープを欠く抗体も免疫系で耐性化され、真の自己抗原とより同様に挙動する。

【００２２】

“外来T－細胞エピトープ”（又は“外来T－リンパ球エピトープ”）は、MHC分子に結合でき、動物種でT－細胞を刺激するペプチドである。この発明で好ましい外来T－細胞エピトープは“乱交雑”（または“一般的”あるいは“広範囲”）エピトープで、すなわち、動物種または集団で特定のクラスのMHC分子の実質的なフラクションと結合するエピトープである。ごく限られた数のこのような乱交雑T－細胞エピトープが知られており、それらを以下に詳述する。この発明に従って使用される免疫原を、できるだけ大きな動物集団のフラクションで有効にするため、１）同じ免疫原にいくつかの外来T－細胞エピトープを挿入し、また２）各アナログが、挿入された異なる乱交雑エピトープを有する幾つかの免疫原を作ることが必要であろうことを知るべきである。また、外来T－細胞エピトープの観念は、潜在性T－細胞エピトープ、すなわち非免疫原性タンパク質から由来し、かつ問題の非タンパク質の部分がない遊離した形で存在する場合に、免疫原性の挙動を奏するのみであるエピトープの使用を包含することを知るべきである。

【００２３】

“外来T－ヘルパーリンパ球エピトープ”（外来T_Hエピトープ）は、MHCクラスII分子を結合し、MHCクラスII分子に結合した抗原提示細胞（APC）の表面に存在することができる外来Ｔ細胞エピトープである。

“抗原に対して異種であるMHCクラスII結合アミノ酸配列”は、従って問題の多重結合タンパク質で存在しないMHCクラスII結合ペプチドである。このようなペプチドは、多重結合タンパク質を宿す動物種に対して真に外来である場合でも、外来T_Hエピトープであろう。

【００２４】

（生体）分子の“官能部分”は、この文で、分子によって奏せられる生化学的または生理

学的な効果の少なくとも１つに応答しうる分子の部分を意味することを意図する。多くの酵素と他のエフェクター分子が、問題の分子によって奏せされる効果に応答しうる活性部位を有することは、当該技術で周知である。分子の他の部分は、安定化または溶解性の増強の目的に役立つであろう、従って、この目的が、この発明のある種の具体例に関して関係がないならば除かれるであろう。

【００２５】

用語“アジュバント”は、ワクチン技術の分野での一般的な意味である、すなわち、１）それ自体でワクチンの免疫原に対する特異的な免疫応答を始めることができないが、２）にもかかわらず、免疫原に対する免疫応答を増強できる、物質または組成物である。または、換言すれば、アジュバントでのワクチン化は、単独で免疫原に対する免疫応答を提供せず、免疫原でのワクチン化は免疫原に対する免疫応答を発生させるか、または発生させないが、免疫原とアジュバントでのワクチン化の組合せは、免疫原単独で誘因されるより強い免疫原に対する免疫応答を誘因する。

【００２６】

分子の“標的化”は、この明細書で、動物に導入される分子が、特定の組織で優先的に現れるか、特定の細胞もしくは細胞タイプと優先的に会合する状況を指すことを意図する。その効果は、免疫原を、標的化を促進する組成物中での免疫原の形成、または標的化を促進するグループの免疫原に導入することによる、を含む多くの方法で達成することができる。この争点を以下に詳細に述べるつもりである。

【００２７】

“免疫系の刺激”は、ある物質または問題の組成物が、一般の非特異的な免疫刺激効果を発揮することを意味する。多くのアジュバントと推定上のアジュバント（例えばあるサイトカイン）は、免疫系を刺激する能力を共有する。免疫刺激剤を用いる成果は、免疫原での同時または次いでの免疫化が、免疫原の遊離した使用と比較して有意でより効果的な免疫応答を誘因することを意味する免疫系の増加された“機敏さ（alertness）”である。

用語“ポリヒドロキシポリマーキャリヤー”は、アミノ酸配列を担持する免疫原の部分を示すことを意図する。一般のルールとして、ポリヒドロキシポリマーキャリヤーは、例えば免疫原をプロセシングしている抗原提示細胞で、アミノ酸配列がペプチダーゼで開裂されえる外限界を有している。従って、ポリヒドロキシポリマーキャリヤーは、活性化基を有するポリヒドロキシポリマーであり得、活性化基とアミノ酸配列の結合を、APCで、ペプチダーゼによって開裂でき、またはポリヒドロキシポリマーは、活性化基と、単一のＬ－アミノ酸または多くのＤ－アミノ酸のような、例えばリンカーを有するポリヒドロキシポリマーであり得、リンカーの最後の部分が、アミノ酸配列に結合でき、APCで、ペプチダーゼによって開裂されえる。

【００２８】

用語“ポリサッカライド”は、通常の意味、すなわち“グリコシド結合で互いに結合した９以上のモノサッカライドの組合せ”で使用されることを意図する（Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 第11版, SaxとLewis編, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1987を参照）。そのポリサッカライドの例は、デキストラン（例：デキストラン40、デキストラン70、デキストラン75）、アガロース、セルロースと澱粉である。

【００２９】

第１と第２抗原決定基

本発明の背後の原理は、合成免疫原（特にペプチド含有免疫原）の提供が、最後生成物の組成物にわたって詳細に制御することを提供することである。対照的に、組換えで作られたポリペプチド免疫原を使用する場合、精製と特徴付けが常に主要な課題である。ここから特異的な抗原決定基（エピトープ）が、免疫原で、主要な構成成分として適していることが同定される場合、本発明は、効果的なその様式で、免疫原を作る簡便な方法を提供する。

【００３０】

殆どの抗原に対して、エピトープ（Ｂ－細胞エピトープとCTLエピトープの両方）は、既に

知られており、科学文献で刊行されている－実際に公知のタンパク質を、タンパク質に対して生じたモノクロナール抗体と反応するエピトープの重複するそのトランケートを作ることによってエピトープを“スキャン”できる。抗体と反応するフラグメントは、局所的なエピトープを構成する。他の適する技術は、Irving MBら，Curr Opin Chem Biol 2001 5(3)：314～24,Parker CEとTomer KB，Methods Mol Biol 2000；146：185～201およびNelson PNら，Mol Pathol 2000；53(3)：111～7に記載のものがある。エピトープを予測する方法は、Nussinov RとWolfson HJ，Comb Chem High Throughput Screen 1999；2(5)：261～9に記載されている。その上、コンピューターアルゴリズムを介してエピトープ（特にタンパク質抗原中）の存在を予測しマッピングする方法も、当該技術で周知である。例えば、CTLエピトープは、Rothbardら，EMBO J.7：93-100(1988)とde Groot MSら，Vaccine 2001；19(31)：4385～95に記載の方法を介して予測、または、Rammensee H-G.ら(1995)，Immunogenetics 41：178～228，Schirle Mら，Eur J Immunol 2000；30(18)：2216～2225に記載の技術を介して同定できる。

【００３１】

従って、免疫原の少なくとも１つの第１と第２抗原決定基の何れかまたは両方がペプチドであること、すなわちアミノ酸配列で構成されることが特に好ましく、第１と第２アミノ酸配列は、通常、活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーに別々に付着されるため、それぞれの長さは、最少に保たれ、従って各ペプチド種の合成工程を促進する。このようなアミノ酸配列の長さは、約4～約100アミノ酸（上限はないが）の範囲であると想定されるが、上限は好ましくは80アミノ酸を越えず、上限が60アミノ酸を越えないのが好ましい。その結果、ペプチド抗原決定基の特に好ましい長さは、約4～約50アミノ酸の間の範囲である。多くて40、多くて30、多くて25アミノ酸のような低い上限が考えられる。ペプチド抗原決定基は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24または25アミノ酸のアミノ酸配列で構成されるのが特に好ましい。例えば第１抗原決定基を構成する分子として組換えで作られたポリペプチドと、第２抗原決定基として合成ペプチドを使って、利用することも考えられる。このことは、完全長の自己ポリペプチドがキャリヤーと結合し、T_Hエピトープが他の位置で結合している結合体を提供するであろう。それにより、必要なT_Hエピトープ（多分いくつかの種）を、自己ポリペプチドの３次元構造と実質的に干渉することなく同じ分子体に付着させ、それによって耐性をブレークすることが可能であろう。

【００３２】

抗原提示細胞（APCs）で免疫原のペプチドのプロセッシングと提示を得るため、APCsは、ポリヒドロキシポリマーからペプチド抗原決定基を分裂できなければならない。このことは、ペプチド配列をプロセッシングするAPCsで活性であるペプチダーゼ類のようなペプチダーゼで分裂される結合を介して、キャリヤーに結合したペプチド抗原決定基を有することにより最も簡便に達成できる。このことは、例えば、ペプチド結合またはアミド結合によりキャリヤーに結合する決定基を有することにより達成できる。好ましい具体例で、抗原決定基は、キャリヤーに結合され、そこで、抗原決定基は、アミドまたはペプチド結合の窒素原子を提供する－ペプチド抗原決定基に対し、このことは、ペプチドがフリーのカルボキシ末端を有する結果、活性化基としてトシル基を使用した場合に得られる効果を有する。

【００３３】

多くの場合、第１と第２抗原決定基は、異なる分子から由来する、すなわち天然の同一の分子には見出されない。その上、通常、同一種から由来しない場合もある。そして、第１と第２抗原決定基は、独立して活性化ポリヒドロキシポリマーに結合されるのが好ましいが、例えば互いに融合し、融合物の末端でキャリヤーに結合されることを考えることができる－このことは、両方の抗原決定基が比較的に小さい場合（例えば第１抗原決定基がCTLエピトープで第２が純なT_Hエピトープのとき）に、可能であろう。

【００３４】

第２抗原決定基は、好ましくは免疫優勢T_Hエピトープを含み、すなわちワクチン化された

個体で、有意な免疫応答を惹起するエピトープであり、ある個体で免疫優勢であるT_Hエピトープが同一種の他の個体でMHCクラスII分子を結合しうるが同種の他の個体で必ずしも免疫優勢ではないことは周知の事実である。しかし、通常、ＭＨＣクラスII分子に強く結合するペプチドを利用することで十分であろう。

【００３５】

Tヘルパーエピトープについて、免疫優勢とMHC制限に関する特別な考慮の課題に関して、例えばWO 00／65058とWO 00／20027で参照され、そこには十分な記述が見られる。

【００３６】

第２抗原決定基の部分であるT_Hエピトープは、無差別(promiscuous)T_Hエピトープが好ましい。動物種または動物集団の大きな割合の個体で活性である多数の天然に存在する無差別T－細胞エピトープが存在し、それらをワクチンに導入することが好ましく、それにより同じワクチン免疫原または同じワクチン組成物で非常に多数の異なる改質第２抗原決定基の必要性が減少する。

【００３７】

無差別エピトープは、この発明によれば、テタナストキソイド(tetanus toxoid)（例P2とP30エピトープ、それぞれSEQ ID NO１と２参照）、ジフテリヤトキソイド(diphtheria toxoid)、インフルエンザウイルスヘマグティニン(Influenza virus hemagluttinin)(HA)、P．ファルシパルム(P.falciparum) CS抗原のような天然に存在するヒトT_Hエピトープでありえる。

【００３８】

長年の間に、多くのその他の無差別T－細胞エピトープが同定されている。特に、異なるHLA－DR対立遺伝子でエンコードされたHLA－DR分子の大部分に結合しうるペプチドが同定され、これらは、この発明により使用される改質CEAに導入される全ての可能なT－細胞エピトープである。ここに引例として全て組み込まれている次の引用文献で記載されているエピトープも参照：WO 98/23635 (Frazer IHら，クイーンズランド大学へ譲渡)、Southwood Sら，1998，J．Immunol,160：3363～3373；Sinigaglia Fら，1998，Nature336：778～780；Rammensee HGら，1995，Immunogenetics41：4178～228；Chicz RMら，1993，J．Exp．Med178：27～47；Hammer Jら，1993，Cell74：197～203；およびFalk Kら，1994，Immunogenetics39：230～242。後者の引例は、HLA－DQと－DPリガンドも扱っている。これら5つの引例に挙げられた全てのエピトープはこれらと共通のモチーフをもつエピトープであるので、この発明で使用される天然エピトープの候補として関連している。

【００３９】

代わりに、エピトープはハプロタイプの大部分に結合しうるあらゆる人工T－細胞エピトープでもよい。この文で、WO 95／07707と対応する刊行物Alexandre Jら，1994，Immunity 1：751～761(両開示をここに引例として組み込まれる)に記載のパンDRエピトープペプチド（“PADRE”）が、この発明により使用できるエピトープの興味ある候補である。これらの刊行物で開示の最も有効なPADREペプチドは、投与されたとき安定性を改善するため、C－とN－末端にD－アミノ酸を担持することを知るべきである。しかしこの発明は、主に免疫原の一部として関連エピトープを導入することを目的としており、MHC－II分子の関係で続く提示をさせるため、従ってAPCsのリポゾーム区割の中で続いて酵素的に分解されるべきであり、そのためこの発明で使用されるエピトープ中にＤ－アミノ酸を導入することは得策ではない。

【００４０】

１つの特に好ましいPADREペプチドは、アミノ酸配列AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID No.３)を有するもの、またはそれと免疫学的に有効なサブシークエンスである。これおよびMHC制限の同じ欠損を有する他のエピトープは、この発明の方法で使用される改質CEAで存在すべき好ましいT－細胞エピトープである。このように超無差別エピトープは、この発明の最も簡便な具体例を構成させ、そこでただ１つの単一改質CEAがワクチン化された動物免疫系に提示される。

【００４１】

第１と第２抗原決定基とは別に、この発明の免疫原は、免疫原の望ましい特長を付与する他の部位を含んでもよい。例えば、免疫原は、さらにポリヒドロキシポリマーに結合した少なくとも１つの部位からなってもよい、その少なくとも１つの部位は、免疫刺激部位、標的化部位、提示強化部位－これらはアジュバントとの関連で下記に詳述される－からなる群から選択される。このような部位がペプチドの場合、第１と第２抗原決定基のカップリングと同じ工程で活性化ポリヒドロキシポリマーに結合できる。

【００４２】

それゆえ、この発明の免疫原は、APCまたはB－リンパ球への免疫原を標的とする部位の導入も含むことができる。例えば、第１部位はB－リンパ球特異性表面抗原またはAPC特異性表面抗原に対する特異性結合パートナーであることができる。このような多くの特異性表面抗原が、この分野で知られている。例えば部位は、B－リンパ球またはAPC上のレセプターがある炭化水素（例えばマンナンまたはマンノース）である。一方、例えば、第２部位はハプテンである。または、APCsまたはリンパ球上の表面分子を特異的に認識する抗体フラグメントを、第１部位として使用できる（表面分子は、例えばFcγRIのようなマクロファージと単球のFCγレセプターか、または一方CD40あるいはCTLＡ－4のような他の特異性表面マーカーである）。これらの例示の標的分子の全てはアジュバントの一部として使用できることを留意すべきである（下記参照）。CD40リガンド、CD40に対する抗体、またはCD40を結合とするその変異体は、樹状細胞に対する改質CEAを標的とするであろう。同時に最近の結果によれば、CD40分子との相互作用は、T_H細胞がCTL応答を得るのに重要でなくなることを示している。それゆえ、第１部位として（またはアジュバントとして、下記参照）CD40結合分子の一般的な使用は、CTL応答をかなり増強させるであろう。事実この発明の意味で、アジュバントおよび“第１部位”としてこのようなCD40結合分子の使用は、自己の権利で発明であると思われる。

【００４３】

増強された免疫応答を達成するため、ある種の細胞タイプへ免疫を標的化する代替剤または補助剤として、免疫系刺激部位を含めることで免疫系の応答レベルを高めることができる。このような部位の代表例は、サイトカイン、ヒートショックタンパク質、ホルモンならびにそれらの有効部分である。

【００４４】

この発明に使用できる適切なサイトカインは、通常、ワクチン組成物でアジュバントとしても機能するものである、例えばインターフェロンγ(TFN－γ)、Flt3リガンド(Flt3L)、インターロイキン1(IL－1)、インターロイキン2(IL－2)、インターロイキン4(IL－4)、インターロイキン6(IL－6)、インターロイキン12(IL－12)、インターロイキン13(IL－13)、インターロイキン15(IL－15)および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子(CM－CSF)。または、サイトカイン分子の官能部分は第２部位として十分であろう。このようなサイトカインのアジュバント物質としての使用については、下記を参照。

【００４５】

一方、免疫刺激部位は、トキシン、例えばリステリオリシン(LLO)、リピドAと熱不安定エンテロトキシンがありえる。また、MDP(ムラミルジペプチド)、CFA(完全フロイントアジュバント)、トレハロースジエステルTDMとTDEのような多くのマイコバクテリヤ誘導体が興味ある可能性である。

この発明によれば、免疫刺激部位として使用される適切なヒートショックタンパク質は、HSP70、HSP90、HSC70(ヒートショック同族体)、GRP94とカルレチキュリン(CRT)でありえる。最後にCpGモチーフと免疫刺激ペプチドトフトシン(tuftsin)は、それ以外の可能性のあるものである。

【００４６】

また、提示増強部位を導入する可能性は、発明の重要な具体例である。この原理のいくつかの例を当該技術で示している。例えば、ボレリヤブルクドルフェリ(Borrelia burgdorferi)タンパク質OspA中のパルミトイル脂質化アンカーが、自己アジュバント化ポリペプチドを提供するために利用できることが知られている（例えばWO 96／40718参照）。脂質化

した(lapidated)タンパク質は、ポリペプチドの脂質化アンカー部分とそれから突出する分子の残存部分からなるコアを有するミセル様構造を作るとみられ、抗原決定基のマルチ提示をもたらす。それゆえ、これと異なる脂質化アンカー（例：ミリスチル基、ファーネシル基、ゲラニル－ゲラニル基、CPI－アンカー、N－アシルジグリセリド基）を用いた関連したアプローチを使用することが、この発明の好ましい態様である。特に、このような脂質化アンカーを組換えで作られたタンパク質で提供することはかなり簡単であり、そして単に免疫原の組成分の融合パートナーとして、例えば天然に存在するシグナル配列の使用を必要とするからである。他の可能性は、補体因子C3のC3dフラグメント、またはC3それ自体を使用することである（Dempseyら，1996，Science271，348～350；LouおよびKohler，1998，Nature Biotechnology 16，458～462を参照）。

【００４７】

ポリヒドロキシポリマーキャリヤー

アミノ酸配列をポリヒドロキシポリマーに結合さすため、通常、アミノ酸配列に必要な結合を形成できる適当な反応基でポリヒドロキシポリマーを“活性化する”ことが必要である。

用語“ポリヒドロキシポリマー”は、一般にWO 00／05316と同じ意味を有することを意図する。すなわち、ポリヒドロキシポリマーは、その出願で詳細に教示されているのと正確に同じ特性を持つことができる。従ってポリヒドロキシポリマーは、水溶解性か不溶性であることができる（つまり、免疫原の製造中、異なる合成工程を必要とする）。両方の具体例はある種の利点を与える。一般に、ペプチドと水溶性活性化ポリヒドロキシポリマーとのカップリングは、不溶性ポリマーに適用できる合成よりも化学的に簡単である。CTLsの導入は、この発明の水溶性キャリヤーを用いて容易にできることも想定される（このような免疫原は、ピノサイトシスを介して吸収される）。一方、不溶性ポリマーは、粉砕されると、主にAPCsで吸収され、抗原の局所的な濃度をもたらすため、Ｔ－細胞ヘルプを誘因するのに十分に適すると考えられる粒形成分を形成できる。そのため、水溶性と水不溶性の免疫原の両方を利用するワクチンのストラテジを利用することは、この発明の範囲内でもある。

【００４８】

ポリマーがデキストランの場合、水溶性形態は一般に線状分子であり、一方デキストランの水不溶性形態は架橋されている。

ポリヒドロキシポリマーは、天然に存在するポリヒドロキシ化合物と合成ポリヒドロキシ化合物から選択できる。

【００４９】

特別の好ましいポリヒドロキシポリマーは、アセタン、アミロペクチン、寒天ゴム(gum agar-agar)、アガロース、アルギネート、アラビアゴム、カラギーナン、セルロース、シクロデキストリン類、デキストラン、フルセララン、ガラクトマンナン、ゼラチン、ガッチィ、グルカン、グリコーゲン、グアヤ、カラヤ、コンキアク／Ａ、ローカストビーンガム、マンナン、ペクチン、プシリウム(psyllium)、プルラン、澱粉、タマリン、トラガント、キサンタンとキシログルカンから選択されるポリサッカライド類である。デキストランが特に好ましい。

【００５０】

しかし、ポリヒドロキシポリマーは、また、高度に分枝したポリ(エチレンイミン)(PEI)、テトラチエニレンビニレン、ケブラー(長鎖のポリ－パラフェニルテレフタルアミド)、ポリ(ウレタン)、ポリ(シロキサン)、ポリジメチルシロキサン、シリコン、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(２－ヒドロキシメチルメタクリレート)、ポリ(Ｎ－ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アクリル酸)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレン－コ－ビニルアセテート)、ポリ(エチレングリコール)と誘導体、ポリ(メタクリル酸)、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコリッド(PGA)、ポリ(ラクチド－コ－グリコリッド)(PLGA)、ポリビニルアルコール、ポリ(ヒドロキシメチルメタクリレート)、ポリ(ヒドロ

キシエチルメタクリレート)、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリレート)、ポリ無水物、ポリオルソエステルならびに対応するコポリマーから選択できる。

【００５１】

問題の(すなわち活性化前)ポリヒドロキシポリマーの(重量)平均分子量は、少なくとも500、一般に、少なくとも1,000、例えば少なくとも2,000、好ましくは2,500～2,000,000の範囲、より好ましくは3,000～1,000,000の範囲、特に5,000～500,000の範囲である。10,000～20,000の範囲の平均分子量を有するポリヒドロキシポリマーが、特に有利とみられる。

【００５２】

水溶性ポリヒドロキシポリマーを使用する場合、室温で、少なくとも10mg／ml、好ましくは少なくとも25mg／ml、例えば少なくとも50mg／ml、特に少なくとも100mg／ml、例えば少なくとも150mg／mlの程度で水溶性であることが好ましい。デキストランは、ここで記述したように活性化した場合でも、水溶解性についての要件を満たすことが知られている。

【００５３】

最も興味あるポリヒドロキシポリマーのいくつかについて、未活性化ポリヒドロキシポリマー(すなわち活性化前の天然ポリヒドロキシポリマー)のC(炭素原子)とOH基(水酸基)との比は、1.3～2.5、例えば1.5～2.3、好ましくは1.6～2.1、特に1.85～2.05の範囲である。特別の理論とは結び付かないが、未活性化ポリヒドロキシポリマーのこのようなC／OH比は、親水性の非常に有利なレベルを示すと考えられる。ポリビニルアルコールとポリサッカライドは、この要件を満たすポリヒドロキシポリマーの例である。上記の比は、活性化比がむしろ低いので、活性化ポリヒドロキシポリマーに対しほぼ同じであると考えられる。

【００５４】

上記のように、ポリヒドロキシポリマーは官能基(活性化基)を担持し、これがペプチドのキャリヤーへの固着を促進する。広い範囲の適用可能な官能基が当該技術で知られている。例えばトレシル(トリフルオロエチルスルホニル)、マレイミド、p－ニトロフェニルクロロホルメート、臭化シアン、トシル(p－トルエンスルホニル)、トリフリル(トリフルオロメタンスルホニル)、ペンタフルオロベンゼンスルホニルとビニルスルホン基。官能基の好ましい例は、トレシル、マレイミド、トシル、トリフリル、ペンタフルオロベンゼンスルホニル、p－ニトロフェニルクロロホルメートとビニルスルホンで、その中でトレシル、マレイミドとトシル基が特に好ましい。

トレシル活性化ポリヒドロキシポリマーは、WO 00／05316の実施例１のデキストランの活性化に記載またはGregoriusら, J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65～73に記載のトレシルクロリドを使用して作ることができる。

【００５５】

マレイミド活性化ポリヒドロキシポリマーは、WO 00／05316の実施例３でデキストランの活性化で記述されたように、p－マレイミドフェニルイソシアネートを用いて作ることができる。または、マレイミド基は、トレシル活性化されたポリヒドロキシポリマー(例えばトレシル活性化デキストラン(TAD))を、ジアミン化合物(一般に$H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$、n＝1～20、好ましくは1～8)、例えば過剰の1,3－ジアミノプロパンで誘導体化し、次いで、TADに導入されたアミノ基と試薬、例えばサクシニミジル4－(N－マレイミドメチル)シクロヘキサン－1－カルボキシレート(SMCC)、スルホサクシニミジル4－(N－マレイミドメチル)シクロヘキサン－１－カルボキシレート(スルホ－SMCC)、サクシニミジル4－(p－マレイミドフェニル)ブチレート(スルホ－SMPB)、N－γ－マレイミドブチリルロキシサクシイミドエステル(GMBS)またはN－γ－マレイミドブチリルオキシ－スルホサクシンミドエステルと反応させ、ポリヒドロキシポリマーに導入できる。異なる試薬と活性化ルートは、形式上、マレイミド官能性と残部の活性化が行われる親のヒドロキシ基との結合に関して、わずかに異なるマレイミド活性化物が得られるが、全ておよびそれぞれは“マレイミド活性化ポリヒドロキシポリマー”と考えられる。

【００５６】
トシル活性化されたポリヒドロキシポリマーは、WO 00／05316の実施例２でのデキストラン活性化で記載のように、トシルクロリドを用いて作ることができる。トリフリル(Trifl yl)とペンタフルオロベンゼンスルホニル活性化されたポリヒドロキシポリマーは、例えば対応する酸クロリドを用いて、トシルまたはトレシル活性化類似体として作られる。
臭化シアン活性化ポリヒドロキシポリマーは、ポリヒドロキシポリマーと臭化シアンとを常法で反応させて作ることができる。得られる官能基は、通常、ポリヒドロキシポリマーの２つのヒドロキシ基を有するシアネートエステルである。
【００５７】
活性化の程度は、遊離ヒドロキシ基と活性化基(すなわち官能化ヒドロキシ基)の比として表しうる。ポリヒドロキシポリマーの遊離ヒドロキシ基と活性化基との比は、ポリヒドロキシポリマーの親水性と反応性との有利なバランスを得るために250：1と4：1の間であると思われる。好ましくは、100：1と6：1の間、より好ましくは60：1と8：1の間、特に40：1と10：1の間の比である。
【００５８】
この発明に従い一般的に応用可能な免疫原の作成方法で使用するのに特に興味ある活性化ポリヒドロキシポリマーは、トレシル、トシルとマレイミド活性化されたポリサッカライド、特にトレシル活性化されたデキストラン(TAD)、トシル活性化されたデキストラン(TosAD)とマレイミド活性化されたデキストラン(MAD)である。
【００５９】
ポリヒドロキシポリマーキャリヤーは、抗原決定基がAPC代謝の抗原プロセッシング工程に入らないために、活性化基がペプチダーゼ開裂結合の部分を提供する必要があるアミノ酸残基を実質的に無くてもよい。しかし上記のように、キャリヤーは、また、少なくとも１つのL－アミノ酸を含むスペーサを、単に含んでいてもよい。にもかかわらず、少なくとも第１および少なくとも第２抗原決定基は、窒素原子を介し、好ましくはアミノ酸配列のN－末端でポリヒドロキシポリマーの活性化バージョンに通常結合される。
【００６０】
要するに、抗原決定基の何れかがペプチドであるこの発明の好ましい具体例で、活性化ポリヒドロキシポリマーは、アミノ酸と活性化基との結合が、APCの生化学機構で分解できない場合、通常、少なくとも１つのアミノ酸基を含まなければならない。次いで、少なくとも１つのアミノ酸基は、活性基を抗原のペプチド決定基との間でスペーサとして役立ち、次いで、キャリヤーのアミノ酸とペプチド決定基との結合が開裂され、APCプロセッシング経路のペプチダーゼによって攻撃されないペプチドを残す。もちろん、活性化基とペプチド決定基との結合は、ペプチダーゼ開裂に敏感である必要はない－APCで見られるその他の生理化学的条件に同時に十分に敏感であってもよい。達すべき重要な目的は、抗原決定基がAPC内で遊離され、そしてMHC分子に結合させ、続いてリンパ球に対して提示することである。
【００６１】
発明の免疫原の製造
好ましいペプチド決定基を使用する場合、N－末端のものを除く全ての利用可能なアミノ基を保護し、次いで得られた保護ペプチドを活性化ポリヒドロキシポリマー部位と結合させ、最後に得られる結合体を脱保護するようにペプチドを合成することができる。この手法の特殊な実施例を以下の実施例で記載する－しかし、ペプチド化学の当業者は、この効果を得るために、多くの方法を使用できることを認識するであろう。
【００６２】
WO 00／05316と米国特許5,874,469で教示された水溶性ポリサッカライド分子を使用する代わりに、上記したように、架橋ポリサッカライド分子を使用することが等しく可能であり、それゆえにポリペプチドとポリサッカライドとの粒状の結合体が得られる－このことは、2つの目標が達せられ、すなわち結合体を注射した場合、局所的な堆積効果が得られ、APCによる取込みにとって魅力的なターゲットである粒子が得られることから、ポリペ

プチドの免疫系に対する提示の改善につながると考えられる。このような粒形系を用いる手法を、実施例でも詳述しているが、一般に活性化ポリヒドロキシポリマーは、B－細胞エピトープとT－ヘルパーエピトープを含有する抗原決定基を結合するのに用いられ、これは上記のように固相合成として行うことができ、最終産物を洗浄と濾過により収得し精製できる。活性化ポリヒドロキシポリマー（ペプチド、タグ等）に結合される要素は、低いpH、例えばpH４～５でポリヒドロキシポリマーに加え、受動拡散により“ゲル”に等しく分配させることができる。次いで、pHをpH9～10に上げ、ペプチドとタグ上で１級アミノ基に、ポリヒドロキシポリマーのトレシル基との反応を開始させる。ペプチドと例えば免疫刺激要素または標的の部位とのカップリングの後、ゲルをすりつぶし、免疫用の適当な大きさの粒子をつくる。

【００６３】

最終製品中のB－細胞エピトープとT－ヘルパーエピトープ(P2、P30、PADREまたは他の適当なエピトープ)の割合は、合成工程におけるこれらの分子の濃度を変化させることにより変えることができる。上記のように、免疫原性分子は、例えばマンノース、ツフトシン、CpG－モチーフまたは他の免疫刺激物質(ここに記述)を、必要であればこの物質のアミノ化誘導体を用い、合成工程でカーボネート緩衝液に加えることにより標識化できる。

【００６４】

ワクチンと他の免疫製剤

この発明の免疫原をヒトのような動物に投与する場合、免疫原の製剤化は、当該技術で一般に知られた原理に従う。ペプチドが、上記の第１と第２抗原決定基の好ましい具体例を構成するため、次にペプチドワクチン類と免疫原性組成物に関する詳細な説明を挙げる。当業者は、次に挙げる一般原理が殆ど応用できることを理解し、そうでないとしても、発明の免疫原を含むワクチンのストラテジを理解するであろう。

【００６５】

活性成分としてペプチド配列を含有するワクチンと免疫化剤の製造は、引例としてここに組み込まれている米国特許4,608,251；4,601,903；4,599,231；4,599,230；4,596,792および4,578,770（全て参考としてここに導入）に例示されているように当該技術で一般によく理解されている。一般に、そのようなワクチンは液体溶液または懸濁液の何れかの注射可能物として作られる。注射前に、液体に溶液または懸濁液に適した固体の形態も作ることができる。製剤は乳化もできる。活性成分は、それと医薬的に許容で適合性である賦形剤と混合されることが多い。適当な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組合せである。加えて所望により、ワクチンは、湿潤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、ワクチンの効能を増強するアジュバント（下記のアジュバントの詳細な説明参照）のような少量の補助物質を含有してもよい。

【００６６】

ワクチンは、通常、非経口的に、例えば皮下的、皮内的または筋肉的に注射で投与される。他の投与形態に適した付加的な製剤は、座剤と、ある場合に経口、バッカル、舌下、腹腔、膣内、肛門、硬膜、脊髄、頭蓋内製剤を含む。座剤について、従来の結合剤と賦形剤、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含むことができる。このような座剤は、0.5％～10％、好ましくは１～２％の範囲の活性成分を含有する混合物から形成できる。経口製剤は、通常使用される賦形剤、例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、遅延放出製剤または粉剤の形態をとり、活性成分の10～95％、好ましくは25～70％を含む。経口製剤で、コレラトキシンは、興味ある製剤相手（かつ可能な抱合相手でも）である。

【００６７】

免疫原は、中性または塩の形としてワクチンに製剤化できる。医薬的に受容な塩は、酸付加塩（例えば発明の免疫原のペプチド構成部分の遊離アミノ基と形成）、かつ、塩酸またはリン酸のような無機酸、酢酸、修酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸とで形成

される。遊離カルボキシ基とで形成される塩は、また、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄のような無機塩基、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導できる。

【００６８】

ワクチンは、投与製剤と矛盾のないやり方で、治療的に有効で免疫原性であるような量で投与される。投与量は、例えば個体の免疫系が免疫応答をする能力および所望される防護程度を含む処置される被検者に依存する。適切な服用量範囲は、ワクチン化当たり数100mgの活性成分のオーダ、好ましい範囲は、約0.1μg～2000μg（1～10mgの範囲のより高い量が考えられるが）、例えば約0.5μg～1000μg、好ましくは1μg～500μgの範囲、特に約10μg～100μgの範囲である。当初投与とブースターショットの適当な養正法は変えられるが、当初投与に続く第二接種またはその他の投与が代表的である。

【００６９】

適用の仕方は広く変えられる。ワクチンの通常の投与方法を適用できる。これには、固形の生理学的に許容な基材上、または生理学的に許容な分散液での経口適用、注射などの非経口適用が含まれる。ワクチンの服用量は、投与ルートにより、ワクチン化されるヒトの年令と抗原の製剤により変わるであろう。

ワクチン中の免疫原のあるものは、ワクチン中で十分に免疫原性であるが、他のあるものでは、免疫応答は、ワクチンがさらにアジュバント物質を含む場合に、増強されるであろう。

【００７０】

ワクチンのアジュバント効果を達成する各種の方法が知られている。一般の原理と方法は、Duncan E. S. Stewart-Tull(編)、John Wiley & Sons社、“The Theory & Practical Application of Adjuvants”、ISBN 0-471-95170-6およびGregoriadis Gら(編)、Plenum Press, New York, “Vaccines：New Generation Immunological Adjuvants”、ISBN 0-306-45283-9（共方を引例としてここに組み込まれる）に詳述されている。

【００７１】

自己タンパク質と、そのサイズが小さいために単に非免疫原性ではない他のハプテンへの自己寛容の破壊を促進することを例証できるアジュバントを用いるのが特に好ましい。しかし、ポリヒドロキシポリマーに結合した抗原決定基が十分に大きく、かつ十分に免疫原性の場合、アジュバントを導入する必要はない。

【００７２】

適したアジュバントの限定されない例は、免疫標的アジュバント、トキシ、サイトカイン、マイコバクテリヤ誘導体のような免疫調整アジュバント、油性製剤、ポリマー、ミセル形成アジュバント、サポニン、免疫刺激コンプレックスマトリックス（ISCOMマトリックス）、粒子、DDA、アルミニウムアジュバント、DNAアジュバント、γ－インシュリン、カプセル化アジュバントからなる群から選択される。一般に、免疫原の部位に有用な化合物と剤に関する上記の開示は、この発明のワクチンのアジュバントの使用に必要に応じ変更できると知るべきである。換言すれば、このような部位は、この発明の免疫原の部分である代わりに、この発明の製剤の部分としても適する。

【００７３】

アジュバントの適用は、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム（Alum）のような剤の使用を含む、普通には緩衝食塩水中0.05～0.1%溶液として、0.25%液として用いられる糖の合成ポリマー（例：カーボポール(登録商標)）との混合で用いられ、70～101℃の範囲の温度で30秒～2分の加熱処理によるワクチン中のタンパク質の集合体および架橋剤による集合体も可能である。アルブミンにペプシン処理抗体(Fab区分)による再活性化による集合体、C. パルバム(C. parvum)のような細菌細胞あるいはエンドトキシンまたはグラム陽性細菌のリポポリサッカライド成分との混合物、マンニドモノオレエート(Aracel A)のような生理学的に許容な油ビヒクル中のエマルジョン、ブロック交替品として使用されるペルフルオロカーボン(Fluosol-DA)の20%液中のエマルジョンも使用できる。スク

アレンとＩＦＡのような油との混合物も好ましい。
【００７４】
この発明によれば、DDA(ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)は、DNAとγ－イヌリンであるような興味あるアジュバントの候補であり、またフロイド完全と不完全アジュバント、ならびにQuil AとQS21のようなクイラジャ(quillaja)サポニンも、RIBIであるように興味がある。さらに、モノホスホリル脂質A(MPL)、上記のC_3とC_3dおよびムラミルジペプチド(MDP)が可能性がある。
リポソーム製剤も、アジュバント効果を示すことが知られており、リポソームアジュバントがこの発明によれば好ましい。
【００７５】
また、免疫刺激複合マトリックスタイプ(ISCOM(登録商標)マトリックス)のアジュバントもこの発明による好ましい選択となり、特に、このタイプのアジュバントは、APCsによるMHCクラスII発現を上方調節(up-regulating)できるからである。ISCOM(登録商標)マトリックスは、クイラジャサポナリア(Quillaja saponaria)からの(任意に分画した)サポニン(トリテルペノイド)、コレステロールとリン脂質からなる。免疫原性タンパク質と混合すると得られる粒状製剤は、サポニンが60～70w/w%からなり、コレステロールリン脂質が10～15w/w%とタンパク質が10～15w/w%のISCOM粒子として知られるものである。免疫刺激複合物の組成と使用に関する詳細は、例えば上記のアジュバントを扱う本に見出され、さらにMorein Bら，1995，Clin. Immunother.3：461～475ならびにBarr IGおよびMitchell GF，1996，Immunol. And Cell Biol. 74：8～25（双方を引例として組み込む）は、完全な免疫刺激複合物の調製の有用な指針を与える。
【００７６】
アジュバント効果を達する他の非常に興味なる可能性は、Gosselinら，1992(ここに引例として組み込む)に記載の技術を使用することである。つまり、この発明の抗原のような、関連の抗原の提示は、抗原と、単球／マクロファージ上のFcγレセプターに対する抗体(または抗原結合抗体フラグメント)と結合させることにより増強できる。特に、抗原と抗FcγRIとの複合物は、ワクチン化の目的のために免疫原性を強化することが示されている。
【００７７】
他の可能性は、タンパク質構成物の部位として請求項で挙げた標的化および免疫調整物質(すなわち、サイトカイン)の使用である。これに関して、ポリI：Cのようなサイトカインの合成誘導物質が可能性がある。
【００７８】
適したマイコバクテリヤ誘導体は、ムラミルジペプチド、完全フロイントアジュバント、RIBI、ならびにTDMおよびTDEのようなトレハロースのジエステルからなる群から選択される。
【００７９】
適した免疫標的化アジュバントは、CD40リガンド、CD40抗体または特にその結合フラグメント(上記参照)、マンノース、FabフラグメントとCTLA－4からなる群から選択される。
【００８０】
適したポリマーアジュバントは、デキストラン、PEG、澱粉、マンナンとマンノースのような炭化水素、プラスチックポリマー、ラテックスビーズのようなラテックスからなる群から選択される。
【００８１】
免疫応答を調節する他の興味深い方法は、“仮想のリンパ節(Virtual lymph node)”(VLN)(ニューヨーク、NY10017－6501、レキシントン　アベニュー360のイムノケラピー社開発の家庭用医療具)中に、免疫原(任意にアジュバントと医薬的に許容な担体と賦形剤)を含めることである。VLN(薄い管状具)は、リンパ節の構造と機能によく似ている。VLNを皮下に入れると、サイトカインとケモキンが急増して殺菌炎症部位を作る。T－細胞とB－細胞ならびにAPCは、危険信号に素早く応答し、炎症部位に帰り、VLNの多孔のマトリックス

内に蓄積する。抗原に対する免疫応答を展開するのに必要な抗原用量は、VLNを使用すると減少し、かつVLNを使用する免疫化によって与えられた免疫保護は、アジュバントとしてRibiを使用する通常の免疫化を上回ることが示された。その技術は、簡単にGelber Cら, 1998, “Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node”、“From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 10月12日～15日 1998, Seascape Resort, Aptos, California”に記載されている。

【００８２】

この発明のワクチンは、１年に少なくとも１回、例えば１年に1、2、3、4、5、6、12回投与すべきである。より詳しくは、１年に12回が期待され、例えば個体の必要により１年に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12回である。この発明による好ましい自家ワクチンの使用によって誘引されるメモリー免疫性は永久ではなく、そのため免疫系は、類似体で周期的に感染される必要があることが以前に示されている。

【００８３】

遺伝学的な変異により、異なる個体は、同じポリペプチドに、変動する強さの免疫応答を使って反応できる。そのため、この発明によるワクチンは、免疫応答を増加させるために、抗原決定基の選択で、差異のあるいくつかの異なる免疫原からなってもよい。外来T－細胞エピトープ導入の選択に関する上の記述も参照のこと。ワクチンは、2以上の免疫原からなることができ、その免疫原の全ては上で定義したものである。

【００８４】

結果として、ワクチンは、発明の異なる3～20の免疫原、例えば3～10の免疫原からなってもよい。しかし、通常、類似体の数は、１また２のような最低の類似体に保たれるべきであろう、特に、免疫原は、ワクチン集団のフラクションを大きなものとしてターゲットにするために、必要な第１抗原決定基と必要な第２抗原決定基の双方を含むように仕立てられるからである。

【００８５】

有用な免疫原の同定

上記のように、この発明の免疫原の利点は、第１抗原決定基と第２抗原決定基の最適の割合を与えるべく仕上げることができることである。また、このことは、発明の有用な免疫原の選定と調製の方法を提供させる。その方法は、各異なる免疫原が第１と第２抗原決定基の特徴的割合を有する、この発明の少なくとも２つの異なる免疫原の調製を必要とする。次いでこの免疫原は、免疫剤（実施例３参照）として製剤化され、第１抗原決定基に対する特異的な免疫応答を誘因するそれぞれの性能が決定される。最も有効な免疫原を選択し、さらに開発のため用いる。

最良の効能を得るため、この発明の免疫原に導入すべきタ標的または免疫調節部位の精密な相対量を決める場合、同様な手法を使用できる。

第１と第２抗原決定基ならびに可能な他の部位は、本実施例で本質的に記載のように、活性化ポリヒドロキシポリマーに結合される。免疫原中の導入された分子の割合は、接種混合物中の分子の相対濃度に依存するため、単に分子の相対濃度を調節して、多数の異なる免疫原を作ることに問題はない。

この発明を、ここに、次の非限定的な実施例で例証する。

【００８６】

実施例１

架橋剤として活性化ポリヒドロキシポリマーを使用するAβペプチドコポリマーワクチンの合成

序言

従来の複合物ワクチンは、キャリヤータンパク質のようなキャリヤーに共有結合した抗原またはハプテン（例：ポリペプチド抗原またはハプテンの形で）からなる。抗原／ハプテンは、B－細胞またはCTLエピトープを含み、キャリヤータンパク質はT_Hエピトープを提供する。しかし、殆どのキャリヤータンパク質は、普通、T_Hエピトープと無関係であり、こ

れは全配列のごく小部分のみが関連T_Hエピトープを含むからである。このようなエピトープは、例えば9～15アミノ酸のペプチドとして定義し合成できる。これらペプチドが、B－細胞またはCTLエピトープを含むペプチドに、例えばここで示唆する多価活性化ポリヒドロキシポリマーを介して共有結合するとすれば、抗原の関連部分と従来のキャリヤーを含有するのみのワクチン分子を得ることができる。さらに、B－細胞エピトープ、CTLエピトープおよびT_Hエピトープの最適組成を含む免疫原を提供することが可能である。

【００８７】

活性化ポリヒドロキシポリマーの合成

デキストラン、澱粉、アガロースなどのポリヒドロキシポリマーを、N－メチルピロリジノン(NMP)に溶解した均一合成(デキストラン)、または例えばアセトン中の異質合成(澱粉、アガロース、架橋デキストラン)の手段の何かにより、2,2,2－トリフルオロエタンスルホニルクロリド(トレシルクロリド)で活性化できる。

【００８８】

225mlの乾燥W－メチルピロリジノン(NMP)を、乾燥状態で、撹拌するための磁気が供給される500mlの丸底フラスコ中で、凍結乾燥した水溶性デキストラン(4.5g、83mmol、臨床グレード、平均分子量78000)に加える。フラスコを磁気撹拌下で、60℃の油浴に入れる。温度を20分間92℃に上げる。デキストランが溶解したとき、フラスコを直ちに油浴から除去し、油浴の温度を40℃に下げる。フラスコを油浴に再び入れ、磁気撹拌をつづけ、トレシルクロリド(2.764ml、25mmol)を滴下する。15分後、乾燥ピリジン(無水、2.020ml、25mmol)を滴下する。フラスコを油浴から除去し、室温で１時間撹拌する。生成分(トレシル活性化デキストラン、TAD)を、1200mlの冷エタノール(99.9%)中で沈殿させる。上澄液を傾斜し、沈殿物を50mlのポリプロピレンチューブ中2000rpmでの遠心分離で採取する。沈殿物を、50mlの0.5%酢酸に溶解し、5000mlの 0.5%酢酸で２回透析し、凍結乾燥する。TADを、－20℃で凍結乾燥粉末として貯蔵することができる。

【００８９】

一方、アガロースまたは架橋デキストランのような不溶性ポリヒドロキシポリマーは、それの、例えばアセトン中の懸濁液を作り、固相合成のような合成を行ってトレシル活性化できる。活性化ポリヒドロキシポリマーは、濾取できる。適当な方法は、例えばNilsson KおよびMosbach K(1987), “Methods in Enzymology135, p.67”とHermansson GTら, (1992)“Immobilized Affinity Ligand Techniques”(Academic Press, Inc., p.87)で報告されている。

【００９０】

この発明の免疫原－例示のペプチド抗原として、ヒトAβ－42－の合成

TAD(10mg)を100μlのH_2Oに溶解し、5mgのAβ－42(SEQ ID No.2、残基673～714)、2.5mgのP2(SEQ ID No.1)と、2.5gのP30(SEQ ID No.2)を含有する1000μlの炭酸塩緩衝液(pH9.6)を加える。Aβ－42とP2とP30ペプチドの全ては、保護したリジン基を含む。これらは、１－(4,4－ジメチル－2,6－ジオキソシクロヘキシ－１－イリデン)エチル(Dde)保護リジン基の形である。ペプチドは標準Fmoc法で作る。ここで通常のFmoc－Lys(Boc)－OHは、Fmoc－Lys(Ddo)－OH(Novabiochem、カタログNo. 04-12-1121から得られる)で置き換えられる。すなわち、ε－アミノ基がBocの代わりにDdeで保護される。

【００９１】

pH値を測定し、1MHClで9.6に調整する。室温で2.5時間後、80%ヒドラジン液を、8%の最終ヒドラジン濃度まで加え、溶液をさらに30分間室温で培養し、その後直ちに凍結乾燥する。凍結乾燥品を水に溶解させ、最後に凍結する前に水に対して大量に透析させる。

【００９２】

最終製品中のB－細胞エピトープ(Aβ)とT－ヘルパーエピトープ(P2とP30)の比を、合成工程で様々な濃度のこれらペプチドを用いて変化させる。さらに、最終物を、合成工程で炭酸塩緩衝液にアミノ化マンノースを加えて、（複合物をAPCsに標的化するように）例えばマンノースで標的化することができる。

【００９３】

不溶の活性化ポリヒドロキシポリマーが、B－細胞エピトープとT－ヘルパーエピトープを含むペプチドを結合するのに用いられると、ポリマーへの結合は、従来の固相合成で行うことができ、最終物を、洗浄と濾過で採取し、精製する。

【００９４】

一般記載で挙げたように、ペプチドベースのワクチンを作るためのここに記載のアプローチは、他のポリペプチド抗原に適用でき、それは純粋な合成ペプチドワクチンを作るのに便利であり、問題のポリペプチド抗原は、１つの単一ペプチド中で、十分な免疫原性を供給する。

【００９５】

実施例２

ペプチドコポリマーワクチンの一般合成

TAD(10mg)を100μlの水に溶解し、1～5mgのペプチドA(興味ある何れかの免疫原性ペプチド)、1～5mgのP2(ジフテリヤトキソイドP2エピトープ)、および1～5mgのP30(ジフテリヤトキソイドP30エピトープ)を含有する1000μlのpH9.6の炭酸塩緩衝液を加える。pH値を測定し、0.1MHClで9.6に調整する。室温で2.5時間後、その後直ちに溶液を凍結乾燥する。凍結乾燥品を水に溶解し、最後に凍結乾燥させる前に水で大々的に透析するか、ゲル濾過カラムで脱塩する。ペプチドがその配列中にリジンを有する場合、リジン側鎖のε－アミンを、合成で、Lys(Dde)－OH誘導体(GregoriusおよびTheisen 2001、提出)を用いてDdeで保護すべきである。結合後、80%溶液からのヒドラジンを、1～20%の最終ヒドラジン濃度まで加える。溶液を、室温でもう一度３０分間培養し、その後直ちに凍結乾燥し、最後に凍結乾燥させる前に、水で大々的に透析するか、ゲル濾過カラムで脱塩する。原理を、Fig2で、概略図で示す。

【００９６】

このような免疫原を、発明者らは、“ペプチドA”としてボレリアバーグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)タンパク質OSPCの短い8アミノ酸C末端フラグメントとペプチドBとしてジフテリヤトキソイドエピトープ(P2またはP30)を使って利用した。この抗原での免疫化研究の結果から、ワクチン化マウスのMHCハプロタイプ(haplotype)に合致するOspCフラグメントと、外来ジフテリヤエピトープを含むこの発明の免疫原のみで、これらのマウス中で、OspCに反応性の抗体を誘因し得たことが明らかにされた。対照的に、OspCペプチドのみを含む分子は、抗体産生を誘因できず、これは、一方でOspCを含み、そして他方でエピトープを含む２つの免疫原の混合物にも同じであった。従って、同じポリヒドロキシポリマーキャリヤー中に含めることが、必須でないとしても、OspCとして短いペプチドハプテンに対する抗体産生を誘因するのに優れていると結論付けられる。

【００９７】

C－末端OspCフラグメントを使った上記の参考実験は、ペプチドのTADの結合が、特異性T－細胞ヘルプを与えるT_Hリンパ球をトリガーできる免疫原を与えることも例証する。このことは、免疫原が、１）APCsで取込みできること、２）続いてAPCsはT_Hリンパ球へのMHCクラスIIの関係でT_Hエピトープを提示するように免疫原を加工できることを意味する。この発明者の知る限り、ポリヒドロキシポリマーのこの効果を達成する能力は、今まで決して例証されていなかった。

【００９８】

実施例３

ワクチン化と効能測定

ワクチン化

この発明の免疫原を、マウス、ラット、モルモット、ウサギまたはサルのような適当な動物種に注射する。

【００９９】

免疫原は、例えばフロイントアジュバント、ISA－51、アルミニウムベースのアジュバント(リン酸アルミニウム、または水酸化アルミニウム、例えばDanfossから入手)、リン酸カルシウム、QS21(Antigenics)、MF59(Chiron Corp.)とRibi(Glaxo SmithKline)のような

適当なアジュバントと混合できる。タンパク質ワクチンは、通常、例えば0、3、6、9、12週で、3～5回授与される。

【０１００】

抗体適定測定

ワクチン化された動物からの血清を、ELISAにて特異的な抗体をテストに対して試験することができる。96穴のマキシソルブプレート(例えばNunc, Life Technologies, Taastrup, デンマークから入手)を、第１抗原決定基由来の抗原か、そのままの抗原決定基の何れかの適当量(例：50μl)でコートできる。このことを、pH9.6の炭酸塩緩衝液のような適当な緩衝液中、例えば1μg／穴の最終含量を与える適当な濃度で行う。プレートは、例えば1時間培養し、例えばPBS＋0.5MnaCl＋1%トリトンX－100の洗浄緩衝液で洗浄し、そして例えば洗浄緩衝液＋1%BSAでありうる希釈緩衝液中で、例えば1時間ブロックする。標準品と希釈血清サンプルを同様に加え、プレート中例えば30分間培養する。洗浄後、第２の抗体の希釈液(例えばDAKO(Glostrup, デンマーク)からのHRP複合ウサギ－抗マウスIgG)を添加でき(例えば希釈緩衝液中1：1000希釈)、30分間培養する。次いで、洗浄緩衝液で洗浄でき、染色基体、例えばOPD基体(Sigma－Aldrich(Vallensbak Strand, デンマーク)からの)を加えることができる。反応を、例えば2N－H_2SO_4で停止させることができ、光学密度は、490nmでDynex MRX ELISAプレート・リーダーで測定することができる。血清抗体濃度を、例えばサンプルの光学密度を標準曲線に関連させて計算できる。一般に、市販源または学問用源から入手できる多くの抗体が存在し、これらの抗体は、標準曲線を作るのに使用できるが、抗体が入手できないときは、当該技術で知られた方法で作ることができる。

【０１０１】

ELISAは、様々な目的に改良できる。サンドウィッチELISAは、抗血清が、プレート被覆抗原または第１抗原決定基への結合から、例えばビチオンラベル化、治療上関連の抗体を置換できる反応性を含むかどうかをモニターするのに使用できる。特殊なELISAキットは、抗血清中などのイソタイプサブクラスの分布を測定するのに使用できる。

【０１０２】

抗－CEA CTL活性のモニターアッセイ

CTLエピトープ含有のワクチンでの免疫化が、抗原特異性CTL応答を誘因できるかどうかを探索することができる。免疫原で使用されたCTLエピトープは、例えば従来の細胞毒T細胞アッセイでAPCsをパルスするのに使用できる。抗体発現標的細胞(例えば関心のある抗原をコードする遺伝子をトランスフェクトしたMHCクラスＩ表現細胞系)は、抗原特異性細胞毒Tリンパ球(CTLs)の標的として使用できる。マウスを、適当なワクチン化スキーム(上記参照)を用いて、この発明のワクチンでワクチン化できる。ポジの対照として、抗原配列由来の例えばMHCクラスＩペプチドでマウスを免疫化できる。適当な間隔、例えば第１の免疫化3週間後に、免疫化マウスから脾臓細胞(splenocytes)を、ペプチドを負荷したマイトマイシンC処理(例えば、50μg／ml、37℃で20分)した同系の脾臓細胞で再刺激できる。この再刺激過程で、ペプチド負荷同系脾臓細胞の適当な数(例えば100×10^6)を、ワクチン化されたマウスからの脾臓細胞の適当な数(例えば60×10^6)と混合でき、37℃で例えば7日間培養される。再刺激過程の後、エフェクター細胞の細胞毒活性を、例えばクロム放出アッセイでモニターできる。標的細胞の適当な数(例えば5×10^6)を、クロム^{51}(例えば200mCi)でラベル化され、必要であれば抗原由来のペプチドを負荷し、そしてクロム^{51}放出アッセイで標的として用いる。関連抗体でトランスフェクトした細胞系は、CTLsの標的としても使用できる。このようなCTLアッセイは、適当な認容性標的細胞または再刺激用細胞を使用し、正常な野生型マウス、形質転換マウスおよび／またはヒトHLAクラスＩ分子の形質転換体マウス(例えばHHDマウス)で行うことができる。

【０１０３】

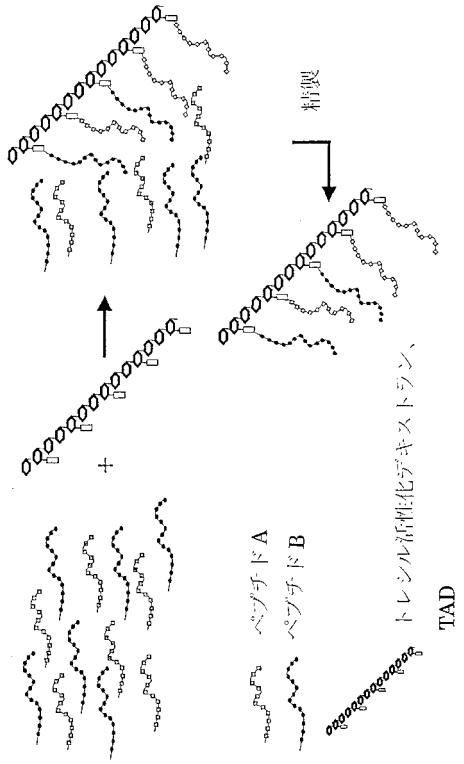
この発明のワクチンの抗原特異性CTL応答を誘因する能力は、抗原特異性テトラマー染色およびエリスポットアッセイを含む他のアッセイ法(全てこれらは免疫学での当業者で周知である)を用いて測定することもできる。

【図面の簡単な説明】

【０１０４】

【図１】TADへのペプチド結合を例にした、この発明の免疫原の合成の概略図。

【図１】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066056 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/385

(21) International Application Number: PCT/DK02/00112

(22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/DK01/00113 19 February 2001 (19.02.2001) DK
09/785,215 20 February 2001 (20.02.2001) US
PA 2001 01231 20 August 2001 (20.08.2001) DK
60/337,543 22 October 2001 (22.10.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHARMEXA A/S** [DK/DK]; Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **NIELSEN, Klaus, Gregorius** [DK/DK]; c/o M & B Biotech A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **KOEFOED, Peter** [DK/DK]; c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(74) Agent: **KOEFOED, Peter**; c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK (utility model), DM, DZ, EC, EE (utility model), ES, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/066056 A2

(54) Title: SYNTHETIC VACCINE AGENTS

(57) Abstract: The present invention provides for novel immunogens that are comprised of an activated polyhydroxypolymer backbone to which is attached 2 separate antigenic determinants. The 1st antigenic determinant includes a B-cell or CTL epitope and the 2nd antigenic determinant includes a T-helper epitope. In preferred embodiments, the antigenic determinants are derived from different molecules and species. Exemplary immunogens of the invention are constituted of a linear tresyl-activated dextran backbone to which is coupled B-cell or CTL epitopes of an antigen and to which is also coupled universal T-helper epitopes. Also disclosed are immunogenic compositions comprising the immunogens, methods of immunisation and a method for identification of suitable immunogens of the invention.

SYNTHETIC VACCINE AGENTS

The present invention provides for novel vaccine agents, which have a controllable distribution of different, well-defined peptides and which allows for detachment of these peptides from the agent by means of peptidase cleavage.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Agents for immunizing or vaccinating animals include a large variety of different solutions to various problems involved in immunization.

When immunizing with small antigens or haptens, one problem is often the absence of peptide sequences in the immunogen that can trigger CD4+ cells to provide the necessary help for B-cell or CTLs to mount a sufficient immune response. This problem is especially important when the antigen is of self-origin.

The traditional approach has been to covalently couple (conjugate) the antigen of interest to a large immunogenic carrier protein. In recent years this technology has been refined by utilising immunogens comprised of short peptide antigens fused to relevant carrier proteins or even to known universal T-helper epitopes.

However, both of these prior art technologies suffer a number of drawbacks. If using the traditional carrier approach, it is difficult to characterise the resulting product and it is further a problem that the immune response induced will have a tendency to be directed towards the carrier moiety and not to

towards the peptide antigen - this phenomenon is known as "carrier suppression".

Furthermore, when coupling a small peptide to a large carrier, it is normally not predictable whether or not the antigenic determinant(s) of the peptide will be accessible to the immune system, since the carrier moiety to some degree will shield the peptide.

Similar problems exist with fusion of carriers to peptides - this problem is to some extent avoided when using "carriers" that are constituted of short T-helper epitopes. Nevertheless, this may also give rise to problems. Due to the small size of both the peptide and the T-helper epitope, it is not in any way a certain thing that the ratio between T-helper epitopes and antigenic determinant is optimal in order to trigger the most effective immune response.

In conclusion, there is a definite need to device novel strategies for preparing vaccine based on small antigenic peptides or small haptens.

OBJECT OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide for novel immunogenic agents that utilise an inert carrier as a multivalent coupling agent to which one can couple both an antigen of interest but also a controlled amount of T-helper epitopes and/or other immunologically suitable moieties. It is a further object of the invention to provide for compositions including such immunogenic agents as well as to provide for novel methods of immunization.

SUMMARY OF THE INVENTION

One known way of achieving coupling of peptides to an immunologically inert carrier is to activate a suitable polyhydroxypolymer with tresyl (trifluoroethylsulphonyl) groups or other suitable activation groups such as maleimido, p-Nitrophenyl cloroformate (for activation of OH groups and formation of a peptide bond between peptide and polyhydroxypolymer), and tosyl (p-toluenesulfonyl). It is e.g. possible to prepare activated polysaccharides as described in WO 00/05316 and US 5,874,469 (both incorporated by reference herein) and couple these to peptides that have been prepared by means of conventional solid or liquid phase peptide synthesis techniques. The resulting product consists of a polyhydroxypolymer backbone (e.g. a dextran backbone) that has, attached thereto by their N-termini or by other available nitrogen moieties, peptides of choice.

This known way of coupling peptides (or other suitable antigenic determinants) to e.g. tresylated water-soluble dextran has to the best of the present inventors' knowledge previously merely been contemplated for dianogstic uses. However, the present inventors have now surprisingly discovered that such peptide-polyhydroxypolymer conjugates are very suitable as agents for immunisation. This has been demonstrated in a series of experiments where a mixture of a C-terminal peptide (the 8 C-terminal amino acids) from the Borrelia antigen OspC and a known T_H epitope peptide was coupled to a tresyl-activated dextran and used as an immunization agent in mice.

However, this principle or coupling a peptide antigen to a polyhydroxypolymer is in the opinion of the present inventors a generally applicable, novel and inventive approach:

Molecules can be obtained that comprise a T helper epitope and molecules representing or including B-cell epitopes linked covalently to a non-immunogenic polymer molecule acting as a vehicle, e.g. a multivalent activated poly-hydroxypolymer - this type of molecule functions as a vaccine molecule that only contains the immunologically relevant parts of antigens. Promiscuous or so-called universal T-helper epitopes can be used if e.g. the target for the vaccine is a hapten (such as a self-antigen) or an antigen that otherwise could be rendered more immunogenic by adding further T_H epitopes. Furthermore, elements that enhance the immunological response could be also co-coupled to the vehicle and thereby act as an adjuvant. Such elements could be mannose, tuftsin, muramyl dipeptide, CpG motifs etc, cf. below. In that case, subsequent adjuvant formulation of the vaccine product might be unnecessary and the product could be administered in pure water or saline.

By coupling cytotoxic T cell (CTL) epitopes together with the T-helper epitopes it will also be possible to generate CTL's specific for the antigen from which the CTL epitope was derived. Elements that promote uptake of the product to the cytosol, such as mannose, of the APC, e.g. a macrophage, could also be co-coupled to the vehicle together with the CTL- and the T helper epitope and enhance the CTL response.

Hence, in its most broad and general scope, the present invention provides for a novel immunogen which comprises

a) at least one first antigenic determinant that includes at least one B-cell epitope and/or at least one CTL epitope, and

b) at least one second antigenic determinant that includes a T helper cell epitope (T_H epitope),

wherein each of the at least one first and second antigenic determinants are coupled to a pharmaceutically acceptable activated polyhydroxypolymer carrier.

Another aspect of the invention relates to an immunogenic composition comprising the immunogen of the invention.

A third aspect of the invention relates to a method of immunizing/vaccinating an animal against an antigen of choice by administering the immunogen or the immunogenic composition of the invention, where the immunogen and the antigen of choice shares the same at least one first antigenic determinant.

A fourth aspect of the invention relates to a method for preparing and selecting useful immunogens of the invention.

It should be noted that the present disclosure focuses on the use of antigenic *peptide* determinants - in fact it is necessary that the 2nd antigenic determinant is, or at least contains, an amino acid sequence that constitutes an MHC Class II binding peptide (a T_H epitope). However, if the 1st determinant includes B-cell epitopes, it need not necessarily be a peptide - it will be understood by the skilled reader that all disclosures relating to the 1st antigenic determinant may relate to other B-cell epitope-containing molecular entities, unless the present disclosure specifically discusses characteristics of 1st peptide determinants that would not be applicable to other antigenic determinants (for instance in the event the 1st determinant is a CTL epitope).

LEGEND TO THE FIGURE

Fig. 1: Schematic drawing of the synthesis of immunogens of the invention, exemplified by peptide-coupling to TAD. A mixture of peptides A and B is brought in contact (essentially as described in Example 2) with a tresyl-activated, water-soluble dextran. Peptides A and B react with the activation groups on the TAD, and after purification the immunogen is provided.

DETAILED DISCLOSURE OF THE INVENTION

Definitions

In the following, a number of terms used in the present specification and claims will be defined and explained in detail in order to clarify the metes and bounds of the invention.

The terms "T-lymphocyte" and "T-cell" will be used interchangeably for lymphocytes of thymic origin that are responsible for various cell mediated immune responses as well as for helper activity in antigen specific immune responses. Likewise, the terms "B-lymphocyte" and "B-cell" will be used interchangeably for antibody-producing lymphocytes. The terms "cytotoxic T-cell", "cytotoxic T lymphocyte" and the term "CTL" are also used interchangeably for lymphocytes that induce cell killing in response to recognition of peptide sequences bound to MHC Class I molecules on the surface of the cells.

"An immunogen" is herein meant to designate a single molecule that includes one or more antigenic determinants of an antigen

of interest *and* one or more T_H epitopes that are recognized by the animal to be immunized.

"Antigenic determinant" is herein designating a molecule or a part of a molecule that is specifically recognised by certain clones of lymphocytes. An antigenic determinant may e.g. be a B-cell epitope and thus recognized by B-cells and their corresponding antibodies. A B-cell epitope is characterized by its 3D shape and in essence any part of a molecule that can fit into the antigen binding site of an antibody may constitute an antigenic determinant of that molecule. Other antigenic determinants are CTL and T_H epitopes – these are always peptides or contains peptides and they are characterized by their linear structure.

The term "peptide" is in the present context intended to mean both short peptides of from 2 to 10 amino acid residues, oligopeptides of from 11 to 100 amino acid residues, and polypeptides of more than 100 amino acid residues. Furthermore, the term is also intended to include proteins, *i.e.* functional biomolecules comprising at least one polypeptide. The peptide may be glycosylated and/or lipidated and/or comprise prosthetic groups.

The term "subsequence" means any consecutive stretch of at least 3 amino acids or, when relevant, of at least 3 nucleotides, derived directly from a naturally occurring amino acid sequence or nucleic acid sequence, respectively.

The term "animal" is in the present context in general intended to denote an animal species (preferably mammalian), such as *Homo sapiens*, *Canis domesticus*, etc. and not just one single animal. However, the term also denotes a population of such an animal species, since it is important that the indi-

viduals immunized according to the invention all harbour substantially the same antigen allowing for immunization of the animals with the same immunogen(s). If, for instance, genetic variants of the antigen exists in different human populations it may be necessary to use different immunogens in these different populations in order to be able to break the tolerance towards the antigen in each population. It will be clear to the skilled person that an animal in the present context is a living being which has an immune system. It is preferred that the animal is a vertebrate, such as a mammal.

The expression "effecting presentation ... to the immune system" is intended to denote that the animal's immune system is subjected to an immunogenic challenge in a controlled manner. As will appear from the disclosure below, such challenge of the immune system can be by vaccination with peptide-containing immunogens of the invention. The important result to achieve is that immune competent cells in the animal are confronted with the antigen in an immunologically effective manner, whereas the precise mode of achieving this result is of less importance to the inventive idea underlying the present invention.

The term "immunogenically effective amount" has its usual meaning in the art, *i.e.* an amount of an immunogen which is capable of inducing an immune response which significantly engages agents (e.g. pathogenic agents) which share immunological features with the immunogen.

When discussing "autotolerance towards an autologous antigen" it is understood that since the relevant antigen is a self-molecule in the population to be vaccinated, normal individuals in the population do not mount an immune response against

it; it cannot be excluded, though, that occasional individuals in an animal population might be able to produce antibodies against the native antigen, e.g. as part of an autoimmune disorder. At any rate, an animal species will normally only be autotolerant towards its own antigen, but it cannot be excluded that analogues derived from other animal species or from a population having a different phenotype would also be tolerated by said animal. Furthermore, antigens that lack size or (normally more relevant) T_H epitopes are also tolerated by the immune system and these will behave in much the same way as a true self-antigen.

A "foreign T-cell epitope" (or: "foreign T-lymphocyte epitope") is a peptide which is able to bind to an MHC molecule and which stimulates T-cells in an animal species. Preferred foreign T-cell epitopes in the invention are "promiscuous" (or "universal" or "broad-range") epitopes, *i.e.* epitopes which bind to a substantial fraction of a particular class of MHC molecules in an animal species or population. Only a very limited number of such promiscuous T-cell epitopes are known, and they will be discussed in detail below. It should be noted that in order for the immunogens which are used according to the present invention to be effective in as large a fraction of an animal population as possible, it may be necessary to 1) insert several foreign T-cell epitopes in the same immunogen or 2) prepare several immunogens wherein each analogue has a different promiscuous epitope inserted. It should be noted also that the concept of foreign T-cell epitopes also encompasses use of cryptic T-cell epitopes, *i.e.* epitopes which are derived from a non-immunogenic protein and which only exerts immunogenic behaviour when existing in isolated form without being part of the non-protein in question.

A "foreign T helper lymphocyte epitope" (a foreign T_H epitope) is a foreign T cell epitope which binds an MHC Class II molecule and can be presented on the surface of an antigen presenting cell (APC) bound to the MHC Class II molecule.

An "MHC Class II binding amino acid sequence that is heterologous to an antigen" is therefore an MHC Class II binding peptide that does not exist in the multimeric protein in question. Such a peptide will, if it is also truly foreign to the animal species harbouring the multimeric protein, be a foreign T_H epitope.

A "functional part" of a (bio)molecule is in the present context intended to mean the part of the molecule which is responsible for at least one of the biochemical or physiological effects exerted by the molecule. It is well-known in the art that many enzymes and other effector molecules have an active site which is responsible for the effects exerted by the molecule in question. Other parts of the molecule may serve a stabilizing or solubility enhancing purpose and can therefore be left out if these purposes are not of relevance in the context of a certain embodiment of the present invention.

The term "adjuvant" has its usual meaning in the art of vaccine technology, *i.e.* a substance or a composition of matter which is 1) not in itself capable of mounting a specific immune response against the immunogen of the vaccine, but which is 2) nevertheless capable of enhancing the immune response against the immunogen. Or, in other words, vaccination with the adjuvant alone does not provide an immune response against the immunogen, vaccination with the immunogen may or may not give rise to an immune response against the immunogen, but the combination of vaccination with immunogen and adjuvant induces

an immune response against the immunogen which is stronger than that induced by the immunogen alone.

"Targeting" of a molecule is in the present context intended to denote the situation where a molecule upon introduction in the animal will appear preferentially in certain tissue(s) or will be preferentially associated with certain cells or cell types. The effect can be accomplished in a number of ways including formulation of the immunogen in a composition facilitating targeting or by introduction in the immunogen of groups which facilitates targeting. These issues will be discussed in detail below.

"Stimulation of the immune system" means that a substance or composition of matter exhibits a general, non-specific immunostimulatory effect. A number of adjuvants and putative adjuvants (such as certain cytokines) share the ability to stimulate the immune system. The result of using an immunostimulating agent is an increased "alertness" of the immune system meaning that simultaneous or subsequent immunization with an immunogen induces a significantly more effective immune response compared to isolated use of the immunogen.

The term "polyhydroxypolymer carrier" is intended to denote the part of the immunogen that carries the amino acid sequences. As a general rule, the polyhydroxypolymer carrier has its outer limits where amino acid sequences can be cleaved of by a peptidase, e.g. in an antigen presenting cell that is processing the immunogen. Hence, the polyhydroxypolymer carrier can be the polyhydroxypolymer with an activation group, where the bond between the activation group and the amino acid sequence is cleavable by a peptidase in an APC, or the polyhydroxypolymer carrier can be a polyhydroxypolymer with activa-

tion group and e.g. a linker such as a single L-amino acid or a number of D-amino acids, where the last part of the linker can bond to the amino acid sequences and be cleaved by a peptidase in an APC.

The term "polysaccharide" is intended to be used with its normal meaning, i.e. "a combination of nine or more monosaccharides, linked together by glycosidic bonds", cf. Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 11th ed., Sax and Lewis, eds., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1987. Examples of such polysaccharides are dextran (e.g. Dextran 40, Dextran 70, Dextran 75), agarose, cellulose and starch.

1st and 2nd antigenic determinants

The rationale behind the present invention is that the provision of synthetic immunogens (especially peptide-containing immunogens) provides a greater deal of control over the composition of the end-product. In contrast, when using recombinantly produced polypeptide immunogens, purification and characterization is always a major task. Hence, in cases where specific antigenic determinants (epitopes) can be identified that are suitable as the main constituent in an immunogen, the present invention provides for a convenient way of preparing the immunogens in a cost-effective manner.

For most antigens, epitopes (both B-cell epitopes and CTL epitopes) are already known and published in the scientific literature - in practice a known protein may be "scanned" for epitopes by preparing overlapping truncates thereof that are reacted with monoclonal antibodies raised against the protein. The fragments that react with the antibody constitute local epitopes. Other suitable technologies include those described in Irving MB *et al.*, Curr Opin Chem Biol 2001 **5**(3):314-24,

Parker CE and Tomer KB, Methods Mol Biol 2000;**146**:185-201, and Nelson PN *et al.*, Mol Pathol 2000; **53**(3):111-7. Methods for prediction of epitopes are described in Nussinov R and Wolfson HJ, Comb Chem High Throughput Screen 1999;**2**(5):261-9 Furthermore, methods of predicting and mapping the presence of epitopes (especially in protein antigens) via computer algorithms are also well-known in the art. For instance, CTL epitopes may be predicted via the methods described in Rothbard *et al.* EMBO J. **7**:93-100 (1988) and in de Groot MS *et al.*, Vaccine 2001;**19**(31):4385-95 or otherwise identified via the technologies described in Rammensee H-G. *et al.* (1995), Immunogenetics 41: 178-228, Schirle M *et al.* Eur J Immunol 2000;30(18):2216-2225.

Hence, it is especially preferred that either or both of the at least one first and second antigenic determinants of the immunogen are peptides, *i.e.* that they are constituted by amino acid sequences - since the 1st and 2nd amino acid sequences are normally attached separately to the activated polyhydroxypolymer carrier, their respective lengths can be kept at a minimum, thus facilitating the synthesis steps for each peptide species. The length of such amino sequences are contemplated to range from about 4 amino acids to about 100 (even though there is no upper limit), but preferably the upper limit will not exceed 80 amino acids, and it is preferred that the upper limit does not exceed 60 amino acids. Especially preferred lengths of peptidic antigenic determinants are thus in the range between about 4 to about 50 amino acids. Even lower upper limits are envisaged, such as at most 40, at most 30 and at most 25 amino acids. It is especially preferred that a peptidic antigenic determinant is constituted by an amino acid sequence of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 amino acids. It

is also contemplated to utilise e.g. recombinantly produced polypeptides as the molecule constituting the 1st antigenic determinant and using synthetic peptides as the 2nd antigenic determinant. This would e.g. provide for conjugates where a full-length self-polypeptide is coupled to the carrier and the T_H epitopes are coupled in other positions. It should thereby be possible to attach the necessary T_H epitopes (perhaps several species) to the same molecular entity, without substantially interfering with the 3D structure of the self-polypeptide and thereby break tolerance.

In order to obtain processing and presentation of peptides of the immunogen by antigen presenting cells (APCs), the APCs must be able to cleave off the peptide antigenic determinant from the polyhydroxypolymer carrier. This is most conveniently achieved by having such a peptide antigenic determinant coupled to the carrier via a bond that can be cleaved by a peptidase, such as the peptidases that are active in the APCs' processing of peptide sequences. This can e.g. be achieved by having the determinants coupled to the carrier by means of a peptide bond or an amide bond. In preferred embodiments the antigenic determinant is bound to the carrier, where the antigenic determinant provides for the nitrogen atom of the amide or peptide bond - for peptidic antigenic determinants, this has the consequence that the peptide has a free carboxy terminus, an effect obtained when using a tresyl group as the activation group.

In many cases the 1st and 2nd antigenic determinants will be derived from different molecules, *i.e.* they are not found in the same molecule in nature. Further, it is normally also the case that they are not derived from the same species. And, even though it is preferred that the 1st and 2nd antigenic determi-

nants are coupled independently to the activated polyhydroxy-polymer it can be envisaged that they are e.g. fused to each other and coupled to the carrier at the terminus of the fusion product - this will be feasible when both antigenic determinants are relatively small (such as when the 1st antigenic determinant is a CTL epitope and the 2nd is a pure T_H epitope).

The 2nd antigenic determinant preferably includes an immunodominant T_H epitope, that is, epitope which in the vaccinated individual gives rise to a significant immune response, but it is a well-known fact that a T_H epitope which is immunodominant in one individual is not necessarily immunodominant in another individual of the same species, even though it may be capable of binding MHC Class II molecules in the latter individual. However, normally it will suffice to utilise a peptide that strongly binds to an MHC class II molecule.

With respect to the issues of particular considerations concerning immunodominance and MHC restriction of T helper epitopes, reference is made to e.g. WO 00/65058 and WO 00/20027 where thorough descriptions can be found.

The T_H epitope being part of the 2nd antigenic determinant is preferably a promiscuous T_H epitope. There exist a number of naturally occurring promiscuous T-cell epitopes which are active in a large proportion of individuals of an animal species or an animal population and these are preferably introduced in the vaccine thereby reducing the need for a very large number of different modified 2nd antigenic determinants in the same vaccine immunogen or in the same vaccine composition.

The promiscuous epitope can according to the invention be a naturally occurring human TH epitope such as epitopes from tetanus toxoid (e.g. the P2 and P30 epitopes, cf. SEQ ID NOs:

1 and 2, respectively), diphtheria toxoid, Influenza virus hemagluttinin (HA), and P. falciparum CS antigen.

Over the years a number of other promiscuous T-cell epitopes have been identified. Especially peptides capable of binding a large proportion of HLA-DR molecules encoded by the different HLA-DR alleles have been identified and these are all possible T-cell epitopes to be introduced in modified CEA used according to the present invention. Cf. also the epitopes discussed in the following references which are hereby all incorporated by reference herein: WO 98/23635 (Frazer IH *et al.*, assigned to The University of Queensland); Southwood S *et. al*, 1998, J. Immunol. **160**: 3363-3373; Sinigaglia F *et al.*, 1988, Nature **336**: 778-780; Rammensee HG *et al.*, 1995, Immunogenetics **41**: 4 178-228; Chicz RM *et al.*, 1993, J. Exp. Med **178**: 27-47; Hammer J *et al.*, 1993, Cell **74**: 197-203; and Falk K *et al.*, 1994, Immunogenetics **39**: 230-242. The latter reference also deals with HLA-DQ and -DP ligands. All epitopes listed in these 5 references are relevant as candidate natural epitopes to be used in the present invention, as are epitopes which share common motifs with these.

Alternatively, the epitope can be any artificial T-cell epitope which is capable of binding a large proportion of haplotypes. In this context the pan DR epitope peptides ("PADRE") described in WO 95/07707 and in the corresponding paper Alexander J et al., 1994, Immunity 1: 751-761 (both disclosures are incorporated by reference herein) are interesting candidates for epitopes to be used according to the present invention. It should be noted that the most effective PADRE peptides disclosed in these papers carry D-amino acids in the C- and N-termini in order to improve stability when administered. However, the present invention primarily aims at incorporating

the relevant epitopes as part of the immunogen which should then subsequently be broken down enzymatically inside the lysosomal compartment of APCs to allow subsequent presentation in the context of an MHC-II molecule and therefore it is not expedient to incorporate D-amino acids in the epitopes used in the present invention.

One especially preferred PADRE peptide is the one having the amino acid sequence AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 3) or an immunologically effective subsequence thereof. This, and other epitopes having the same lack of MHC restriction are preferred T-cell epitopes that should be present in the modified CEA used in the inventive method. Such super-promiscuous epitopes will allow for the simplest embodiments of the invention wherein only one single modified CEA is presented to the vaccinated animal's immune system.

Apart from the 1st and 2nd antigenic determinants, the immunogen of the invention may also contain other moieties that provide for desirable features of the immunogen. For instance, the immunogen may further comprise at least one moiety coupled to the polyhydroxypolymer, said at least one moiety being selected from the group consisting of an immune stimulating moiety, a targeting moiety, or a presentation enhancing moiety – these are also discussed in detail below in connection with adjuvants. If such a moiety is a peptide it may be coupled to the activated polyhydroxypolymer in the same step as the coupling of the 1st and 2nd antigenic determinants.

Hence, the immunogen of the invention can also include the introduction of a moiety which targets the immunogen to an APC or a B-lymphocyte. For instance, the first moiety can be a specific binding partner for a B-lymphocyte specific surface

antigen or for an APC specific surface antigen. Many such specific surface antigens are known in the art. For instance, the moiety can be a carbohydrate for which there is a receptor on the B-lymphocyte or the APC (e.g. mannan or mannose). Alternatively, the second moiety can be a hapten. Also an antibody fragment which specifically recognizes a surface molecule on APCs or lymphocytes can be used as a first moiety (the surface molecule can e.g. be an FCγ receptor of macrophages and monocytes, such as FCγRI or, alternatively any other specific surface marker such as CD40 or CTLA-4). It should be noted that all these exemplary targeting molecules can be used as part of an adjuvant, cf. below. CD40 ligand, antibodies against CD40, or variants thereof which bind CD40 will target the modified CEA to dendritic cells. At the same time, recent results have shown that the interaction with the CD40 molecule renders the T_H cells unessential for obtaining a CTL response. Hence, it is contemplated that the general use of CD40 binding molecules as the first moiety (or as adjuvants, cf. below) will enhance the CTL response considerably; in fact, the use of such CD40 binding molecules as adjuvants and "first moieties" in the meaning of the present invention is believed to be inventive in its own right.

As an alternative or supplement to targeting the immunogen to a certain cell type in order to achieve an enhanced immune response, it is possible to increase the level of responsiveness of the immune system by including the an immune system stimulating moiety. Typical examples of such moieties are cytokines, heat-shock proteins, and hormones, as well as effective parts thereof.

Suitable cytokines to be used according to the invention are those which will normally also function as adjuvants in a vac-

cine composition, e.g. interferon γ (IFN-γ), Flt3 ligand (Flt3L), interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 13 (IL-13), interleukin 15 (IL-15), and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); alternatively, the functional part of the cytokine molecule may suffice as the second moiety. With respect to the use of such cytokines as adjuvant substances, cf. the discussion below.

Alternatively, the immune stimulating moiety can be a toxin, such as listeriolycin (LLO), lipid A and heat-labile enterotoxin. Also, a number of mycobacterial derivatives such as MDP (muramyl dipeptide), CFA (complete Freund's adjuvant) and the trehalose diesters TDM and TDE are interesting possibilities.

According to the invention, suitable heat shock proteins used as the immune stimulating moiety can be HSP70, HSP90, HSC70 (a heat shock cognate), GRP94, and calreticulin (CRT). Finally, CpG motifs and the immune stimulating peptide tuftsin are other possibilities.

Also the possibility of introducing a presentation enhancing moiety is an important embodiment of the invention. The art has shown several examples of this principle. For instance, it is known that the palmitoyl lipidation anchor in the *Borrelia burgdorferi* protein OspA can be utilised so as to provide self-adjuvating polypeptides (cf. e.g. WO 96/40718). It seems that the lipidated proteins form up micelle-like structures with a core consisting of the lipidation anchor parts of the polypeptides and the remaining parts of the molecule protruding therefrom, resulting in multiple presentations of the antigenic determinants. Hence, the use of this and related approaches using different lipidation anchors (e.g. a myristyl

group, a farnesyl group, a geranyl-geranyl group, a GPI-anchor, and an N-acyl diglyceride group) are preferred embodiments of the invention, especially since the provision of such a lipidation anchor in a recombinantly produced protein is fairly straightforward and merely requires use of e.g. a naturally occurring signal sequence as a fusion partner for a component of the immunogen. Another possibility is use of the C3d fragment of complement factor C3 or C3 itself (cf. Dempsey et al., 1996, Science 271, 348-350 and Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462).

The polyhydroxypolymer carrier

In order for amino acid sequences to couple to the polyhydroxypolymer it is normally necessary to "activate" the polyhydroxypolymer with a suitable reactive group that can form the necessary link to the amino acid sequences.

The term "polyhydroxypolymer" is generally intended to have the same meaning as in WO 00/05316, *i.e.* the polyhydroxypolymer can have exactly the same characteristics as is specifically taught in that application. Hence, the polyhydroxypolymer can be water soluble or insoluble (thus requiring different synthesis steps during preparation of the immunogen). Both embodiments given rise to certain advantages. In general, the coupling of peptides to a water-soluble activated polyhydroxypolymer is chemically simpler than the synthesis applicable for an insoluble polymer. It is also contemplated that induction of CTLs will be facilitated by using water-soluble carriers in the invention since such immunogens would be likely to be taken up via pinocytosis. On the other hand, the insoluble polymer can, when grinded, form a particulate composition that is believed to be well-suited for inducing T-cell

help due to it being predominantly taken up by APCs and since it results in local concentration of antigen. It is therefore also within the scope of the present invention to utilise vaccination strategies where both water-soluble and water-insoluble immunogens are utilised.

In the event the polymer is dextran, water soluble forms are in general linear molecules, whereas the water insoluble forms of dextran are cross-linked.

The polyhydroxypolymer can be selected from naturally occurring polyhydroxy compounds and synthetic polyhydroxy compounds.

Specific and preferred polyhydroxypolymers are polysaccharides selected from acetan, amylopectin, gum agar-agar, agarose, alginates, gum Arabic, carregeenan, cellulose, cyclodextrins, dextran, furcellaran, galactomannan, gelatin, ghatti, glucan, glycogen, guar, karaya, konjac/A, locust bean gum, mannan, pectin, psyllium, pullulan, starch, tamarine, tragacanth, xanthan, xylan, and xyloglucan. Dextran is especially preferred.

However, the polyhydroxypolymer can also be selected from highly branched poly(ethyleneimine)(PEI), tetrathienylene vinylene, Kevlar (long chains of poly-paraphenyl terephtalamide), Poly(urethanes), Poly(siloxanes), polydimethylsiloxane, silicone, Poly(methyl methacrylate) (PMMA), Poly(vinyl alcohol), Poly(vinyl pyrrolidone), Poly(2-hydroxymethylmethacrylate), Poly(N-vinyl pyrrolidone), Poly(vinyl alcohol), Poly(acrylic acid), Polytetrafluoroethylene (PTFE), Polyacrylamide, Poly(ethylene-co-vinyl acetate), Poly(ethylene glycol) and derivatives, Poly(methacrylic acid), Polylactides (PLA), Polyglycolides (PGA), Poly(lactide-co-glycolides) (PLGA), polyvinylalcohol, poly(hydroxymethylmethacrylate),

poly(hydroxyethylmethacrylate), poly(hydroxypropylmethacrylate)Polyanhydrides, and Polyorthoesters, as well as corresponding copolymers.

The (weight) average molecular weight of the polyhydroxypolymer in question (i.e. before activation) is at least 500, typically at least 1,000, such as at least 2,000, preferably in the range of 2,500-2,000,000, more preferably in the range of 3,000-1,000,000, in particular in the range of 5,000-500,000. It is believed that polyhydroxypolymers having an average molecular weight in the range of 10,000-200,000 are particularly advantageous.

When using a water-soluble polyhydroxypolymer, it is preferably water soluble to an extent of at least 10 mg/ml, preferably at least 25 mg/ml, such as at least 50 mg/ml, in particular at least 100 mg/ml, such as at least 150 mg/ml at room temperature. It is known that dextran, even when activated as described herein, fulfils the requirements with respect to water solubility.

For some of the most interesting polyhydroxypolymers, the ratio between C (carbon atoms) and OH groups (hydroxy groups) of the unactivated polyhydroxypolymers (i.e. the native polyhydroxypolymer before activation) is in the range of 1.3 to 2.5, such as 1.5-2.3, preferably 1.6-2.1, in particular 1.85-2.05. Without being bound to any specific theory, it is believed that such as a C/OH ratio of the unactivated polyhydroxypolymer represents a highly advantageous level of hydrophilicity. Polyvinylalcohol and polysaccharides are examples of polyhydroxypolymers which fulfil this requirement. It is believed that the above-mentioned ratio should be roughly the same for

the activated polyhydroxypolymer as the activation ratio should be rather low.

As mentioned above, the polyhydroxypolymers carry functional groups (activation groups), which facilitates the anchoring of peptides to the carrier. A wide range of applicable functional groups are known in the art, e.g. tresyl (trifluoroethylsulphonyl), maleimido, p-nitrophenyl cloroformate, cyanogenbromide, tosyl (p-toluenesulfonyl), triflyl (trifluoromethanesulfonyl), pentafluorobenzenesulfonyl, and vinyl sulphone groups. Preferred examples of functional groups within the present invention are tresyl, maleimido, tosyl, triflyl, pentafluorobenzenesulfonyl, p-nitrophenyl cloroformate, and vinylsulphone groups, among which tresyl, maleimido, and tosyl groups are particularly relevant.

Tresyl activated polyhydroxypolymers can be prepared using tresyl chloride as described for activation of dextran in Example 1 in WO 00/05316 or as described in Gregorius et al., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65-73.

Maleimido activated polyhydroxypolymers can be prepared using *p*-maleimidophenyl isocyanate as described for activation of dextran in Example 3 of WO 00/05316. Alternatively, maleimido groups could be introduced to a polyhydroxypolymer, such as dextran, by derivatisation of a tresyl activated polyhydroxypolymer (such as tresyl activated dextran (TAD)) with a diamine compound (generally $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, where n is 1-20, preferably 1-8), e.g. 1,3-diaminopropane, in excess and subsequently react the amino groups introduced in TAD with reagents such as succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC), succinimidyl 4-(*p*-

maleimidophenyl)butyrate (SMPB), sulfo-succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate (sulfo-SMPB), N-γ-maleimidobutyryloxy-succinimide ester (GMBS) or N-γ-maleimidobutyryloxy-sulfosuccinimide ester. Although the different reagents and routes for activation formally results in slightly different maleimide activated products with respect to the linkage between the maleimide functionality and the remainder of the parent hydroxy group on which activation is performed, all and every are considered as "maleimide activated polyhydroxypolymers".

Tosyl activated polyhydroxypolymers can be prepared using tosyl chloride as described for activation of dextran in Example 2 in WO 00/05316. Triflyl and pentafluorobenzenesulfonyl activated polyhydroxypolymers are prepared as the tosyl or tresyl activated analogues, e.g. by using the corresponding acid chlorides.

Cyanogenbromide activated polyhydroxypolymer can be prepared by reacting the polyhydroxypolymer with cyanogenbromide using conventional methods. The resulting functional groups are normally cyanate esters with two hydroxy groups of the polyhydroxypolymer.

The degree of activation can be expressed as the ratio between the free hydroxy groups and the activation groups (i.e. functionalised hydroxy groups). It is believed that a ratio between the free hydroxy groups of the polyhydroxypolymer and the activation groups should be between 250:1 and 4:1 in order to obtain an advantageous balance between the hydrophilicity and the reactivity of the polyhydroxypolymer. Preferably the ratio is between 100:1 and 6:1, more preferably between 60:1 and 8:1, in particular between 40:1 and 10:1.

Especially interesting activated polyhydroxypolymers for use in the method for producing the generally applicable immunogen according to the invention are tresyl, tosyl and maleimido activated polysaccharides, especially tresyl activated dextran (TAD), tosyl activated dextran (TosAD), and maleimido activated dextran (MAD).

The polyhydroxypolymer carrier may be substantially free of amino acid residues, necessitating that the activation group provides for part of a peptidase cleavable bond since the antigenic determinant would not otherwise be able to enter the antigen processing steps of the APC's metabolism. However, as mentioned, the carrier may also simply include a spacer including at least one L-amino acid. Nevertheless, the at least first and at least second antigenic determinants are normally bound to the activated version of the polyhydroxypolymer via a nitrogen, preferably at the N-terminus of an amino acid sequence.

In brief, in the preferred embodiments of the invention where either of the antigenic determinants may be a peptide, the activated polyhydroxypolymer must normally contain at least one amino acid group if the bond between an amino acid and the activation group cannot be broken by the APC's biochemical machinery. The at least one amino acid group(s) then serves as spacer(s) between the activation group and the antigenic peptide determinant, with the consequence that the bond between the carrier's amino acid(s) and the peptide determinant may be cleaved, leaving the peptide free for attack by peptidases of the APC's processing pathway. Of course, the binding between an activation group and a peptide determinant need not be sensitive to peptidase cleavage - it may equally well be sensitive to other physicochemical conditions that are found in the

APC. The important goal to achieve is that the antigenic determinant is liberated inside the APC, thus allowing for binding to an MHC molecule and subsequent presentation to lymphocytes.

Preparation of immunogen of the invention

When using the preferred peptide determinants, it is possible to synthesise the peptides so as to protect all available amino groups but the one at the N-terminus, subsequently couple the resulting protected peptides to the activated polyhydroxypolymer moiety, and finally de-protecting the resulting conjugate. A specific example of this approach is described in the examples below - it will, however, be appreciated by the skilled person in peptide chemistry, that multiple methods for obtaining this effect may be employed.

Instead of using the water-soluble polysaccharide molecules as taught in WO 00/05316 and US 5,874,469, it is, as mentioned above, equally possible to utilise cross-linked polysaccharide molecules, thereby obtaining a particulate conjugate between polypeptides and polysaccharide - this is believed to lead to an improved presentation to the immune system of the polypeptides, since two goals are reached, namely to obtain a local deposit effect when injecting the conjugate and to obtain particles which are attractive targets for uptake by APCs. The approach of using such particulate systems is also detailed in the examples, but in general the activated polyhydroxy polymer is used to combine the antigenic determinants containing the B-cell epitope and the T-helper epitopes it can, as mentioned above be performed as a solid phase synthesis and the final product can be harvested and purified by wash and filtration. The elements to be coupled to an activated polyhydroxypolymer

(peptides, tags etc) can be added to the polyhydroxypolymer at low pH, e.g. pH 4-5, and allowed to be equally distributed in the "gel" by passive diffusion. Subsequently, the pH can be raised to pH 9-10 to start the reaction of the primary amino groups on the peptides and tags to the tresyl groups on the polyhydroxy polymer. After coupling of peptides and e.g. immune stimulating elements or targeting moieties the gel is grinded to form particles of suitable size for immunization.

The ratio of B-cell epitopes and T-helper epitopes (P2, P30, PADRE or other suitable epitopes) in the final product can be varied by varying the concentration of these molecules in the synthesis step. As mentioned above, the immunogenic molecule can be tagged with e.g. mannose, tuftsin, CpG-motifs or other immune stimulating substances (described herein) by adding these, if necessary by using e.g. aminated derivatives of the substances, to the carbonate buffer in the synthesis step.

Vaccine and other immunizing formulations

When administration of the immunogens of the invention to an animal such as a human being, the formulation of the immunogen follows the principles generally acknowledged in the art. In the following is given a detailed description relevant for peptide vaccines and immunizing compositions since peptides constitute the most preferred embodiments of the above-mentioned 1st and 2nd antigenic determinants. The skilled reader will, though, appreciate that the general principles given below also will be applicable for most, if not all, vaccine strategies that include an immunogen of the invention.

Preparation of vaccines and immunizing agents that contain peptide sequences as active ingredients is generally well understood in the art, as exemplified by U.S. Patents 4,608,251;

4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; and 4,578,770, all incorporated herein by reference. Typically, such vaccines are prepared as injectables either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified. The active immunogenic ingredient is often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like, and combinations thereof. In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, or adjuvants which enhance the effectiveness of the vaccines; cf. the detailed discussion of adjuvants below.

The vaccines are conventionally administered parenterally, by injection, for example, either subcutaneously, intracutaneously, or intramuscularly. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories and, in some cases, oral, buccal, sublinqual, intraperitoneal, intravaginal, anal, epidural, spinal, and intracranial formulations. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkalene glycols or triglycerides; such suppositories may be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1-2%. Oral formulations include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain 10-95% of active ingredient, preferably 25-70%. For

oral formulations, cholera toxin is an interesting formulation partner (and also a possible conjugation partner).

The immunogens may be formulated into the vaccine as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include acid addition salts (e.g. formed with the free amino groups of a peptide constituting part of an immunogen of the invention) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be therapeutically effective and immunogenic. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, including, e.g., the capacity of the individual's immune system to mount an immune response, and the degree of protection desired. Suitable dosage ranges are of the order of several hundred micrograms active ingredient per vaccination with a preferred range from about 0.1 µg to 2,000 µg (even though higher amounts in the 1-10 mg range are contemplated), such as in the range from about 0.5 µg to 1,000 µg, preferably in the range from 1 µg to 500 µg and especially in the range from about 10 µg to 100 µg. Suitable regimens for initial administration and booster shots are also variable but are typified by an initial administration followed by subsequent inoculations or other administrations.

The manner of application may be varied widely. Any of the conventional methods for administration of a vaccine are applicable. These include oral application on a solid physiologically acceptable base or in a physiologically acceptable dispersion, parenterally, by injection or the like. The dosage of the vaccine will depend on the route of administration and will vary according to the age of the person to be vaccinated and the formulation of the antigen.

Some of the immunogens of the vaccine are sufficiently immunogenic in a vaccine, but for some of the others the immune response will be enhanced if the vaccine further comprises an adjuvant substance.

Various methods of achieving adjuvant effect for the vaccine are known. General principles and methods are detailed in "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (ed.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, and also in "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G *et al.* (eds.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, both of which are hereby incorporated by reference herein.

It is especially preferred to use an adjuvant which can be demonstrated to facilitate breaking of the autotolerance to self-protiens and other haptens that are not merely non-immunogenic due to their small size; however, in cases where the antigenic determinants coupled to the polyhydroxy polymer are both sufficiently large and sufficiently immunogenic, the adjuvant need not be incorporated.

Non-limiting examples of suitable adjuvants are selected from the group consisting of an immune targeting adjuvant; an immune modulating adjuvant such as a toxin, a cytokine, and a

mycobacterial derivative; an oil formulation; a polymer; a micelle forming adjuvant; a saponin; an immunostimulating complex matrix (ISCOM matrix); a particle; DDA; aluminium adjuvants; DNA adjuvants; γ-inulin; and an encapsulating adjuvant. In general it should be noted that the disclosures above which relate to compounds and agents useful as moieties in the immunogens also refer *mutatis mutandis* to their use in the adjuvant of a vaccine of the invention - in other words, instead of being part of the immunogen of the invention, such moieties are also suited as parts of the formulations of the present invention.

The application of adjuvants include use of agents such as aluminium hydroxide or phosphate (alum), commonly used as 0.05 to 0.1 percent solution in buffered saline, admixture with synthetic polymers of sugars (e.g. Carbopol®) used as 0.25 percent solution, aggregation of protein in the vaccine by heat treatment with temperatures ranging between 70° to 101°C for 30 second to 2 minute periods respectively and also aggregation by means of cross-linking agents are possible. Aggregation by reactivation with pepsin treated antibodies (Fab fragments) to albumin, mixture with bacterial cells such as *C. parvum* or endotoxins or lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria, emulsion in physiologically acceptable oil vehicles such as mannide mono-oleate (Aracel A) or emulsion with 20 percent solution of a perfluorocarbon (Fluosol-DA) used as a block substitute may also be employed. Admixture with oils such as squalene and IFA is also preferred.

According to the invention DDA (dimethyldioctadecylammonium bromide) is an interesting candidate for an adjuvant as is DNA and γ-inulin, but also Freund's complete and incomplete adjuvants as well as *quillaja* saponins such as QuilA and QS21 are

interesting as is RIBI. Further possibilities are monophosphoryl lipid A (MPL), the above mentioned C3 and C3d, and muramyl dipeptide (MDP).

Liposome formulations are also known to confer adjuvant effects, and therefore liposome adjuvants are preferred according to the invention.

Also immunostimulating complex matrix type (ISCOM® matrix) adjuvants are preferred choices according to the invention, especially since it has been shown that this type of adjuvants are capable of up-regulating MHC Class II expression by APCs. An ISCOM® matrix consists of (optionally fractionated) saponins (triterpenoids) from *Quillaja saponaria*, cholesterol, and phospholipid. When admixed with the immunogenic protein, the resulting particulate formulation is what is known as an ISCOM particle where the saponin constitutes 60-70% w/w, the cholesterol and phospholipid 10-15% w/w, and the protein 10-15% w/w. Details relating to composition and use of immunostimulating complexes can e.g. be found in the above-mentioned text-books dealing with adjuvants, but also Morein B *et al.*, 1995, Clin. Immunother. **3**: 461-475 as well as Barr IG and Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. **74**: 8-25 (both incorporated by reference herein) provide useful instructions for the preparation of complete immunostimulating complexes.

Another highly interesting (and thus, preferred) possibility of achieving adjuvant effect is to employ the technique described in Gosselin et al., 1992 (which is hereby incorporated by reference herein). In brief, the presentation of a relevant antigen such as an antigen of the present invention can be enhanced by conjugating the antigen to antibodies (or antigen binding antibody fragments) against the Fcγ receptors on mono-

cytes/macrophages. Especially conjugates between antigen and anti-FcγRI have been demonstrated to enhance immunogenicity for the purposes of vaccination.

Other possibilities involve the use of the targeting and immune modulating substances (*i.a.* cytokines) mentioned in the claims as moieties for the protein constructs. In this connection, also synthetic inducers of cytokines like poly I:C are possibilities.

Suitable mycobacterial derivatives are selected from the group consisting of muramyl dipeptide, complete Freund's adjuvant, RIBI, and a diester of trehalose such as TDM and TDE.

Suitable immune targeting adjuvants are selected from the group consisting of CD40 ligand and CD40 antibodies or specifically binding fragments thereof (cf. the discussion above), mannose, a Fab fragment, and CTLA-4.

Suitable polymer adjuvants are selected from the group consisting of a carbohydrate such as dextran, PEG, starch, mannan, and mannose; a plastic polymer; and latex such as latex beads.

Yet another interesting way of modulating an immune response is to include the immunogen (optionally together with adjuvants and pharmaceutically acceptable carriers and vehicles) in a "virtual lymph node" (VLN) (a proprietary medical device developed by ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). The VLN (a thin tubular device) mimics the structure and function of a lymph node. Insertion of a VLN under the skin creates a site of sterile inflammation with an upsurge of cytokines and chemokines. T- and B-cells as well as APCs rapidly respond to the danger signals, home to the in-

flamed site and accumulate inside the porous matrix of the VLN. It has been shown that the necessary antigen dose required to mount an immune response to an antigen is reduced when using the VLN and that immune protection conferred by vaccination using a VLN surpassed conventional immunization using Ribi as an adjuvant. The technology is *i.a.* described briefly in Gelber C *et al.*, 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", in: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th - 15th 1998, Seascape Resort, Aptos, California".

It is expected that the vaccine of the invention should be administered at least once a year, such as at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 12 times a year. More specifically, 1-12 times per year is expected, such as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 times a year to an individual in need thereof. It has previously been shown that the memory immunity induced by the use of the preferred autovaccines according to the invention is not permanent, and therefor the immune system needs to be periodically challenged with the analogues.

Due to genetic variation, different individuals may react with immune responses of varying strength to the same polypeptide. Therefore, the vaccine according to the invention may comprise several different immunogens with differences in the choice of antigenic determinants in order to increase the immune response, cf. also the discussion above concerning the choice of foreign T-cell epitope introductions. The vaccine may comprise two or more immunogens, where all of the immunogens are as defined above.

The vaccine may consequently comprise 3-20 different immunogens of the invention, such as 3-10 immunogens. However, normally the number of analogues will be sought kept to a minimum such as 1 or 2 analogues, especially because the immunogens may be tailored to include both the necessary 1st antigenic determinants and the necessary 2nd antigenic determinants in order to target as large a fraction of the vaccinated population.

Identifying useful immunogens

As mentioned above, an advantage of the immunogens of the invention is that they can be tailored to provide the optimum ratio between 1st and 2nd antigenic determinants. This also allows for the provision of a method for selection and preparation of useful immunogens of the invention. The method entails preparation of at least two different immunogens of the invention where each different immunogen has a characteristic ratio between the 1st and 2nd antigenic determinants. These immunogens are then formulated as immunizing agents (cf. example 3) and their respective capabilities of inducing a specific immune response against the 1st antigenic determinant are determined. The most effective immunogen(s) is/are selected and used for further development.

A similar approach can be used when determining the precise relative amount of targeting or immunostimulating moieties that should be incorporated in the immunogens of the invention in order to obtain the best efficacy.

The 1st and 2nd antigenic determinants as well as possible further moieties are coupled to the activated polyhydroxypolymer essentially as described in the present examples. And since the ratio of incorporated molecules in the immunogen is de-

pendent on the relative concentrations of the molecules in the incubation mixture, it is unproblematic to prepare a large number of different immunogens merely be adjusting the relative concentrations of the molecules.

The present invention will now be illustrated by means of the following non-limiting examples.

EXAMPLE 1

Synthesis of an Aβ Peptide Copolymer Vaccine using activated poly-hydroxypolymer as the cross-linking agent.

Introduction. A traditional conjugate vaccine consists of an antigen or hapten (e.g. in the form of a polypeptide antigen or hapten) coupled covalently to a carrier, such as a carrier protein. The antigen/hapten contains the B-cell or CTL epitope(s) and the carrier protein provides T_H epitopes. However, most of the carrier protein will normally be irrelevant as a source for T_H epitopes, since only a minor part of the total sequence contains the relevant T_H epitopes. Such epitopes can be defined and synthesized as peptides of e.g. 9-15 amino acids. If these peptides are linked covalently to peptides containing the B-cell or CTL epitopes, e.g. via a multivalent activated polyhydroxypolymer as taught herein, a vaccine molecule that only contains the relevant parts of the antigen and the traditional carrier can be obtained. It is further possible to provide an immunogen that contains an optimized composition of B-cell epitopes, CTL epitopes, and T_H epitopes.

Synthesis of the activated poly-hydroxypolymer. Polyhydroxypolymers such as dextran, starch, agarose etc. can be activated with 2,2,2-trifluoroethanesulfonyl chloride (tresyl

chloride), either by means of a homogenous synthesis (dextran) dissolved in N-methylpyrrolidinone (NMP) or by means of a heterogeneous synthesis (starch, agarose, cross-linked dextran) in e.g. acetone.

225 ml dry N-methyl pyrrolidinone (NMP) is added under dry conditions to freeze dried, water-soluble dextran (4.5 g, 83 mmol, clinical grade, Mw(avg) 78000) in a 500 ml round bottom flask supplied with a magnet for stirring. The flask is placed in a 60°C oil bath with magnetic stirring. The temperature is raised to 92°C over a period of 20 min. When the dextran is dissolved the flask is immediately removed from the oil bath and the temperature in the bath is lowered to 40°C. The flask is placed into the oil bath agaom, still with magnetic stirring, and tresyl chloride (2.764 ml, 25 mmol) is added drop-wise. After 15 min, dry pyridine (anhydrous, 2.020 ml, 25 mmol) is added drop-wise. The flask is removed from the oil bath and stirred for 1 hour at room temperature. The product (Tresyl Activated Dextran, TAD) is precipitated in 1200 ml cold ethanol (99.9%). The supernatant is decanted and the precipitate is harvested in 50 ml polypropylene tubes in a centrifuge at 2000 rpm. The precipitate is dissolved in 50 ml 0.5% acetic acid, dialyzed 2 times against 5000 ml 0.5% acetic acid and freeze-dried. TAD can be stored as a freeze-dried powder at -20°C.

Alternatively, an insoluble poly-hydroxypolymer, such as agarose or cross-linked dextran can be tresyl activated by making a suspension of the poly-hydroxypolymer in e.g. acetone and perform the synthesis as a solid phase synthesis. The activated poly-hydroxypolymer can be harvested by filtration. Suitable methods are reported in e.g. Nilsson K and Mosbach K (1987), Methods in Enzymology **135**, p. 67, and in Hermansson GT

et al. (1992), in "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., p. 87.

Synthesis of the immunogens of the invention - human Aβ-42 as an exemplary peptide antigen. TAD (10 mg) is dissolved in 100 µl H_2O and 1000 µl carbonate buffer, pH 9.6, containing 5 mg Aβ-42 (SEQ ID NO: 2, residues 673-714), 2.5 mg P2 (SEQ ID NO: 1) and 2.5 mg P30 (SEQ ID NO: 2) is added. The Aβ-42 and the P2 and P30 peptides all contain protected lysine groups: these are in the form of 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl (Dde) protected lysine groups. The peptides are prepared by means of a standard Fmoc strategy, where the conventional Fmoc-Lys(Boc)-OH has been substituted with Fmoc-Lys(Dde)-OH (obtained from Novabiochem , cat. no. 04-12-1121), *i.e.* the ε-amino group in lysine is protected with Dde instead of Boc.

The pH value is measured and adjusted to 9.6 using 1 M HCl. After 2.5 hours at room temperature, hydrazine from an 80% solution is added to a final hydrazine concentration of 8% and the solution is incubated for another 30 min. at room temperature and freeze-dried immediately thereafter. The freeze-dried product is dissolved in H_2O and dialysed extensively against H_2O before the final freeze-drying.

The ratio between B-cell epitopes (Aβ) and T-helper epitopes (P2 and P30) in the final product is varied using different concentrations of these peptides in the synthesis step. Furthermore, the final product can be tagged with e.g. mannose (so as to target the conjugate to APCs) by adding aminated mannose to the carbonate buffer in the synthesis step.

If an insoluble activated poly-hydroxypolymer is used to combine the peptides containing the B-cell epitope and the T-helper epitopes, the coupling to the polymer can be performed as a traditional solid phase synthesis and the final product is harvested and purified by wash and filtration.

As mentioned in the general description, the presently described approach for preparing a peptide based vaccine may be applied to any other polypeptide antigen where it would be convenient to prepare a purely synthetic peptide vaccine and where the polypeptide antigen in question provides sufficient immunogenicity in one single peptide:

EXAMPLE 2

General Synthesis Peptide Copolymer Vaccines

TAD (10 mg) is dissolved in 100 µl H_2O and 1000 µl carbonate buffer, pH 9.6, containing 1-5 mg peptide A (any immunogenic peptide of interest), 1-5 mg P2 (diphtheria toxoid P2 epitope) and 1-5 mg P30 (diphtheria toxoid P30 epitope) is added. The pH value is measured and adjusted to 9.6 using 0.1 M HCl. After 2.5 hours at room temperature the solution is freeze dried immediately hereafter. The freeze-dried product is dissolved in H_2O and dialysed extensively against H_2O or desalted on a gelfiltration column before the final freeze-drying. In case the peptides have lysine in the sequence the ε-amine in the lysine side chain should be protected by Dde using the Fmoc-Lys(Dde)-OH derivative in the synthesis (Gregorius and Theisen 2001, submitted). After coupling, hydrazine from an 80% solution is added to a final hydrazine concentration between 1-20% and the solution is incubated for another 30 min at room temperature, freeze dried immediately hereafter and dialysed ex-

tensively against H_2O or desalted on a gelfiltration column before the final freeze-drying. The principle is set forth in schematic form in Fig. 2.

Such immunogens have been utilised by the inventors with the short 8 amino acid C-terminal fragment of the *Borrelia burgdorferi* protein OspC as "peptide A" and a diptheria toxoid epitope (P2 or P30) as peptide B. The results of immunization studies with this antigen revealed that only the immunogen of the invention including the OspC fragment *and* a foreign diptheria epitope matching the MHC haplotype of the vaccinated mice were capable of inducing antibodies reactive with OspC in these mice. In contrast, a molecule containing only the OspC peptide was unable to induce antibody production and the same was true for a mixture of 2 immunogens where one contained the OspC and the other the epitope. It is therefore concluded that the inclusion in the same polyhydroxypolymer carrier is superior, if not essential, in order to induce antibody production against a short peptide hapten as OspC.

The above referenced experiment with the C-terminal OspC fragment has also demonstrated that coupling of peptides to TAD provides for an immunogen that is capable of triggering T_H lymphocytes that provide specific T-cell help. This means that the immunogen is 1) capable of being taken up by APCs and 2) that the APCs are subsequently capable of processing the immunogen so as to present the T_H epitopes in an MHC Class II context to T_H lymphocytes. To the best of the present inventors' beliefs, the capacity of a polyhydroxypolymer to accomplish this effect has never been demonstrated previously.

EXAMPLE 3

Vaccination and efficacy determination

Vaccinations

The immunogen of the invention is injected into a suitable animal species such as mouse, rat, guinea pig, rabbit, or monkey.

The immunogens can be mixed with a suitable adjuvant such as for example Freund's Adjuvant, ISA-51, aluminum-based adjuvants (aluminium phosphate or aluminium hydroxide, e.g. from Danfoss), Calcium Phosphate, QS21 (Antigenics), MF59 (Chiron Corp.), and Ribi (Glaxo SmithKline). Protein vaccines are usually administered 3-5 times, for example at weeks 0, 3, 6, 9, 12.

Antibody titer determination

Sera from vaccinated animals can be tested for specific antibodies by ELISA. 96-well Maxisorb plates (e.g obtained from Nunc, Life Technologies, Taastrup, Denmark) can be coated with a suitable volume (e.g. 50 ul) of either the antigen from which the 1st antigenic determinant is derived or with the antigenic determinant as such. This is done in a suitable buffer such as carbonate buffer pH 9.6 in a suitable concentration giving a final content of e.g. 1 ug/well. The plates are incubated, e.g. for 1 hour, washed in washing buffer, e.g. PBS + 0.5M NaCl + 1% Triton X-100 and then blocked for e.g. 1 hour in dilution buffer that could e.g. be washing buffer plus 1% BSA. Standards and diluted serum samples can be added in duplicate and incubated in the plates, e.g. for 30 minutes. After washing, a dilution of secondary antibody (e.g. HRP conju-

gated rabbit-anti-mouse IgG e.g. from DAKO, Glostrup, Denmark) can be added (e.g diluted 1:1000 in dilution buffer) and incubated for 30 minutes. The plates can then be washed in washing buffer, and a chromogenic substrate, e.g. OPD substrate (e.g. from Sigma-Aldrich, Vallensbæk Strand, Denmark) can be added. The reaction can be stopped with e.g 2N H_2SO_4 and the optical density be measured in e.g. a Dynex MRX ELISA plate reader at 490nm. Serum antibody concentrations can be calculated e.g. by relating the optical densities of the samples to a standard curve. In general, there are many antibodies available from commercial or academic sources - these antibodies can be used to generate a standard curve, but in the event such an antibody should not be available, it can be prepared by methods known in the art.

The ELISA can be modified for different purposes. Sandwich ELISA can be used to monitor whether the antisera contains reactivities that can displace e.g. a biotin-labeled, therapeutically relevant antibody from binding to plate-coated antigen or 1st antigenic determinant. Specialized ELISA kits can be used to determine the isotype subclass distribution in antisera etc.

Assays to monitor anti-CEA CTL activity

It can be investigated whether immunization with CTL epitope containing vaccines can induce an antigen-specific CTL response. The CTL epitopes used in the immunogen can be used to pulse APCs in e.g. typical cytotoxic T cell assays. Antigen-expressing target cells (e.g. MHC class I expressing cell lines transfected with a gene encoding the antigen of interes) can be used as targets for antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Mice will be vaccinated with the inventive

immunogens using an appropriate vaccination scheme, cf. above. As positive control, mice could be immunized with e.g. MHC class I peptides derived from the antigen sequence. After a suitable time interval, e.g. three weeks after the first immunization, splenocytes from immunized mice can be re-stimulated e.g. with mytomicin C-treated (e.g. 50 µg/ml, 20 min at 37 °C) syngeneic splenocytes loaded with the peptides. For this re-stimulation process, a suitable number (e.g. $100x10^6$) of peptide-loaded syngeneic splenocytes can be mixed with a suitable number (e.g. $60x10^6$) of splenocytes from vaccinated mice in and incubated at 37 °C for e.g. 7 days. After the restimulation process, the cytotoxic activity of the effector cells can be monitored e.g. in a chromium release assay. A suitable number (e.g. $5x10^6$) of target cells is labeled with ^{51}Chromium (e.g. 200 mCi), if necessary loaded with antigen-derived peptide, and used as targets in a ^{51}Chromium release assay. Cell lines transfected with the relevant antigen can also be used as targets for CTLs. Such CTL assays can e.g. be performed in normal wild type mice, transgenic mice and/or mice transgenic for human HLA class I molecules (e.g. HHD mice) using suitable compatible target cells and cells for restimulation.

The ability of a vaccine of the invention to induce antigen-specific CTL responses can also be measured using other assay methods including antigen-specific tetramer stainings and Elispot assays; all such methods are well-known to the person skilled in immunology.

CLAIMS

1. An immunogen which comprises

c) at least one first antigenic determinant that includes at least one B-cell epitope and/or at least one CTL epitope, and

d) at least one second antigenic determinant that includes a T helper cell epitope (T_H epitope),

wherein each of the at least one first and second antigenic determinants are coupled to a pharmaceutically acceptable activated polyhydroxypolymer carrier.

2. The immunogen according to claim 1, wherein the at least one first antigenic determinant is constituted by an amino acid sequence and/or wherein the at least one second antigenic determinant is constituted by an amino acid sequence.

3. The immunogen according to claim 1 or 2, wherein the at least first and at least second antigenic determinants are coupled to the polyhydroxypolymer carrier via a bond cleavable by a peptidase.

4. The immunogen according to any one of claims 1-3, wherein the at least first and at least second antigenic determinants are coupled to the activated polyhydroxypolymer carrier via an amide bond or a peptide bond.

5. The immunogen according to claim 4, wherein the at least first and at least second antigenic determinants each provide for the nitrogen moiety of their respective bond.

6. The immunogen according to any one of the preceding claims, wherein the polyhydroxypolymer carrier is substantially free of amino acid residues.

7. The immunogen according to claim 5 or 6, wherein the at least first and at least second antigenic determinants are bound to the activated polyhydroxypolymer via a nitrogen atom at the N-terminus of an amino acid sequence.

8. The immunogen acccording to any of one of the preceding claims wherein the polyhydroxypolymer is water soluble.

9. The immunogen acccording to any one of claims 1-7 wherein the polyhydroxypolymer is water insoluble.

10. The immunogen according to any one of the preceding claims, wherein the polyhydroxypolymer is selected from naturally occurring polyhydroxy compounds and synthetic polyhydroxy compounds.

11. The immunogen according to any one of the preceding claims, wherein the polyhydroxypolymer is a polysaccharide selected from acetan, amylopectin, gum agar-agar, agarose, alginates, gum Arabic, carregeenan, cellulose, cyclodextrins, dextran, furcellaran, galactomannan, gelatin, ghatti, glucan, glycogen, guar, karaya, konjac/A, locust bean gum, mannan, pectin, psyllium, pullulan, starch, tamarine, tragacanth, xanthan, xylan, and xyloglucan.

12. The immunogen according to claim 11, wherein the polyhydroxypolymer is dextran.

13. The immunogen according to any one claims 1-10, wherein the polyhydroxypolymer is selected from highly branched

poly(ethyleneimine)(PEI), tetrathienylene vinylene, Kevlar (long chains of poly-paraphenyl terephtalamide), Poly(urethanes), Poly(siloxanes), polydimethylsiloxane, silicone, Poly(methyl methacrylate) (PMMA), Poly(vinyl alcohol), Poly(vinyl pyrrolidone), Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate), Poly(N-vinyl pyrrolidone), Poly(vinyl alcohol), Poly(acrylic acid), Polytetrafluoroethylene (PTFE), Polyacrylamide, Poly(ethylene-co-vinyl acetate), Poly(ethylene glycol) and derivatives, Poly(methacrylic acid), Polylactides (PLA), Polyglycolides (PGA), Poly(lactide-co-glycolides) (PLGA), Polyanhydrides, and Polyorthoesters.

14. The immunogen according to any of the preceding claims, wherein the average molecular weight of the polyhydroxypolymer before activation is at least 500.

15. The immunogen according to any one of the preceding claims, wherein the polyhydroxypolymer is activated with functional groups selected from tresyl (trifluoroethylsulphonyl), maleimido, p-nitrophenyl cloroformate, and tosyl (p-toluenesulfonyl).

16. The immunogen according to any of the preceding claims that further comprises that at least one moiety is coupled to the polyhydroxypolymer, said at least one moiety being selected from the group consisting of an immune stimulating moiety or a targeting moiety.

17. The immunogen according to claim 16, wherein the at least one moiety is a peptide.

18. The immunogen according to any of the preceding claims which is capable of being taken up by an antigen presenting cell (APC).

19. The immunogen according to claim 18, which is capable of being processed by the APC whereby the APC presents the T_H epitope on its surface bound to an MHC Class II molecule.

20. The immunogen according to any one of the preceding claims wherein the at least one first and second antigenic determinants are not derived from the same naturally occurring molecule.

21. The immunogen according to claim 20, wherein the at least one and the at least second antigenic determinants do not occur naturally in the same species.

22. The immunogen according to any one of the preceding claims, wherein the T_H epitope binds strongly to at least one human MHC Class II molecule.

23. The immunogen according to claim 22, wherein the T_H epitope is a promiscuous T_H epitope in humans.

24. An immunogenic composition for raising an immune response against an antigen in a mammal, including a human being, comprising the immunogen according to any one of the preceding claims in admixture with a pharmacologically an immunologically acceptable carrier, excipient or diluent, and optionally with an adjuvant.

25. The immunogenic composition according to claim 24, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of an immune targeting adjuvant; an immune modulating adjuvant such as a toxin, a cytokine and a mycobacterial derivative; an oil formulation; a polymer; a micelle forming adjuvant; a saponin; an immunostimulating complex matrix (an ISCOM matrix); a par-

ticle; DDA; aluminium adjuvants; DNA adjuvants; γ-inulin; and an encapsulating adjuvant.

26. A method for immunizing an animal, including a human being, against an antigen of choice, the method comprising administering an effective amount of the immunogen according to any of claims 1-23 or the immunogenic composition according to claim 24 or 25 to the animal, wherein the antigen shares the at least one first antigenic determinant with the immunogen.

27. The method according to claim 26, wherein the immunogen or the immunogenic composition is administered via a route selected from a route selected from the group consisting of the parenteral route such as the intracutaneous, the subcutaneous, and the intramuscular routes; the peritoneal route; the oral route; the buccal route; the sublinqual route; the epidural route; the spinal route; the anal route; and the intracranial route.

28. The method according to claim 26 or 27, wherein the effective amount of the immunogen is between 0.5 µg and 2,000 µg.

29. The method according to any of claims 26-28, which includes at least one administration per year, such as at least 2, at least 3, at least 4, at least 6, and at least 12 administrations per year.

30. The method according to any one of claims 26-29, wherein the immunogen or the immunogenic composition is contained in a virtual lymph node (VLN) device.

1/1

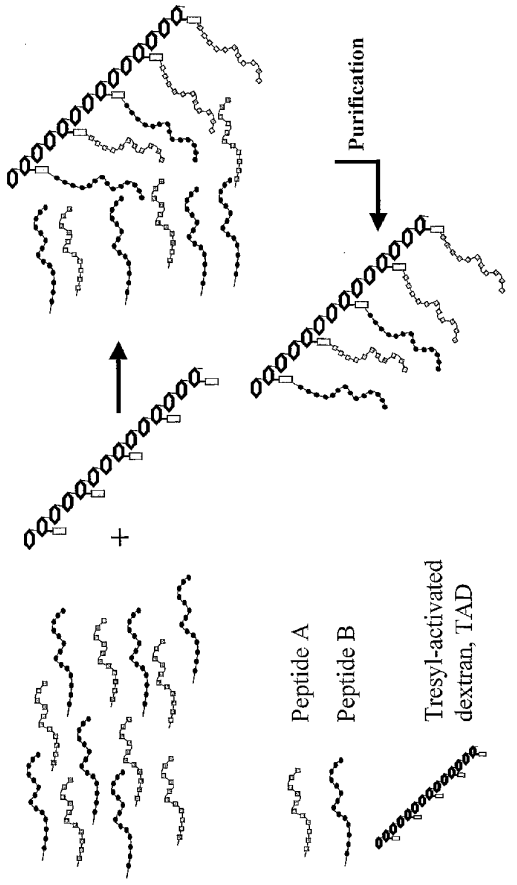

Purification
+
Peptide A
Peptide B
Tresyl-activated
dextran, TAD

Fig. 1

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmexa A/S

<120> SYNTHETIC VACCINE AGENTS

<130> P1015PC00

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 1

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 2

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial universal MHC Class II DR binding sequence

<400> 3

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066056 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/385, 47/48

(21) International Application Number: PCT/DK02/00112

(22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/DK01/00113 19 February 2001 (19.02.2001) DK
09/785,215 20 February 2001 (20.02.2001) US
PA 2001 01231 20 August 2001 (20.08.2001) DK
60/337,543 22 October 2001 (22.10.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHARMEXA A/S** [DK/DK]; Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **NIELSEN, Klaus, Gregorius** [DK/DK]; c/o M & B Biotech A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **KOEFOED, Peter** [DK/DK]; c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(74) Agent: **KOEFOED, Peter**; c/o Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
3 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/066056 A3

(54) Title: SYNTHETIC VACCINES COMPRISING POLYHYDROXYPOLYMER CARRIERS

(57) Abstract: The present invention provides for novel immunogens that are comprised of an activated polyhydroxypolymer backbone to which is attached 2 separate antigenic determinants. The 1st antigenic determinant includes a B-cell or CTL epitope and the 2nd antigenic determinant includes a T-helper epitope. In preferred embodiments, the antigenic determinants are derived from different molecules and species. Exemplary immunogens of the invention are constituted of a linear tresyl-activated dextran backbone to which is coupled B-cell or CTL epitopes of an antigen and to which is also coupled universal T-helper epitopes. Also disclosed are immunogenic compositions comprising the immunogens, methods of immunisation and a method for identification of suitable immunogens of the invention.

【手続補正書】
【提出日】平成15年4月4日(2003.4.4)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）少なくとも１つのB－細胞エピトープおよび／または少なくとも１つのCTLエピトープを含むアミノ酸配列で構成された少なくとも１つの第１抗原決定因子と
ｂ）T－ヘルパー細胞エピトープ（T_Hエピトープ）を含むアミノ酸配列で構成された少なくとも１つの第２抗原決定因子とからなり、少なくとも１つの第１と第２抗原決定因子のそれぞれが、独立してそれぞれのN－末端での窒素原子で医薬上受容な活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーとペプチダーゼで開裂しうる結合を介して結合している免疫原。
【請求項２】
少なくとも第１抗原決定因子と少なくとも第２抗原決定因子が、アミド結合またはペプチド結合を介して活性化ポリヒドロキシポリマーキャリヤーと結合している請求項１による免疫原。
【請求項３】
少なくとも第１抗原決定因子と少なくとも第２抗原決定因子が、それぞれ、それらのそれぞれの結合の窒素部位を提供する請求項２による免疫原。
【請求項４】
ポリヒドロキシポリマーキャリヤーが、実質上、アミノ酸残基がない前期請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項５】
ポリヒドロキシポリマーが水溶性である、前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項６】
ポリヒドロキシポリマーが、水不溶性である、請求項１～４の何れか１つによる免疫原。
【請求項７】
ポリヒドロキシポリマーが、天然に存在するポリヒドロキシ化合物と合成ポリヒドロキシ化合物から選択される、前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項８】
ポリヒドロキシポリマーが、アセタン、アミロペクチン、寒天ゴム、アガロース、アルギネート、アラビアゴム、カラギーナン、セルロース、サイクロデキストリン類、デキストラン、フルセララン、ガラクトマンナン、ゼラチン、ガッチィ、グルカン、グリコーゲン、グアヤ、カラヤ、コンキアク／Ａ、ローカストビーンガム、マンナン、ペクチン、プシリウム、プルラン、澱粉、タマリン、トラガント、キサンタンとキシログルカンから選択されたポリサッカライド類である、前記請求項の何れか１つに記載の免疫原。
【請求項９】
ポリヒドロキシポリマーが、デキストランである請求項８による免疫原。
【請求項１０】
ポリヒドロキシポリマーが、高度に分枝したポリ(エチレンイミン)(PEI)、テトラチエニレンビニレン、ケブラー(長鎖のポリ－パラフェニルテレフタルアミド)、ポリ(ウレタン)、ポリ(シロキサン)、ポリジメチルシロキサン、シリコン、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(２－ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(Ｎ－ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アクリル酸)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレン－コ－ビニルアセテート)、ポリ(エチレングリコール)と誘導体、ポリ(メタクリル酸)、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコリッド(PGA)、ポリ(ラクチド－コ－グリコリッド)(PLGA)、ポリ無

水物、ポリオルソエステルから選択される、請求項1～７の何れか１つによる免疫原。
【請求項１１】
活性化前記ポリヒドロキシポリマーの平均分子量が、少なくとも500である前記請求項の何れかによる免疫原。
【請求項１２】
ポリヒドロキシポリマーが、トレシル(トリフルオロエチルスルホニル)、マレイミド、ｐ－ニトロフェニルクロロホルメートとトシル(p－トルエンスルホニル)から選択された官能基で活性化される前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項１３】
少なくとも１つの部位が、免疫刺激部位または標的部位からなる群から選択され、ポリヒドロキシポリマーと結合してさらになる前記請求項の何れかによる免疫原。
【請求項１４】
少なくとも１つの部位が、ペプチドである請求項１３による免疫原。
【請求項１５】
抗原提示細胞(APC)で取込まれうる前記請求項の何れかによる免疫原。
【請求項１６】
APCで加工でき、それによりMHCクラスII分子に結合した表面でT_Hエピトープを提示する請求項１５による免疫原。
【請求項１７】
少なくとも１つの第１と第２抗原決定因子が、同一の天然に存在する分子から由来しない前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項１８】
少なくとも１つの第１と少なくとも１つの第２抗原決定因子が同一種中に天然に存在しない請求項１７による免疫原。
【請求項１９】
T_Hエピトープが、少なくとも１つのヒトMHCクラスII分子に強く結合する前記請求項の何れか１つによる免疫原。
【請求項２０】
T_Hエピトープが、ヒトの無差別T_Hエピトープである請求項１９による免疫原。
【請求項２１】
前記請求項の何れか１つによる免疫原と、薬理学的に免疫学上受容なキャリヤー、賦形剤または希釈剤と、任意にアジュバントとの混合でなる、ヒトを含む哺乳動物の抗原に対し免疫応答を惹起する免疫原性組成物。
【請求項２２】
アジュバントが、免疫標的アジュバント、トキシ、サイトキン、マイコバクテリヤ誘導体のような免疫調整アジュバント、油性製剤、ポリマー、ミセル形成アジュバント、サポニン、免疫刺激コンプレックスマトリックス（ISCOM　マトリックス）、粒子、DDA、アルミニウムアジュバント、DNAアジュバント、γ－インシュリン、カプセル化アジュバントからなる群から選択される、請求項２１による免疫原性組成物。
【請求項２３】
請求項１～２０の何れかによる免疫原または請求項２１あるいは２２による免疫原性組成物の有効量を動物に投与することからなり、抗原が免疫原と少なくとも１つの抗原決定因子と共有する、ヒトを含む動物を選択の抗原に対し免疫化する方法。
【請求項２４】
非経口ルート例えば皮下、皮内と筋肉ルート、腹腔内ルート、経口ルート、バッカルルート、舌下ルート、硬膜下ルート、脊髄ルート、膣内ルートと頭蓋内ルートからなる群から選択されたルートから選択されたルートを介して投与される請求項２３による方法。
【請求項２５】
免疫原の有効量が0.5μgと2,000μgの間である請求項２３または２４による方法。
【請求項２６】

一年当たり少なくとも１回投与、例えば一年当たり少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも６と少なくとも１２回投与を含む請求項２３～２５の何れかによる方法。

【請求項２７】

免疫原または免疫原性組成物がバーチャルリンパ節(VLN)具に含まれている請求項２３～２６の何れか１つによる方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK 02/00112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: A61K 39/385, A61K 47/48
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)

IPC7: A61K

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)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, BIOSIS, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9323076 A1 (THE JOHNS-HOPKINS UNIVERSITY), 25 November 1993 (25.11.93), see example 2, pages 14-15	1-30
X	WO 0020027 A2 (M & E BIOTECH A/S), 13 April 2000 (13.04.00), page 37, line 22 - line 27	1-30
X	WO 9315760 A1 (MOND, JAMES), 19 August 1993 (19.08.93), page 7, line 15 - page 8, line 9, claim 6	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 August 2002	03. 09. 2002
Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer ANNA BJÖRKLUND/BS Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.
PCT/DK02/00112

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see next sheet*

2. ☒ Claims Nos.: 1,24,26, all partially
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see next sheet**

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK02/00112

*
Claims 26-30 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

**

Present claims 1, 24 and 26 relate to an immunogen comprising a polyhydroxypolymer. The number of possible polyhydroxypolymers is extremely large and support within the meaning of Article 6 PCT and / or disclosure within the meaning of Article 5 PCT, is only to be found for a very small proportion of the polyhydroxypolymers claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims that appear to be supported and disclosed, namely those parts related to the examples found in the description. Therefore, the search has been limited and focused on the use of dextran as a carrier molecule in the immunogenic preparation of the invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

06/07/02

International application No.
PCT/DK 02/00112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9323076 A1	25/11/93	AU 4377793 A	13/12/93
WO 0020027 A2	13/04/00	AU 5851099 A	26/04/00
		CN 1323217 T	21/11/01
		EP 1117421 A	25/07/01
		NO 20011586 A	31/05/01
		PL 347977 A	06/05/02
		TR 200100936 T	00/00/00
		US 6020676 A	01/02/00
		US 6072268 A	06/06/00
WO 9315760 A1	19/08/93	AU 685047 B	15/01/98
		AU 3722093 A	03/09/93
		CA 2129899 A	12/08/93
		EP 0625910 A	30/11/94
		EP 0911036 A	28/04/99
		IL 104696 A	26/01/99
		JP 7506811 T	27/07/95
		NZ 249704 A	26/11/96
		NZ 286834 A	25/08/00
		US 5585100 A	17/12/96
		US 5955079 A	21/09/99
		ZA 9300945 A	31/10/94

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	ＦＩ	テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ 17/02	Ｃ０７Ｋ 17/02	

(31)優先権主張番号 60/337,543
(32)優先日 平成13年10月22日(2001.10.22)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 コーフォード，ペーター
デンマーク、ディーケー－２９７０ ホーショルム、コグレ アレ ６、シー／オー ファーメクサ エイ／エス

Ｆターム(参考) 4C076 CC07 EE59
4C085 AA03 BA01 DD73 DD74 EE01 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA86 EA31 FA33