

(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2005-526692

(P2005-526692A)

(43) 公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 C O 7 6
A 6 1 K 39/385	A 6 1 K 39/385	4 C O 8 5
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2003-520755 (P2003-520755)	(71) 出願人	502174379
(86) (22) 出願日	平成14年8月5日 (2002.8.5)		ビオミラ, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月11日 (2004.3.11)		カナダ国 アルバータ ティジイエヌ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024735		エイチ1, エドモントン, 2011-94
(87) 国際公開番号	W02003/015796		ストリート, エドモントン リサーチ パーク
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)	(74) 代理人	100083714
(31) 優先権主張番号	60/311, 850		弁理士 舟橋 榮子
(32) 優先日	平成13年8月14日 (2001.8.14)	(72) 発明者	克蘭ツ, マーク, ジェイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国 アルバータ ティ6ダブリュ
			1シー3, エドモントン, ブラックバーン
			ドライブ ウェスト 189
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 炭水化物ハプテンの免疫原共役体および凝集タンパク質キャリア

(57) 【要約】

複数の炭水化物ハプテンおよびキャリア部分のモノマー単位の凝集体（多量体）の共役体を提供する。共役体は免疫応答を顕在化させるために使用することができる。共役体は好ましくはK L Hモノマー、特に、凝集した二量体、三量体または四量体の炭水化物一置換凝集体である。凝集したS T n-K L H共役体は特に興味を起こさせるものである。本発明は、同じかまたは異なる、複数の炭水化物ハプテン部分、およびリジン含有免疫原タンパク質キャリア部分の複数のモノマー単位からなる非天然発生免疫原共役体である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

同じかまたは異なる、複数の炭水化物ハプテン部分、およびリジン含有免疫原タンパク質キャリア部分の複数のモノマー単位からなり、前記ハプテン部分が直接または間接的に、キャリア部分のモノマー単位のリジンに結合する、非天然発生免疫原共役体。

【請求項 2】

前記キャリア部分が鍵穴リンペットヘモシアニンである請求項 1 記載の共役体。

【請求項 3】

800 kD 以上の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 4】

1, 200 kD 以上の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 5】

1, 600 kD 以上の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 6】

少なくとも 1, 000 kD の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 7】

少なくとも 1, 500 kD の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 8】

少なくとも 2, 000 kD の見かけの分子量をもつ請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 9】

5, 000 kD 以上の見かけの分子量をもたない請求項 1 - 8 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 10】

2, 500 kD 以上の見かけの分子量をもたない請求項 1 - 8 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 11】

免疫原力価が前記ハプテン部分からなる参照共役体のその少なくとも 200% であり、前記キャリア部分の単一モノマー単位がキャリアのモノマー単位に対し同じ予想された数のハプテン部分をもつ請求項 1 - 10 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 12】

キャリアのモノマー単位に対し予想された数のハプテン部分が少なくとも 10 である請求項 1 - 12 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 13】

1 またはそれ以上の前記炭水化物ハプテン部分がシアリル Tn エピトープである請求項 1 - 12 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 14】

共役体のタンパク質含量の割合としてシアル酸の量として測定すると NANA 含量が 3% (weight/weight) を超える請求項 13 記載の共役体。

【請求項 15】

NANA 含量が少なくとも 4% である請求項 13 記載の共役体。

【請求項 16】

NANA 含量が少なくとも 5% である請求項 13 記載の共役体。

【請求項 17】

NANA 含量が少なくとも 6% である請求項 13 記載の共役体。

【請求項 18】

NANA 含量が少なくとも 7% である請求項 13 記載の共役体。

【請求項 19】

各炭水化物ハプテン部分がリンカーによってキャリア部分のモノマー単位に結合する請求項 1 - 18 のいずれか 1 項記載の共役体。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

リンカーが12以下の水素とは異なる原子からなる脂肪族基である請求項19記載の共役体。

【請求項21】

リンカーがアルキル基である請求項20記載の共役体。

【請求項22】

リンカーがハプテン部分の酸素をアミノ窒素に結合する請求項19-21のいずれか1項記載の共役体。

【請求項23】

リンカーが単一ハプテン部分を前記モノマー単位の単一アタッチメント部位に結合する請求項19-22のいずれか1項記載の共役体。

【請求項24】

リンカーが複数のハプテン部分を前記モノマー単位の単一アタッチメント部位に結合する請求項19-22のいずれか1項記載の共役体。

【請求項25】

前記炭水化物ハプテン部分の少なくとも1が天然にK L Hと結合していない請求項1-24のいずれか1項記載の共役体。

【請求項26】

共役体分子からなる組成物であって、前記共役体分子が前記炭水化物ハプテン部分からなる前記組成物において全共役体分子の少なくとも50重量%である請求項1-25のいずれか1項記載の組成物。

【請求項27】

共役体分子からなる組成物であって、前記共役体分子が前記炭水化物ハプテン部分からなる前記組成物において全共役体分子の少なくとも75重量%である請求項1-25のいずれか1項記載の組成物。

【請求項28】

共役体分子からなる組成物であって、前記共役体分子が前記炭水化物ハプテン部分からなる前記組成物において全共役体分子の少なくとも90重量%である請求項1-25のいずれか1項記載の組成物。

【請求項29】

共役体分子からなる組成物であって、前記共役体分子が前記炭水化物ハプテン部分からなる前記組成物において全共役体分子の少なくとも95重量%である請求項1-25のいずれか1項記載の組成物。

【請求項30】

1またはそれ以上の試薬を反応させる共役工程からなる請求項1-25のいずれか1項記載の共役体を調製する方法であって、前記共役体を得るように、各試薬は前記炭水化物ハプテン部分の少なくとも1からなり、前記モノマー単位、または前記単位の複数からなる予め凝集したキャリア部分を有する方法。

【請求項31】

前記試薬が前記炭水化物ハプテンのアルデヒド誘導体である請求項30記載の方法。

【請求項32】

前記アルデヒド誘導体がオゾナイドを得るためにクロチル誘導体をオゾン化し、アルデヒド誘導体を形成するようにオゾン化物を還元する請求項31記載の方法。

【請求項33】

アセトアルデヒドをハプテンアルデヒドの製造の副産物として得る請求項32記載の方法。

【請求項34】

共役工程において、反応温度が39℃ないし45℃であり、反応時間が17時間ないし25時間である請求項30-33のいずれか1項記載の方法。

【請求項35】

共役工程において、反応温度が26℃以上である請求項30-33のいずれか1項記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 36】

共役工程において、反応温度が少なくとも 30℃である請求項 30-33 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 37】

共役工程において、反応温度が少なくとも 35℃である請求項 30-33 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 38】

共役工程において、反応温度が少なくとも 39℃である請求項 30-33 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 39】

共役工程において、反応温度が 45℃以下である請求項 30-38 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 40】

共役工程において、反応温度が 43℃以下である請求項 30-38 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 41】

共役工程において、反応時間が 6 時間以上である請求項 30-40 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 42】

共役工程において、反応時間が少なくとも 12 時間である請求項 30-40 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 43】

共役工程において、反応時間が少なくとも 17 時間である請求項 30-40 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 44】

共役工程において、反応時間が 40 時間以下である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 45】

共役工程において、反応時間が 30 時間以下である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 46】

共役工程において、反応時間が 25 時間以下である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 47】

ハブテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも 0.6 : 1 である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 48】

ハブテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも 1 : 1 である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 49】

ハブテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも 1.5 : 1 である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 50】

ハブテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも 1.75 : 1 である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 51】

ハブテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも 2 : 1 である請求項 30-43 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 52】

50

ハプテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が4 : 1以上ではない請求項30-51のいずれか1項記載の方法。

【請求項53】

ハプテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも3.25 : 1である請求項30-51のいずれか1項記載の方法。

【請求項54】

ハプテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が少なくとも2.75 : 1である請求項30-51のいずれか1項記載の方法。

【請求項55】

ハプテンーアルデヒド対キャリアモノマーの重量比が約2.25 : 1である請求項30-51のいずれか1項記載の方法。 10

【請求項56】

前記共役工程がシッフ塩基中間体の製造からなり、中間体は還元剤で還元する請求項30-51のいずれか1項記載の方法。

【請求項57】

還元剤が水素化シアノホウ素ナトリウムである請求項56記載の方法。

【請求項58】

還元剤を最終濃度25-125 mMで用いる請求項57記載の方法。

【請求項59】

還元剤を最終濃度45-75 mMで用いる請求項57記載の方法。 20

【請求項60】

対象に炭水化物ハプテンー特異的免疫応答を誘発させる方法が、請求項1ないし25のいずれか1項記載の共役体または請求項26-29のいずれか1項記載の組成物の免疫学的に有効量を対象に投与することからなる方法。

【請求項61】

体液性免疫応答を誘発する請求項59記載の方法。

【請求項62】

細胞性免疫応答を誘発する請求項59記載の方法。

【請求項63】

炭水化物ハプテンが腫瘍ー結合である請求項59記載の方法。 30

【請求項64】

前記共役体または組成物が病気に対し保護される請求項60-63のいずれか1項記載の方法。

【請求項65】

病気が癌である請求項64記載の方法。

【請求項66】

病気に対して対象を保護するための組成物の製造において請求項1-25のいずれか1項記載の共役体または請求項26-28のいずれか1項記載の組成物を使用する方法。

【請求項67】

病気が癌である請求項66記載の方法。 40

【請求項68】

共役体がキャリア部分の少なくとも3つのモノマー単位からなる請求項1または2記載の共役体。

【請求項69】

共役体がキャリア部分の少なくとも4つのモノマー単位からなる請求項1または2記載の共役体。

【請求項70】

請求項68の少なくとも1の共役体からなる請求項26記載の組成物。

【請求項71】

請求項69の少なくとも1の共役体からなる請求項26記載の組成物。 50

【請求項 7 2】

キャリヤ部分のモノマー単位がヘモシアニンのモノマー単位である請求項 1 記載の共役体。

【請求項 7 3】

ヘモシアニンが節足動物のヘモシアニンである請求項 7 2 記載の共役体。

【請求項 7 4】

ヘモシアニンが軟体動物のヘモシアニンである請求項 7 2 記載の共役体。

【請求項 7 5】

ヘモシアニンが腹足類のヘモシアニンである請求項 7 2 記載の共役体。

【請求項 7 6】

ヘモシアニンが Fissurellidae ヘモシアニンである請求項 7 2 記載の共役体。

【請求項 7 7】

共役体のキャリヤ部分が K L H のモノマー単位のデカマー、ジデカマー、またはマルチデカマーではない請求項 2 記載の共役体。

【請求項 7 8】

共役体のキャリヤ部分が K L H のモノマー単位のダイマーではない請求項 2 または 7 7 記載の共役体。

【請求項 7 9】

共役体のキャリヤ部分が K L H のモノマー単位のダイマー、トリマー、テトラマーまたはペンタマーである請求項 2 記載の共役体。

【請求項 8 0】

少なくとも 1 の炭水化物ハプテン部分が T F 二糖類からなる請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 8 1】

少なくとも 1 の炭水化物ハプテン部分が T n からなる請求項 1 または 2 記載の共役体。

【請求項 8 2】

少なくとも 1 の炭水化物ハプテン部分がシアリル化炭水化物である請求項 1 または 2 記載の共役体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願はその全体を参考文献に組み込む 2001 年 8 月 14 日出願の先行仮出願 60 / 311, 850 の非仮出願である。本発明は免疫応答が炭水化物エピトープに誘発される免疫治療に関する。これは炭水化物ハプテンの免疫原共役体、および凝集した（マルチマー）タンパク質キャリヤの用途である。鍵穴リンペットヘモシアニン（K L H）マルチマーへの S T n の共役体は特に興味深いものである。

【背景技術】

【0002】

免疫システム

感染性の微生物、毒素、ビールス、または他の外来マクロ分子に対し防護するための脊椎動物の能力は免疫として引用される。その技術は天然、および捕捉されたまたは特異的免疫の間で区別する（非特許文献 1）。自然の免疫は防御機構からなり、微生物または外来マクロ分子に曝される前は活性であり、このような暴露によって高まることはなく、身体には外来の大抵の物質と区別がない。自然の免疫のエフェクターは皮膚または粘液性膜のような肉体バリヤー、マクロファージや好中球のような食細胞、自然のキラー細胞と名づけたリンパ球のクラス、および補体系である。補体は血清タンパク複合体であり、一定のバクテリアおよび特異的補体—固定抗体によって感作された他の細胞に破壊的であり；その活性はタンパク分解性の開裂で生じる一連の相互作用によって影響され、1 または少なくとも 2 の他の経路に従うことができる（非特許文献 2、3）。

【0003】

10

20

30

40

50

取得しまたは特異的免疫は外来物質に暴露することによって誘発または刺激される防衛機構からなる。

脊椎動物では、自然または特異的免疫の機構は宿主防衛系内に協同し、免疫機構は外来の侵入者を排除する。微生物、癌細胞、寄生虫およびビールス感染細胞のほかに、免疫系はまた遺伝的に異なるそれぞれの同じ種（同種移殖）からまたは異なる種（異種移殖）から対象に移殖された細胞または組織を認識し取り除く。

【0004】

特異的免疫の機構が侵略する微生物、癌細胞に対して防御に従事する場合は免疫応答を終わらせる。脊椎動物は、体液性および細胞性の2つの基本的免疫応答をもつ。体液性免疫はBリンパ球によって与えられ、増殖および分化後、血液およびリンパ液で循環する抗体を生む。細胞性免疫はリンパ系のT細胞によって与えられる。細胞免疫応答は特に菌類、寄生虫、細胞内ビールス感染症、癌細胞および外来物質に有効であるが、体液性応答は本来バクテリアとビールス性感染の細胞外相に対して防御する。

10

【0005】

「抗原」は外来物質であり、抗体またはT細胞受容体によって（特に結合）認識され、免疫応答を誘発することができるかどうかは問わない。特異的免疫を誘発する外来物質は「免疫抗原」、または「免疫原」と呼ばれる。「ハプテン」はそれ自体によって、（ハプテンの複数の分子の共役体、またはマクロ分子のキャリアへのハプテンの共役体はそうするが）免疫応答を誘発することができない抗原である。本出願は免疫応答を誘発することに関するので、「抗原」の語は他に述べなければ抗原を免疫化することを指す。

20

【0006】

腫瘍結合炭水化物抗原決定因子。

臨床で重要な多くの抗原は炭水化物決定因子を運ぶ。そのような抗原の1の群は腫瘍-結合ムチンからなる（非特許文献4）。

一般にムチンは唾液、胃液等に見られる糖タンパク質であり、粘性溶液を形成し身体の外表面および内面で滑剤または保護剤として作用する。ムチンは一般に高分子量（多くは $>1,000,000$ ダルトン）であり広範囲にグリコシル化されている。ムチンのグリカン鎖はO-結合であり（セリンまたはスレオニン残基に対して）糖タンパク質の分子量の80%以上の量である。ムチンは管の上皮細胞によっておよび同じ起源の腫瘍によって生成し、完全な膜タンパク質として細胞-結合する（非特許文献5、6）。

30

【0007】

癌性組織は正常のカウンター部分よりもグリコシル化が比較的少ないことが知られている異常なムチンを生成する（非特許文献7）。癌細胞でのタンパク質グリコシル化組織の機能的変更により、腫瘍-結合ムチンは一般に短い不完全グリカンを含む。したがって、人乳脂肪小球を結合した正常のムチンは、四糖グリカン、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{glcNAc}1-6(\text{Gal}\beta 1-3)\text{galNAc}-\alpha$ およびそのシアリル化類似体（Hull, et al.）から主としてなるが、腫瘍-結合Tnハプテンは単糖残基、 $\alpha-2$ -アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル、および二糖 $\beta-D$ -ガラクトピラノシル- $(1-3)\alpha$ -アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシルのT-ハプテンのみからなる。腫瘍-結合ムチンの他のハプテン、例えばシアリル-Tnおよびシアリル- $(2-6)$ Tハプテンは、短TnおよびTグリカンへの末端シアリル残基の結合から生じる（非特許文献8、9、10、11）。

40

【0008】

TおよびTn抗原（非特許文献12）は大抵の一次癌細胞およびそれらの転移部（全ヒト癌の $>90\%$ ）の外表面膜に免疫反応形に見出される。癌マーカーとしてTおよびTnは早くに免疫組織化学的検出および若干の癌の侵襲性の予後判定（Springer）を可能にする。腫瘍細胞でのシアリル-Tnハプテンの存在は不利な予後のパラメーターとして同定された（非特許文献12、13）。複数のタイプの腫瘍-結合炭水化物抗原は通常のヒト癌に大きく発現する。Tn、TおよびSTnハプテンはムチン-タイプ（O-リンク）炭水化物として生じる。さらに、GM2およびGD3のような癌-結合グリコスフィンゴリピ

50

ドは種々の人癌に発現する。

【0009】

癌結合ムチンによって示される変更されたグリカン決定因子は患者の免疫系によって非自己または外来として認識される (Springer)。実際に、大抵の患者では、Tハプテンに強い自己免疫性の応答が見られる。これらの応答は、先に可能であったよりも早くに、容易に測定でき、さらに大きい感受性と特異性をもつ癌の検出を可能にする。最後に、TおよびT_nの発現の範囲は癌の分化の程度と相関している。(Springer)。

【0010】

炭水化物タンパク質共役体。

腫瘍結合抗原は癌の多くのタイプの診断およびモニターに有用で、また治療にも有用であるから、多くの研究者は炭水化物ハプテンのグリコシドおよびそれらのシアリル化類似体を合成し、これらグリコシドをタンパク質または合成ペプチドキャリアにハプテンを共役するために用いた。グリコシドは一般にグリコン部分を含み、そこから高い反応性の機能性を各ハプテングリコシドの糖タンパク質を変更することなく生成することができる。

「活性化」ハプテングリコシドは次にタンパク質または合成ペプチドキャリアのアミノ基と反応し、シッフ塩基結合のアミドを形成する。シッフ塩基群はホウ化水素で還元して二次アミン結合を形成して安定化できる；全体のカップリング工程を次に還元アミノ化と呼ぶ。(非特許文献15)。

【0011】

これら共役体の例 (特許文献1-7参照)。

ヤングは炭水化物ハプテンのタンパク質キャリアとの共役体の形成方法を開示している (特許文献8)。まず、アルファオレフィングリコシドをクロチルアルコールのようなオレフィンアルコールのフィッシャータイプグリコシル化によって調製する。アルファオレフィングリコシドをオゾン分解しハプテンアルデヒド (および副生成物として第二アルデヒド) を生成する。副生成物は好ましくはアセトアルデヒドまたは高級アルデヒドであり、ホルムアルデヒドではない。

ハプテンアルデヒドは次いでK L Hのようなキャリアタンパク質に共役させる。

【0012】

S T N-K L H共役体

バイオミラで開発されたTheratope (登録商標) ワクチンはK L Hに共役した合成S T nハプテンからなり、アジュバントとエマルジョンで与えられる。相Iおよび相II臨床試験で用いられるワクチンはハプテン代用レベルであり、約2.5ないし3重量%のシアリ酸 (N A N A) を含む。相II臨床試験は進行中であるが、共役方法論は約7%のN A N A含量を達成できるように改良された。高い共役生成物はマウスで抗-S T n抗体のかなり高い力価、そして小さい架橋研究ではヒトに非常に高い抗-S T n

I g G力価を誘発した。高い抗-S T n I g G力価は相II臨床試験では生存の改良と相関関係があることが見受けられたので、大きい相III臨床試験は約7%のN A N A含量のS T n-K L H共役体を用いて開始した。

【0013】

エピトープクラスター

炭水化物エピトープクラスターは文献に報告されているが、これらの重要性はまだ明確に定義されていない (非特許文献16、Clustred STn、非特許文献17)。同様に、Oグリコシル化部位のクラスターが報告された (非特許文献18)。

【0014】

我々はモノマーまたはクラスターと反応させたクラスターその他に特異的であったM a bを用いて、種々のS T n-K L H処方「S T nクラスター」含量を調べた。全部のワクチン調製品はクラスター含量を検出できるが、多分ハプテンよりもはるかに大きいM a b sの立体障害のためハプテン検出の上限は低い。改良された有効性はクラスター密度が測定には大きすぎるのでさらに高い置換レベルで空間的配列の生成に特異的に与えることができなかった。これら研究の過程で、我々は後述のようにプロセス変量で一定の変化をさ

10

20

30

40

50

せることによって有効性を少し改良してワクチンのNANA含量を7%まで増加させることができる。これは後記のシステムでの観察された有効性の改良が単にハプテン「クラスター」の形成にあるとすることはできない。

参照：Sloan-Kettering, W098/46246；Sloan-Kettering, W097/34921；

Sloan-Kettering,

W099/15201（フコシルGM1-KLH 共役体；KLHの分子量は 5×10^6 ）；

Kjeldsen, USP 5,660,834；Zhang, et al., Cancer Res. 55:3364-8（1995年8月1日）；

Swiss

Prot P04253；Swiss-Prot P80888；Swiss-Prot P02768；Kjeldsen, USP5,747,048。

次の米国特許は「クラスター形成したエピトープ」の語を用いる。

10

6,376,463、6,258,937、6,180,371、5,929,220、5,888,974、5,859,204、5,744,466。

次の米国特許は「クラスター形成した」および「炭水化物エピトープ」列挙した。

6,365,124、6,287,574、6,013,779、5,965,544、5,268,364、4,837,306。

【特許文献1】米国特許第4,866,045号明細書

【特許文献2】米国特許第4,935,503号明細書

【特許文献3】米国特許第4,42,284号明細書

【特許文献4】米国特許第4,563,445号明細書

【特許文献5】米国特許第5,055,562号明細書

【特許文献6】米国特許第4,356,170号明細書

【特許文献7】米国特許第5,034,516号明細書

20

【特許文献8】米国特許第6,013,779号明細書

【非特許文献1】Abbas, et al., Cellular and Molecular Immunology, W. B.Saunders Company, 1991。

【非特許文献2】Hood et al., Immunology, 2nd Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1984。

【非特許文献3】Illustrated Stedman's Medical Dictionary, 24th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1982。

【非特許文献4】Roussel, et al., Biochimie 70, 1471, 1988。

【非特許文献5】Burchell, et al., Cancer Res., 47, 5476, 1987。

【非特許文献6】Jerome, et al., Cancer Res., 51, 2908, 1991。

30

【非特許文献7】Hull, et al., Cancer Commun., 1, 261, 1989。

【非特許文献8】Hanisch, et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 370, 21, 1989。

【非特許文献9】Hakormori, Adv.Cancer Res., 52:257, 1989。

【非特許文献10】Tornben, et al., Int. J. Cancer, 45, 666, 1990。

【非特許文献11】Samuel, et al., Cancer Res., 50, 4801, 1990。

【非特許文献12】Springer, Science, 224, 1198, 1984。

【非特許文献13】Itzkowitz, et al., Cancer, 66, 1960, 1990。

【非特許文献14】Yonezawa, et al., Am. J. Clin. Pathol., 98, 167, 1992。

【非特許文献15】Gray, Arch. Biochem. Biophys., 163, 426, 1974。

【非特許文献16】Reddish, et al., Glycoconjugate J., 14:549-60(1997)。

40

【非特許文献17】Ragupathi, et al., Cancer Immunol. Immunother. 48:1-8 (1999)。

【非特許文献18】Gendler, et al., J. Biol. Chem., 263:12820(1988)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は凝集した多量体タンパク質キャリアへの複数の炭水化物ハプテンの免疫原共役に関する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

凝集は多量体物質を形成するためのタンパク質キャリアの各モノマーの相後作用の結果

50

である。相互作用は結合によって、および／または（炭水化物ハプテンの結合前、最中または後の）各タンパク質鎖のもつれによる。結合がオリゴマー形成に貢献するならば、それは共有結合または非共有結合である。

好ましくは、凝集は多少ともタンパク質への炭水化物の結合で生じる。

これら調製品の免疫原効力は高いハプテン置換比の組合せ、および多量体物質を形成するためのタンパク質キャリアの凝集に貢献する。

好ましくは多量体物質は二量体、三量体、四量体、および／またはタンパク質キャリアのモノマー単位の五量体である。

【発明の効果】

【0017】

10

本発明によれば、複数の炭水化物ハプテンおよびキャリア部分のモノマー単位の凝集体（多量体）の共役体を提供する。共役体は免疫応答を顕在化させるために使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

炭水化物ハプテン；エピトープ

本発明の炭水化物ハプテンは炭水化物エピトープからなり（好ましくはこれに等しい）炭水化物である。

「炭水化物」の語は単糖類、オリゴ糖および多糖類、ならびにカルボニル基の還元（アルジトール）によって、1またはそれ以上の末端基のカルボン酸への酸化によって、または水素原子、アミノ基、チオール基、または類似のヘテロ原子基による1またはそれ以上の水酸基の置換によって単糖類から誘導される物質を含む。また、前記の誘導体を含む。通常、多糖類は一般にそれ自体の状態で免疫原であるために十分に大きいので、炭水化物ハプテンは多糖類ではない。オリゴ糖と多糖類との間の境界は固定していないが、我々は2ないし20の単糖類（糖）単位からなるものとしてオリゴ糖を定義する。

20

ハプテンは（他のそのような単位へのグリコシド結合なしで）単糖類またはオリゴ糖である。オリゴ糖ならば、好ましくは10以下の糖単位である。

単糖類は3またはそれ以上の炭素原子をもつポリヒドロキシアルデヒド（ $H[CHOH]_n-CHO$ ）またはポリヒドロキシケトン（ $H-[CHOH]_n-CO-[CHOH]_m-H$ ）である。

各単糖類単位はアルドース（アルデヒドカルボニルまたは潜在的アルデヒドカルボニル基をもつ）またはケトース（ケトンカルボニルまたは潜在的ケトンカルボニル基をもつ）である。さらに単糖類は1以上のカルボニル基（または潜在的カルボニル基）をもち、したがってジアルドース、ジケトース、またはアルドケトースである。「潜在的アルデヒドカルボニル基」の語は環閉鎖によって生じるヘミアセタール基、およびケトン対応物（ヘミケタール構造）を指す。

30

単糖類単位は環状ヘミアセタールまたはヘミケタールである。3員環をもつ環状形態はオキシロース、4員環はオキシトース、5員環はフラノース、6員環はピラノース、7員環はセプタノース、8員環はオクタビールスである。環閉鎖の位置の位置づけは変わる。

単糖類単位はさらにデオキシ糖（水素によって置換されたアルコール性ヒドロキシ基、アミノ糖（アミノ基によって置換されたアルコール性ヒドロキシ基）、 $C=S$ によって置換されたチオ糖（チオールまたは、 $C=$ によって置換されたアルコール性ヒドロキシ基）、または硫黄によって置換された環状形態の環酸素）、セレン糖、テルル糖、置換された単糖類、不飽和単糖類、アザ糖（窒素によって置換された環炭素）、アミノ糖（窒素によって置換された環酸素）、アルジトール（ $CHOH$ 基によって置換されたカルボニル基）、アルドン酸（カルボニル基によって置換されたアルデヒド基）、ケトアルドン酸、ウロン酸、アルダル酸等である。

40

またN-アセチルノイラミン酸（NANA）として知られているシアル酸は、特に興味深い。それは幾つかの腫瘍結合炭水化物エピトープの末端糖である。

腫瘍結合炭水化物エピトープは特に興味深い。

種々の炭水化物は、特に腫瘍を検出し治療する際に用いるため本発明により共役できる。

50

T_n、T、シアリル T_n およびシアリル (2→6) T ハプテンは特に好ましい。

特に、腫瘍を検出し治療するため、通常のヒト癌で高く発現される 3 種の腫瘍結合炭水化物エピトープはアミノ化した化合物に共役される。これらは特にラクトシリーズタイプ 1 と 2 の鎖、癌結合ガングリオ鎖、および中性スフィンゴ糖脂質を含む。

ラクトシリーズタイプ 1 と 2 の鎖の例は次の通りである。

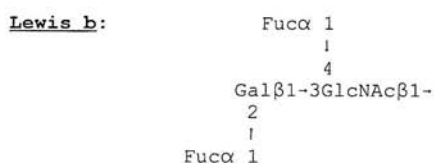
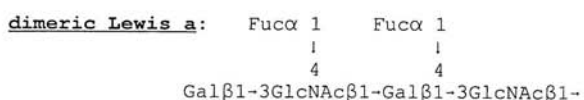
【0019】

【化1】

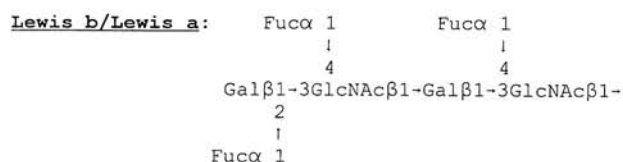
ラクトシリーズタイプ A 及びタイプ 2 の鎖



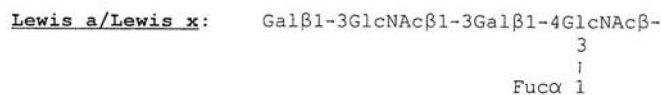
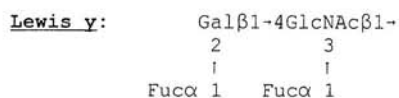
10



20



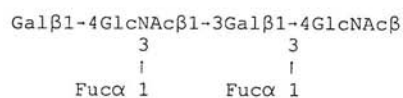
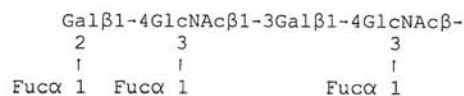
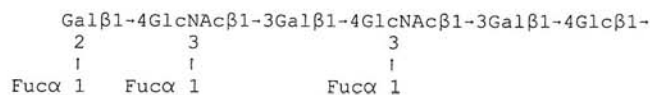
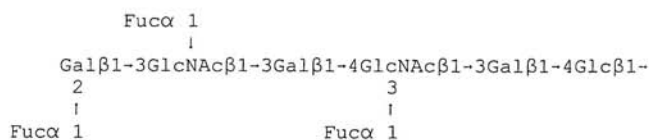
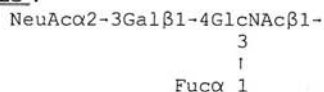
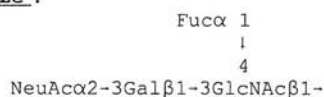
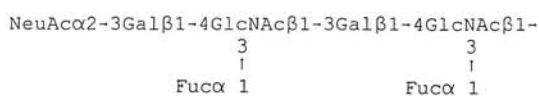
30



【0020】

40

【化 2】

Lewis x/Lewis x (dimeric Le^x):Lewis y/Lewis x:Trifucosyl Lewis y:Trifucosyl Lewis b:Sialosyl Le^x:Sialosyl Le^a:Sialosyl Dimeric Le^x:

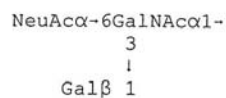
10

20

30

【 0 0 2 1 】

【化 3】

Tn: GalNAc α 1-Sialosyl-Tn: NeuAc α -6GalNAc α 1-Sialosyl-T: NeuAc α -6(Gal β 1-3)GalNAc α 1-T: Gal β 1-3GalNAc α 1-

40

本発明によるアミノ化した化合物に共役できる癌結合ガングリオ鎖の例は次の通りである。

【 0 0 2 2 】

【化 4】

癌結合ガングリオ鎖

GM3: NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-GD3: NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-

GM2: GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-
 3
 |
 NeuAc α 2

GM4: NeuAc α 2-3Gal β 1-

GD2: GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-
 3
 |
 NeuAc α 2-8NeuAc α 2

GM1: Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-
 3
 |
 NeuAc α 2

GD-1a: NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-
 3
 |
 NeuAc α 2

GD-1b: Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-
 3
 |
 NeuAc α 2-8NeuAc α 2

10

20

上記の他に、中性スフィンゴ糖脂質はまた本発明によるアミノ化した化合物に共役できる。
 。

30

【 0 0 2 3 】

【化 5】

選択された中性 スフィンゴ糖脂質

Globotriose:	Gal α -4Gal β 1-4Glc β 1-	
Globotetraose:	GalNAc β 1-3Gal α -4Gal β 1-4Glc β 1-	
Globopentaose:	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α -4Gal β 1-4Glc β 1-	
Isoglobotriose:	Gal α -3Gal β 1-4Glc β 1-	10
Isoglobotetraose:	GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-	
Mucotriose:	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-	
Mucotetraose:	Gal β 1-3Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-	
Lactotriose:	GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-	
Lactotetraose:	GalNAc β 1-3GalNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-	
Neolactotetraose:	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-	20
Gangliotriose:	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-	
Gangliotetraose:	Gal β 1-GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-	
Galabiose:	Gal α -4Gal β 1-	
9-0-Acetyl-GD3:	9-0-Ac-NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-	

【0024】

30

タンパク質キャリア

タンパク質キャリアはモノマー形態では、少なくとも10kDの分子量の多量体であり、1またはそれ以上のリジン残基を含む。好ましくは、(モルで)少なくとも3%のリジンである。

好適なタンパク質キャリアは節足動物または軟体動物ヘモシアニンのようなヘモシアニンである。特にFissurellidae (鍵穴カサガイ) の腹足類のヘモシアニン、および特に鍵穴カサガイ (Magathura crenulata) のヘモシアニンは最も好ましい。

ヘモシアニンは多くの節足動物および軟体動物の酸素輸送タンパク質である。鍵穴カサガイのヘモシアニンは、天然で、多量体であり、全MWが約8,000kDaである。モノマーは約400kDaである。2つの免疫学的に生理学的に明確なイソ型、KLH1とKLH2からなる。両者は円筒状20量体として血リンパに存在する。各イソ型モノマーは8官能基単位 (Fus) を含み、N-ないしC-末端から「a」ないし「h」と呼ぶ。KLH1のFUs「b」ないし「g」は全部で2141a.a.であり、KLH2のFUs「b」ないし「h」は全部で2473a.a.である (参照、Altenheim et al., "Sequence of Keyhole Limpet Hemocyanin", Abstract, Swerdlow, Comp. Biochem. Biophys. 113B: 537-48 (1986); Stoeva, Biochem. Biophys. Acta 1435: 94-109 (1999); Harris and Markl, Micron., 30: 597-623 (1999). Swerdlow はKLH-Aが449kDaでKLH-Bが392kDaであることを報告している。SohnngenらはEur. J. Biochem., 248: 602-14 (1997) にKLH1が400kDaでありKLH2が345kDaであることを報告している。Ebertは米国特許5,855,919に400kDaの値を用いている。

50

好ましくは、本発明の共役体において、キャリア部分のモノマー単位がKLHモノマーであるならば、共役体はK L Hモノマーの置換した十量体、二十量体または多十量体ではない。

天然K L Hは銅が豊富であるが、銅は還元アミノ化の間になくなる。約4%の分子量の炭水化物含量でK L Hはグリコシル化される。上記Harrisらを参照。

好ましくは、K L Hモノマーを用いる場合、少なくとも1の炭水化物ハプテン部分はK L Hと自然結合したものではない。好ましくは、炭水化物ハプテン部分の少なくとも1の成分の糖はK L Hと自然結合したものではない。

【0025】

凝集度

本発明の好適な免疫原は凝集した炭水化物ハプテン置換したK L Hである。各モノマー単位はK L H 1、K L H 2または幾つかの他のK L Hモノマーである。

ここに用いられるような「置換したK L Hモノマー」の語は自然に結合したものに加えて複数の炭水化物ハプテンと置換したK L Hを意味する。これらは存在する自然の炭水化物鎖の複製であるが、さらに通常はK L Hと自然に結合しないハプテンを含む。K L Hは、必要ではないが、脱グリコシルして自然の炭水化物をハプテン置換の前に特異的にまたは非特異的に若干または全部除くことができる。

置換したK L Hモノマーの分子量は置換していないK L Hのそれよりも大きい。後者が400kDa（文献値は345ないし449kDaの範囲である）であるならば、置換したK L Hはさらに大きい分子量である。増加は各ハプテン部分の分子量に依存し（リンカーを含む）ハプテン部分対モノマーの数に依存する。

置換していないK L Hモノマーが400kDaであるならば、置換した二量体は必ず分子量が800kDaよりも大きい。したがって、置換した凝集体は好ましくは見かけの分子量が800kDa以上、さらに好ましくは1,200kDa以上、またさらに好ましくは1,600kDa以上である。

好適な炭水化物ハプテン置換モノマー形態のK L Hは分子量が約500kDaであり；追加の炭水化物（およびリンカー）なしで、約400kDaである。したがって、ハプテン置換は置換していないK L Hモノマーに対して、分子量を25重量%、またはそれ以上増加することができる。また好ましくは置換した凝集体は見かけ分子量が少なくとも1,000kDaであり、さらに好ましくは少なくとも1,500kDaであり、またさらに好ましくは少なくとも2,000kDaである。

調製品はn-量体、例えば、モノマー、二量体、三量体、四量体、等の不均一な混合物からなり、見かけの分子量は実際にn-量体の各サイズクラスの見かけの分子量の平均重量である。

調製品は理論的には分子量によって分けられn-量体の各サイズクラスに貢献できる画分を決定できる。好ましくは、モノマーは調製品の50重量%以下であり、さらに好ましくは25%以下であり、またさらに好ましくは10%以下、最も好ましくは5%以下である。調製品はまた優勢なモノマー画分を捨ててこれにより多量体を豊富にする目的で分画することもできる。

凝集度の最大リミットは溶液から沈殿するほど凝集が大きくなることである。しかし、見かけ分子量は好ましくは5,000kDa以下（置換した十量体に等しい）、さらに好ましくは2,500kDa以下（置換した五量体に等しい）である。

見かけの分子量は好ましくはレーザー光散乱によって決定される。Wyatt, Anal. Chim. Acta, 272: 1-40 ((1993)参照。サイズ排除（分子篩）クロマトグラフィによって、以下に示すように予測される。一般に、RRT値は0.97以下が望ましい。

図12はShodexのサイズ排除クロマトグラフィによって相対的保持時間（RRT%）に対する分子量（kDa）の回帰プロットを示す。

回帰線は分子量とRRTの間の予備的關係を与え、表1のデーターを説明するのに有用である。回帰線は

$MW(D) = 30,455.378 - (302.626 * RRT\%)$ であり

RRT%はチログロブリンを100とした関係を表す。MWはRRTに逆比例する。RRT

10

20

30

40

50

$\% = 100 \times R R T$ 。

回帰に対する R^2 は0.719であった。回帰は92-100の範囲の $R R T$ % 値を基礎とした。

【0026】

【表1】

Regression Summary

MW (kDa) vs. RRT (%)

Count	12
Num. Missing	4
R	.848
R Squared	.719
Adjusted R Squared	.690
RMS Residual	576.442

10

ANOVA Table

MW (kDa) vs. RRT (%)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
regression	1	8486638.969	8486638.969	25.540	.0005
Residual	10	3322852.698	332285.270		
Total	11	11809491.667			

20

Regression Coefficients

MW(kDa) vs. RRT (%)

	Coefficient	Std. Error	Std. Coeff.	t-Value	P-Value
Intercept	30455.378	5731.094	30455.378	5.314	.003
RRT (%)	-302.626	59.882	-.848	-5.054	.005

30

Confidence Intervals

MW (kDa) vs. RRT (%)

	Coefficient	95% Lower	95% Upper
Intercept	30455.378	17685.704	43225.052
RRT (%)	-302.626	-436.051	-169.201

【0027】

40

好ましくは、 $R R T$ % は99以下、さらに好ましくは98以下、またさらに好ましくは97以下、さらに好ましくは96、95、94、93、92、91、90、89、88または87のように96以下（1に近づく）である。

上の $R R T$ % 範囲のロット、96以上（ $R R T = 0.96$ ）に対し、治療用途の前にロットの有効性を試験することが望ましい。

好ましくは、本発明の凝集した免疫原はキャリアが凝集していない同じハプテンキャリアモノマー置換比では、同じハプテンとキャリアの共役体の有効性の少なくとも200%である有効性をもつ。このため、有効性は免疫化マウスの抗体応答によって有効性は測定される。

共役体

50

ハプテンの各分子はキャリアに共役する。キャリアの結合点は通常、キャリアのアミノ末端、またはさらに通常リジンのイプシロンアミノ基のような、利用し易いアミノ基である。

ハプテンはこの接合点に直接またはリンカーを通して共役する。通常、リンカーは炭水化物またはペプチド自体ではない。リンカーは、たとえあるとしても、好ましくは水素とは別の12原子以下の炭素、水素、および任意に、酸素、窒素および／または硫黄からなる小さい脂肪基である。さらに好ましくはそれは線状または分枝の12以下の炭素原子のアルキル基である。さらに好ましくはそれは $n = 1$ ないし12の $-(CH_2)_n$ である。最も好ましくはそれは $-CH_2CH_2-$ である。各リンカーは炭水化物ハプテンの酸素をアミノ窒素、すなわち、リジンのイプシロン窒素、またはタンパク質キャリアのアミノ末端に結合する。

10

リンカーは（たった1つのハプテンをキャリアモノマーに結合する）二機能性または（ケースワンリンカーは複数のハプテンをキャリアモノマーに結合する）多機能性である。

「結合剤」はAとBに反応し構造A-リンカー-Bを形成し、「リンカー」は元の結合剤の構造に関係する。反応は同時に起こり、または結合剤はまずAと反応し構造A-結合アームを形成し、次いで後者とBからA-リンカー-Bを形成する。

ハプテン結合アームがハプテンクロチル（例えば ST_n -クロチル）であるならば、次にオゾン分解は反応性ハプテンアルデヒドを生成し、キャリアの還元アミノ化に用いられハプテン $-CH_2CH_2-$ キャリア、すなわち好適な2炭素リンカーを生成する。ハプテンは通常リンカーにO-結合するが、他の結合が可能である。

20

関心のある他の結合剤はMMCCH結合剤、4-（4-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシルヒドラジドである。Ragaputhi, et al., Cancer

Immunol.Immunother.48:1-8(1999)。

クロチル結合化学に基づく若干の多官能リンカーはReddish, et al., Glycoconjugate J.,14:549-60(1997)の図1に描かれている。

ハプテン置換比

本発明では、炭水化物ハプテンはキャリア、特に、KLHに共役する。キャリアはまた凝集する。

好ましくは、ハプテン対キャリアの比は共役したハプテン对各キャリアモノマーの少なくとも10分子である。最大比は接近できる結合部位の数によって決定される。通常、その比は10-120の範囲である。

30

NANA含量

シアリル化共役体、例えば ST_n/KLH 共役体の場合、NANA含量はハプテン置換比（シアリル化ハプテン対キャリアモノマー）を示す。NANA含量は以下に示すようにアッセイされる。

ST_n/KLH 共役体の場合には、NANA含量は好ましくは3%を超え、さらに好ましくは少なくとも4%、さらに好ましくは少なくとも5%、更に好ましくは少なくとも6%、もっとも好ましくは少なくとも7%である。好適な値は表5と6に示される。

最大可能なNANA含量はKLHの可能な ST_n 結合部位の全数の関数である。 ST_n がKLHの各リジン部位鎖に結合すると仮定すると、NANA含量は共役体の約12重量%である。これはリンカーまたは T_n の分子量を含まない。置換していないKLHの分子量に対して計算するならば、それは約13%である。全ハプテンリンカーアーム含量は置換していないKLHの分子量に対して約19%である。

40

さらに高いNANA含量は最初にグリコシル化反応でのハプテン対KLHの比を増加することによって達成される。

ハプテンの量がNANA含量を上げるが、これは免疫原性の増加とはならないように増加するならば、余分のハプテンは、実際に、むだになる。従って、経済的理由から、10重量%以下にNANA含量を制限することが望ましい。

従って、NANA含量は6ないし10重量%が最適である。

共役反応

50

共役反応を実施するために、炭水化物ハプテン（例、S T n）のアルデヒド誘導体を用意する。これはタンパク質（例、K L H）キャリアでインキュベートされる。縮合反応はハプテンアルデヒドとタンパク質のリジン側鎖のイプシロンアミノ基との間で起こる。反応生成物は Schiff 塩基中間体である。これは適当な還元剤、例えば水素化シアノホウ素ナトリウムで還元し、ハプテンとキャリアの間に安定な結合を与える。

ハプテンアルデヒドはハプテンのクロチル誘導体を与え、この誘導体をオゾン化してオゾン化物を形成することによって得られる。オゾン化物はたとえば、ジメチルスルフィドで還元し、アルデヒド誘導体を生成する。アセトアルデヒド副生成物はタンパク質と縮合しないように除去する。

凝縮度に影響する主なプロセスのパラメーターは反応温度と時間である。

10

ハプテン置換比に影響する主なプロセスのパラメーターはハプテン／キャリアの比、残りのアセトアルデヒドの水準、そして水素化シアノホウ素濃度であった。

反応温度と時間

共役反応温度は好ましくは39℃ないし45℃であり、反応時間は好ましくは17ないし25時間である。

反応温度は十分長い時間、所望の凝集度になるため十分に高くなければならない。

好ましくは、温度は26℃よりも高く、さらに好ましくは少なくとも30℃、またさらに好ましくは少なくとも35℃、最も好ましくは少なくとも39℃である。

用いた温度は免疫原を変性するほどは高くない。好ましくは温度は45℃以下である。さらに好ましくは、43℃以下である。

20

反応時間は所望の凝集度を達成するために十分長くなければならず、必要な高い温度と短い反応時間を期待することは当然である。しかし、温度が低すぎると、温度にかかわらず凝集度は不十分である。また、反応温度と時間は所望のハプテン置換度を達成するように十分に長くなければならない。反応温度が低いほど、反応時間が長いほど、所定のハプテン置換水準を達成する。

反応時間は好ましくは6時間以上、さらに好ましくは少なくとも12時間、またさらに好ましくは少なくとも17時間である。

反応時間には絶対的な制限はない。しかし、反応部位がハプテンによって占めることになるので、共役反応はゆっくりになる。凝集割合はまた時間進行とともに下がる。

従って、反応持続時間が40時間以下、さらに好ましくは30時間以下、またさらに好ましくは25時間以下であることが通常望ましい。

30

ハプテンアルデヒド対キャリアモノマーの比

ハプテンアルデヒド対キャリアモノマーの重量比は反応速度と達成されるハプテン置換比に影響を与える。

重量比は好ましくは少なくとも0.6：1、さらに好ましくは少なくとも1：1、またさらに好ましくは少なくとも1.5：1、さらに好ましくは少なくとも1.75：1、最も好ましくは少なくとも2：1である。

好ましくは、重量比は4：1以下、さらに好ましくは3.25：1以下、またさらに好ましくは2.75：1以下である。

最も好ましくは、重量比は約2.25：1である。最終のK L H濃度は好ましくは8 mg/mLないし11.5mg/mLである。

40

水素化シアノホウ素濃度

最終の水素化シアノホウ素濃度は好ましくは25－125mM、さらに好ましくは45－75mMの範囲にある。代わりの還元剤は水素化ホウ素ナトリウムおよび水素化ホウ素－ピリジン複合体を含む。

【0028】

免疫応答の性質決定

細胞性の免疫応答はインヴィトロとインヴィヴォでアッセイすることができる。伝統的なインヴィトロアッセイはT細胞増殖アッセイである。血液サンプルは病気に関連した利害のある病気に罹っている個人、またはワクチン注射をした個人から取る。この個人のT細胞

50

胞はしたがって増殖によって抗原に新しく曝されて応答の用意をしなければならない。増殖はDNA複製での役割のためにチミジンを必要とする。

一般的に言えば、T細胞増殖はB細胞増殖よりもはるかに広範であり、分離していない細胞母集団でさえも強いT細胞応答を検出することができる。しかし、T細胞の精製はT細胞応答検出を容易にするために望ましい。抗原-特異的増殖に実質的に逆影響しないT細胞精製の任意の方法が用いられる。我々の好ましい方法では、全てのリンパ球母集団は比密度10.7にて等密度勾配、すなわちFicoll-HypaqueまたはPercoll勾配分離で（血液、脾臓、またはリンパ節から）先ず収集によって得られる。この混合した細胞母集団を次にさらにT細胞母集団に複数の手段によって精製することができる。最も簡単な分離はB細胞および単球/マクロファージ母集団のナイロンウールカラムへの結合による。T細胞母集団はナイロンウールを通過し>90%純粋なT母集団が1回の通過で得られる。他の方法は非T細胞母集団（ネガチブ選択）を溶解するように補体タンパク質の存在でB細胞への特異的抗体およびまたは単球抗原を用いることを含む。さらに別の方法はポジティブ選択技法であり、抗-T細胞抗体（CD3）を（磁性ビーズのような）固相マトリックスに結合し、これによりT細胞を結合し非-T細胞母集団から（例えば磁気により）分離する。これらは機械的または化学的破壊によりマトリックスから回収される。

精製したT細胞母集団が得られると、照射抗原存在細胞（脾臓マクロファージ、B細胞、樹状細胞がすべて存在する）の存在で培養される。（これらの細胞は照射してトリチウム化チミジンの応答および取り込みを避ける）。生存可能なT細胞（20単位でIL2を用いて補充した100 μ lの培地にウェルにつき100,000-400,000個）を次に試験ペプチドまたは他の抗原を用いて試験抗原を濃度1ないし100 μ g/mLで3ないし7日間インキュベーションする。

抗原刺激期間の終りで、応答を複数の方法で測定する。先ず、細胞を含まない上澄み液を収集し、特異的なサイトカインの存在をテストする。 α -インターフェロン、IL2またはIL12はThヘルパータイプ1固体群応答を示す。IL4、IL6およびIL10の存在はともにThヘルパータイプ2免疫応答を示す。したがってこの方法はヘルパーT細胞サブセットの同定を見込む。

胚発生で終わる第二の方法は抗原刺激期間の終りに培養基（例えば、ウェル当り1 μ キュリー）にトリチウム化チミジンを追加することを含み、細胞にシンチレーションカウンティング用フィルターで収集する前に4-16時間放射標識代謝産物を混入する。混入した放射活性チミジンのレベルはT細胞複製活性の測定である。ネガチブ抗原または抗原コントロールのないウェルを用いて刺激インデックスによって胚発生の応答を計算する。これはCPMテスト/CPMコントロールである。好ましくは、得られた刺激インデックスは少なくとも2であり、さらに好ましくは少なくとも3であり、またさらに好ましくは5であり、最も好ましくは少なくとも10である。

CMIはまたインヴィヴォで標準実験動物、例えばマウスでアッセイされる。マウスは準備刺激抗原で免疫化する。T細胞に対する応答を待った後、マウスをテスト抗原を足に注射して免疫性をテストする。（テストマウスを膨潤する）DTH応答は例えば食塩水を注射したコントロールマウスのそれと比較する。

好ましくは、応答は少なくとも.10mm、さらに好ましくは少なくとも.15mm、またさらに好ましくは少なくとも.20mm、最も好ましくは少なくとも.30mmである。

インヴィヴォの体液性の免疫応答は免疫化したマウスから血液を抜き、関心のある抗原を結合する抗体の存在について血液をアッセイして測定される。例えば、テスト抗原を固定化しサンプルでインキュベーションして、これによって同族の抗体を捕捉し、次いで捕捉した抗体を標識を付けた抗-アイソタイプ抗体をもつ固相をインキュベーションして測定する。

好ましくは、体液性の免疫応答は、所望により、少なくとも1/100、さらに好ましくは少なくとも1/1000、またさらに好ましくは少なくとも1/10,000の抗体力価によって示されるほど少なくとも強い。

対象

10

20

30

40

50

本発明のワクチンのレシピエントは体液性または細胞性の免疫応答によって特異的免疫を取得できる任意の脊椎動物である。

哺乳動物の中で、好適なレシピエントは霊長類目（ヒト、サルおよびモンキイを含む）、Arteriodactyla（ウマ、ヒツジ、ウシ、ヒツジ、ブタを含む）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、およびハムスターを含む）、および食肉目（ネコ、イヌを含む）の哺乳動物である。鳥の中では、好適なレシピエントは七面鳥、ニワトリおよび他の同類のものである。最適なレシピエントはヒトである。

本発明の好ましい動物対象は霊長類哺乳類である。「哺乳類」の語は勿論ヒトを含む哺乳類にそれぞれ属することを意味する。そのうえ獣医用に向けようとしているが、本発明は特にヒト対象の治療に有用である。「非ヒト霊長類」の語はヒト科を除く節足動物亜目のメンバーである。そのような非ヒト霊長類はヒト上科、ヒト族（カツラザル属、ホウラーモンキー、クモザルおよびリスザルを含む新世界モンキー）およびCallithricidae族（マーモセットを含む）；オナガザル上科、オナガザル族（マカーク、マンドリル、ヒヒ、テングザル、モナザル、およびインドの神聖なフナマンモンキーを含む）；そしてヒト上科、ショウジョウ族（テナガザル、オランウータン、ゴリラ、およびチンパンジーを含む）を含む。アカゲザルはマカークザルの一員である。

製薬構成物

本発明の製薬調製品は保護免疫応答を顕在化するために有効な量で少なくとも1の免疫原を含む。応答は体液性、細胞性、またはそれらの組合せである。構成物は複数の免疫原を含むことができる。

さらに構成物はリポソームからなる。好適なリポソームは2000年11月25日出願の Jiang, et al., PCT/US00/31281（我々の書類記号JIANG3A-PCT）、および1994年4月12日出願の Longenecker, et al., 08/229,606（我々の書類記号LONGENECKER5-USA）および1995年4月12日出願の PCT/US95/04540（我々の書類記号LONGENECKER5-PCT）で同定されたものを含む。

構成物は抗原－提示細胞を含み、さらに有効な提示のために、投与前に、この場合に免疫原は細胞にパルスできる。

構成物はこの分野で既知の補助剤または賦形剤を含むことができる。参照、例えばベルコウラ著、ザメルクマニュアル、15版、メルク社、ラスウェイ、N.J. 1987；グッドマンら著、メルク社、ラスウェイ エヌ ジジエ、1987；グッドマンら著、グッドマン及びギルマンのThe Pharmacological Basis of Therapeutics, 8版、ペルガモンプレス社、エルムスフォード、N.Y., (1990)；アペリーの薬品治療：Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3版、ADISプレス社、ウィリアムス及びウイルキンス、バルチモア、M.D.(1987), カツング著、Basic and Clinical Pharmacology, 5版、Appleton and Lange, Norwalk, Conn.(1992)

らは参考文献として全体的にここに組み込まれる。

構成物はさらに免疫応答を非特異的に高めるアジュバントを含む。いくつかのアジュバントは体液性および細胞性の免疫応答の両方を増強し、他のものは1または他に対し特異的である。いくつかは1を増強し他を阻害する。したがってアジュバントの選択は所望の免疫応答による。

構成物は免疫調節物質、例えば細胞性または体液性免疫応答を与えるか阻害するサイトカイン、またはそのようなサイトカインに対し阻害性の抗体を含む。

本発明による製薬構成物はさらに抗一代謝物、ブレオマイシンペプチド抗生物質、ポドフィリンアルカロイド、Vincaアルカロイド、アルキル化剤、抗生物質、シスプラチン、またはニトロソウレアからなる群から選択されるような、少なくとも1の癌化学療法的化合物を含む。本発明による製薬構成物さらにまたは追加的にガンマグロブリン、アマンタジン、グアニジン、ヒドロキシベンズイミダゾール、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、チオセミカルバゾン、メチサゾン、リファンピン、リブピリン、ピリミジン類似物、プリン類似物、フォスカネット、ホスホノ酢酸、アシクロビル、ジデオキシヌクレオシド、またはガンシクロビルから選択された少なくとも1の

ビールス化学療法化合物を含む。参照、例えばKatzung, 上記、および798-800および680-681頁に引用された文献、それぞれを、これら文献は参考文献として全体がここに組み込まれる。

抗-寄生虫剤は、類人猿、寄生虫（回虫、ギョウチュウ、線虫、十二指腸虫、サナダムシ、および住血吸虫を含む）および原生動物（アメーバ、およびマラリヤ、トキソプラズマ、およびトリコモナス生物体を含む）に用いるのに適した薬剤を含む。例としてチアベンゾール、種々のピレスリン、プラジカンテル、ニクロスアミド、メベンダゾール、クロロキンHCl、メトロニダゾール、ヨードキノール、ピリメタミン、メフロキンHCl、およびヒドロキシクロロキンHClを含む。

製薬目的

本発明の目的は病気に対し対象を保護することである。ここで用いられるように、「保護」の語は「感染または病気から保護」として、「予防」、「抑制」または「治療」を含む。「予防」は病気になる前に製薬構成物を投与することを含む。「抑制」は病気が臨床的に現れる前に構成物を投与することを含む。「治療」は病気が現れた後に保護構成物を投与することを含む。治療は改善または治癒である。

ヒトおよび獣医の医薬では、最終的誘導の事象が未知であり、潜在的であり、または患者が事象の発生後に良くなるまで確かめないから、「予防」と「制御」を区別することは常に可能ではないことは理解されるだろう。従って、「治療」とは別個のものとしてここに定義された「予防」および「制御」を含むように「防御」の語を用いることが一般的である。ここで使用されるような「保護」の語は「防御」を含む。参照、例えばベルカー、上記、グッドマン、上記、Avery, 上記およびカツング、上記をここに引用した全参考文献を含み、参考文献として全体を組み込む。

規定された「保護」は絶対的である必要はなく、すなわち、コントロール集団に対して統計的にかなり改善（ $p=0.05$ ）されているという条件で、病気は全体的に予防または根絶する必要はない。保護は病気の症状の開始の苦しさや速度を弱めるように制限される。拮抗剤よりも保護が小さい薬剤は他の薬剤が特定の個人に無効であるならば、保護のレベルを高める他の薬剤と組み合わせる用いられるならば、または拮抗剤よりも安全であるならば、まだ価値がある。

治療の有効性は、持続時間、つらさ等、好ましくは病気の段階の意味にマッチした未治療コントロール群のそれと治療後の病気の影響を比較して決定される。

予防の有効性は通常治療グループの病気の範囲をコントロールグループの病気の範囲と比較して確かめ、治療およびコントロールグループは等しいリスクがあると考えられ、または期待されるリスク差を補正した。

一般に、予防が、家族史、前の個人の医療史、または原因となる薬剤への高められた量によって病気のリスクが高いと考えられるものに行われる。

製薬投与

本発明の少なくとも1の保護剤は、前述の製薬構成物を用いて、意図する目的を達成する任意の手段によって投与できる。

投与は経口または非経口であり、そして、非経口ならば、局所的または全身的である。例えば、そのような構成物の投与は種々の非経口、例えば皮下、静脈、皮内、筋肉内、腹膜内、鼻腔内、経皮、または頬面経路による。非経口投与は丸薬注入または時間をかけて徐々に灌流することによってできる。本発明の製薬構成物を用いる好適なかたちは皮下、筋肉内または静脈内投与である。参照、例えば上記ベルクナー、上記グッドマン、上記アベリー、上記カツング、これらは、ここに含まれる引用した参考文献を含み、参考文献として全体をここに組み込まれる。

進行中の特異的免疫治療による免疫応答によって緩和されることができ病気または状態を予防、抑制、または治療する代表的レジメは、1回の治療、またはエンハンサーまたはブースターの投薬として繰り返し、1週間と約24ヶ月の間を含む期間にわたり、有効量の上記のような製薬構成物の投与を含む。

有効投与量は受容者の年齢、性別、健康状態、および体重、同時治療の種類、たとえある

10

20

30

40

50

としても、治療頻度、および望ましい効果の性質による。以下の有効投与量の範囲は本発明を制限するものではなく好適な投与量の範囲を示すものである。しかし、最適な投与量は、過度の実験なしで、当業者によって理解され決定できるように、個々の対象に調整される。これは一般に、例えば、患者の体重が軽いと減らすといった標準投与量の調整を含む。参照、例えばベルコウら著、ザメルクマニュアル、15版、メルク社、ラーウェイ、ニュージャージー、1987；グッドマンら著、グッドマンとギルマンの治療学の薬理学基礎、8版、ペルガモンプレス社、エルムスフォード、ニューヨーク、(1990)；アベリーの薬物治療：臨床薬理学および治療学の基本と実際、3版、ADISプレス社、ウィリアムスおよびウイルキンス、バルチモア、MD、(1987)、エバジ、薬理学、リトルブラウンアンドカンパニー、ボストン、(1985)；チャブナーら、上記；デビタラ、上記；サーモン、上記；ショレダーら、上記；サルトレリら、上記；およびカッシング、上記、参考文献およびここに引用された参考文献は、全体をここに参考文献として組み込まれる。

ヒトに用いる前に、まず薬剤は実験室動物で安全性と有効性を評価される。ヒトの臨床研究では、問題の薬剤の予備臨床データに基づき、(たとえあるとしても)類似の薬剤の通常の投与量に基づき、ヒトに安全であると期待される投与量で開始される。この投与量が有効であるならば、投与量を減らし、所望により、最少の有効量を決定する。この投与量が無効であるならば、患者の副作用のサインをモニターし注意深く増量する。参照、例えば、ベルコウら著、ザメルクマニュアル、15版、メルク社、ラーウェイ、ニュージャージー、1987；グッドマンら著、グッドマンとギルマンの治療学の薬理学基礎、8版、ペルガモンプレス社、エルムスフォード、ニューヨーク、(1990)；アベリーの薬物治療：臨床薬理学および治療学の基本と実際、3版、ADISプレス社、ウィリアムスおよびウイルキンス、バルチモア、MD、(1987)、エバジ、薬理学、リトル、ブラウンアンドカンパニー、ボストン、(1985)、参考文献およびここに引用された参考文献は、全体をここに参考文献として組み込まれる。

各治療に必要な全投与量は複数回の投与(同じかまたは異なる量で)または一回の投与で、予め決定されたかまたは特別に、免疫スケジュールによって投与できる。スケジュールは、抗原に有効な免疫応答を顕在化するために、これによって可能ならば他の薬剤と共に保護を与えるために十分であるように免疫学的に有効であるように選択される。これを達成するために十分な投薬量は「治療学的に有効な投薬量」と定義される。(注、スケジュールは個々の投与量が、それ自体で投与される場合、有効ではないとしても、免疫学的には有効であり、「治療学的に有効な投与量」は免疫スケジュールに関連して良く解釈される。)この使用に有効な分量は、例えば、ペプチド構成物、投与方法、治療する病気の段階と程度、患者の健康時の体重と一般的な状態、および処方医師の判断による。

代表的には、薬剤の活性成分の一日の投与量は、70kgの成人に対し、10ナノグラムないし10グラムの範囲である。免疫原には、このような患者に対するさらに一般的な投薬量は10ナノグラムないし10ミリグラムであり、さらに1ミクログラムないし10ミリグラムである。しかし、本発明はこれら投与量の範囲を限定しない。

本発明の構成物は一般的に重大な病気の段階、すなわち、命を脅かすまたは潜在的に命を脅かす状態に用いられることを心にとめておかねばならない。そのような場合、外来物質の最少化とペプチドの相対的無毒性の観点で、これらペプチド構成物の本質的な過剰量を投与することは治療する医師には可能であり、望ましいと感じるかも知れない。

投与は有効な任意の間隔で行われる。間隔が短すぎると、免疫麻痺または他の逆効果が生じる。間隔が長すぎると、免疫が損なわれる。最適な間隔は各投与量が多いほど長くてよい。一般的な間隔は1週間、2週間、4週間(または1ヶ月)、6週間、8週間(または2ヶ月)および1年である。追加の投与量、および間隔の増減の適正值は、患者の免疫適確性(例えば、関連する抗原への抗体のレベル)を考慮して、継続的基準で再評価される。

種々の方法は例えば、ここに参考文献として組み込まれるスゾカら、Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467(1980)、米国特許第4,235,871号、4,501,728号、4,83

7, 028号、および5, 019, 369号に記載されているようなリポソームを調製するために得られる。

適当な投与形態は病気、免疫原、および投与形態により、可能なものは錠剤、カプセル、トローチ、歯磨き、座薬、吸入薬、溶液、軟膏および非経口デポを含む。参照、例えば上記ベルカー、上記グッドマン、上記アベリー、上記エバジ、ここに引用された全参考文献を含み、全体がここに参考文献として組み込まれる。

抗原は、例えば、抗原提示の「内発的経路」が起こるような抗原物質の細胞内成分への供給を高める方法で供給することができる。例えば、抗原を（細胞と融合する）リポソームで包括し、または（細胞を感染させる）ビールスベクターのコートタンパク質に組み込まれる。

抗原がペプチドであるとき応用できる他のアプローチは、筋肉内に、抗原を宿主に符号化する裸のDNAを注入することである。DNAは内部移行し発現される。

また本発明の構成物を用い自己のPBLSを初回刺激し、PBLSが所望の応答を表すことを確認し、次いでPBLS、またはそのサブセットを対象に投与することができる。

【0029】

方法

共役体の合成

STn-KLHの合成のための一般法の記述

STn-KLHの調製は2つの化学的プロセス、STNアルデヒドを生成するためSTn-クロチルのオゾン分解、そしてKLHへのSTn-アルデヒドの共役を要する。

これらのプロセスは生成物の形成と反応副生成物の十分な除去を確保するためにコントロールされなければならない。

オゾン分解

STn-クロチル（6-O-アルファシアリル、N-アセチルアルファD-ガラクトサミニル-1-O-2-ブテン）はカナダ、アルバータ、エドモントンのライロケミカル社から粉末で入手される。STn-クロチルは水溶性でオゾンにさらすと炭素-炭素二重結合を酸化し、オゾン化物構造を形成する。次に窒素ガスを溶液に通し過剰のオゾンを除く。STn-アルデヒド（STN-CHO）を形成するように残留オゾン/酸素の除去とオゾン化物ボンドの還元はジメチルスルフィド（DMS）の添加によって完了する。アセトアルデヒド、等モル量で生成した副生成物を先ずジエチルエーテル抽出によって除去した。まず酢酸エチルで抽出して除去し、残りのアセトアルデヒドと酢酸エチルのレベルをさらにロータリーイェバポレーションによって減らす。最後のSTn-アルデヒド溶液を濾過し必要になるまで-20℃で冷凍貯蔵する。

STnアルデヒドとKLHの共役

STn-アルデヒドとKLHは共にリン酸緩衝液でインキュベーションする。STn-CHOのアルデヒド部分とKLHのリジン部分残基の末端アミン基との間の縮合反応によってSTnをKLHに結合させる。形成する Schiff 塩基中間体を水素化シアノホウ素ナトリウムによって還元しSTnとKLHの間に安定な結合を与える。ダイアフィルトレーションは残りの水素化シアノホウ素ナトリウム、反応副産物STn-アルコール、ならびにオゾン化の最後に存在したジメチルスルフォキシドと酢酸エチルを除く。生成物のタンパク質濃度は希釈により調整され、濾過により滅菌され、2ないし8℃で貯蔵される。

相I / IIプロセスの例

水素化シアノホウ素ナトリウム250mgを秤量し、7.8mlのPBSに溶解し滅菌濾過し貯蔵溶液（40mg/ml）を与えた。125mgを含むKLH溶液のアリコットを秤量した（8.85mg/mlで14.1mlの溶液）。150mgのハプテンを含むSTn-アルデヒド溶液のアリコットをKLH溶液に添加し、2.5+/-0.5分間21℃+/-3℃にて（1.2:1比STn/KLH w/w）混合した。水素化シアノホウ素ナトリウム125mgを含む貯蔵溶液のアリコットを次にKLHとSTn-アルデヒド混合物に添加し、反応混合物を18+/-0.5時間21+/-3℃にて静かに振とうしインキュベーションした。反応副産物をYM30膜をもつアミコン限外濾過ユニットを用い

10

20

30

40

50

ダイアフィльтраーションによって除去した。生成物をミリポアミレックスーGV0.2ミクロンフィルターに通して濾過した。

生成物の%NANAを増加するために導入したプロセス変化

STn/KLHの比は3:1(w/w)に増加し、0.05Mリン酸カリウム緩衝液、pH7.5をPBSの代わりに用いた。反応温度は39+/-2℃まであげて、水素化シアノホウ素ナトリウム溶液を14のアリコットに、3.5時間15分毎に125mM最終濃度まで添加した。インキュベーション時間は21+/-3時間、次いで反応副生物はダイアフィльтраーションによって除去した。

臨床生成物の調製のための最終プロセス変化

STn/KLHの比は2.25:1(w/w)まで減少し、シアノホウ素水素化物濃度は60mMまで減少した。 10

カスタム共役体のためのプロセス変化

反応パラメーターを表2にまとめる。

【0030】

動物効力アッセイ

免疫化

最初のセットの実験(表4および5の結果)のため、1グループにつき9または10匹のマウス(8-12週齢雌CAF1)に各ロットのテスト物質を用いENHANNZY(登録商標)アジュバントインジェクタブルエマルジョン(Corixa)と合わせ、0.25μgの投与量で注入した。第二の注入は14日目に行い、血清を26日目に収集した。 20
第二の組の実験のために(表6の結果)、各ロットのテスト物質を3レベル投薬図で45匹のマウス(8-12週齢雌CAF1)に注入した。3種のテスト物質の投与量(0.25μg、0.05μg、0.01μg)をENHANNZY(登録商標)アジュバントインジェクタブルエマルジョン(Corixa)と合わせ、各投与量を15匹のグループに注入し、同時に他の組のマウスに同じ3回分のSTn-KLHワクチンをインハウス参照(ロットSTNK0055)に注入した。第二の注入は14日目に行い、血清を26日目に収集した。

第三の組の実験のために(表7の結果)、少なくとも2つの投与量が力価において参照ロットによって画定された標準曲線の作動範囲内にあることになるように、テストロットの投与量が適当に選択された(0.0125μgないし1.6μgの範囲内)ことを除き注入図は第二の組と同じであった。 30

アッセイプロトコル

STnへの特異的IgG抗体応答はヒツジの顎下のムチン(OSM)で被覆したプレート上の動力学的ELISAによって決定した。免疫マウスからの血清を3倍シリーズに希釈し(1/300-1/656, 100)室温で1時間OSM被覆ウェルに添加した。洗浄工程で結合していない一次抗体を除去後、パーオキシダーゼ標識二次抗体を添加し、次いで色素生産性基質ABTSを添加した。各希釈でのVmax値はSOF Tmax(登録商標)プロソフトウェアを備えたモレキュラーデバイシーズTHERMOMax(登録商標)マイクロプレートリーダーを用いる代表的な10分動力学的読みで得られた。3倍希釈はこれらの研究で行われたが、2倍希釈を用いて生成した過去の動物力価とヒト免疫応答のデーターを直接比較するために、希釈値はlog2力価としてとして表現された。 40

各マウスのためのエンドポイント力価は後のVmax値(ΔVmax)間の数の差に基づく数学的アルゴリズムによって得られた。過去のデーターと現在のデーターの分析によって、ノイズと統計的に区別できるΔVmax値を同定し、エンドポイント決定のためのワーキングルールは次のように定義された:エンドポイント力価はlog2力価であり、前のVmaxドロップ値が6mOD/分以下にならない6mOD/分を超えるVmax値で最後のドロップに相当する。

データー分析

第一の組の実験では、マウス(表4)のグループからの抗体応答の平均力価として結果が表される。統計的優位性の分析は表5に示す。第二の組の実験では、相対的力価は表6に 50

示すように計算された。第三の組の実験では、相対的力価は表 7 に示すように計算された。

【0031】

分析方法

NANA 含量の決定

K L H に共役したシアリル-T n の量は酸加水分解後の共役体から放出された N A N A の量として決定された。パルス電流測定検出 (A E - H P L C - P A D) を用いる Dionex C arboPac PA1 アニオン交換カラムで、N A N A 含量を定量的に H P L C によって決定した。標準曲線は N A N A 標準の濃度対ピーク面積をプロットしてつくり、テストサンプルの N A N A 濃度は標準曲線から得た。

10

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度は 280 nm の吸光度で決定した。K L H と S T n - K L H の吸光係数 (1 mg / mL) を 50 mM リン酸カリウム緩衝液で $A_{280} = 1.37$ であると決定した。

分子サイズの決定

移動相が 50 mM リン酸カリウム pH 7.5、流速が 0.5 mL / 分の 1000 オングストローム T S K G 5000 P W_{XL} サイズ排除カラムを用いて分子の大きさを決定した。カラムをウォーターズ 2690 アリانس H P L C システムに結合し 3 つの検出器、UV 吸光度、屈折率 (R I) およびレーザー光散乱 (L I S) によりモニターした。精度検出器のレーザー光散乱プラットフォームをウォーターズ 2410 屈折率検出器の温度制御チャンバ内に取付けた。静的光散乱測定と組合せて示差屈折率測定を分子の大きさの決定に用いた。精度獲得 32 および精度分析を用いてデーター獲得と分析を行った。

20

【0032】

結果と論考

代替レベルに影響することがわかった反応因子はアセトアルデヒドの完全な除去、ハプテン / K L H 比、シアノホウ素水素化物濃度、反応時間および反応温度であった。反応温度が 39 °C であるが、室温ではないとき、サブユニット会合が起きた。反応速度は室温では遅いが、反応時間を適当に調整することにより N A N A 含量を大きくできた。

3-レベル投与量によりテストしたサンプルに対する反応条件、分子サイズ、N A N A 含量、そして相対的潜在力を表 6 に示す。結果は N A N A 含量が 5 % 以上であり、三量体 (たぶん二量体は十分) の凝集状態が高潜在力を達成するために望ましい。約 20 量体までの高い凝集状態は何も利点をもたらさない。

30

ロット P D 0 2 0 1 0 5 - 0 8 を先ずワクチンプラシーボとしてつくる、すなわち、何もハプテンは存在しないが、ワクチンと同じ共役プロセスによって凝集させた (2, 000 k D の範囲)。次いで再度 23 °C にてハプテンを用いるプロセスで 6.8 % の N A N A を生成した。23 °C の反応条件は通常凝集しないが、この場合さらに凝集が起これ、複雑な分子サイズパターンがサイズ排除クロマトグラフィで得られた。このサンプルの有効性は他の「良好な」ロットと比較できた。

分子篩溶出プロファイルおよびピークを横切る水力学半径の計算値を図 1-9 に示す。040400-R T および 260100 R T のロットのプロファイルは図 5 に重なって示され、詳細に比較される。これら 2 ロットは全分析テストでほぼ同じであるが、若干有効性で異なる。水動学的半径 (サイズの測定) はピークを横切って変化し、サイズは凝集したサンプルと凝集していないサンプルとは重ならないことに注意。平均 MW 量はサイズの範囲が何かは語らないが、ピークの「切片」を再計算して得られる。

40

初期の研究での 1-レベル投与によってテストしたサンプルの分子サイズ、N A N A 含量、および相対的有効性は表 4 に示す。若干のサンプルは両者の研究でテストした。表 6 と 7 は表 4 に報告されていない特性をもつサンプルを含む。

表 2 に報告したサンプルのデーター分析は表 4, 5, 6 および 7 に示す。サブユニットまたは約 7 % の N A N A を含む凝集したワクチンでマウスを免疫化後、O S M での抗-ハプテン抗体力価の比較を表 4 に示す。各タイプの 3 ロットを用意した。データーは統計学的分析のために一緒にした。約 3 % の N A N A を含むワクチンロットの同じような比較を表

50

4 に示す。

抗-O S M力価での差の統計学的有意性を表5に示す。3% N A N AとのS T n-K L Hの凝集は有意な効果がなかった。同様に、凝集なしの7%までのN A N A含量の増加は有効性には意味がある効果を与えなかった。% N A N Aが増加し生成物が凝集したとき、有効性の改善は他のグループのものと比較してP-値<. 0 0 0 1で有意であった。

【0 0 3 3】

パラメーターの範囲と解説：

(a) アセトアルデヒドを< 1% (モル/モル；アセト-CHO/S T n-CHO) のスベックまで除く。これはR P-H P L Cリミットテストによって確かめられる。生の反応生成物は5 0%モル/モルであった。残りのアセトアルデヒドの効果の大きさは各モルのアセト-CHO/S T nCHOに対しN A N A含量が約0. 3%の減少である。ここでテストした全サンプルはアセトアルデヒドの除去の内訳に合致した。

10

(b) ハプテン/K L H比は重量/重量である。

(c) シアノホウ素水素化物濃度はミリモルである、テストした値の範囲は2 0-ないし2 0 0 m Mであった。

(d) 温度は初めはサイズに、そして反応温度に影響を与える。最終% N A N Aは必ずしも温度の増加と共に増加しない。3 9℃で3% N A N Aを超える最短反応時間は約6時間である。4 8時間を超える反応時間は3 9℃でさらに高い凝集物を生成する。

(e) 温度> 3 0℃では2 4時間で凝集が得られると我々は概算する。我々は4 3℃まで問題がなかったが、それより高い温度では生成物が硬くなる(たぶん凝集物が容易に取り扱うには大きすぎるのだらう)。

20

表2は反応条件の要因分析である。

【0 0 3 4】

【表 2】

SORT by Starting Weight Ratio (S.W.R.)

Run STn-CH

Order	S.W.R.	O	KLH	NaCNBH3	Time	Temp	NANA	R.R.T*
	STn/KLH	mg/mL	mg/mL	mM	hr	deg C	%/wt	Shodex
8	1.52	17.5	11.5	45	17	35	6.2	0.98
9	1.52	17.5	11.5	45	25	43	6.5	0.89
10	1.52	17.5	11.5	75	25	43	6.7	0.89
16	1.52	17.5	11.5	75	17	35	6.1	0.97
20	1.52	17.5	11.5	75	25	35	7.1	0.92
22	1.52	17.5	11.5	75	17	43	7.2	0.89
28	1.52	17.5	11.5	45	25	35	6.7	0.94
32	1.52	17.5	11.5	45	17	43	7.3	0.89
2	2.06	17.5	8.5	75	25	35	6.9	0.93
6	2.06	17.5	8.5	75	17	43	7.5	0.9
11	2.06	17.5	8.5	45	17	43	7.8	0.9
14	2.06	17.5	8.5	45	25	35	6.1	0.97
24	2.06	17.5	8.5	45	17	35	6.5	0.98
27	2.06	17.5	8.5	45	25	43	7.7	0.9
31	2.06	17.5	8.5	75	17	35	7.1	0.97
34	2.06	17.5	8.5	75	25	43	7.1	0.89
4	2.25	22.5	10	60	21	39	8.5	0.89
18	2.25	22.5	10	60	21	39	7.5	0.92
19	2.25	22.5	10	60	21	39	8.5	0.91
30	2.25	22.5	10	60	21	39	8.6	0.9
1	2.39	27.5	11.5	75	25	35	8.2	0.91
5	2.39	27.5	11.5	75	17	43	7.9	0.91
12	2.39	27.5	11.5	45	17	43	8.4	0.89
15	2.39	27.5	11.5	45	25	35	7.4	0.96
21	2.39	27.5	11.5	45	17	35	8.0	0.97
23	2.39	27.5	11.5	45	25	43	9.7	0.89
33	2.39	27.5	11.5	75	17	35	7.7	0.96
35	2.39	27.5	11.5	75	25	43	8.4	0.89
3	3.24	27.5	8.5	45	17	35	7.9	0.97
7	3.24	27.5	8.5	45	25	43	8.9	0.9
13	3.24	27.5	8.5	75	17	35	7.8	0.96
17	3.24	27.5	8.5	75	25	43	8.5	0.91
25	3.24	27.5	8.5	75	25	35	8.9	0.93
26	3.24	27.5	8.5	75	17	43	9.2	0.9
29	3.24	27.5	8.5	45	17	43	9.8	0.91
36	3.24	27.5	8.5	45	25	35	7.7	0.96

10

20

30

40

【0035】

* R. R. T = Shodexでのサイズ排除クロマトグラフィによる相対保持時間。
 数値はチログロブリン基準に関連し、分子サイズに反比例している。

レーザー光散乱による分子量との関係は表3に示す。

% NANA 含量は100* (シアル酸、遊離した糖として、280nmでの吸光度で測定されるタンパク質含量によって分けられる)。重量/重量計算である。

表3は動物有効性実験に用いたSTn-KLHロットの反応条件と物理的性質である。

【0036】

50

【表 3】

Lo	ID	Temp	Time	S.W.R,	NaCNBH3	MW	R.R.T,	NANA,
t #		, deg	, hr	STn/KL	,	,	Shode	%
		C		H	mM	kDa	x	
1	STNK0055	39	23	3.0	125	1200	0.97	7.8
2	STNK0058	39	21	2.25	125	1500	0.96	8.1
3	270100-39	39	18.5	2.25	60	1300	0.93	6.7
4	050400-39	39	20	2.25	60	2100	0.93	8.2
5	029910-03	39	21	2.25	60	1500	0.95	7.9
6	BH01003	39	21	2.25	60	1900	0.94	7.4
7	020105-08	39	21	0.0	60			
*								
7		23	48	3.0	60	9500	---	6.8
*								
8	020202-09-3	39	20	1.3	50	2100	---	6.3
9	020202-09-2	39	20	1.1	50	2100	---	5.8
10	011299-03	39	20	0.8	50	2500	0.92	5.1
11	020202-09-1	39	20	0.8	50	2500	---	4.8
12	201299-01	39	18.5	0.3	80	4000	0.92	3.0
13	260100-RT	23	48	2.25	60	500	0.98	7.2
14	040400-RT	23	48	2.25	60	460	0.99	7.0
15	SR1328-36	23	48	2.25	60	500	0.99	7.4
16	211299-01	23	6	1	35	590	1.00	3.2

10

20

30

40

【0037】

* プラセボワクチンはハプテン不在で39℃にてプロセスを通してKLHを媒介し、次いでハプテンで23℃にて再処理して製造した。

MWおよびショデックスは共にいつでも入手できると報告されている。ショデックスの作業範囲は極めて短い、そのポイントは「サブユニット」MWが通常ショデックス値0.98ないし1.00に相当することである。この意味で、表2に注目すると、0.98のショデックス値は反応時間(21時間)と温度(39℃)がともに特定の条件から17時間と35℃にそれぞれ減ったときにのみ生じる。0.97以下のショデックス値でのすべて他の反応条件は凝集生成物を代表するように思う。ラン#8(表2での最初の項、ショデックス値0.98)は(TSKクロマトグラフィ/レーザー光散乱によって)約25%の凝集物質を含むと見積もられる。

表4は平均log2抗体力価によるワクチン有効性の決定。高いNANAを含む6ロットをテストし(3凝集および3サブユニット)、1組は2回テストし、全部で79匹のマウスを用いた。低いNANAを含む2ロットをテストし(1凝集および1サブユニット)、全部で18匹のマウスを用いた。

【0038】

【表 4】

Group Type	Lot #	MW, kDa	NANA, %	Mean log2 titer
High NANA	2	1500	8.1	15.1
Aggregated	3	1300	6.7	15.9, 16.2
	4	2100	8.2	15.6
	Group Mean			15.6
High NANA	13	500	7.2	11.9, 13.3
Subunit	14	460	7.0	12.4
	15	500	7.4	13.1
	Group Mean			12.4
Low NANA	12	4000	3.0	9.4
Aggregated				
Low NANA	16	590	3.2	10.9
Subunit				

10

【0039】

表 5 はグループ間の log 2 抗体力価の統計的有意差を示す。

【0040】

【表 5】

20

Group 1	Group2	p-value
High NANA, Aggregated	High NANA, Subunit	<0.0001
High NANA, Aggregated	Low NANA, Aggregated	<0.0001
High NANA, Aggregated	Low NANA, Subunit	<0.0001
High NANA, Subunit	Low NANA, Subunit	0.35
High NANA, Subunit	Low NANA, Aggregated	0.05
Low NANA, Aggregated	Low NANA, Subunit	0.88

30

【0041】

表 6 は 3 レベルでの投薬量によるワクチン有効性の決定および投与－応答曲線に合致した平行線の置換の評価を示す。3つの別々の実験からの 3 投与での log 2 力価のランクに基づくランク関連有効性をロット 1 につき計算した。全ての点を通る最良の同時フィットを用いて参照投薬－応答曲線（相対的有效性 1.00）を決定した。3 投薬のランク相対的有效性をテストロットにつき計算し、平行フィット投薬－応答曲線を参照の曲線と置換して相対的有效性を計算した（テスト／参照）。

【0042】

【表 6】

Lot #	MW, kDa	NANA, %	Rel. Potency	p-value
1 (Ref., 3 runs)	1200	7.8	1.00	
5	1500	7.9	0.70	0.32
6	1900	7.4	1.55	0.23
7	9500	6.8	1.22	0.58
10	2500	5.1	0.15	<0.0001
12	4000	3.0	0.07	<0.0001
13	500	7.2	0.33	0.0024
14	460	7.0	0.18	<0.0001
16	590	3.2	0.04	<0.0001

10

【0043】

表7は中央値力価の5-ポイント参照投薬-応答曲線での内挿によるワクチン有効性の決定を示す。テストロットに複数投薬して、少なくとも2つの中央値log2力価が標準曲線の作業範囲にあるようにした。相対的有效性はタンパク質含量によって決定されるワクチン濃度によって分けられる標準曲線から得た。

20

【0044】

【表 7】

Lot No.	MW, kDa	NANA, %	Rel. Potency
6 (Reference)	1900	7.4	1.00
2	1500	8.1	0.94
1	1200	7.8	0.89
7	9500	6.8	1.09
8	2100	6.3	1.45
9	2100	5.8	0.57
10	2500	5.1	0.15
11	2500	4.8	0.17
12	4000	3.0	0.06
13	500	7.2	0.41
14	460	7.0	0.06
15	500	7.4	0.32
16	590	3.2	0.01

30

40

【0045】

ここに引用した文書は直接関係のある従来技術であることを意図するものではなく、また本発明の請求の範囲の特許性を考慮するものでもない。これら文書の内容について日付や表示に関する全記述は本出願人が入手できた情報に基づくものでありこれら文書の日付や内容の正確性について何ら容認するものではない。

添付した請求の範囲は好適例を制限なく詳説するものとして取り扱われる。

ほかの場所で示されるものに加えて、次の参考文献はここに参照文献として組み込むが、これらは本出願時の最新の刊行物である。

【0046】

50

ナビゲーター；細胞：実験マニュアル；酵母遺伝学での方法：実験コースマニュアル；ニューロンを発見：神経科学の実験基礎；ゲノム分析：実験マニュアルシリーズ；実験DNA科学；タンパク質精製と特性化のための戦略：実験コースマニュアル；病原性バクテリアの遺伝子分析；PCRプライマー：実験マニュアル；植物分子生物学での方法：実験コースマニュアル；マウス胚を操作する：実験マニュアル；神経系の分子プローブ；分裂酵母を用いた実験：実験コースマニュアル；バクテリア遺伝学のショートコース；エシェリシアコリおよび関連するバクテリアのための実験マニュアルおよびハンドブック；DNA科学：組み替えDNA技術の最初のコース；酵母遺伝学の方法：実験コースマニュアル；植物の分子生物学：実験コースマニュアル。

ここに引用した全参考文献は、関連する米国または外国特許出願の前に刊行された対応するジャーナルやアブストラクトを含め、或いは他の参考文献は、全てのデータ、表、数字、および引用文献に示されたテキストを含め、全体をここに参考文献として組み込む。さらに、ここに引用した参考文献内に引用された参考文献の全内容も全体を参考文献として組み込む。

工程の既知の方法、従来法の工程、既知の方法または従来法の参照は本発明の解釈、記述または実施例が開示され、教示され、または関連した分野で示唆されることを許すものではない。

特定の実施例の前記記述は本発明の一般的性質を完全に示し、他者は、（ここに引用した参考文献の内容を含め）当業者の範囲で知識を応用することにより、本発明の一般的概念から逸脱することなく、過度の実験をすることなく、前記特定例のような種々の応用を容易に変更しおよび／または種々採用することができる。従って、そのような応用や変更はここに示される教示やガイダンスに基づき、開示した好適例の意味および同等の範囲内である。ここにある術語または用語は記述のためのものであり制限するものではないということを理解すべきであり、本明細書の用語または術語はここに示される教示やガイダンスに照らして、当該分野の通常の知識と組み合わせて当業者によって解釈されるべきである。

本発明の実施で有用または好ましいクラスまたは範囲の記述はいずれもそこに含まれる任意のサブクラス（例えば、省略した1以上の開示された部分をもつ開示されたクラス）または下位の範囲、ならびに前記クラスまたは範囲での各部分または重要性の別々の記述であると考える。

好適例の記述は個々に、不可能である組み合わせ（例えば、本発明の要素を相互に排除選択）またはこの明細書で特に排除している組み合わせを除いて、そのような好適例の任意可能な組み合わせの記述であると考える。

この発明の具体例が従来技術に開示されるなら、本発明の記述はそのような摘出された具体例と共にここに開示されたような本発明を含むと考える。

出願人によって企図されたような本発明は、請求の範囲、および請求の範囲にはない組み合わせに示された主題を含むが制限されるものではない。さらに、従来技術に開示された1以上の欠点を解消することに限られた主題を含む。従来技術によって開示または示唆された主題へ請求の範囲が侵食する範囲まで、出願人は削り取られた侵食する主題をもつそのような請求の範囲に相当する発明を予期している。

この明細書で引用された特許、特許出願、書籍、刊行物、およびオンライン源を含む全参考文献は、これら参考文献によって引用された参考文献も同様に、ここに参考文献として組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】 Lot PD020105-08 (9,500 kDa、6.8% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィーを示す図である。

【図2】 Lot 211299-01 (590 kDa、3.2% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィーを示す図である。

【図3】 Lot 040400-RT (460 kDa、7.0% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィーを示す

10

20

30

40

50

図である。

【図 4】 Lot 260100RT (500 k Da、7.2% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィを示す図である。

【図 5】 Lots 040400-RT および 260100RT のサイズ除外クロマトグラフィプロフィルのオーバーレイを示す図である。

【図 6】 Lot 201299-01 (4000 k Da、3% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィを示す図である。

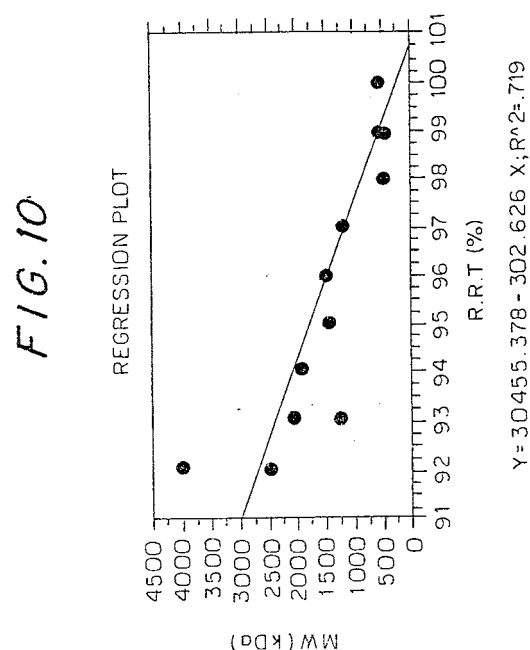
【図 7】 Lot 011299-03 (2600 k Da、5.1% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィを示す図である。

【図 8】 Lot STNK0055 (1200 k Da、7.8% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィを示す図 10

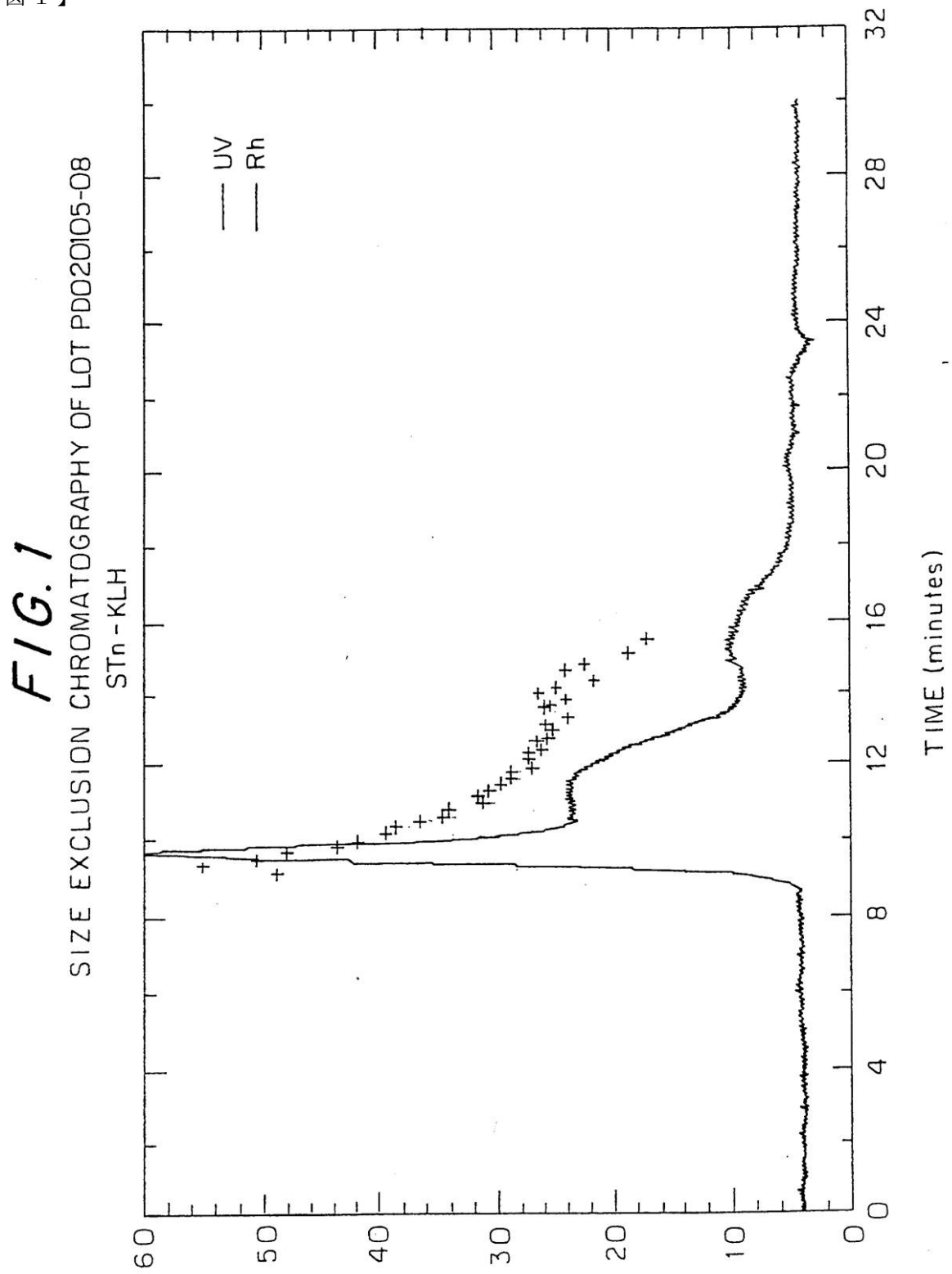
【図 9】 Lot PD029910-03 (1,500 k Da、7.9% NANA) のサイズ除外クロマトグラフィを示す図である。

【図 10】 相対的保持時間% (チログロブリン=100) に対する分子量 (kDa) の回帰プロットである。

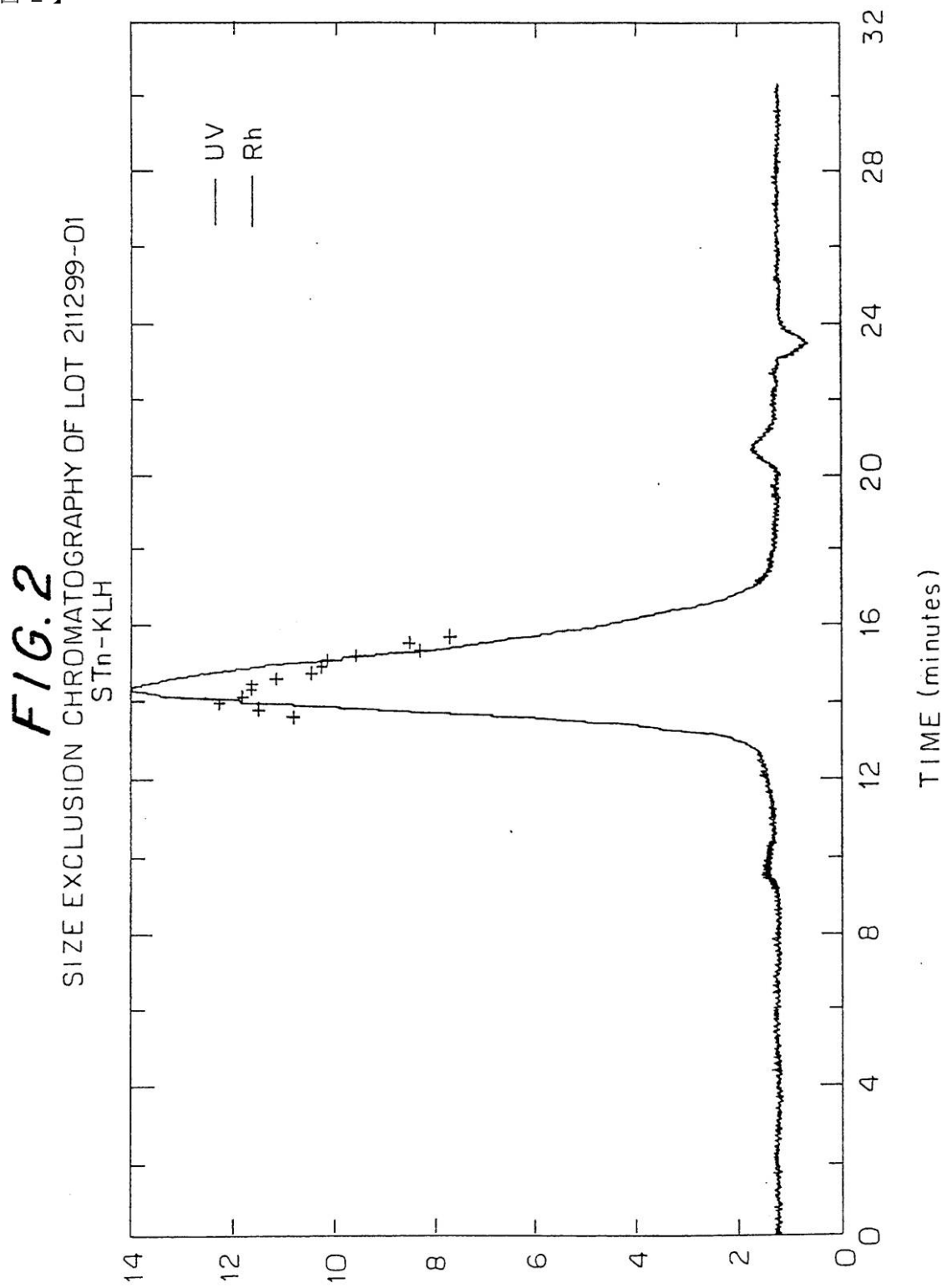
【図 10】



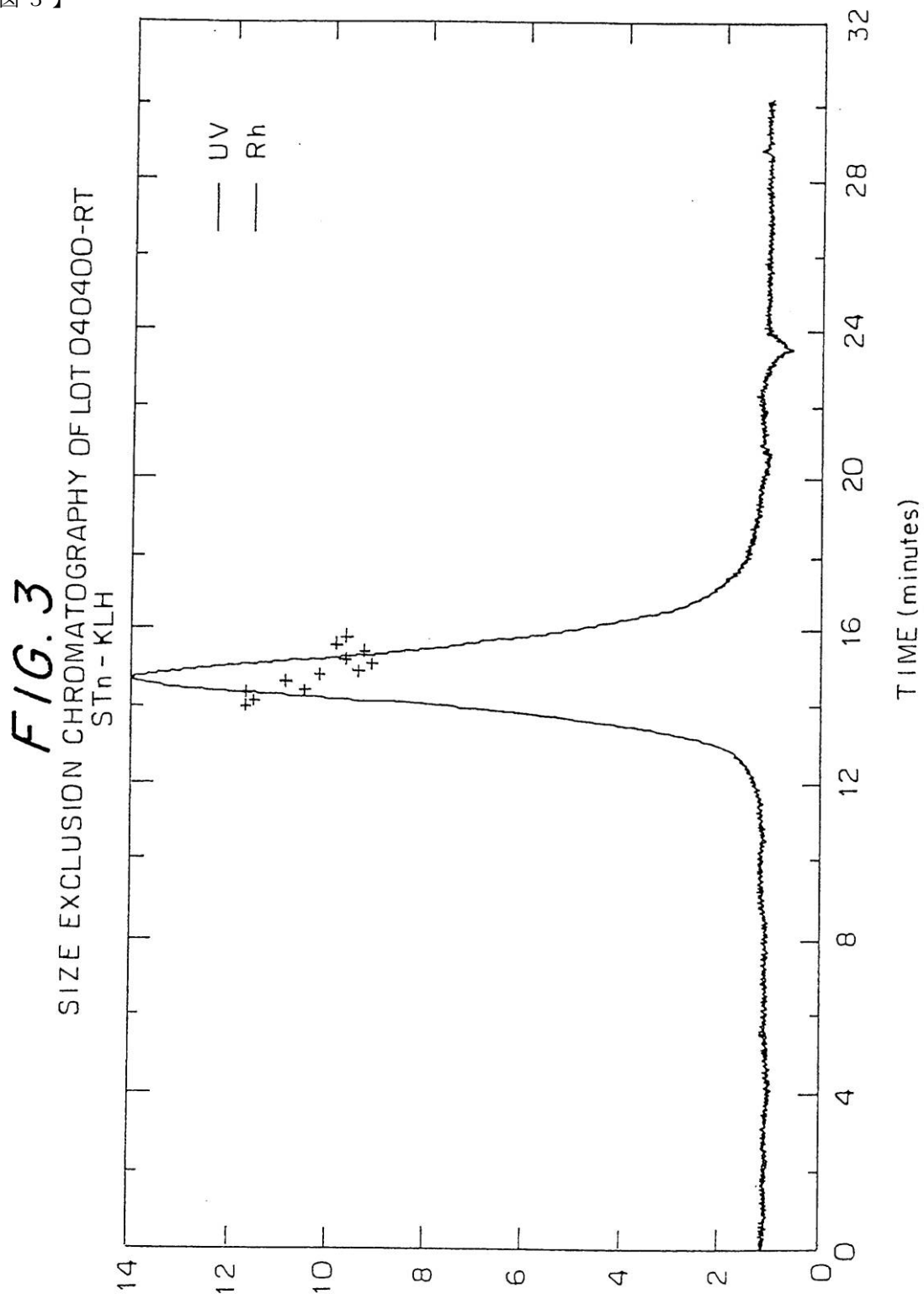
【図 1】



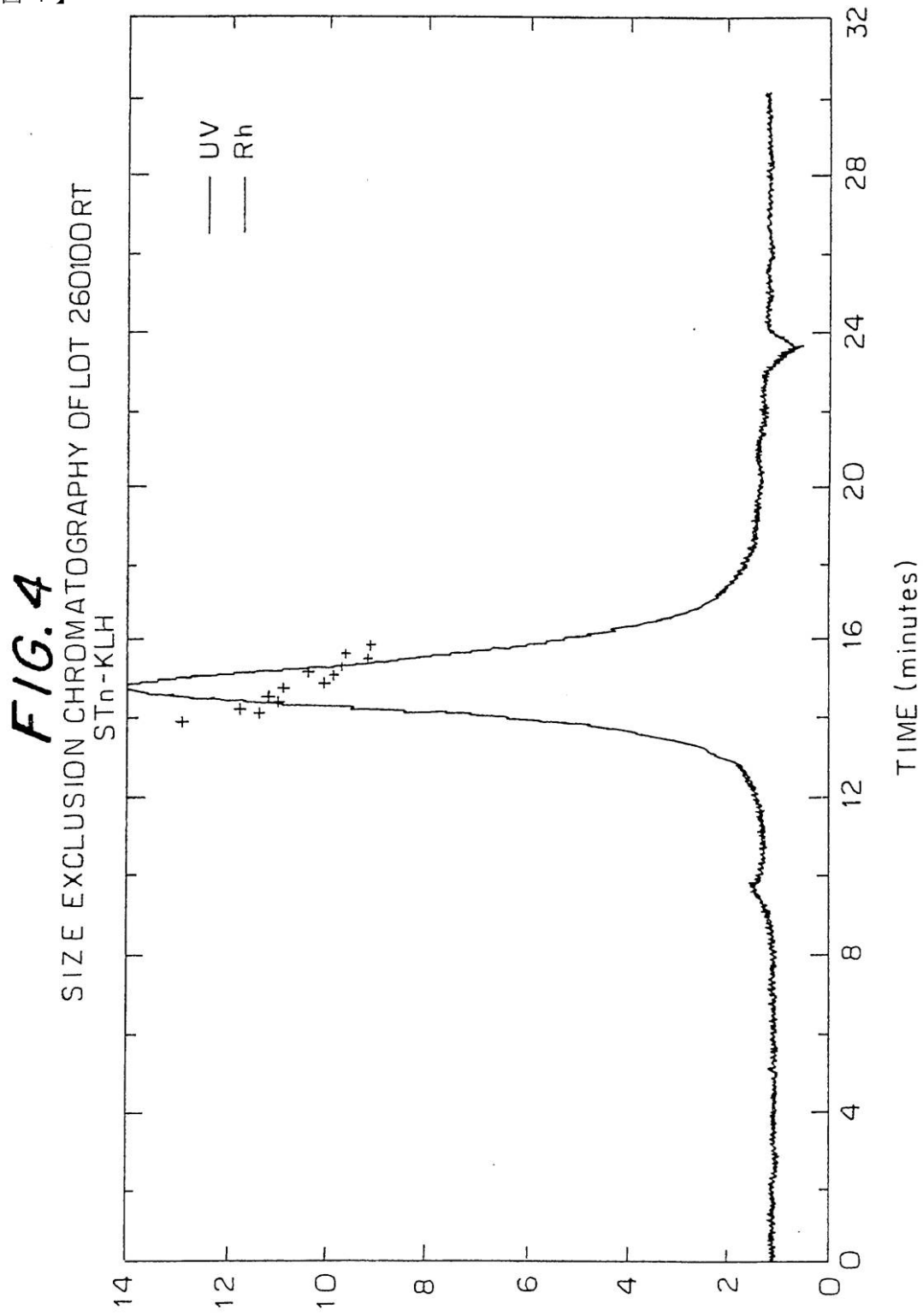
【図 2】



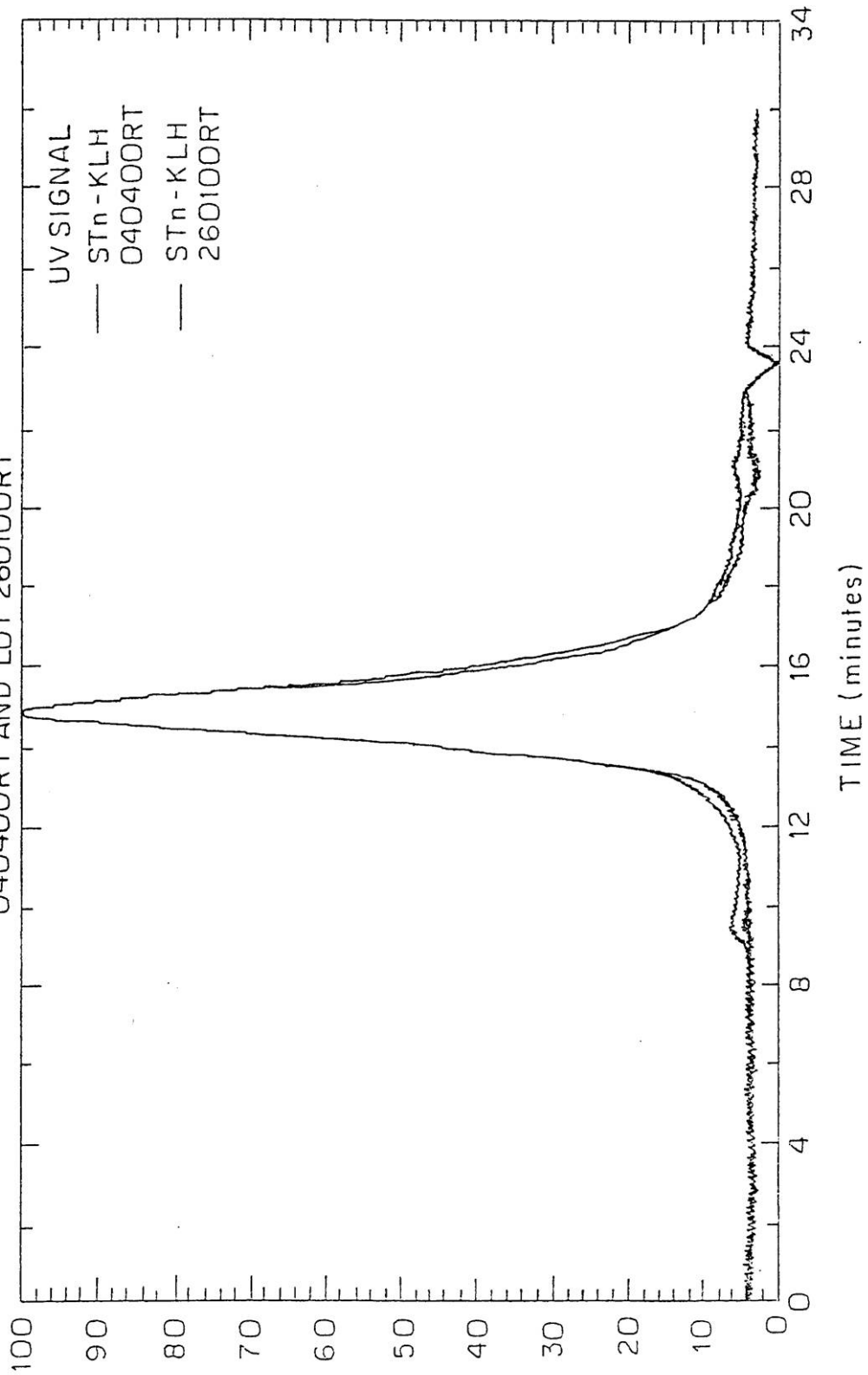
【図 3】



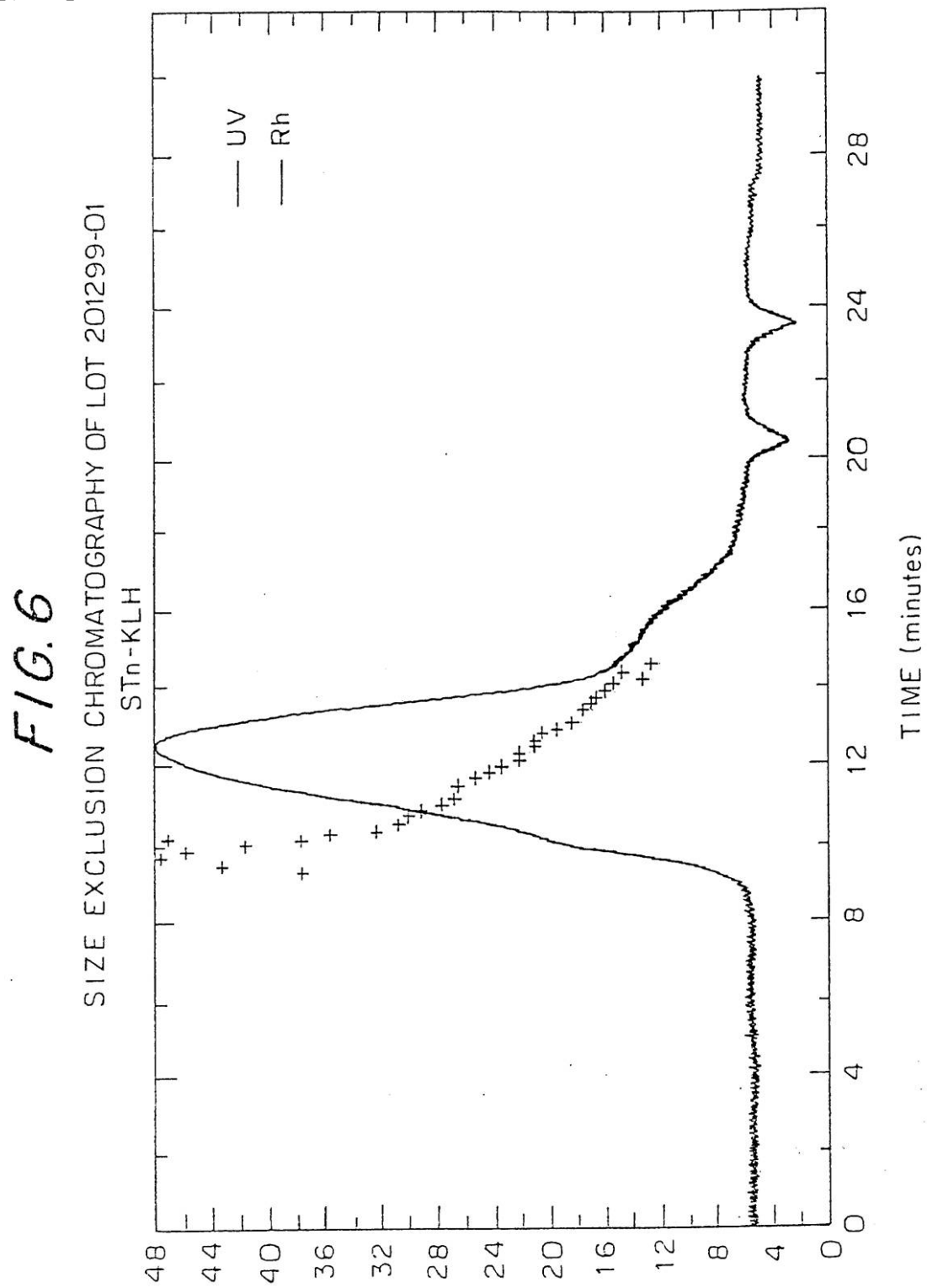
【図 4】



【図 5】

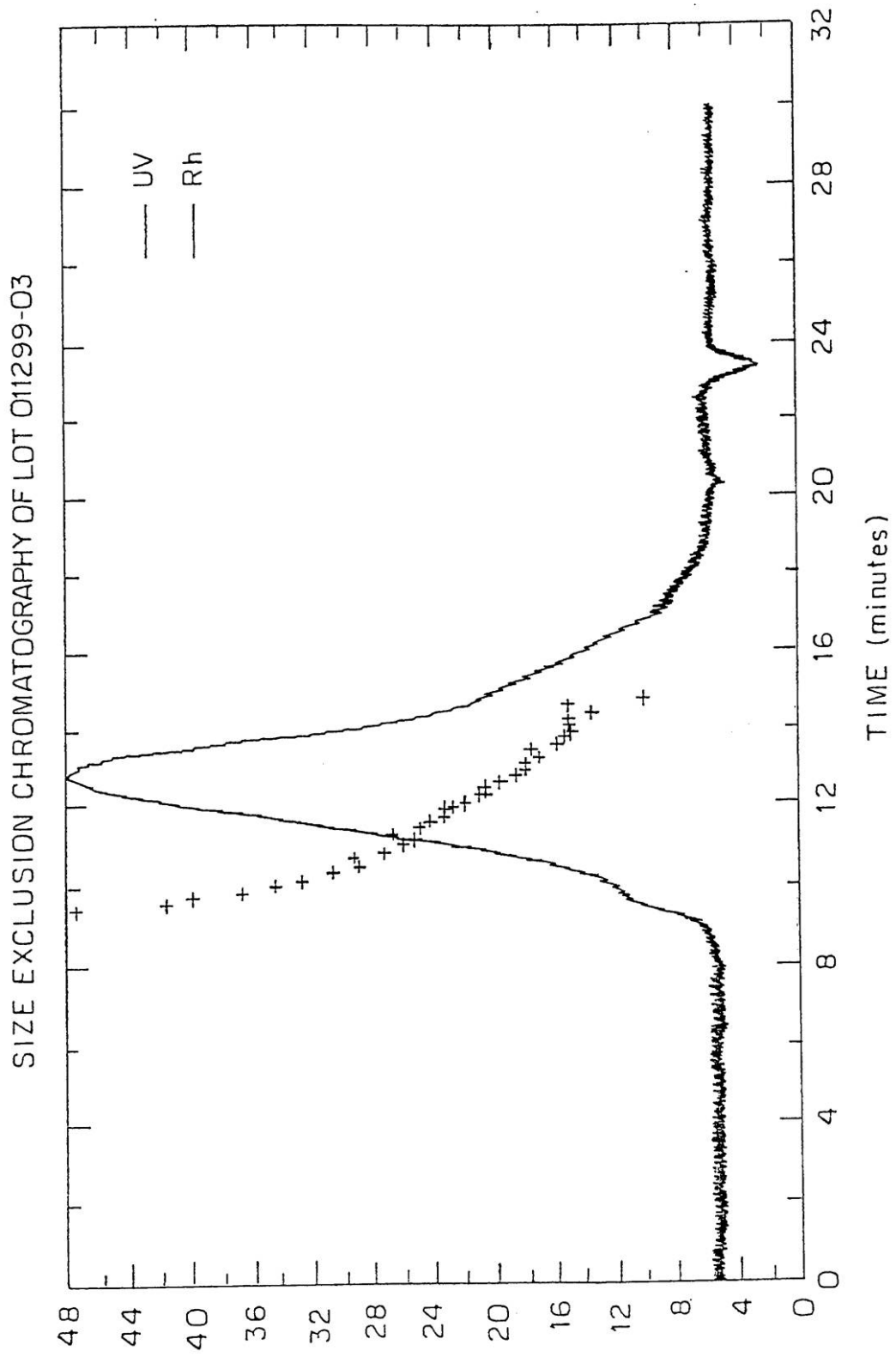
FIG. 5OVERLAY OF SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY PROFILES OF LOT
040400RT AND LOT 260100RT

【図 6】



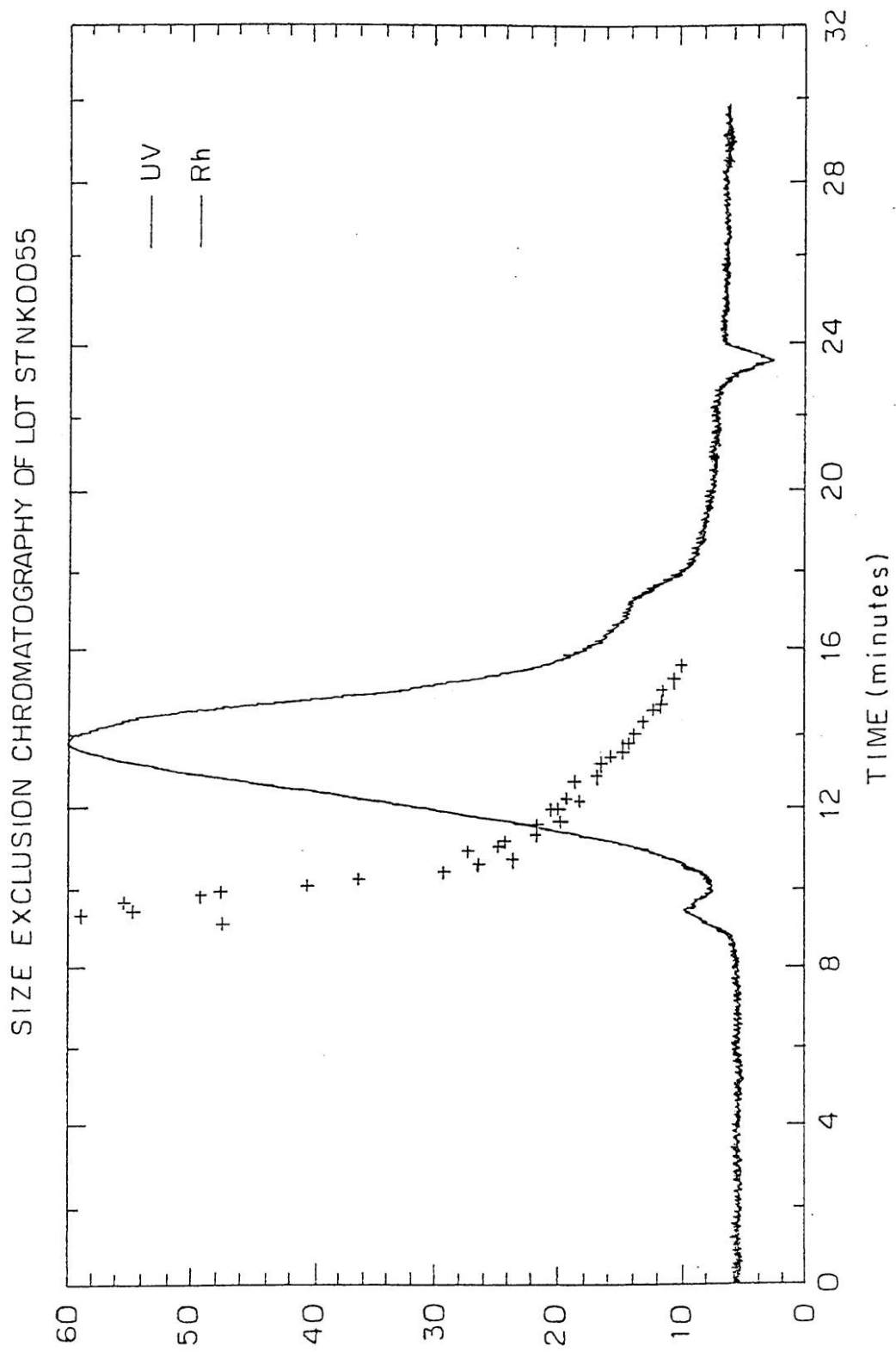
【図 7】

FIG. 7



【図 8】

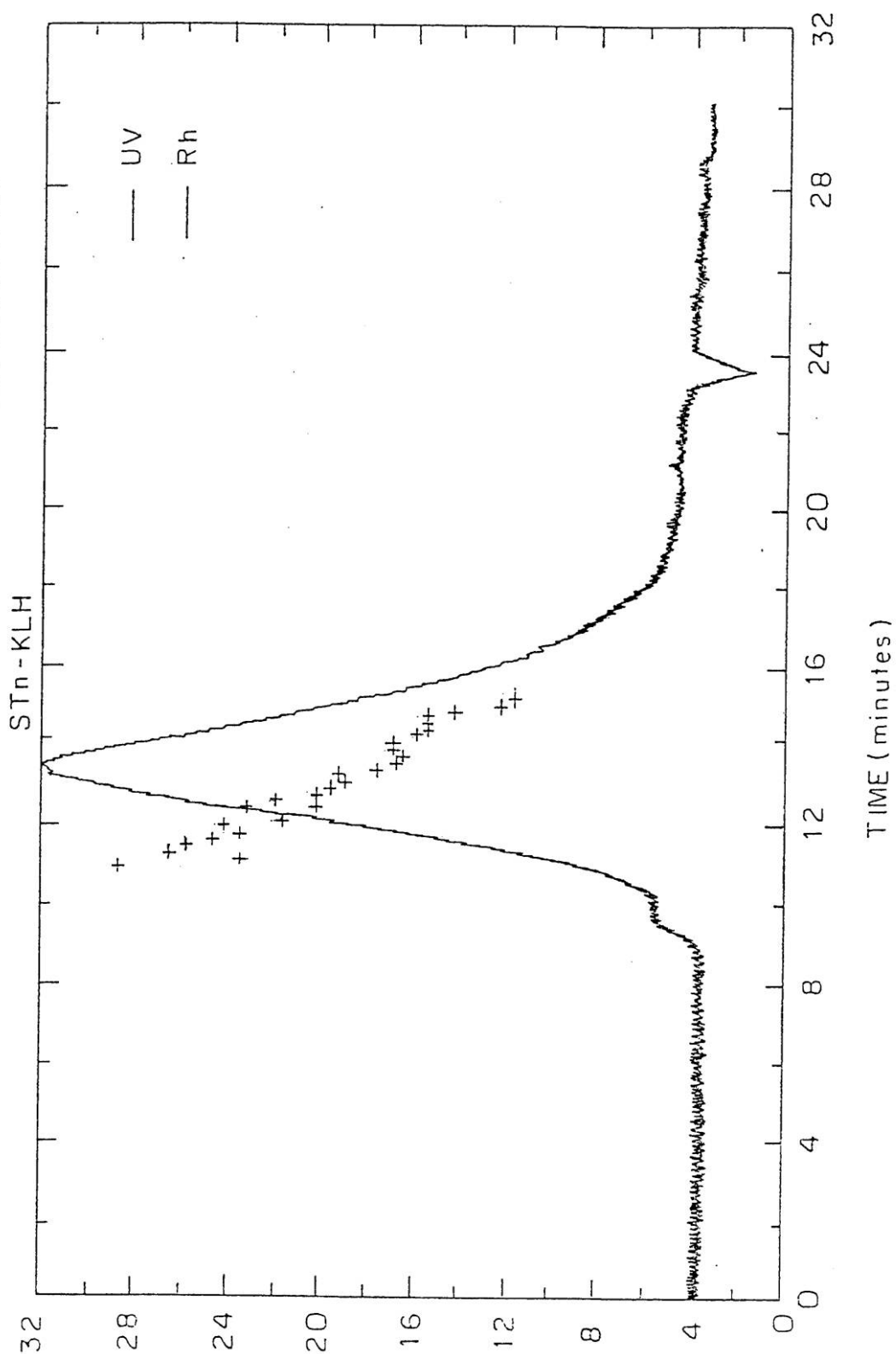
FIG. 8



【図 9】

FIG. 9

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY OF LOT PD029910-03



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/24735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 31/70, 31/715, 38/00; C12N 9/10, 9/20; D21C 3/00

US CL : 514/2, 53, 54, 61, 62; 435/193.1, 198.1, 278.1

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)

U.S. : 514/2, 53, 54, 61, 62; 435/193.1, 198.1, 278.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
noneElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,013,779 A (WONG ET AL) 11 January 2000 (11.01.2000), see column 6, lines 53-56; column 14, lines 36-39; and column 19, lines 11-22.	1-8, 68, 69, and 72-82
X	KUDUK et al. Synthetic and Immunological Studies on Clustered Modes of Mucin-Related Tn and TF O-Linked Antigens: The Preparation of a Glycopeptide-Based Vaccine for Clinical Trials Against Prostate Cancer. Journal of the American Chemical Society. 1998, Vol. 120, pages 12474-12485, see the abstract, page 12475 left column, and page 12476 right column.	1-8, 68, 69, and 72-82
X	WO 95/27505 A1 (BIOMIRA, INC.) 19 October 1995 (19.10.1995), see page 23 lines 17-33, page 27 lines 41-45, and page 38 lines 24-36.	1, 3-8, 68, 69, 77, 78, and 80-82

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

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

Date of the actual completion of the international search

10 September 2002 (10.09.2002)

Date of mailing of the international search report

05 NOV 2002

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Kathleen Kauter Fonda, Ph.D.

Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/24735

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

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
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:
3. ☒ Claim Nos.: 9-67, 70, and 71
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24735

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

databases: EAST, HCAPLUS, Biosis, Derwent

search terms: TN, TF, STn, conjugate, "keyhole limpet," KLH, immunoconjugate, immunogen, immunogenic

フロントページの続き

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,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 ロンジェネッカー, ビー., マイケル

カナダ国 アルバータ ティ6アール 1 シィ8, エドモントン, ルーニィ クレセント 440

(72)発明者 コガンティ, アール., ラオ

カナダ国 アルバータ ティ6ジェイ 3アール3, エドモントン, 11605-26アヴェニュー

(72)発明者 ウォン, チン, チ

カナダ国 アルバータ ティ6アール 1 エクス3, エドモントン, バーレイ ドライブ 930

Fターム(参考) 4C076 AA95 EE30A EE59A FF32 FF63

4C085 AA03 BB11 DD51 EE01 EE05 FF14