(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6383740号
(P6383740)
(45)発行日　平成30年8月29日(2018.8.29)　(24)登録日　平成30年8月10日(2018.8.10)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	ZNA
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08	
C12N 15/117	(2010.01)	C12N	15/117	Z
C08B 37/00	(2006.01)	C08B	37/00	C
C07H 21/00	(2006.01)	C07H	21/00	

請求項の数 14　(全 25 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-561185(P2015-561185)
(86)(22)出願日　平成26年12月25日(2014.12.25)
(86)国際出願番号　PCT/JP2014/084374
(87)国際公開番号　WO2015/118789
(87)国際公開日　平成27年8月13日(2015.8.13)
審査請求日　平成28年8月1日(2016.8.1)
(31)優先権主張番号　特願2014-21333(P2014-21333)
(32)優先日　平成26年2月6日(2014.2.6)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　100139262
弁理士　中嶋　和昭
(72)発明者　櫻井　和朗
福岡県北九州市若松区ひびきの１番１号
公立大学法人北九州市立大学　国際環境工学部内
(72)発明者　望月　慎一
福岡県北九州市若松区ひびきの１番１号
公立大学法人北九州市立大学　国際環境工学部内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペプチド／β－１，３－グルカン複合体及びそれを含む医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、

アミノ酸残基数が８～１２の抗原性を有するペプチドが、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と共有結合を介して結合したペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートとを含み、

前記ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートのポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成していることを特徴とするペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項２】

前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖が、シゾフィラン、レンチナン、スクレログルカン及びカードランのいずれかであることを特徴とする請求項１記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項３】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体がポリデオキシアデノシンであることを特徴とする請求項１又は２記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項４】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエ

ステル結合の少なくとも一部がホスホロチオエート基で置換されたポリヌクレオチド誘導体であることを特徴とする請求項１から３のいずれか１項記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項５】

前記ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合のうち少なくとも一部がホスホロチオエート基で置換されたポリヌクレオチド誘導体において、ホスホジエステル結合の５０％以上がホスホロチオエート基で置換されていることを特徴とする請求項４記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項６】

前記ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートを構成する前記抗原性を有するペプチドと前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体とが、アルキンとアジド誘導体との付加環化反応、マレイミド基とチオール基との反応、ペプチドＣ末端のシステイン残基のチオール基とチオール修飾核酸のチオール基との反応のいずれかにより生成した共有結合を介して結合していることを特徴とする請求項１から５のいずれか１項記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項７】

請求項１から６のいずれか１項記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、

免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を更に含み、

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成していることを特徴とするペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項８】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分がポリデオキシアデノシンであることを特徴とする請求項７記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項９】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分が、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合の少なくとも一部がホスホロチオエート基で置換されたポリヌクレオチド誘導体であることを特徴とする請求項７又は８記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項１０】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分において、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合の５０％以上がホスホロチオエート基で置換されていることを特徴とする請求項９記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体。

【請求項１１】

免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と、

請求項１から６のいずれか１項記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体とを含む医薬組成物。

【請求項１２】

前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有するポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体を形成していることを特徴とする請求項１１記載の医薬組成物。

【請求項１３】
前記ポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体を構成する前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖が、シゾフィラン、レンチナン、スクレログルカン及びカードランのいずれかであることを特徴とする請求項１２記載の医薬組成物。
【請求項１４】
請求項７から１０のいずれか１項記載のペプチド／β－１，３－グルカン複合体を含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規なペプチド／β－１，３－グルカン複合体及びその製造方法並びにそれを含む医薬組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
ワクチンによる感染予防の基本的な原理は、人為的な擬似感染により、獲得免疫を誘導し、特定の病原体に対する抗体産生や細胞性免疫を誘導することにある。獲得免疫においては、免疫の「記憶」を担当するＴ細胞やＢ細胞が中心的な役割を果たし、ＤＮＡの再構成による抗体の可変領域の多様性が、無数の抗原への特異的な免疫反応を可能にしていることが知られている。一方、白血球、マクロファージ、樹状細胞等の食細胞が中心的な役割を果たしている自然免疫は、従来、病原体や異物を貪食する非特異的なプロセスであり、獲得免疫成立までの「一時しのぎ」としての役割のみを果たしていると考えられていたが、自然免疫の分子機構に関する研究の進展により、自然免疫においても、自己・非自己の特異的な認識が行われていることや、自然免疫が獲得免疫の成立に必須であることが明らかにされた。より具体的には、樹状細胞、マクロファージ、Ｂ細胞等の抗原提示細胞に存在するＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）ファミリーが、様々な病原体と反応し、サイトカインの産生を誘導し、ナイーブＴ細胞のＴｈ１細胞への分化の促進、キラーＴ細胞の活性化等を通して、獲得免疫を誘導することが、最近の研究により明らかにされた。
【０００３】
一連のＴＬＲファミリーにより認識される病原体の構成成分は多岐にわたるが、その中の１つに、ＴＬＲ９のリガンドである、ＣｐＧ配列を有するＤＮＡ（ＣｐＧ　ＤＮＡ）がある。ＣｐＧ配列は、中心部にシトシン（Ｃ）とグアニン（Ｇ）が並ぶ６個の塩基を基本とする配列で、ほ乳類には少なく、微生物には多く見られる塩基配列である。また、ほ乳類においては、少数存在するＣｐＧ配列の殆どがメチル化を受けている。ほ乳類中に殆ど存在しない非メチル化ＣｐＧ配列は、強力な免疫賦活活性を有している（例えば、非特許文献１～３参照）。エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたＣｐＧ　ＤＮＡは、ファゴソーム様小胞体に存在するＴＬＲ９により認識され、Ｔｈ１反応を強く誘導する。Ｔｈ１反応は、Ｔｈ２反応が優位なアレルギー反応を抑制すると共に、強い抗腫瘍活性を有する。そのため、ＣｐＧ　ＤＮＡは、感染予防に加え、アレルギー疾患、腫瘍性疾患に対するアジュバントとしても期待されている（例えば非特許文献４参照）。
【０００４】
しかし、ＣｐＧ　ＤＮＡを免疫療法のアジュバントとして使用する場合、細胞質や血漿中のヌクレアーゼによる分解や、タンパク質との非特異的な結合を回避しつつ、いかに標的細胞の内部にＣｐＧ　ＤＮＡを到達させるかが問題となる。
【０００５】
本発明者らは、新規な遺伝子キャリアとしてβ－１，３－グルカン骨格を有する多糖（以下、「β－１，３－グルカン」と略称する場合がある。）に着目し、これまでに、β－１，３－グルカンが核酸医薬（アンチセンスＤＮＡ、ＣｐＧ　ＤＮＡ）をはじめとする種々の核酸と新しいタイプの複合体を形成することを見出してきた（例えば、特許文献１、２、非特許文献５～７参照）。
【０００６】

天然では３重らせんで存在するβ－１，３－グルカンを、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）等の非プロトン性極性有機溶媒、或いは０．１Ｎ以上のアルカリ溶液に溶解して１本鎖に解離させた後に、１本鎖の核酸を加え、溶媒を水或いは中性に戻すことによって、核酸１分子とβ－１，３－グルカン２分子とからなる３重らせん複合体が形成することを見出した。この場合、３重らせん複合体におけるβ－１，３－グルカン分子と核酸分子とは、主として水素結合と疎水性相互作用により分子間結合を形成しているものと考えられている（非特許文献８参照）。

【０００７】

上述のように、核酸をβ－１，３－グルカンと複合化することにより、ヌクレアーゼによる核酸分子の加水分解や、血漿タンパク質と核酸との非特異的な結合等の、核酸分子と生体内タンパク質との望ましくない相互作用を抑制しつつ、核酸を細胞の内部に到達させることが可能になった。β－１，３－グルカンと核酸との複合体、さらには抗原性を有するタンパク質を含む３元複合体を利用して、ＣｐＧ　ＤＮＡの細胞内へのデリバリーに成功した（例えば、特許文献３、４、非特許文献９～１１参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際公開第０１／３４２０７号
【特許文献２】国際公開第０２／０７２１５２号
【特許文献３】特開２００７－１７４１０７号公報
【特許文献４】特開２０１０－７０３０７号公報

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Bacterial CpG DNA Activates Immune Cells to Signal Infectious Danger, H. Wagner, Adv. Immunol., 73, 329-368 (1999).
【非特許文献２】CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, M. Krieg, Annu. Rev. Immunol., 20, 709-760 (2002).
【非特許文献３】The discovery of immunostimulatory DNA sequence, S. Yamamoto, T. Yamamoto, and T. Tokunaga, Springer Seminars in Immunopathology, 22, 11-19 (2000).
【非特許文献４】「標準免疫学」第２版、医学書院、２００２年、３３３頁
【非特許文献５】Molecular Recognition of Adenine, Cytosine, and Uracil in a Single-Stranded RNA by a Natural Polysaccharide: Schizophyllan. K. Sakurai and S. Shinkai, J. Am. Chem. Soc., 122, 4520-4521 (2000).
【非特許文献６】Polysaccharide-Polynucleotide Complexes. 2. Complementary Polynucleotide Mimic Behavior of the Natural Polysaccharide Schizophyllan in the Macromolecular Complex with Single-Stranded RNA and DNA. K. Sakurai, M. Mizu and S. Shinkai, Biomacromolecules, 2, 641-650 (2001).
【非特許文献７】Dectin-1 targeting delivery of TNF-α antisense ODNs complexed with β-1,3-glucan protects mice from LPS-induced hepatitis. S. Mochizuki and K. Sakurai, J. Control. Release, 151 (2011) 155-161.
【非特許文献８】Structural Analysis of the Curdlan/Poly (cytidylic acid) Complex with Semiempirical Molecular Orbital Calculations. K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai and S. Shinkai, Biomacromolecules, 6, 1540-1546 (2005).
【非特許文献９】A Polysaccharide Carrier for Immunostimulatory CpG DNAs to Enhance Cytokine Secretion, M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki and K. Sakurai, J. Am. Chem. Soc., 126, 8372-8373 (2004).
【非特許文献１０】Protection of Polynucleotides against Nuclease-mediated H

ydrolysis by Complexation with Schizophyllan, M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, K. Sakurai and S. Shinkai, Biomaterials, 25, 15, 3109-3116 (2004).

【非特許文献１１】Synthesis and in Vitro Characterization of Antigen-Conjugated Polysaccharide as a CpG DNA Carrier, N. Shimada, K. J. Ishii, Y. Takeda, C. Coban, Y. Torii, S. Shinkai, S. Akira and K. Sakurai, Bioconjugate Chem., 17 1136-1140 (2006).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

しかしながら、上記従来の技術は、以下のような課題を有していた。例えば、非特許文献１１記載のβ－１，３－グルカン／抗原性を有するタンパク質／ＣｐＧ　ＤＮＡの３元複合体の製造方法においては、過ヨウ素酸酸化により、β－１，３－グルカンの側鎖のグルコース残基上にホルミル基を生成させ、還元的アミノ化反応により、ホルミル基と抗原性を有するペプチド（以下、「抗原性ペプチド」と略称する場合がある。）のアミノ基とを反応させ、β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドとが共有結合した複合体を形成するが、収率がきわめて低いという課題を有していた。かかる事情に鑑みて、例えば、特許文献４記載のβ－１，３－グルカン／抗原性タンパク質（抗原性ペプチド）／ＣｐＧ　ＤＮＡの３元複合体の製造方法においては、側鎖にホルミル基を有するβ－１，３－グルカンと抗原性ペプチドとを、アルカリ水溶液中で反応させると同時に中和を行なう、或いはアルカリ水溶液中で反応させて逐次中和を行なうことにより、β－１，３－グルカンの側鎖上のホルミル基と抗原性ペプチドのアミノ基との反応性及び収率を向上させている。しかしながら、ペプチドには複数のアミノ基が存在するため、反応点の制御が困難である。したがって、抗原性ペプチドの反応位置による免疫原性の違いや、β－１，３－グルカンとの反応生成物が複雑な混合物となることに起因する分離精製の困難性等の問題の発生が懸念される。また、水素結合による複合体形成を利用したβ－１，３－グルカンとＤＮＡとの複合体の形成に比べ、β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドの共有結合の形成に基づく複合体の形成は煩雑である。これらの点において、特許文献４記載のβ－１，３－グルカン／抗原性ペプチド／ＣｐＧ　ＤＮＡの３元複合体の製造方法は、生産性等の点で依然として課題を有している。

【００１１】

本発明はかかる事情に鑑みてなされたもので、生産性に優れ、高い免疫賦活活性を有するペプチド／β－１，３－グルカン複合体及びその製造方法並びにそれを含む医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明の第１の態様は、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、アミノ酸残基数が８～１２の抗原性を有するペプチドが、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と共有結合を介して結合したペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートとを含み、前記ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートのポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成していることを特徴とするペプチド／β－１，３－グルカン複合体を提供することにより上記課題を解決するものである。

【００１５】

本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖が、シゾフィラン、レンチナン、スクレログルカン及びカードランのいずれかであることが好ましい。

【００１６】

本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体がポリデオキシアデノシンであってもよい。

【００１７】

本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合の少なくとも一部がホスホロチオエート基で置換されたポリヌクレオチド誘導体であることが好ましい。

【００１８】

本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、ホスホジエステル結合の５０％以上がホスホロチオエート基で置換されていてもよい。

【００１９】

本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートを構成する前記抗原性を有するペプチドと前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体とが、アルキンとアジド誘導体との付加環化反応、マレイミド基とチオール基との反応、ペプチドＣ末端のシステイン残基のチオール基とチオール修飾核酸のチオール基との反応のいずれかにより生成した共有結合を介して結合していてもよい。

【００２２】

本発明の第２の態様は、本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を更に含み、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成していることを特徴とするペプチド／β－１，３－グルカン複合体を提供することにより上記課題を解決するものである。

【００２３】

本発明の第２の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分がポリデオキシアデノシンであることが好ましい。

【００２４】

本発明の第２の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分が、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合の少なくとも一部がホスホロチオエート基で置換されたポリヌクレオチド誘導体であることが好ましい。

【００２５】

本発明の第２の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の、前記三重螺旋構造を有する複合体を形成する部分において、ＤＮＡ又はＲＮＡのホスホジエステル結合の５０％以上がホスホロチオエート基で置換されていてもよい。

【００２７】

本発明の第３の態様は、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と、本発明の第１の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体とを含む医薬組成物を提供することにより上記課題を解決するものである。

【００２８】

本発明の第３の態様に係る医薬組成物において、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、水素結合を介して結合し、前記ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有するポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体を形成していてもよい。

【００２９】
本発明の第３の態様に係る医薬組成物において、前記ポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体を構成する前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖が、シゾフィラン、レンチナン、スクレログルカン及びカードランのいずれかであることが好ましい。
【００３０】
本発明の第４の態様は、本発明の第２の態様に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体を含む医薬組成物を提供することにより上記課題を解決するものである。
【発明の効果】
【００３１】
本発明によると、以下のような有利な効果が得られる。
（１）β－１，３－グルカン及び抗原性ペプチドの種類、分子量、組み合わせ等に応じて、β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドとの結合様式を、β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドとの共有結合、β－１，３－グルカンとペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートのポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体との間の水素結合から選択できるので、広範なβ－１，３－グルカンと抗原性ペプチドの組み合わせについて、ペプチド／β－１，３－グルカン複合体を得ることができる。
【００３２】
（２）β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドとの共有結合を生成させる反応として、アルキンとアジド誘導体との付加環化反応、マレイミド基とチオール基との反応（マイケル付加反応）のいずれかを用いることにより、水を含む極性溶媒中でも迅速かつ高効率に反応を進行させることができる。したがって、短時間に高収率でペプチド／β－１，３－グルカン複合体が得られ、単離精製に要する手間も軽減することが可能になる。したがって、本発明のペプチド／β－１，３－グルカン複合体は、生産性に優れており、低コストで製造することができる。
【００３３】
（３）本発明のペプチド／β－１，３－グルカン複合体を用いることにより、抗原性ペプチドを単独で使用した場合に比べ、抗原性ペプチドに特異的な免疫応答の誘導をより効果的に行うことができる。
【００３４】
（４）本発明のペプチド／β－１，３－グルカン複合体を、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と組み合わせて用いるか、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を更に含み、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、β－１，３－グルカンと水素結合を介して結合し、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本とβ－１，３－グルカンの分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成しているペプチド／β－１，３－グルカン複合体を用いることにより、より効果的に免疫応答の誘導を行うことができる。
【００３５】
（５）本発明のペプチド／β－１，３－グルカン複合体を含む医薬組成物は、抗原性ペプチドを単独で用いた場合よりも、広範な抗原性ペプチドについて、特異的な免疫応答をより効果的に誘導できる。そのため、ワクチンや免疫賦活剤としての応用が期待できる。
【図面の簡単な説明】
【００３６】
【図１】実施例１における、ｄＡ４０（Ｓ）（ａｌｋｙｎｅ）とＯＶＡ（Ｎ３）の化学構造である。
【図２】実施例１における、抗原性ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲート体作製の結果を示すＨＰＬＣクロマトグラムである。
【図３】実施例２における、抗原性ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）とＳＰＧの複合化の結果を示すゲル電気泳動写真である。
【図４】実施例３における、各サンプルで免疫誘導したマウスの脾臓細胞を抗原性ペプチ

ドで刺激することで産生された、抗原性ペプチド特異的ＩＦＮ－γの産生量を定量した結果を示すグラフである。

【図５】実施例４における、各サンプルで免疫誘導したマウスの脾臓細胞を抗原性ペプチドで刺激し増殖した、抗原性ペプチド特異的細胞傷害性Ｔ細胞の割合を示すグラフである。

【図６】実施例５における、ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体の作製の結果を示すゲル電気泳動写真である。

【図７】実施例６における、各サンプルで免疫誘導したマウスの脾臓細胞を抗原性ペプチドで刺激することで産生された、抗原性ペプチド特異的ＩＦＮ－γの産生量を定量した結果を示すグラフである。

【図８】実施例７における、各サンプルで免疫誘導したマウスの脾臓細胞を抗原性ペプチドで刺激し増殖した、抗原性ペプチド特異的細胞傷害性Ｔ細胞の割合を示すグラフである。

【図９】実施例８における、各サンプルで免疫誘導したマウスの脾臓細胞を抗原性ペプチドで刺激することで産生された、抗原性ペプチド特異的ＩＦＮ－γの産生量を定量した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００３７】

以下、本発明を具体化した実施の形態につき説明し、本発明の理解に供する。

本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体は、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖（β－１，３－グルカン）と、抗原性を有するペプチド（抗原性ペプチド）が、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と共有結合を介して結合したペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートとを含んでいる。ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートのポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、β－１，３－グルカンと、水素結合を介して結合し、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカンの分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成している。

【００３８】

（１）β－１，３－グルカン

β－１，３－グルカンは、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本とβ－１，３－グルカンの分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体を形成することができるものであれば、任意の種類、分子量のものを特に制限なく用いることができる。β－１，３－グルカン骨格を有する多糖は、ｐｏｌｙ（Ｃ）等の核酸と近似するヘリックスパラメータを有しており（例えば、高橋、小畠、鈴木、Ｐｒｏｇ．　Ｐｏｌｙｍ．　Ｐｈｙｓ．　Ｊｐｎ．２７巻、７６７ページ、及び「Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ」、Ｓｈａｒｗｏｏｄ　ａｃａｄｅｍｉｃ　ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ、１９９８年を参照）、核酸塩基と水素結合可能な水酸基を有しているため、核酸と相互作用し、三重らせん構造を有する安定な複合体を形成することが知られている。β－１，３－グルカンの具体例としては、シゾフィラン、カードラン、レンチナン、パキマン（ｐａｃｈｙｍａｎ）、グリホラン、スクレログルカン等が挙げられる。これらは、主鎖がβ－結合（β－Ｄ－結合）により結合したグルカンで、側鎖の頻度が異なる天然の多糖である。これらのβ－１，３－グルカンは、化学修飾等の処理を行うことなくそのまま用いてもよいが、通常の過ヨウ素酸化法を用いてその側鎖を適当に間引くことにより、その溶解性を制御することもできる。

【００３９】

β－１，３－グルカンの分子量は、ペプチド／ヌクレオチドコンジュゲートに含まれるポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の塩基配列及び塩基長等に応じて適宜調節される。しかし、分子量が小さいと、いわゆるクラスター効果（高分子系の協同現象）が発現し難くなり好ましくない。通常は、核酸と複合体を形成しうるβ－１，３－グルカンの重量平均分子量（分子鎖１本あたり）としては、核酸塩基の種類や高次構造によって異

なるが、好ましくは２０００以上、さらに好ましくは４０００以上、より好ましくは６０００以上である。また、ポリヌクレオチド上の核酸塩基と水素結合を形成する水酸基の数は、通常は、５個以上、好ましくは、８個以上、さらに好ましくは、１０個以上必要である。

なお、β－１，３－グルカンの重量平均分子量は、光散乱法、沈降速度法（超遠心法）等の任意の公知の方法を用いて決定することができる。

【００４０】

β－１，３－グルカンは、一般に菌類や真性細菌によって産生されるため、これらの微生物を培養後、菌体をホモゲナイズし、細胞溶出分や不溶性残渣等の不純物から超遠心法等の方法により単離することにより得ることができる。一般に、このようにして得られるβ－１，３－グルカンは高分子量（重量平均分子量が数十万程度）で三重らせん構造を取る。必要に応じて低分子化して用いてもよい。低分子化は、β－１，３－グルカンの種類や所望の分子量に応じて、酵素分解、酸加水分解等から適宜適当な方法及び条件を選択して行う。例えば、シゾフィランの場合には、８０％ＤＭＳＯ－硫酸による加水分解等により、種々の分子量を有する一本鎖シゾフィランを得ることができる。

【００４１】

（２）ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲート

ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートは、抗原性ペプチドと、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体とが、共有結合を介して結合した複合体である。抗原性ペプチドに結合させたポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、上述のとおり、β－１，３－グルカンとの間で三重螺旋構造を有する複合体を形成させることにより、抗原性ペプチドとβ－１，３－グルカンとを結合させる役割を果たす。

【００４２】

「抗原性を有するペプチド」としては、抗原性を有するもの、すなわち、生体の免疫系において異物であると認識され、特異的な抗体産生を引き起こす（免疫応答を誘導する）ものであれば、任意のアミノ酸配列及びアミノ酸残基数を有するものを、特に制限なく用いることができる。本実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造に用いられる抗原性ペプチドとしては、食物アレルギー等のアレルギーの原因となるタンパク質、細菌、ウィルス等の病原体、腫瘍細胞等を起源とするタンパク質のうち、エピトープとして作用しうる部分アミノ酸配列を有するものが挙げられる。抗原性ペプチドを構成するアミノ酸残基数は、エピトープとして作用しうる限りにおいて特に制限されないが、多くの場合、５～３０の範囲内であり、大部分は、８～１７程度の範囲内にある。

【００４３】

抗原性ペプチドは、起源となるタンパク質の酵素分解、ペプチド合成等の任意の公知の方法を用いて得ることができる。また、抗原性ペプチドのアミノ酸配列は、ペプチドアレイを用いたエピトープ解析等の任意の公知の方法を用いて決定することができる。

【００４４】

抗原性ペプチドに結合させるポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、上述のとおり、β－１，３－グルカンとの間で三重螺旋構造を有する複合体を形成できる限りにおいて、任意の塩基配列及び塩基数を有するポリヌクレオチド又はその誘導体を特に制限なく用いることができる。ポリヌクレオチドの具体例としては、β－１，３－グルカンと結合能が高いポリリボアデニル酸（ｐｏｌｙＡ）、ポリリボシチジル酸（ｐｏｌｙＣ）、ポリデオキシリボアデニル酸（ｐｏｌｙ（ｄＡ））、ポリデオキシリボチミジル酸（ｐｏｌｙ（ｄＴ））が挙げられる。ポリヌクレオチドの塩基数は、上述のとおり、β－１，３－グルカンとの間で三重螺旋構造を有する複合体を形成できる限りにおいて特に制限されないが、複合体形成能を向上させるために、ポリヌクレオチドは、β－１，３－グルカンと結合能が高いポリリボアデニル酸（ｐｏｌｙＡ）、ポリリボシチジル酸（ｐｏｌｙＣ）、ポリデオキシリボアデニル酸（ｐｏｌｙ（ｄＡ））、ポリデオキシリボチミジル酸（ｐｏｌｙ（ｄＴ））のいずれかの繰り返し配列を有していることが好ましい。好ましい繰り返し配列を構成する塩基及びヌクレオチドの種類並びに塩基数は、リボヌクレオチド部分

の長さ、用いられるβ－１，３－グルカンの種類および分子量等に応じて適宜決定される。例えば、β－１，３－グルカンとしてシゾフィランが用いられる場合には、ポリデオキシヌクレオチド部分が、繰り返し配列としてｐｏｌｙ（ｄＡ）配列を有していることが好ましい。繰り返し配列の長さは、塩基数が少ないと、β－１，３－グルカンとの水素結合による三重螺旋構造の形成が困難であるため、塩基数は、１０以上である必要があり、２０～８０であることが好ましく、３０～８０であることが更に好ましい。

【００４５】

ポリヌクレオチドは、生体内でヌクレアーゼによる分解を受けやすいので、生体内での安定性を向上させるために、ポリヌクレオチドの代わりにポリヌクレオチド誘導体を用いてもよい。ポリヌクレオチド誘導体の例としては、リボヌクレオチドの２'位のヒドロキシル基の全部又は一部がフッ素又はメトキシ基で置換されているもの、ポリリボヌクレオチド（ＲＮＡ）又はポリデオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）のホスホジエステル基の全部又は一部がホスホロチオエート基で置換されているもの等が挙げられる。ポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドのホスホジエステル基の一部がホスホロチオエート基で置換されている場合、ホスホジエステル結合の５０％以上がホスホロチオエート基で置換されていることが好ましい。ホスホロチオエート基で置換されるホスホジエステル基の位置は特に制限されず、連続した複数のホスホジエステル基が置換されていてもよく、或いはホスホロチオエート基が互いに隣り合わないように置換されていてもよい。

【００４６】

ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、抗原性ペプチドのＮ末端、Ｃ末端、或いは側鎖のいずれに結合していてもよい。両者は、適当な反応性官能基同士の反応により直接結合していてもよく、適当なスペーサーを介して結合していてもよい。反応性官能基としては、抗原性ペプチド及びポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体に存在する官能基をそのまま、或いは化学修飾により活性化したものを用いてもよいが、適当な反応性官能基を導入してもよい。また、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、５'末端側が抗原性ペプチドと結合していてもよく、３'末端側が結合していてもよい。

【００４７】

好ましいペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートの一例は、下記の式（Ａ）に示すように、ペプチドのＣ末端側に、ホスホロチオエート化ポリデオキシアデニル酸（ｐｏｌｙＡのホスホジエステル基がホスホロチオエート基に置換されたポリヌクレオチド誘導体）の５'末端側が結合した構造を有している。

［抗原性ペプチド］－Ｘ－（ｄＡ（Ｓ））$_x$　　（Ａ）

【００４８】

なお、式（Ａ）において、ｄＡ（Ｓ）は、ホスホロチオエート化デオキシアデニル酸を表し、ｘは、例えば２０以上８０以下の整数である。Ｘは、スペーサー又は反応性官能基同士の反応により形成された官能基を表す。スペーサーの一例としては、アルキル基、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等が挙げられる。反応性官能基の組み合わせの例としては、例えば、バイオチップ表面への生体分子の固定に用いられる反応性官能基同士の組み合わせが挙げられ、より具体的には、下記に示すものが挙げられる。

【００４９】

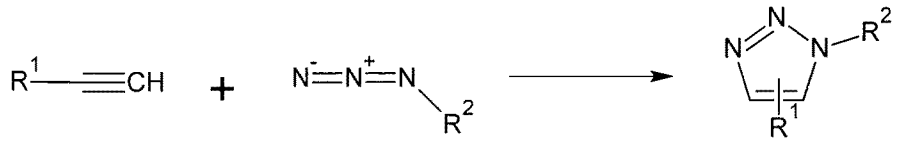
（ａ）アルキンとアジド化合物

アルキンとアジド化合物（アジ化物）は、下記に示すような付加環化反応（フイスゲン反応）により、１，２，３－トリアゾール環を形成する。両者は、生体分子を含む多くの有機化合物に導入可能な安定な官能基であり、水を含む溶媒中でも迅速かつほぼ定量的に反応し、殆ど副反応を伴わず、余分な廃棄物を生成しないため、いわゆる「クリックケミストリー」の中心的な反応として、生化学の分野で広く用いられている。アルキン誘導体及びアジド基は、任意の公知の方法を用いて、抗原性ペプチド又はポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド誘導体に導入することができる。アルキン誘導体としては、プロパルギルアルコール、プロパルギルアミン等の反応性官能基を有するものが容易に入手でき、これらをカルボキシル基やヒドロキシル基等の反応性官能基と直接反応させ、或いはカ

ルボニルジイミダゾール等と共に反応させ、生成するアミド結合、エステル結合、ウレタン結合等を介してアルキン誘導体を導入することができる。アジド基についても、任意の公知の方法を用いて、抗原性ペプチド又はポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド誘導体に導入することができる。なお、フイスゲン反応は銅触媒の存在下で行われるが、抗原性ペプチド及びリン酸ジエステル基がホスホロチオエート基等の含硫黄官能基で置換されたポリヌクレオチド誘導体には、銅イオンに配位する硫黄原子が存在するため、銅の触媒活性が低下するおそれがある。反応率を向上させるために過剰量の銅を添加することが好ましい。

【００５０】

【化１】



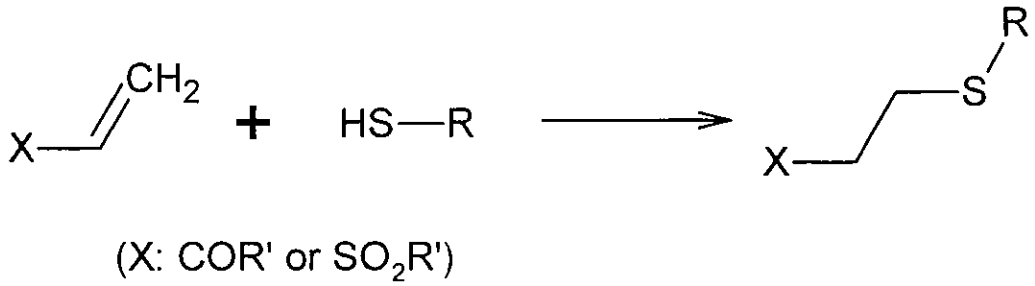
【００５１】

（ｂ）マレイミド又はビニルスルホンとチオール基

電子求引性のカルボニル基又はスルホン基に隣接する二重結合を有するマレイミド又はビニルスルホンは、中性付近のｐＨで、下記に示すように、チオール基との付加反応（マイケル付加反応）により、安定なチオエーテル誘導体を生成する。適当なスペーサーを有するマレイミド及びビニルスルホン誘導体が市販されているため、抗原性ペプチド又はポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド誘導体にこれらの官能基を導入することは容易である。抗原性ペプチドにチオール基を導入する場合、システインを含む抗原性ペプチドの場合には、システイン残基側鎖のチオール基を利用できる。ただし、システインは、存在比が低いアミノ酸であるため、抗原性ペプチドのＣ末端側にシステインを導入したものを用いる。チオール基を含むポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体としては、これらの５'末端のヒドロキシル基をチオール基に変換したチオール化ポリヌクレオチドが用いられる。

【００５２】

【化２】



【００５３】

（ｃ）システイン側鎖のチオール基とチオール化ポリヌクレオチドのチオール基

上述のとおり、Ｃ末端側にシステインを導入した抗原性ペプチドのシステイン残基側鎖のチオール基と、チオール化ポリヌクレオチドのチオール基とを反応させ、ジスルフィド基を形成させる。ジスルフィド結合は、還元剤の存在下で切断されるため、上両者に比べ、安定性の点で劣る。

【００５４】

（３）ペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造

シゾフィラン等のβ－１，３－グルカンは、通常、水中で三重らせん構造を呈している。したがって、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と複合体を形成するためには、ＤＭＳＯのような溶媒に溶解して分子間水素結合及び疎水性相互作用による会合状態を解いて一本鎖にする。これにポリヌクレオチドを含有する水溶液（又はアルコール等の極性溶媒の溶液）を添加してゆくと、溶媒の極性の増大に伴い、疎水性相互作用によりポ

リヌクレオチドとβ－１，３－グルカンとが会合し、ポリヌクレオチドの分子鎖を取り込みながら分子内及び分子間でポリヌクレオチドと多糖との会合体が形成される。その結果、１分子のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と２分子のβ－１，３－グルカン分子とからなる三重螺旋構造を有する複合体が形成される。複合体の形成は、例えば、ＣＤ（円偏光二色性）スペクトルを測定することにより、コンホメーション変化を調べることによって確認することができる。

【００５５】

本発明の第２の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体は、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖と、アルキンとアジド誘導体との付加環化反応、マレイミド基又はビニルスルホン基とチオール基との反応のいずれかにより生成した共有結合を介して、前β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の主鎖又は側鎖上のグルコース残基に結合した抗原性を有するペプチドとを含んでいる。

【００５６】

本実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造に用いられる抗原性ペプチド、β－１，３－グルカンについては、本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造に用いられるものと同様であるため、詳しい説明を省略する。β－１，３－グルカンと抗原性ペプチドは、アルキンとアジド誘導体との付加環化反応、マレイミド基又はビニルスルホン基とチオール基との反応のいずれかにより生成した共有結合を介して結合している。抗原性ペプチドは、β－１，３－グルカン分子の主鎖及び側鎖のグルコース残基のどちらに結合していてもよいが、立体障害を考慮すると、側鎖のグルコース残基上に結合していることが好ましい。また、抗原性ペプチドは、Ｎ末端側及びＣ末端側のどちらで結合していてもよく、或いは側鎖で結合していてもよいが、抗原提示細胞との接触時の立体障害を考慮すると、Ｎ末端側又はＣ末端側でβ－１，３－グルカンに結合していることが好ましい。β－１，３－グルカン及び抗原性ペプチドへのアルキン誘導体及びアジド基の導入については、本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造におけるペプチド／ヌクレオチドコンジュゲートの場合と同様に、任意の公知の方法を用いて行うことができる。

【００５７】

本発明の第３の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体は、上述の本発明の第１又は第２の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体において、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を更に含み、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、β－１，３－グルカンと、水素結合を介して結合し、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本とβ－１，３－グルカンの分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有する複合体（抗原性ペプチド、β－１，３－グルカン、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を含む三元複合体）を形成している。

【００５８】

本実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造に用いられる抗原性ペプチド、β－１，３－グルカン、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体中の、β－１，３－グルカンと水素結合を介して結合する部分については、本発明の第１、第２の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造に用いられるものと同様であるため、詳しい説明を省略する。

【００５９】

ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体中の、免疫賦活活性を有する部分塩基配列の具体例としては、ＴＬＲ９による認識を介して、自然免疫と獲得免疫の「橋渡し」をすることで免疫を活性化する、バクテリアやウィルスに由来する非メチル化ＣｐＧ　ＤＮＡ、ＴＬＲ３による認識を介して、自然免疫と獲得免疫の「橋渡し」をすることで免疫を活性化するウィルス由来の２本鎖ＲＮＡ、ＲＩＧ－Ｉ様受容体（ＲＬＲ）による認識を介して免疫を活性化するウィルスゲノムＲＮＡや人工ＲＮＡ等が挙げられる。

【００６０】

上述した免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するＲＮＡ又はＤＮＡと、β－１，３－グルカンと水素結合を介して結合する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体とのハイブリッドは、任意の公知の方法を用いて入手又は合成できる。なお、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が、ＤＮＡの３'末端側にＲＮＡの５'末端側が結合したキメラ核酸である場合、ＲＮＡとＤＮＡの間のホスホジエステル結合が、特に分解を受けやすくなるため、ＤＮＡと結合したＲＮＡの５'末端側ヌクレオチドにおける２'位のヒドロキシル基をメトキシ基又はフルオロ基で置換し、かつ／又はＤＮＡと結合した最初のリボヌクレオチドの３'位と、それに隣接するＲＮＡの５'位との間のホスホジエステル基をホスホロチオエート基で置換する等の誘導体化を行い、加水分解に対する耐性を向上させておくことが好ましい。

【００６１】

本実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体は、下記のいずれかの方法により製造される。

（１）上述のβ－１，３－グルカン、ペプチド／ヌクレオチドコンジュゲート及びポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を、本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造法と同様の方法を用いて複合化させる。

（２）本発明の第２の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体とポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を、本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体の製造法と同様の方法を用いて複合化させる。

【００６２】

本発明の第４の実施の形態に係る医薬組成物（以下、「医薬組成物」と略称する。）は、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体と、β－１，３－グルカン骨格とが、水素結合を介して結合することにより形成され、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の分子鎖１本と前記β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の分子鎖２本とからなる三重螺旋構造を有するポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体と、本発明の第１又は第２の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体、或いは本発明の第３の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体を含んでいる。

【００６３】

ポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体は、ペプチド／ヌクレオチドコンジュゲートの代わりにヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を用いる以外は、本発明の第１の実施の形態に係るペプチド／β－１，３－グルカン複合体と同様の方法を用いて製造される。

【００６４】

医薬組成物の製造には、有効成分としてのペプチド／β－１，３－グルカン複合体及びポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体に加え、任意の公知の成分（医薬用途に許容される任意の担体、賦形剤及び添加物）及び製剤方法を用いることができる。例えば、医薬組成物は、錠剤、座剤、カプセル剤、シロップ剤、ナノゲル等のマイクロカプセル剤、滅菌液剤、懸濁液剤等の注射剤、エアゾール剤、スプレー剤等の形態を取ることができる。

【００６５】

医薬組成物は、ヒトまたは温血動物（マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ、サル等）に対し、経口及び非経口経路のいずれによっても投与可能である。非経口投与経路としては、皮下、皮内及び筋中注射、腹腔内投与、点滴、鼻粘膜や咽頭部への噴霧等が挙げられる。

【００６６】

活性成分であるペプチド／β－１，３－グルカン複合体及びポリヌクレオチド／β－１，３－グルカン複合体の用量は、活性、治療対象となる疾患、投与対象となる動物の種類、体重、性別、年齢、疾患の重篤度、投与方法等に応じて異なる。体重６０ｋｇの成人を例に取ると、経口投与の場合、１日当たりの用量は通常約０．１～約１００ｍｇ、好まし

くは約１．０～約５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～約２０ｍｇであり、非経口投与の場合、１日当たりの用量は通常約０．０１～約３０ｍｇ、好ましくは約０．１～約２０ｍｇ、より好ましくは約０．１～約１０ｍｇである。他の動物に投与する場合には、上記用量を単位体重当たりの用量に換算後、投与対象となる動物の体重を乗じて得られた用量を用いる。

【００６７】

医薬組成物は、免疫を活性化することによる細菌、ウィルス等の病原体の感染に起因する感染症、ガン等の腫瘍の治療及び予防のためのワクチン等として用いることができる。

【実施例】

【００６８】

次に、本発明の作用効果を確認するために行った実施例について説明する。

【００６９】

実施例１：抗原性ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートの作製

本実施例において、デオキシアデニン４０量体中のリン酸ジエステル結合が全てホスホロチオエート結合に置換された構造を有するポリヌクレオチド誘導体（以下、「ｄＡ４０（Ｓ）」という。）の５'側にアルキンを導入したポリヌクレオチド誘導体（以下、「ｄＡ４０（Ｓ）（ａｌｋｙｎｅ）」という。）（株式会社　ジーンデザイン社より購入）とオボアルブミン（ＯＶＡ）由来の抗原性ペプチド（アミノ酸配列：ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号１））のＣ末端にアジド基を導入した抗原性ペプチド（以下、「ＯＶＡ（Ｎ３）」）(株式会社　ジーンデザイン社より購入)との抗原性ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲート体（以下、「ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）」）の作製について検討を行った。化学構造を図１にそれぞれ示す。

【００７０】

ＯＶＡ（Ｎ３）（最終濃度：１０μＭ～８００μＭ、溶媒：水＋ＤＭＳＯ）、ｄＡ４０（Ｓ）（ａｌｋｙｎｅ）（最終濃度：１０μＭ、溶媒：水）、硫酸銅(II)五水和物(最終濃度：１．５ｍＭ、溶媒：水)、アスコルビン酸ナトリウム（最終濃度：３．０ｍＭ、溶媒：水）、(トリス(１－ベンジル－１Ｈ－１,２,３－トリアゾール－４－イル)メチル)アミン（最終濃度：０．６ｍＭ、溶媒：ＤＭＳＯ）となるように混合し、室温で１時間、銅触媒を用いたクリックケミストリーを行った。反応後、キレート剤であるｐＨ７．４のエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（最終濃度：２０ｍＭ以上）でサンプル溶液を希釈した後、ＨＰＬＣ測定を行った。ｄＡ４０（Ｓ）とＨＰＬＣカラムの相互作用が強力で溶出されにくいため、ＥＤＴＡを添加することでその相互作用を弱め、溶出されやすいようにした。

【００７１】

ＨＰＬＣ測定では、カラムとしてＩｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３（ジーエルサイエンス社）、溶離液として０．１Ｍトリエチルアミン－酢酸（ＴＥＡＡ）バッファー（ｐＨ７．０）とアセトニトリル、検出器としてダイオードアレイを用い、２６０ｎｍでのｄＡ４０（Ｓ）（ａｌｋｙｎｅ）のＵＶ吸収変化を追跡した。結果を図２に示す。ｄＡ４０（Ｓ）（ａｌｋｙｎｅ）のピークがペプチドを加えることで、１７分付近から２０分付近へペプチド量依存的にシフトしていることが確認された。逆相カラムを用いた測定において、溶出時間が遅くなることは分子がより疎水的になったことを示唆する。この結果から、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）が生成したことがわかった。

【００７２】

実施例２：抗原性ペプチド／ポリヌクレオチドコンジュゲートとβ－１，３－グルカン骨格を有する多糖の複合化

本実施例において、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖として用いたシゾフィラン（ＳＰＧ）は、特開２０１０－１７４１０７号公報の実施例に記載の方法を用いて得た。これを所定の方法にて、精製した。ＧＰＣにより分子量を算出したところ、１本鎖状態では１５万で、３本鎖では４５万であった。このＳＰＧと、実施例１で調製したＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）との複合化について検討を行った。

【００７３】
上述したとおり、ＳＰＧ等のβ－１，３－グルカンは、アルカリ水溶液中では１本鎖に解離しているが、リン酸緩衝液を添加することにより、β－１，３－グルカンを含む溶液が中和されると、β－１，３－グルカン３分子が水素結合を介して会合し、三重螺旋構造が再生される。このとき、混合物中にｄＡ４０（Ｓ）等のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体が存在すると、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体１分子とβ－１，３－グルカン２分子とが、水素結合及び疎水性相互作用を介して会合し、三重螺旋構造を有する複合体が生成することは、本発明者により見出された。本実施例では、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体の一例であるｄＡ４０（Ｓ）に抗原性ペプチドが結合した抗原性ペプチド－ＤＡ４０（Ｓ）とＳＰＧとの組み合わせにおいても、同様に三重螺旋構造を有する複合体が生成するかについて検証を行った。

【００７４】
０．２５Ｎ　ＮａＯＨ溶液にＳＰＧを溶解し（１５ｍｇ／ｍＬ）、完全に１本鎖に解離させるために２日以上放置したものを用いた。ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）の１０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）水溶液（１０体積％のＤＭＳＯを含む水を溶媒とする溶液。以下同じ。）と、リン酸緩衝液（３３０ｍＭ　NaH_2PO_4、ｐＨ４．５）を混合後、上述のＳＰＧ溶液を添加し、撹拌した。なお、ＳＰＧとＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）の混合比はモル比で３：１であり、ＳＰＧ溶液とリン酸緩衝液の体積比は１：１となるよう、各溶液の濃度を調整した。４℃で一晩静置させた後、撹拌後の反応混合物のアクリルアミドゲル電気泳動を行った。比較のため、抗原性ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）についてもアクリルアミド電気泳動を行った。

【００７５】
電気泳動後、アクリルアミドゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄで染色し、蛍光画像を撮影した結果を図３に示す。撹拌後の反応混合物のレーン（レーン２：ｃｏｍｐｌｅｘ（ｐｅｐｔｉｄｅ／ＳＰＧ））では、レーン１（ｐｅｐｔｉｄｅ－ｄＡ４０Ｓ）において観測されるＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）のバンドが消失していることが確認された。この結果から、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）がＳＰＧと複合化し、より高分子量の複合体（ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体）が生成したことがわかった。

【００７６】
実施例３：マウス脾細胞における、抗原性ペプチドによる抗原特異的免疫応答に抗原性ペプチドとＳＰＧとの複合化が及ぼす影響の評価
（１）オボアルブミン（ＯＶＡ）由来のアミノ酸配列（配列番号１）を有する抗原性ペプチド（ＯＶＡペプチド）（５μｇ）、（２）ＯＶＡペプチド（５μｇ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ（塩基配列：ＡＴＣＧＡＣＴＣＴＣＧＡＧＣＧＴＴＣＴＣ（配列番号２））（３０μｇ）、（３）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（実施例１参照、５μｇ）、（４）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（実施例１で調製、５μｇ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ（３０μｇ）、（５）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（５μｇ）及びフロイトの不完全アジュバント（ＩＦＡ）（３０μｇ）のいずれかを、マウス（Ｃ５７ＢＬ／６マウス、雄性、７週齢）皮内に投与（１回）した。投与から１週間後に、マウスより脾細胞を採取後、９６ウェルに播種し（1.0×10^6　ｃｅｌｌｓ／ウェル）、ＯＶＡペプチドで刺激（１０μｇ/ｍＬ）し、抗原特異的なインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）が誘導されるかについて検討した。

【００７７】
ＯＶＡペプチドによる脾細胞への刺激２４時間後に、酵素結合免疫測定（ＥＬＩＳＡ）を用いて、培地中のＩＦＮ－γ量を定量した。結果を図４に示す。ＯＶＡペプチドのみ投与した場合、ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡを同時投与した場合、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体のみを投与した場合については、ＯＶＡペプチドに特異的なインターフェロン応答は見られなかった。ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体を市販のアジュバントであるフロイトの不完全アジュバント（ＩＦＡ）と同時投与した場合においても、その応答は非常に小さいものであった。しかし、ＯＶＡペプチド－ｄ

Ａ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体をＣｐＧ　ＤＮＡと同時に投与した場合、顕著な免疫応答（ＩＦＮ－γの産生量の増大）が誘起できることが確認された。ＯＶＡペプチドのみを投与した場合には、体内から速やかに排除されてしまうのに対し、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）をＳＰＧと複合化させることにより、抗原提示細胞への取り込みが促進され、そこに、ＴＬＲ９に対するＣｐＧ　ＤＮＡの刺激が加わることにより、抗原特異的Ｔ細胞の割合が増加したためと考えられる。

【００７８】

実施例４：抗原性ペプチド特異的細胞傷害性Ｔ細胞の誘導能に抗原性ペプチドとＳＰＧとの複合化が及ぼす影響の評価

実施例３において、（１）ＯＶＡペプチド、（２）ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡ、（３）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体、（４）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡのいずれかを皮内投与したマウスより採取し、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体で刺激したマウス脾細胞を６日間培養し、抗体染色後、フローサイトメーターを用いて、ＯＶＡペプチドに特異的な細胞傷害性（ＣＤ８陽性）Ｔ細胞の割合を評価した。

【００７９】

脾細胞中のＯＶＡペプチドに特異的なＣＤ８陽性Ｔ細胞の割合を図５に示す。ＯＶＡペプチドのみ投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ）、ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡを同時投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ＋ＣｐＧ）、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体のみを投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ／ＳＰＧ）のいずれについても、ＯＶＡペプチドに特異的なＣＤ８陽性Ｔ細胞の割合は少ないが、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体をＣｐＧ　ＤＮＡと同時に投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ／ＳＰＧ＋ＣｐＧ）には、ＯＶＡペプチドに特異的なＣＤ８陽性Ｔ細胞の割合が有意に増加していることが確認された。

【００８０】

実施例５：抗原性ペプチド、免疫賦活活性を有する部分塩基配列を有するポリヌクレオチド誘導体及びβ－１，３－グルカン骨格を有する多糖の複合化

ＳＰＧと、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）、ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）との同時複合化について検討を行った。

【００８１】

０．２５Ｎ　ＮａＯＨ溶液にＳＰＧを溶解し（１５ｍｇ／ｍＬ）、完全に１本鎖に解離させるために２日以上放置したものを用いた。ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）（ＣｐＧ　ＤＮＡの３'－末端側にｄＡ４０（Ｓ）が結合した構造を有するポリヌクレオチド誘導体）の水溶液と、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）の１０％ＤＭＳＯ水溶液と、リン酸緩衝液（３３０ｍＭ　NaH_2PO_4，ｐＨ４．５）を混合し、上述のＳＰＧ溶液を添加し、撹拌した。なお、ＳＰＧとＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）の混合比、ＳＰＧとＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）の混合比は、共にモル比で３：１であり、ＳＰＧ溶液とリン酸緩衝液の体積比は１：１となるよう、各溶液の濃度を調整した。

【００８２】

電気泳動後、アクリルアミドゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄで染色し、蛍光画像を撮影した結果を図６に示す。撹拌後の反応混合物のレーン（レーン３：ｃｏｍｐｌｅｘ（ｐｅｐｔｉｄｅ／ＣｐＧ／ＳＰＧ））では、レーン１において観測されるＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）のバンド及びレーン２において観測されるＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）のバンドが共に消失していることが確認された。この結果から、抗原性ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）の両者がＳＰＧと複合化し、より高分子量の複合体（ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体）が生成したことがわかった。本実施例では、三元複合体１分子当たり、最大７本のｄＡ４０（Ｓ）の分子鎖が含まれるよう、ＳＰＧ、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）のモル比を調節している。また、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）のモル比は１：１であり、両者の間に

ＳＰＧとの複合体形成能に差はないと考えられることから、三元複合体が生成していると考えられる。

【００８３】

ＯＶＡペプチド以外の抗原性ペプチドとして、下記のアミノ酸配列を有する抗原性ペプチド／ヌクレオチドコンジュゲートについて、上述の方法により三元複合体を調製した。

【００８４】

【表１】

ペプチドの由来	アミノ酸配列
オボアルブミン(OVA)	SIINFEKL(配列番号1)
マウスメラニン産生細胞 gp100	EGSRNQDWL(配列番号3)
ヒトメラニン産生細胞 gp100	KVPRNQDWL(配列番号4)
CT26(大腸ガン株)	SPSYVYHQF(配列番号5)
インフルエンザウィルス HA	IYSTVASSL(配列番号6)
インフルエンザウィルス NP	ASNENMDTM(配列番号7)
インフルエンザウィルス PA	SSLENFRAYV(配列番号8)
β-ガラクトシダーゼ	DAPIYTNV(配列番号9)
MuLV(マウス白血病ウィルス) p15E	KSPWFTTL(配列番号10)
SeV(センダイウィルス)	FAPGNYPAL(配列番号11)
MCMV(マウスサイトメガロウィルス) IE1	YPHFMPTNL(配列番号12)
LCMV(リンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス) gp33	KAVYNFATM(配列番号13)
LCMV NP396	FQPQNGQFI(配列番号14)
LCMV NP118	RPQASGVYM(配列番号15)
マラリア原虫 Pb9	SYIPSAEKI(配列番号16)
HIV P18-I10	RGPGRAFVTI(配列番号17)
BCG MPT51	GGPHAVYLL(配列番号18)
Human CEA(ヒトガン胎児性抗原)	EAQNTTYL(配列番号19)
P815(マウス由来抗原提示細胞)	LPYLGWLVF(配列番号20)
HBsAg(B型肝炎ウィルス抗原)	IPQSLDSWWTSL(配列番号21)
HSV-1(マウス単純ヘルペスウィルス) gB	SSIEFARL(配列番号22)
HY(雄特異抗原) Uty	WMHHNMDLI(配列番号23)
EGFP(高感度緑色蛍光タンパク)	HYLSTQSAL(配列番号24)
HER2	TYLPTNASL(配列番号25)
VSV(水疱性口内炎ウィルス) NP	RGYVYQGL(配列番号26)
ポリオウィルス MT	RRLGRTLLL(配列番号27)

【００８５】

実施例６：抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体によるペプチド特異的免疫応答の評価

（１）実施例２で調製したＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（５μｇ）、（２）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（５μｇ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ（３０μｇ）、（３）ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（５μｇ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）の１０％ＤＭＳＯ水溶液を用いない以外は、実施例５と同様の方法により調製：３０μｇ）、（４）実施例５で調製したＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体（５μｇ）のいずれかを、マウス（Ｃ５７ＢＬ／６マウス、雄性、７週齢）皮内に投与（１回）した。投与から１週間後に、マウスより脾細胞を採取後、９６ウェルに播種し（１．０×１０^{6}　ｃｅｌｌｓ／ウェル）、ＯＶＡペプチドで刺激（

１０μｇ/ｍＬ）し、抗原特異的なインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）が誘導されるかについて検討した。

【００８６】

ＯＶＡペプチドによる脾細胞への刺激２４時間後に、酵素結合免疫測定（ＥＬＩＳＡ）を用いて、培地中のＩＦＮ－γ量を定量した。結果を図７に示す。実施例３に示したように、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体のみではＯＶＡペプチドに特異的なインターフェロン応答が誘導できないが、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡを同時に投与すると、強いインターフェロン応答が誘導された。さらに、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体の投与によっても、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡを同時に投与した場合と同程度のインターフェロン誘導が確認された。興味深いことには、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体を同時に投与した場合に、強いインターフェロン応答が誘導されることが確認された。これらの結果より、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体の投与によっても、抗原提示細胞へのＯＶＡペプチドの取り込み及びＣｐＧ　ＤＮＡによるＴＬＲ９を介した細胞刺激のそれぞれの効果が発揮できていることがわかる。

【００８７】

実施例７：抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体によるペプチド特異的細胞傷害性Ｔ細胞の誘導能の評価

実施例６において、（１）ＯＶＡペプチド、（２）ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡ、（３）ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体、（４）実施例５で調製したＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体のいずれかを皮内投与したマウスより採取し、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体で刺激したマウス脾細胞を６日間培養し、抗体染色後、フローサイトメーターを用いて、ＯＶＡペプチドに特異的な細胞傷害性（ＣＤ８陽性）Ｔ細胞の割合を評価した。

【００８８】

ＣＤ８陽性Ｔ細胞中のうち、ＯＶＡペプチドに特異的なＣＤ８陽性Ｔ細胞の割合を図８に示す。ＯＶＡペプチドのみ投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ）、ＯＶＡペプチド及びＣｐＧ　ＤＮＡを同時投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ＋ＣｐＧ）と比較して、ＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体を投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ＋ＣｐＧ／ＳＰＧ）、或いはＯＶＡペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体を投与した場合（ｐｅｐｔｉｄｅ／ＣｐＧ／ＳＰＧ）に、ＯＶＡペプチドに特異的なＣＤ８陽性Ｔ細胞の割合を増大させることができた。

【００８９】

実施例８：メラノーマ細胞特異的抗原タンパク質由来ペプチドに対する免疫応答（抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体によるペプチド特異的免疫応答の評価）

（１）マウスメラノーマ細胞特異的抗原タンパク由来のアミノ酸配列（ＥＧＳＲＮＱＤＷＬ（配列番号３））を有する抗原性ペプチド（ｇｐ１００）を用いて実施例１、２に従い同様に調製したｇｐ１００ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（５μｇ）及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体（３０μｇ）、（２）実施例５に従い同様に調製したｇｐ１００ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体（５μｇ）のいずれかを、マウス（Ｃ５７ＢＬ／６マウス、雄性、７週齢）皮内に投与（１回）した。投与から１週間後に、マウスより脾細胞を採取後、９６ウェルに播種し（1.0×10^{6}　ｃｅｌｌｓ／ウェル）、ｇｐ１００ペプチドで刺激（１０μｇ/ｍＬ）し、抗原特異的なインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）が誘導されるかについて検討した。

【００９０】

ｇｐ１００ペプチドによる脾細胞への刺激２４時間後に、酵素結合免疫測定（ＥＬＩＳＡ）を用いて、培地中のＩＦＮ－γ量を定量した。結果を図９に示す。実施例３に示したように、ｇｐ１００ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体のみではｇｐ１００ペプチドに特異的なインターフェロン応答が誘導できなかった（ｄａｔａ　ｎｏｔ　ｓｈｏｗｎ）。しかし、ｇｐ１００ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体及びＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ複合体を同時に投与すると、強いインターフェロン応答が誘導された。さらに、ｇｐ１００ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体の投与によっても、同様にインターフェロン誘導が確認された。これらの結果より、ＯＶＡペプチド以外の抗原性ペプチドを含む抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体をマウスに投与することによっても、ペプチド特異的な免疫応答が誘導されたことがわかる。

【００９１】

実施例９：異なる抗原性ペプチドでの免疫応答

ＯＶＡペプチド以外の抗原性ペプチドを用いて、実施例５に記載の方法により、抗原性ペプチド－ｄＡ４０（Ｓ）／ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）／ＳＰＧ三元複合体を調製し、実施例６に記載の手順により、ペプチド特異的免疫応答の評価を行った。用いた抗原性ペプチドのアミノ酸配列及び実験結果（抗原性ペプチドに特異的なＩＦＮ－γの誘導の有無）を、下記の表２に示す。なお、Ｎｏ．２に示したアミノ酸配列（配列番号２８）は、ＯＶＡペプチド（Ｎｏ．１）のランダム配列である。表２中の、Ｎｏ．１、３、４では、マウスより採取後、ウェルに播種した脾細胞の刺激に、三元複合体に含まれる抗原性ペプチドを用いたが、Ｎｏ．２については、アミノ酸組成は同一であるがアミノ酸配列の異なるＯＶＡペプチドを用いた。また、表２のＩＦＮ応答の列中、「＋」は、ＩＦＮ－γの産生が観測されたことを示し、「－」は、ＩＦＮ－γの誘導が観測されなかったことを示す。マウスに投与した三元複合体に用いた抗原性ペプチドと同一のアミノ酸配列を有するペプチドで脾細胞を刺激した場合（Ｎｏ．１、３、４、５）には、抗原性ペプチド特異的なＩＦＮ応答が観察されたのに対し、異なるアミノ酸配列を有するペプチドで脾細胞を刺激した場合（Ｎｏ．２）には、全くＩＦＮ産生が観測されなかった。これらの結果より、マウスに投与した三元複合体により、ペプチド特異的な免疫応答が誘導されたことがわかる。

【００９２】

【表２】

No.	ペプチド配列	IFN応答
1	SIINFEKL(配列番号1)	＋
2	FKILSENI(配列番号28)	－
3	EGSRNQDWL(配列番号3)	＋
4	KVPRNQDWL(配列番号4)	＋
5	SPSYVYHQF(配列番号5)	＋

【００９３】

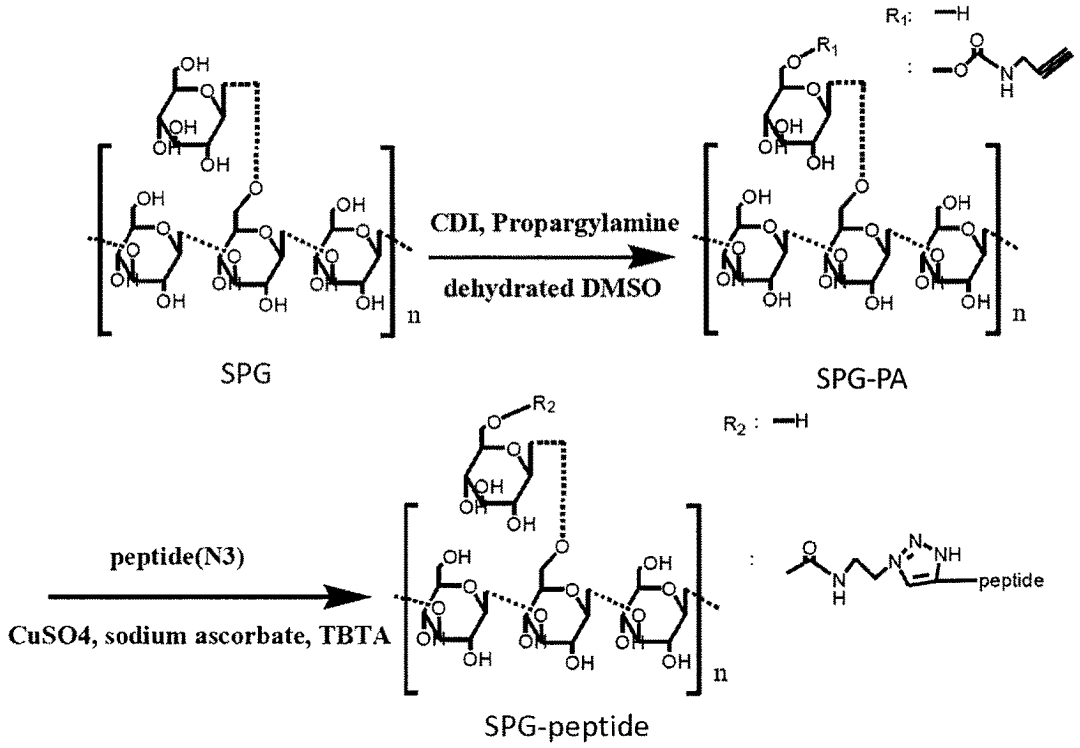
実施例１０：ＳＰＧの主鎖又は側鎖上のグルコース残基への抗原性ペプチドの導入によるペプチド／β－１，３－グルカン複合体の調製（１）

アルキンとアジド化合物の「クリック反応」（フイスゲン反応）を利用したＳＰＧの主鎖又は側鎖上のグルコース残基への抗原性ペプチドの導入を検討した。反応スキームを以下に示す。カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）とプロパルギルアミン（ＰＡ）をＳＰＧのグルコース残基の６－位に存在する第１級アルコールと反応させ、生成するカルバメート結合を介して、ＳＰＧの主鎖又は側鎖グルコース残基上に位置選択的にアルキンを導入した（ＳＰＧ－ＰＡ）。ＳＰＧに導入されたアルキン残基数のグルコース残基数に対する比が１０～２０％であったことから、主鎖のグルコース残基周りの立体障害により、大部分が側鎖のグルコース残基上に導入されていると考えられる。このようにして得られたＳＰＧ誘導体を、胴触媒の存在下、Ｃ末端がアジド基で修飾された抗原性ペプチド（ｐｅｐ

ｔｉｄｅ（Ｎ３）：ジーンデザイン（株）より購入。本実施例では、アジド修飾ＯＶＡペプチドを使用した。）と反応させ、クリック反応により、ペプチド／β－１，３－グルカン複合体を調製した。

【００９４】

【化３】



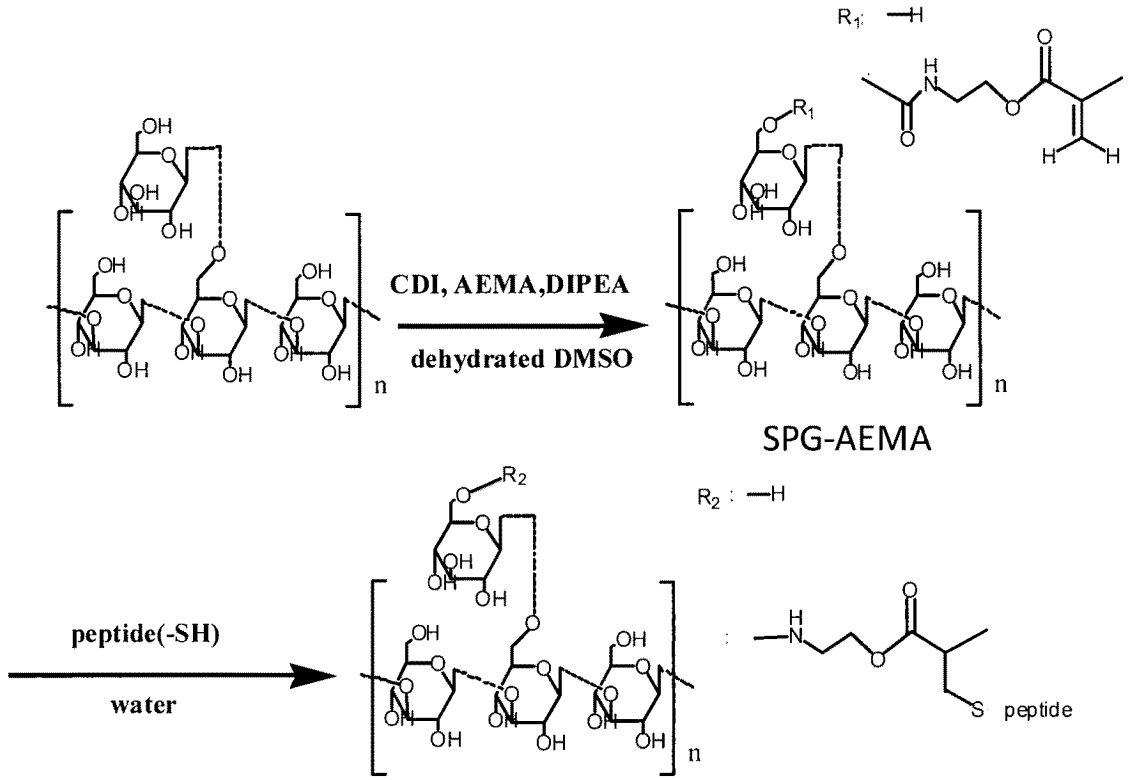
【００９５】

実施例１１：ＳＰＧの主鎖又は側鎖上のグルコース残基への抗原性ペプチドの共有結合を介した導入によるペプチド／β－１，３－グルカン複合体の調製（２）

α，β－不飽和ケトンとチオールのマイケル付加反応を利用したＳＰＧの主鎖又は側鎖上のグルコース残基への抗原性ペプチドの導入を検討した。反応スキームを以下に示す。Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）の存在下、ＳＰＧの側鎖のグルコース残基の６－位に存在する第一級アルコールに対し、カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）と２－アミノエチルメタクリレート（ＡＥＭＡ）を反応させ、生成するカルバメート結合を介して、メタクリロイル基を導入した（ＳＰＧ－ＡＥＭＡ）。その後、Ｃ末端にシステインを導入した抗原性ペプチド（ｐｅｐｔｉｄｅ（－ＳＨ）：ジーンデザイン（株）より購入。）を、トリス（２－カルボカイシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）の存在下、ＳＰＧ－ＡＥＭＡと反応させ、ペプチド／β－１，３－グルカン複合体を調製した。

【００９６】

【化４】



【００９７】

実施例１２：共有結合を介して、β－１，３－グルカン骨格を有する多糖の側鎖上のグルコース残基に抗原性ペプチドが結合した、抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体による抗原性ペプチド特異的免疫応答の評価

実施例１０、１１で調製したペプチド／β－１，３－グルカン複合体を、実施例２、５に記載の方法と同様の方法を用いて、ＣｐＧ　ＤＮＡ－ｄＡ４０（Ｓ）と複合化させ、抗原性ペプチド／ＣｐＧ／ＳＰＧ三元複合体を調製した。これを、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（雄性、７週齢）の皮内に１回投与（ＣｐＧ　ＤＮＡ３０μｇ相当量）した。投与から１週間後に、マウスより脾細胞を採取後、９６ウェルに播種し（１．０×１０^{6}　ｃｅｌｌｓ／ウェル）、ＯＶＡペプチドで刺激（１０μｇ/ｍＬ）し、抗原特異的なインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）が誘導されるかについて検討した。用いた抗原性ペプチドのアミノ酸配列及び実験結果（抗原性ペプチドに特異的なＩＦＮ－γの誘導の有無）を、下記の表３に示す。なお、実施例９と同様、Ｎｏ．２に示したアミノ酸配列（配列番号２８）は、ＯＶＡペプチド（Ｎｏ．１）のランダム配列である。表３中の、Ｎｏ．１、３、４では、マウスより採取後、ウェルに播種した脾細胞の刺激に、三元複合体に含まれる抗原性ペプチドを用いたが、Ｎｏ．２については、アミノ酸組成は同一であるがアミノ酸配列の異なるＯＶＡペプチドを用いた。また、表３のＩＦＮ応答の列中、「＋」は、ＩＦＮ－γの産生が観測されたことを示し、「－」は、ＩＦＮ－γの誘導が観測されなかったことを示す。実施例９の結果と同様、マウスに投与した三元複合体に用いた抗原性ペプチドと同一のアミノ酸配列を有するペプチドで脾細胞を刺激した場合（Ｎｏ．１、３、４）には、抗原性ペプチド特異的なＩＦＮ応答が観察されたのに対し、異なるアミノ酸配列を有するペプチドで脾細胞を刺激した場合（Ｎｏ．２）には、全くＩＦＮ産生が観測されなかった。これらの結果より、マウスに投与した三元複合体により、ペプチド特異的な免疫応答が誘導されたことがわかる。

【００９８】

【表３】

No.	ペプチド配列	IFN応答
1	SIINFEKL(配列番号1)	＋
2	FKILSENI(配列番号28)	－
3	EGSRNQDWL(配列番号3)	＋
4	SPSYVYHQF(配列番号5)	＋

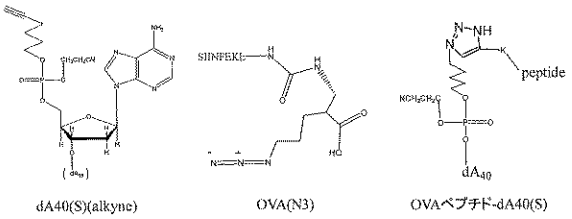
【００９９】

なお、本発明は、本発明の広義の精神と範囲を逸脱することなく、様々な実施形態及び変形が可能とされるものである。また、上述した実施形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。つまり、本発明の範囲は、実施形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内及びそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

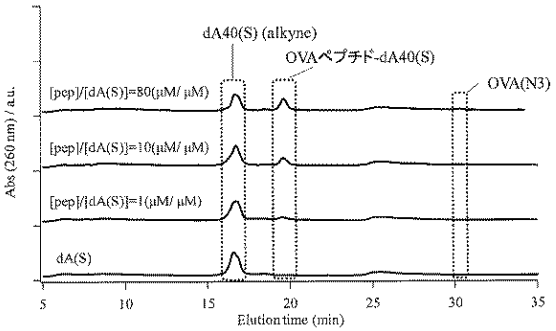
【０１００】

本出願は、２０１４年２月６日に出願された日本国特許出願２０１４－２１３３３号に基づくものであり、その明細書、特許請求の範囲、図面および要約書を含むものである。上記日本国特許出願における開示は、その全体が本明細書中に参照として含まれる。

【図１】



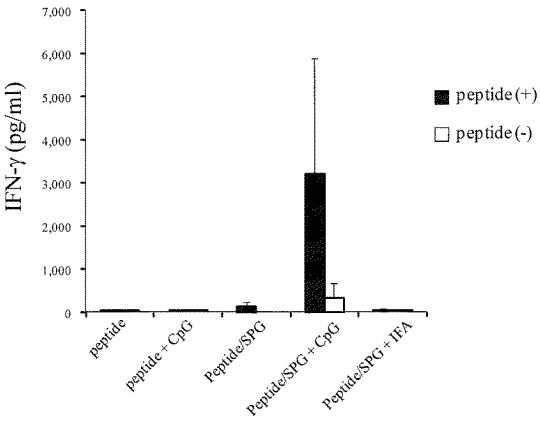
【図２】



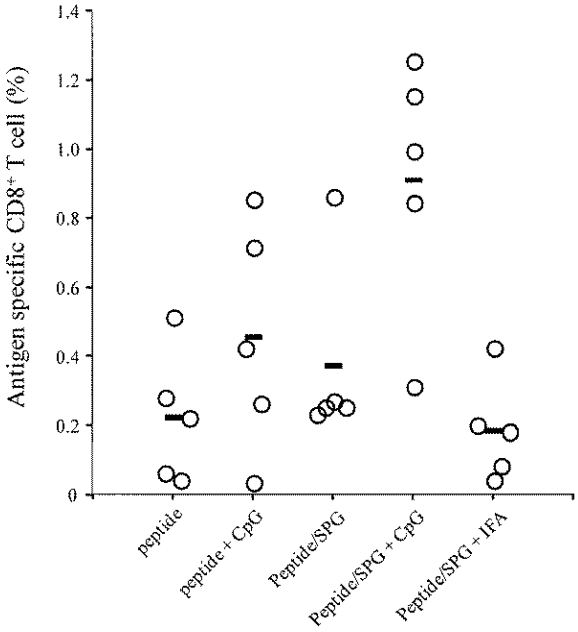
【図３】

1 peptide-dA40S
2 complex (peptide/SPG)

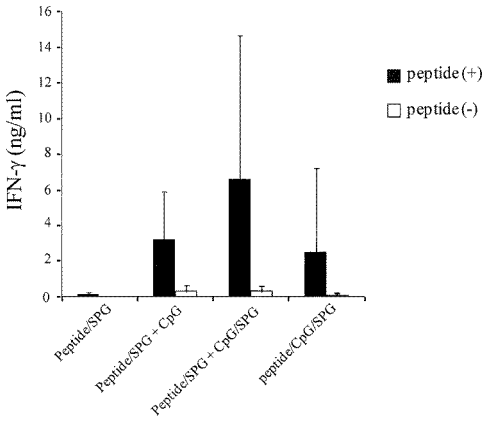
【図４】



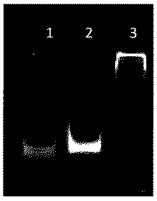
【図５】



【図７】

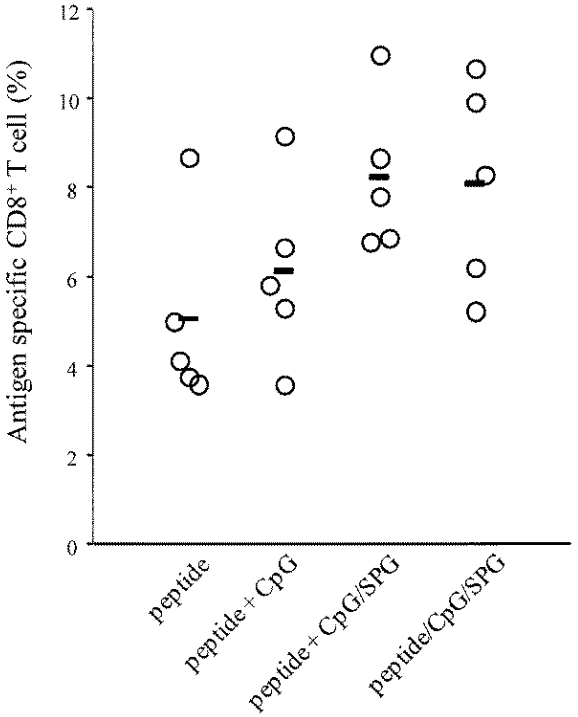


【図６】

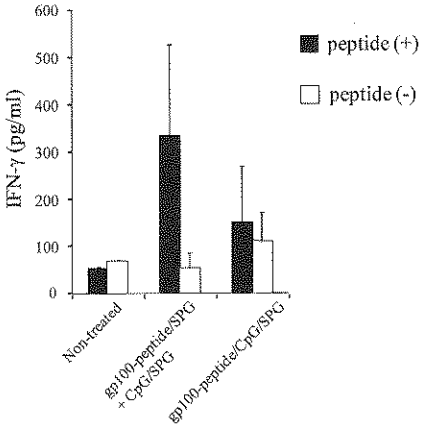


1 peptide-dA40S
2 CpG-dA40S
3 complex (peptide/CpG/SPG)

【図８】



【図９】



【配列表】
0006383740000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
Ｃ０７Ｈ	21/04	(2006.01)	Ｃ０７Ｈ	21/04	Ｚ
Ａ６１Ｋ	39/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ
Ａ６１Ｋ	31/7088	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	31/7125	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	31/7125	
Ａ６１Ｐ	37/04	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ａ６１Ｐ	31/04	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	31/12	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ａ６１Ｐ	35/00	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	35/00	

(72)発明者　森下　博美
福岡県北九州市若松区ひびきの１番１号　公立大学法人北九州市立大学　国際環境工学部内

審査官　高山　敏充

(56)参考文献　国際公開第９６／０１４８７３（WO，Ａ２）
特開２０１０－１７４１０７（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５０３２５４（ＪＰ，Ａ）
Immunobiology of Proteins and Peptides VIII (Advances in Experimental Medicine and Biology)，１９９５年，Vol.383，pp.13-22
化学と工業，２００７年１０月，Vol.60，No.10，pp.976-980
Pharmaceutical Research，２００８年１０月，Vol.25，No.10，pp.2216-2230

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ
ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ