



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816282.2

[43] 公开日 2005年9月14日

[11] 公开号 CN 1668329A

[22] 申请日 2003.6.10 [21] 申请号 03816282.2
[30] 优先权
[32] 2002.6.13 [33] GB [31] 0213622.4
[86] 国际申请 PCT/EP2003/006094 2003.6.10
[87] 国际公布 WO2003/105890 英 2003.12.24
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.10
[71] 申请人 格拉索史密斯克莱生物学股份有限公司
地址 比利时里克森萨特
共同申请人 血清疫苗研究生产中心芬雷学院
[72] 发明人 R·F·巴伯拉莫拉勒斯
P·M·德斯芒司
F·J·多明戈奥瓦乐兹
J·普尔曼

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 赵艳华

权利要求书2页 说明书21页 附图2页

[54] 发明名称 疫苗组合物

[57] 摘要

本发明涉及有效预防或治疗奈瑟球菌，尤其是脑膜炎球菌疾病的疫苗组合物。本发明的疫苗包含多价脑膜炎球菌胞组合物，它包含至少一种具有同种杀菌活性的胞，它得自具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌，和至少一种具有异种杀菌活性的胞，它得自不必具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌。

1. 一种多价脑膜炎球菌荚组合物，包含至少一种具有同种杀菌活性的荚，它得自具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌，和至少一种具有异种杀菌活性的荚，它得自不必具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌。

2. 权利要求1的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中具有异种杀菌活性的荚与得自野生型菌种 H44/76 的荚相比，缺乏免疫显性外膜蛋白，并且具有同种杀菌活性的荚与得自野生型菌种 H44176 的荚相比，不缺乏所述免疫显性外膜蛋白。

3. 权利要求2的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中具有异种杀菌活性的荚得自天然缺乏所述免疫显性外膜蛋白的野生型脑膜炎球菌菌种。

4. 权利要求2的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中具有异种杀菌活性的荚得自产生与野生型菌种相比产生较少或不产生所述免疫显性外膜蛋白的基因工程脑膜炎球菌菌种。

5. 权利要求4的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中所述基因工程脑膜炎球菌菌种已经被遗传改变了编码免疫显性外膜蛋白的基因的启动子或编码区，使得该菌种产生较少或不产生所述免疫显性外膜蛋白。

6. 权利要求2-5的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中免疫显性外膜蛋白是 PorA。

7. 权利要求2或3的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中免疫显性外膜蛋白是 PorA，并且具有异种细菌活性的荚得自脑膜炎球菌 CU-385 (B: 4: P1. 19, 15)。

8. 一种多价脑膜炎球菌荚组合物，包含与由菌种 H44/76 制备的荚相比，缺乏 PorA 的荚制剂和与由菌种 H44/76 制备的荚相比，不缺乏 PorA 的荚制剂。

9. 权利要求8的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中缺乏 PorA 的荚制剂具有低于总荚蛋白 22%的 PorA。

10. 权利要求8或9的多价脑膜炎球菌荚组合物，其中不缺乏 PorA

的胞制剂具有高于总胞蛋白 28%的 PorA。

11. 权利要求 8-10 的多价脑膜炎球菌胞组合物, 其中缺乏 PorA 的胞制剂得自脑膜炎球菌 CU-385 菌种。

12. 一种治疗奈瑟球菌, 尤其是脑膜炎球菌疾病的疫苗, 包含权利要求 1-11 的多价脑膜炎球菌胞组合物和药物可接受赋形剂。

13. 权利要求 12 的疫苗, 另外包含选自下列血清型的一种或多种简单或缀合脑膜炎球菌荚膜多糖: A、C、Y 和 W。

14. 适合新西兰或欧洲使用的权利要求 12 或 13 的疫苗, 其中不缺乏 PorA 的具有同种杀菌活性的胞或胞制剂得自具有血清亚型 P1.4 的脑膜炎球菌菌种。

15. 适合美国使用的权利要求 12 或 13 的疫苗, 其中不缺乏 PorA 的具有同种杀菌活性的胞或胞制剂得自具有血清亚型 P1.7, 16 的脑膜炎球菌菌种, 并且任选包含得自具有选自下列血清亚型: P1.7, 1 ; P1.5, 2 ; P1.22a, 14 ; 和 P1.14 的一种或多种脑膜炎球菌菌种的具有同种杀菌活性的另外的胞。

16. 适合挪威使用的权利要求 12 或 13 的疫苗, 其中不缺乏 PorA 的具有同种杀菌活性的胞或胞制剂得自具有血清亚型 P1.16 的脑膜炎球菌菌种。

17. 一种制备权利要求 1-11 的多价脑膜炎球菌胞组合物或权利要求 12-16 的疫苗的方法, 包括将具有同种杀菌活性的胞与具有异种杀菌活性的胞组合的步骤, 或将不缺乏 PorA 的胞制剂与缺乏 PorA 的胞制剂组合的步骤。

18. 一种预防或治疗奈瑟球菌, 尤其是脑膜炎球菌疾病的方法, 包括给需要其的宿主施用免疫有效量的权利要求 12-16 的疫苗。

19. 免疫有效量的权利要求 12-16 的疫苗在制备预防或治疗奈瑟球菌, 尤其是脑膜炎球菌疾病的药物中的应用。

疫苗组合物

发明领域

本发明涉及奈瑟球菌疫苗组合物，它们的制备，和这种组合物在医学中的用途。更特别地，它涉及新的多价脑膜炎球菌外膜囊 (vesicle) (或疱 (bleb)) 疫苗领域，和产生这种更有效疫苗的有利方法。

发明背景

脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*) (脑膜炎球菌) 是革兰氏阴性细菌，常常分离自人上呼吸道。它偶尔引起侵入性细菌疾病，如菌血症和脑膜炎。脑膜炎球菌疾病的发生率显示出地理季节和年度差异 (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (Supplement), S18-S24, 1989)。温带国家中的多数疾病是由于血清型 B 菌种引起并且发生率从 1-10/100,000/年总人群变化，有时达到更高的值 (Kaczmarek, E. B. (1997), *Commun. Dis. Rep. Rev.* 7: R55-9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. 等, *Clin. Infect. Dis.* 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E. 等, *Epidemiol. Infect.* 105: 119-126, 1990)。两个高风险组，婴儿和十几岁的青少年的年龄特异性发生率达到更高水平。

血清型 A 脑膜炎球菌占优势的流行病大部分发生在非洲中部，有时达到 1000/100,000/年的水平 (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (Supplement), S18-S24, 1989)。总体上几乎所有脑膜炎球菌疾病病例都是由血清 A、B、C、W-135 和 Y 脑膜炎球菌引起的。可获得四价 A、C、W-135、Y 荚膜多糖疫苗 (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., *J. Biol. Stand.* 10: 335-339, 1982)。

当前依靠它们与载体蛋白化学结合方法改良了多糖疫苗

(Lieberman, J. M. , Chiu, S. S. , Wong, V. K. 等, JAMA 275: 1499-1503, 1996)。血清型 B 疫苗得不到, 因为 B 荚膜多糖不具有免疫原性, 最可能因为它与宿主成分共有结构类似性(Wyle, F. A. , Artenstein, M. S. , Brandt, M. L. 等, J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972 ; Finne, J. M. , Leinonen, M. , Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355-357, 1983)。

因此, 多年来, 努力集中于开发基于脑膜炎球菌外膜囊(或疱)的疫苗(de Moraes, J. C. , Perkins, B. , Camargo, M. C. 等, Lancet 340: 1074-1078, 1992 ; Bjune, G. , Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. 等, 338: 1093-1096, 1991)。这种疫苗具有优点, 包括正确折叠构象的几种整体外膜蛋白, 当给予宿主时, 它们可以引起保护性免疫反应。此外, 奈瑟球菌种(包括脑膜炎奈瑟球菌血清型 B-menB)分泌足够量的外膜疱以允许以工业规模制备它们。可供选择地, 可以用已知方法制备疱, 包括细菌细胞的洗涤剂提取(EP 11243), 它具有从疫苗除去了一些内毒素(脂-多糖-或 LPS; 也称作脂-寡糖-或 LOS)的益处。

已经证明得自野生型 menB 菌种的这种多组分外膜蛋白疫苗在较大儿童(>4 年)和青少年中具有 57%-85%的功效, 并且已经在拉丁美洲注册。多数这些功效试验用通过洗涤剂提取方法制备的 menB OMV(外膜囊)实施。

这些疫苗中存在很多细菌外膜成分, 如 PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB, 这些成分对观察到的保护的贡献仍需要进一步确定。其它细菌外膜成分已经确定(使用动物或人抗体)为与诱导保护性免疫潜在相关, 如 TbpB、NspA (Martin, D. , Cadieux, N. , Hamel, J. , Brodeux, B. R. , J. Exp. Med. 185: 1173- 1183, 1997 ; Lissolo, L. , Maitre-Wilmotte, C. , Dumas, p. 等, Inf. Immun. 63: 884- 890, 1995)。保护性免疫的机制将包括抗体介导的细菌活性和调理素吞噬作用(opsonophagocytosis)。

过去几十年中, 很多欧洲国家的脑膜炎奈瑟球菌感染的频率升高。这有助于传播增加, 由于社会活动(例如游泳池、剧院等)增加。分离对某些标准抗生素敏感性较低或具有抗性的脑膜炎奈瑟球菌菌种很平

常。

发明概述

本发明涉及有效预防或治疗奈瑟球菌，尤其是脑膜炎球菌疾病的疫苗组合物。本发明的疫苗包含多价脑膜炎球菌胞组合物，其包含至少一种具有同种杀菌活性 (bactericidal activity) 的胞，它得自具有使用国家中流行的血清亚型 (PorA 免疫型) 的脑膜炎球菌，和至少一种具有异种杀菌活性的胞，它得自不必具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌。

发明详述

本说明书中提及的出版物和专利或专利申请内公开的主题和信息并入这里作为参考。应该理解这里使用的文字“包含”在所有情况下都可以被术语“由...组成”替换，同时仍包括在本发明的范围内。

本发明人已经发现解决当前可获得的脑膜炎球菌胞疫苗仅提供了满意的抗同种菌种 (胞来源的那些菌种) 的血清细菌活性 (SBA) 和抗异种菌种 SBA 不满意的问题的方法。通常本领域中的胞得自在特定国家或区域流行的菌种。尽管同种保护是合理的，但是未保护的异种菌种在流行中快速增加的风险高，尤其是年幼儿童。

本发明人已经发现特定多价胞疫苗组合物 (即包含至少 2 个不同胞的组合物) 可以给宿主提供满意的抗同种和异种奈瑟球菌菌种 (尤其是脑膜炎球菌) 的 SBA。这种疫苗有优点，因为本发明的疫苗不是提供得自一个国家中个体感染的所有/大部分脑膜炎球菌的很多不同胞制成的昂贵胞疫苗，而是提供了好的折衷方法，通过减少疫苗中胞的数量，同时仍提供抗流行菌种和抗这些菌种的突变种的好的特异性和一般保护，或当来自流行菌种的病例减少时，引入新血清型 B 菌种。

因此，本发明的一个方面提供了多价脑膜炎球菌胞组合物，包含至少一种 (如 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 种) 具有同种杀菌活性的胞制剂，它得自具有使用国家中流行的血清亚型 (PorA 免疫型) 的脑膜炎球菌，和至少一种 (如 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 种) 具有异种杀菌活性的胞制剂，它得自不

必具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌。

“具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌”是指所述的疤得自具有在该国家（或区域或洲）引起脑膜炎球菌疾病的所有血清亚型的菌种 - 即国家、区域或洲中脑膜炎球菌疾病的基于实验室的活跃监测过程中分离的菌种中百分比方面最流行（或可能第二或第三或第四流行 - 尤其是如果具有同种杀菌活性的 2 或 3 或 4 种疤制剂并入疫苗中）的血清亚型的脑膜炎球菌。优选这种疤的血清亚型组成引起该国家（或区域或洲）中脑膜炎球菌疾病的所有血清亚型的 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 或 60%以上。

如果组合物中包含具有同种杀菌活性的一种疤制剂，优选它来自具有国家（或区域或洲）中最流行血清亚型的菌种，如果包含两种或三种或四种，那么优选所用的菌种（分别）覆盖该两种或三种或四种最流行血清亚型。

“不必具有使用国家中流行的血清亚型的脑膜炎球菌”是指所述疤可以（但不是必需）得自不是在该国家（或区域或洲）引起脑膜炎球菌疾病的所有血清亚型的菌种 - 即国家、区域或洲中脑膜炎球菌疾病散发病例的基于实验室的活跃监测过程中分离的菌种中百分比方面最流行（或第二、第三、第四、第五或第六）血清亚型的脑膜炎球菌。在这种情况下，优选这种疤的血清亚型组成引起该国家（或区域或洲）中脑膜炎球菌疾病的所有血清亚型的低于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 或 60%。

“得自脑膜炎球菌”是指疤是使用任何已知方法从脑膜炎球菌分离的 - 如无洗涤剂的分离，或分离中包括洗涤剂（如脱氧胆酸盐）的方法。

具有“同种杀菌活性”或“异种杀菌活性”的疤制剂是指当给予宿主时，分别引起抗同种或异种脑膜炎球菌的满意血清杀菌活性（SBA）的疤制剂。

SBA 是估计脑膜炎球菌疫苗功效的最普遍同意的免疫标记 (Perkins 等, *J Infect Dis.* 1998, 177 : 683-691)。用任何已知方法可以确定满意的 SBA。优选在第一次疫苗接种前，第二次疫苗接种后两个月和第三次疫苗接种后一个月（一年中三次疫苗接种是典型的人初级

(primary) 疫苗接种程序, 在例如 0, 2 和 4 个月, 或 0, 1 和 6 个月给予) 取血液样品。这种人初级疫苗接种程序可以对 1 岁以下婴儿实施(例如与 Hib 疫苗接种同时实施) 或也可以对 2-4 岁或青少年疫苗接种以检测这种初级疫苗接种程序的 SBA。另外的血液样品可以取自初级疫苗接种后 6 至 12 个月和如果适用, 在加强剂量后一个月。

对于具有同种杀菌活性的胞制剂, 如果 (2-4 岁人或青少年, 但优选生命第一年的婴儿) 第三次疫苗剂量 (初级疫苗接种程序的) 后一个月, 抗胞所来源的脑膜炎球菌的 SBA 方面 (抗体稀释度) 滴度 (与疫苗接种前滴度相比) 四倍增加的受试者百分比大于 30%, 优选大于 40%, 更优选大于 50%, 和最优选大于 60% 的受试者, 那么 SBA 将是满意的。

当然具有异种杀菌活性的胞制剂也可以组成具有同种杀菌活性的胞制剂, 如果它也可以引起抗它所来源的脑膜炎球菌的满意的 SBA 的话。

对于具有异种杀菌活性的胞制剂, 如果 (2-4 岁人或青少年, 但优选生命第一年的婴儿) 第三次疫苗剂量 (初级疫苗接种程序的) 后一个月, 抗三种异种脑膜炎球菌的 SBA 方面 (抗体稀释度) 滴度 (与疫苗接种前滴度相比) 四倍增加的受试者百分比大于 20%, 优选 30%, 更优选大于 35%, 和最优选大于 40% 的受试者, 那么 SBA 将是满意的。这种检测是具有异种杀菌活性的胞制剂是否可以诱导抗各种脑膜炎球菌的交叉杀菌抗体的好的标志。优选三种异种菌种应该具有彼此不同和优选与制得具有异种杀菌活性的胞制剂的菌种不同的电泳型 (ET) - 复合体或多位点序列分型 (MLST) 模式 (见 Maiden 等 PNAS USA 1998, 95: 3140-5)。本领域技术人员将能够容易确定具有不同 ET-复合体的三个菌种, 它们反映了脑膜炎球菌中观察到的遗传多样性, 尤其是 B 型脑膜炎球菌, 它们被认为是明显疾病负担的原因和/或代表认识的 MenB 超毒力菌系 (见 Maiden 等, 前述)。例如, 能够使用的三个菌种如下: 属于 A-4 簇的 BZ10 (B: 2b:P1.2); 属于 ET-37 复合体的 B16B6 (B: 2a:P1.2); 和属于 ET-5 复合体的 H44/76 (B: 15:P1.7,16), 或属于相同 ET/簇的任何其它菌种。可以使用这种菌种检测由例如属于 ET-5 复合体的脑膜炎球菌 CU385 (B: 4:P1.15) 制成的具有异种杀菌活性的胞制剂。可以使用的另一个样品菌种 (例如代替上面提及的任何 3 个检测菌种) 来自菌系

3 流行病克隆（如 NZ124 [B: 4:P1.7, 4]）。可以与 B16B6 互换使用的另一个 ET-37 菌种是 NGP165 (B: 2a:P1.2)。

测定 SBA 活性的方法是本领域已知的。例如 W099/09176 的实施例 10C 中描述的一个方法。一般来说，待检测菌种培养物生长（优选在铁耗尽的条件下 - 通过向生长培养基中添加铁螯合剂如 EDDA）在生长的 log 期。为了获得调至大约 20000CFU/ml 的工作细胞悬液，可以悬浮于含 BSA 的培养基（如含 0.3% BSA 的 Hanks 培养基）中。一系列两倍稀释的待检测血清（优选 56℃ 加热灭活 30 分钟）[例如 50 μl/孔体积]和 20000CFU/ml 待检测的脑膜炎球菌悬液 [例如 25 μl/孔体积]混合可以制备一系列反应混合物。反应瓶应该孵育（如 37℃ 15 分钟）和振荡（如以 210rpm）。最终反应混合物 [例如 100 μl 体积]另外含有补体（complement）来源 [如 25% 终体积的预测幼兔血清]，并如上孵育 [如 37℃ 60 分钟]。对于人 SBA 血清学，人血清通常用作补体的来源，而不是幼兔补体，而且使用的缓冲液是 PBS MgCl₂ 0.5 mM CaCl₂ 0.9 mM 葡萄糖 0.1% pH 7.4。无菌聚苯乙烯 U 底 96 孔微滴定板可以用于这个试验。使用多通道吸移管从每孔中取出等部分 [如 10 μl]，滴到 Mueller-Hinton 琼脂板上（优选含有 1% Isovitalex 和 1% 加热灭活的马血清）并孵育（例如 37℃ 在 5%CO₂ 中 18 小时）。优选，各个菌落计数达每部分 80CFU。下列三个检测样品可以用作对照：缓冲液+细菌+补体；缓冲液+细菌+灭活补体；血清+细菌+灭活补体。可以使用通过回归计算加工数据而得到相当于 50% 细胞杀灭的稀释度的测量值的程序直接计算 SBA 滴度。

在本发明进一步的方面，发明人发现与正常野生型疤制剂相比，本发明的具有异种杀菌活性的疤制剂缺乏免疫显性外膜蛋白（OMP），因而可以达到其交叉杀菌性能。

因此本发明也提供了本发明的多价脑膜炎球菌疤组合物，其中具有异种杀菌活性的疤与来自比较菌株（例如野生型 MC58，但优选野生型菌种 H44/76）的疤相比，缺乏免疫显性外膜蛋白，与来自相同比较菌种的疤相比，具有同种杀菌活性的疤不相同程度的缺乏（或优选根本不缺乏）所述免疫显性外膜蛋白。

本领域技术人员将容易理解什么是免疫显性 OMP，但是优选本发明的免疫显性 OMP 具有高度免疫原性、表面暴露表位（优选在表面暴露环序列内），并且是脑膜炎球菌表面前 10 种高度表达的 OMP（重量或每个细胞的分子数量）之一。通常这些 OMP 具有高度免疫原性，但是菌种与菌种间它们的环结构的氨基酸序列相当多变。下面详细描述这种 OMP 的实例。

“缺乏”是指本发明的具有异种杀菌活性的疱制剂与由比较菌种制备的疱相比，其表面具有较少本发明的免疫显性 OMP。尤其是与由比较菌种制备的相同量疱（由总蛋白测定，通常大约 10 μ g 蛋白）相比，具有异种杀菌活性的疱制剂应该具有低于 98、95、90、80、70、60、50、40、30、20、10 或 5% 的免疫显性 OMP 量。这可以通过例如 SDS-PAGE 凝胶上 OMP 条带光密度来评估，例如实施例 4 所述。最优选本发明的具有异种杀菌活性的疱制剂应该不具有免疫显性 OMP。上面也是“缺乏”的定义，其中这个文件比较了产生疱菌种表面上与比较菌种相比，免疫显性 OMP 水平。如果 OMP 被改造为不在疱/菌种外膜表面暴露的话，或如果 OMP 以相同水平表达，但为了使由这种菌种制备的疱更大异种杀菌活性，一个或多个表面暴露环通过它们的取代、突变或缺失而被改造为低活性或免疫显性的话，疱或菌种任选也可以缺乏免疫显性 OMP。

优选从来源脑膜炎球菌获得具有异种杀菌活性的疱制剂的方法与用于从比较菌种获得疱的方法相同（优选 Frederiksen 等 NIPH Annals. 1991, 14 : 67-80 所述方法）。然而，不是必需是这种情况，尤其是如果具有异种杀菌活性的疱制剂缺乏免疫显性 OMP 是由于制备疱的方法的话。在这种情况下，比较菌种制备疱的标准程序是 Frederiksen 等 (NIPH Annals. 1991, 14 : 67-80) 或 Bjune 等 (NIPH Annals 1991 14: 81-93) 所述的方法。

具有异种杀菌活性的疱可以得自天然缺乏免疫显性外膜蛋白的野生型脑膜炎球菌，或可以得自使免疫显性外膜蛋白缺乏的脑膜炎球菌。

尤其，通过将生产菌种基因工程改造为 OMP 缺乏或产生与没有改造的野生型菌种相比较少或不产生 OMP，可以使具有异种杀菌活性的疱缺乏免疫显性外膜蛋白。

“较少或不”具体是指与被改造的野生型菌种相比，其表面表达低于 98、95、90、80、70、60、50、40、30、20、10 或 5% 的免疫显性 OMP 量的菌种。最优选改造的菌种不表达任何免疫显性 OMP。如果 OMP 被改造为不在菌种的外膜表面暴露的话，或任选，如果 OMP 以相同水平表达，但为了使由这种菌种制备的疤更大异种杀菌活性，一个或多个表面暴露环通过它们的取代、突变或缺失而被改造为低活性或免疫显性的话，菌种也可以较少或不具有免疫显性 OMP。

编码本发明免疫显性 OMP 的基因可以用已知技术以上述方法被改造。尤其是可以遗传改造脑膜炎球菌基因的启动子或编码区，使得该菌种产生较少或不产生所述免疫显性外膜蛋白。可以完成此的具体方法在 W001/09350 中描述。例如，可以插入转座子（或其它序列）破坏该基因的编码区或启动子区域，或点突变或缺失可以达到类似结果。为了产生免疫显性低的基因产物，启动子或编码区可以完全或部分缺失（例如通过取代、突变或删除表面暴露环中存在的免疫原性表位）。重组事件可以用于删除、插入、取代或突变 OMP 中的序列使得它们免疫显性低，如用强启动子取代较弱（或无）启动子。移码突变也可以插入编码区。

不期望受理论的限制，想到具有同种杀菌活性的疤与这种疤的组合可有效作为疫苗，因为具有同种杀菌活性的疤由于产生的抗本发明免疫显性（但可变）OMP 的杀菌抗体，可有效抵抗使用国家中的流行菌种，然而，由于本发明的免疫显性 OMP 可以免疫掩饰疤表面存在的更保守抗原（以更低水平存在）的功效，所以具有同种杀菌活性的疤的异种杀菌活性不满意，具有上述缺点。本发明具有异种杀菌活性的疤使这种掩饰被一定程度除去，使得疤中以低水平存在的保守 OMP 对宿主免疫系统具有更多影响，并因此可以引起宿主交叉杀菌抗体，具有满意的异种杀菌活性。两种类型的疤的组合提供了可以配制成用于特定国家或区域的最佳疫苗的制剂。

优选具有异种杀菌活性的疤缺乏（或已经被改造很少或无）免疫显性 OMP，它是一个或多个下列抗原：PorA, PorB, OpC, OpA 或 PilC。优选疤缺乏（或已经被改造很少或无）PorA。

本发明的天然缺乏 PorA 的具有异种杀菌活性的优选疤制剂是分离

自脑膜炎球菌 CU-385 (B: 4: P1. 19, 15) 的疤制剂, 优选用 EP 301992-B 描述的方法分离。这个菌种或疤与比较菌种或疤(如 H44/76)相比缺乏 PorA。已经发现来自这个菌种的疤制剂(或来自与 CU-385 或 CU-385 疤相比, 具有等同或较低水平 PorA 的类似菌种[如低于总疤蛋白的 25、22、20、15、10 或 5% ProA]的疤)很适合与与 H44/76 疤相比 PorA 水平正常(等同或更高-如超过总疤蛋白的 28、30、35 或 40% PorA)的具有同种杀菌活性的疤制剂组合。因此这种疤组合(优选包括 CU-385 疤的那些)是本发明优选的疤组合。优选估计最终疤制剂中的 PorA 量。

此外, 可以进一步提高本发明具有异种杀菌活性的疤的交叉杀菌(满意 SBA)性能。通过增加所述疤表面的某些 OMP 量可以达到此。

因此, 以上描述的本发明具有异种杀菌活性的疤优选来自改造的脑膜炎球菌, 其上调表达下列基因的一种或多种(通过向菌种中添加额外拷贝的基因, 或通过现在存基因上游插入更强的启动子, 或 WO 01/09350 中描述的任何其它方法): NspA (WO 96/29412), Hsf 样或其截短物(WO 99/31132 & WO01/55182; 也已知是 NhhA), Hap (PCT/EP99/02766), OMP85 (WO00/23595), PilQ (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO 96/31618), TbpA (WO92/03467, US5912336, WO93/06861 和 EP586266), TbpB (WO93/06861 和 EP586266), NadA (Comanducci 等 J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454), FrpA 和/或 FrpC (WO 92/01460; Thompson 等, (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson 等, (1993) Infect. Immun.. 61: 2906-2911), LbpA, LbpB (PCT/EP98/05117), FhaB (WO98/02547, SEQ ID NO 38 [核苷酸 3083-9025]), HasR (PCT/EP99/05989), lipo02 (PCT/EP99/08315), Tbp2 (WO 99/57280), MItA (WO 99/57280), TspA (WO 00/03003), TspB (WO 00/03003) 和 ctrA (PCT/EP00/00135)。

“上调表达”是指相对于未修饰(即自然发生的)疤或菌种, 增加目的抗原表达的任何方法。应理解“上调”量将根据目的特定目的抗原而变化, 但是不超过会破坏疤的膜完整性的量。抗原上调是指比未修饰疤或菌种至少高 10% 的表达。优选至少高 50%。更优选至少高 100% (2, 3, 5 或 10 倍)。

应该理解未要求保护可能具有本发明的多价疤制剂特性的现有技术的多价疤制剂（或包含这种制剂的疫苗）；例如未要求保护 WO 01/09350 中公开的任何特定多价疤制剂（如由得自所有下列 menB 菌种的疤组成的组合：H44/76, M97/252078, BZ10, NGP165 和 CU385, 或由来自 CU385 的疤和由一种或多种其余 4 个菌种得到的一种或多种疤制剂组成的组合），未要求保护 WO 02/09643 中公开的任何特定多价疤制剂（如由得自所有下列脑膜炎球菌的疤组成的组合：MenC RM1090, MenB BZ198, MenA Z1092, 或由得自这 3 个菌种任何一对的一对疤制剂组成的组合），未要求保护 WO 01/91788 中公开的任何特定多价疤制剂。

疫苗制剂

本发明一个优选的实施方案是治疗或预防奈瑟球菌（尤其是脑膜炎球菌）疾病的疫苗形式的本发明多价疤组合物的制剂，它也可以包含药物可接受赋形剂。

从任何上面提及的菌种（除非另外指出）制备疤制剂可以通过本领域技术人员熟知的任何方法完成。优选使用 EP 301992、US 5,597,572、EP11243 或 US 4,271,147、Frederikson 等 (NIPH Annals [1991], 14: 67-80)、Zollinger 等 (J. Clin. Invest. [1979], 63: 836-848)、Saunders 等 (Infect. Immun. [1999], 67: 113-119)、Drabick 等 (Vaccine [2000], 18: 160-172) 或 W001/09350 (实施例 8) 中公开的方法。通常，用洗涤剂优选脱氧胆酸盐提取 OMV，和任选酶学除去核酸。超离心，之后任选大小排阻层析完成纯化。本发明的 2 种或更多不同疤可以组合在单一容器中形成本发明的多价制剂（尽管如果本发明不同疤为分开容器中的分开组分，同时 [医师观察相同] 给予宿主，也可以认为该制剂是多价的）。通常通过 0.2 μ m 滤膜过滤而对 OMV 制剂进行灭菌，优选保存在已知稳定疤制剂的蔗糖溶液（如 3%）中。

应该指出组成本发明多价疤制剂的疤得自遗传不同的菌种（即用于制备本发明制剂的所有产生疤的菌种的对比表明 3% 以上的任何给定菌种基因组的开放阅读框架与使用的其它菌种的各个开放阅读框架具有遗传差异）。然而最优选，本发明的多价疤制剂完全得自脑膜炎球菌 B

菌种。

Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York) 中一般描述了疫苗制剂。

本发明的多价疤组合物于本发明的疫苗制剂中可以加入佐剂。合适佐剂包括铝盐，如氢氧化铝凝胶、明矾或磷酸铝（优选氢氧化铝），但是也可以是钙盐（优选碳酸钙）、铁盐或锌盐，或可以是酰化酪氨酸、或酰化糖，阳离子或阴离子衍生多糖、或聚磷脲的不溶悬液。

可以使用的合适 Th1 佐剂系统包括一磷酸脂 A，尤其是 3-脱-0-酰化一磷酸脂 A（或 LPS 的其它无毒衍生物），和一磷酸脂 A、优选 3-脱-0-酰化一磷酸脂 A（3D-MPL）[或无毒 LPS 衍生物]与铝盐组合。增强系统包括一磷酸脂 A 和皂甙衍生物组合，尤其是如 WO 94/00153 中公开的 QS21[或其它皂甙]和 3D-MPL[或无毒 LPS 衍生物]组合，或如 WO96/33739 公开的反应原性低的组合物，其中 QS21[或皂甙]与胆固醇淬灭。特别有效佐剂制剂包括 WO95/17210 中描述的含 QS21、3D-MPL 和生育酚的水包油乳剂并且是优选制剂。

疫苗可以包含皂甙，更优选 QS21。也可以包括水包油乳剂和生育酚。含未甲基化 CpG 的寡核苷酸（WO 96/02555）也是 TH1 反应的优选诱导剂并适合用于本发明。

本发明的疫苗制剂也可以用于保护或治疗对感染易感的哺乳动物，通过全身或粘膜途径给予所述疫苗。这些给药途径可以包括通过肌肉、腹膜内、真皮内或皮下途径注射；或通过到口腔/消化道、呼吸道、泌尿生殖道的粘膜给药。因此本发明的一个方面是免疫人宿主抵抗由奈瑟球菌（尤其是脑膜炎球菌）细菌引起的疾病的方法，该方法包括给宿主施用免疫保护剂量的本发明的多价疤制剂。

选择每种疫苗剂量中的疤量作为典型疫苗中诱导免疫保护反应，没有明显副作用的量。这个量可以根据采用的具体免疫原和它如何呈递而变化。通常，预期每剂将包含每种疤 1-100 μg （根据蛋白质计），优选 5-50 μg ，和最优选 5-25 μg 范围。因此，对于本发明的二价疤疫苗，每剂可以典型地包括 $2 \times 25 \mu\text{g}$ 的疤。

用标准研究可以确定特定疫苗中每种孢的最佳量，包括观察受试者的合适的免疫反应。最初（初级）疫苗接种（典型地给予3次，优选在生命第一年或青春期单独一年，例如在0, 2和4个月，或0, 1和6个月）后，受试者可以以足够时间间隔接受一次或几次加强免疫接种（首次初级给药1年后）。本发明的疫苗可以用于免疫生命第一年的婴儿、2-4岁或青少年。特别有优势对生命第一年的婴儿引起满意的异种杀菌活性。

空或灭活全细胞疫苗

本发明灭活想到了多价孢制剂和疫苗的上面对改进可以扩展到空或灭活全细胞制剂和疫苗（具有等同优点）。用于制备本发明的多价孢制剂的脑膜炎球菌也可以用于制备多价空和灭活全细胞疫苗制剂。由革兰氏阴性菌种制备空制剂（包膜完整的空细胞）的方法是本领域熟知的（见例如WO 92/01791）。杀灭全细胞制备用于疫苗的灭活细胞制剂的方法也是熟知的。因此，为了本发明的目的，贯穿本文描述的术语“孢制剂”和“孢疫苗”以及方法分别适用于术语“空制剂”和“空疫苗”，和“灭活全细胞制剂”和“灭活全细胞疫苗”。

本发明优选的疫苗组合物

如上所述的特别适合于新西兰或欧洲（特别是欧共体）的疫苗接种程序的本发明优选的疫苗包括本发明的多价孢组合物，其中具有同种杀菌活性的孢得自血清型P1.4的脑膜炎球菌种。

如上所述的特别适合于美国疫苗接种程序的本发明优选的疫苗包含本发明的多价孢组合物，其中具有同种杀菌活性的孢得自血清型P1.7, 16的脑膜炎球菌种，和任选具有同种杀菌活性的另外的孢也包括得自选自下列：P1.7, 1；P1.5, 2；P1.22a, 14和P1.14的血清型的一种或多种（2, 3或全部4种）脑膜炎球菌种的那些。

如上所述的特别适合于挪威的疫苗接种程序的本发明优选的疫苗包含本发明的多价孢组合物，其中具有同种杀菌活性的孢得自血清型P1.16的脑膜炎球菌种。

对于所有上述疫苗，疫苗所包含的具有异种杀菌活性的胞优选得自 CU-385 菌种（或类似菌种或与 CU-385 或 CU-385 胞具有分别等同或较少 PorA 的胞制剂，如这里所述）。如上所述，接着进一步优选上面所列具有同种杀菌活性的胞或它所来源的菌种具有分别等同或比 H44/76 胞，或菌种更多的 PorA。优选估计最终胞制剂中的 PorA 量。

疫苗组合

本发明另一方面是包含本发明的多价胞制剂或疫苗与有利用于抗某些疾病情况的其它抗原的疫苗组合。已经发现胞特别适合与其它抗原配制，因为它们有利地对与它们混合的抗原具有佐剂作用。

在一个优选组合中，本发明的多价脑膜炎球菌胞制剂或疫苗与下列脑膜炎球菌荚膜（capsular）多糖中的 1, 2, 3 种或优选全部 4 种共同配制：A, C, Y 或 W，这些多糖可以是简单的或缀合包含 T 细胞表位的载体（优选蛋白载体如破伤风类毒素、白喉类毒素或 CRM197）。术语“多糖”意在包括不分大小或按一定大小的多糖，或按一定大小的寡糖。优选欧洲疫苗中至少包括 C 和 Y，美国疫苗中至少包括 C，和非洲、南美或近赤道国家的疫苗中至少包括 A 和 C。这种疫苗可以有利地用作全球脑膜炎球菌疫苗。

在进一步优选实施方案中，本发明的多价胞制剂和疫苗（优选与 1, 2, 3 或全部 4 种简单或缀合的脑膜炎球菌荚膜多糖 A、C、Y 或 W 配制）与缀合流感嗜血杆菌（*H. influenzae*）b 荚膜多糖，和/或一种或多种简单或缀合的肺炎球菌荚膜多糖共同配制。任选，该疫苗也可以包含一种或多种可以保护宿主抗肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）感染的蛋白抗原。这种疫苗可以有利用作全球脑膜炎疫苗。

肺炎球菌荚膜多糖抗原优选选自血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F（最优选血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F）。

优选的肺炎球菌蛋白抗原是暴露在肺炎球菌外表面的那些肺炎球菌蛋白（在肺炎球菌生活周期的至少一部分过程中能够被宿主免疫系统

识别), 或由肺炎球菌分泌或释放的蛋白。最优选, 该蛋白是毒素、粘附素、2-组分信号转导剂或肺炎链球菌的脂蛋白, 或其截短或免疫功能等同物。特别优选的蛋白包括但不限于: 肺炎球菌溶血素(优选被化学处理或突变解毒) [Mitchell 等, *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell 等, *Biochim Biophys Acta* 1989 Jan 23; 1007(1) : 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli* : rapid purification and biological properties.", WO96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton 等), WO 99/03884 (NAVA)] ; PspA 及其跨膜缺失变体 (US 5804193-Briles 等) ; PspC 及其跨膜缺失变体 (WO 97/09994-Briles 等); PsaA 及其跨膜缺失变体 (Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec; 64 (12): 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*") ; 肺炎球菌胆碱结合蛋白及其跨膜缺失变体; CbpA 及其跨膜缺失变体 (WO 97/41151; WO 99/51266); 甘油醛-3-磷酸盐-脱氢酶 (*Infect. Immun.* 1996 64: 3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato 等, *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164 : 207-14); M 样蛋白, SB 专利申请 EP 0837130; 和粘附素 18627, SB 专利申请 EP 0834568。更多优选肺炎球菌蛋白抗原是 WO 98/18931 中公开的那些, 尤其是 WO 98/18930 和 PCT/US99/30390 中选择的那些。

本发明另外优选的肺炎链球菌蛋白抗原选自下组: 多组氨酸三联体 (Poly Histidine Triad) 家族 (Pht; 尤其是 PhtA, PhtB, PhtD 或 PhtE), Lyt 家族 (尤其是 LytA, LytB 或 LytC), SpsA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 和 Sp133, 或其截短或免疫功能等同物。

为了本发明的目的, “免疫功能等同物” 定义为包含来自本发明蛋白的至少一个保护性表位的蛋白的肽。这种表位的特征是表位暴露、高度保守, 并可以引起宿主的杀菌抗体反应或预防毒性作用。优选, 功能等同物具有本发明蛋白的至少 15 和优选 30 或更多连续氨基酸。最优选, 可以使用该蛋白的片段、缺失体, 如它的跨膜缺失变体 (即使用蛋白的

胞外结构域)、融合体、化学或基因解毒衍生物等等,条件是它们基本上能够引起与天然蛋白相同的免疫反应。使用两种方法组合鉴定表面暴露和具有抗原性的肽可以很容易确定在蛋白序列中潜在B细胞表位的位置:2D结构预测和抗原性指数预测。可以使用PSIPRED程序(来自David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)进行2D结构预测。可以基于Jameson和Wolf(CABIOS 4: 181-186 [1988])所述方法计算抗原性指数。

本发明的肺炎链球菌蛋白优选选自下组:来自多组氨酸三联体家族(Pht)的蛋白,来自Lyt家族的蛋白,胆碱结合蛋白,具有LPXTG基序(其中X是任何氨基酸)的蛋白,具有II型信号序列基序LXXC(其中X是任何氨基酸)的蛋白和具有I型信号序列基序的蛋白。这些种类(或基序)的优选实例是下列蛋白(或其截短或免疫功能等同物):

Pht(多组氨酸三联体)家族包括蛋白PhtA、PhtB、PhtD和PhtE。该家族的特征是脂化序列,被富含脯氨酸的区域和几个组氨酸三联体分隔开的两个结构域,可能参与金属或核苷酸结合或酶活性,(3-5)卷曲螺旋区,保守N末端和异源C末端。它存在于被检测的所有肺炎链球菌种中。在其它链球菌和奈瑟球菌中也已经发现了同源蛋白。该家族的优选成员包括PhtA、PhtB和PhtD。更优选,它包括PhtA或PhtD。然而应该理解术语PhtA、B、D和E是指具有下面引用文献中公开的序列的蛋白以及它的天然存在(和人工)的变体,所述变体具有与参照蛋白具有至少90%等同性的序列同源性。优选至少95%等同和最优选97%等同。

对于Pht蛋白,PhtA在WO 98/18930中公开,也称作Sp36。如上指出,它是来自多组氨酸三联体家族的蛋白并具有LXXC的II型信号基序。

PhtD在WO 00/37105中公开,也称作Sp036D。如上指出,它也是来自多组氨酸三联体家族的蛋白并具有LXXC的II型信号基序。

PhtB在WO 00/37105中公开,也称作Sp036B。PhtB家族的另一个成员是C3降解多肽,如WO 00/17370公开。这个蛋白也来自多组氨酸

三联体家族并具有 II 型 LXXC 信号基序。优选的免疫功能等同物是 WO 98/18930 中公开的蛋白 Sp42。PhtB 截短物(大约 79kD)在 WO 99/15675 中公开,也认为是 PhtX 家族的成员。

PhtE 在 WO 00/30299 中公开并称作 BVH-3。

SpsA 是 WO 98/39450 中公开的胆碱结合蛋白(Cbp)。

Lyt 家族是与细胞裂解相关的膜相关蛋白。N 末端结构域包含胆碱结合结构域,然而 Lyt 家族不具有下面指出的胆碱结合蛋白家族(Cbp 家族)中发现的所有特征,并因此对于本发明,认为 Lyt 家族与 Cbp 家族不同。与 Cbp 家族相比,C 末端结构域含有 Lyt 蛋白家族的催化结构域。该家族包括 LytA、B 和 C。对于 Lyt 家族,LytA 在 Ronda 等, Eur J Biochem, 164: 621-624 (1987)中公开。LytB 在 WO 98/18930 中公开,并且也称作 Sp46。LytC 也在 WO 98/18930 中公开,也称作 Sp91。那个家族的优选成员是 LytC。

另一个优选实施方案是 Lyt 家族截短物,其中“Lyt”如上定义并且“截短物”是指缺乏胆碱结合区域的 50%或更多的蛋白。优选这种蛋白缺乏整个胆碱结合区域。

Sp125 是肺炎球菌表面蛋白的实例,具有 LPXTG(其中 X 是任何氨基酸)的细胞壁固定基序。已经发现具有这个基序的这类肺炎球菌表面蛋白中的任何蛋白在本发明中 useful,并因此视为本发明的另一种蛋白。Sp125 本身在 WO 98/18930 中公开,也已知是 ZmpB-锌金属蛋白酶。

Sp101 在 WO 98/06734 中公开(其中它具有参照号 #y85993。它的特征是 I 型信号序列)。

Sp133 在 WO 98/06734 中公开(其中它具有参照号 #y85992。它的特征也是 I 型信号序列)。

Sp128 和 Sp130 在 WO 00/76540 中公开。

本发明中使用的蛋白优选选自 PhtD 和 PhtA 组,或这两种蛋白的组合,或二者之一或二者都具有 CbpA 的组合。

本发明的更多方面

本发明的更多方面提供了:制备本发明的多价脑膜炎球菌胞组合物

或疫苗的方法，包括将具有同种杀菌活性的疤与具有异种杀菌活性的疤组合的步骤；预防或治疗奈瑟球菌，优选脑膜炎球菌疾病的方法，包括给需要它的宿主（优选 2-4 岁或青少年人，和有利地小于两岁[优选一岁]的婴儿）施用免疫有效量的本发明疫苗的步骤（通常使用 3 剂量初级免疫方案，优选每次免疫间隔 1-2 个月，和任选加强）；和免疫有效量的本发明疫苗在制备预防或治疗奈瑟球菌，尤其是脑膜炎球菌疾病（尤其是治疗或预防是通过 3 剂量初级免疫方案[优选每次免疫间隔 1-2 个月，和任选加强]和/或预防或治疗的疾病是在人类中 - 优选 2-4 岁或青少年，和有利地小于两岁[优选一岁]的婴儿）的药物中的用途。

实施例

除了另外详细说明，使用标准技术实施下列实施例，它们对于本领域技术人员是熟知和常规的。实施例是阐述性的，但是不限制本发明。

实施例 1: 缺乏主要免疫显性抗原 PorA 的脑膜炎奈瑟球菌血清型 B 菌种的构建

这在 W001/09350 的实施例 3 中描述。

实施例 2: 本发明的多价脑膜炎球菌疤疫苗的益处

对血清型 B OMV 疫苗实施了很多功效试验。开发了两个具体 OMV 疫苗对抗主要由于单一血清亚型，即分别是 4:P1.15 和 15:P1.16 的古巴和挪威的流行病情况。在十几岁少年中以安慰剂对照双盲方式实施了两个功效试验。在古巴，16 个月的随访时间发现 83% 功效（可信区间：42%-95%）(Sierra NIPH Annals 1991, 14: 195-207)，而在挪威，29 个月的随访时间发现了 57% 的功效（较低可信区间：27%）(Bjune 等, NIPH Annals 1991 14: 81-93)。在挪威，10 个月的随访时间是 86% 的功效，并且随后第三剂量证明免疫原性增强和抗体持续性提高 (Rosenquist, Infect. Immun. 1995 63: 4642-4652)。由于两个试验都以主要类似类型设置实施的，因此对于交叉保护不能做出结论。

在两个头对头试验中并使用抗各个菌种的交叉杀菌活性，与挪威疫

苗相比时，古巴疫苗看来诱导更高水平的交叉杀菌活性（见表1）。

表1: Finlay 脑膜炎球菌 BC 疫苗诱导的血清杀菌活性 (SBA) - SBA 应答者百分比 (3 剂量后)

冰岛试验 (Perkins 等, JID, 177, 1998, 683-691)				
年龄	N	15: P1. 16 (挪威菌种)	4: P1. 15 (古巴菌种)	4: P1. 4 (NZ 型)
Finlay 16-19 岁	74	48	44	36
NIPH	75	84	31	27
智利试验 (Tappero, JAMA, 281, 1999, 1520-27)				
		15: P1. 16	4: P1. 15	
Finlay <1 岁	51	31	90	
2-4 岁	48	41	78	
17-30 岁	53	56	67	
NIPH <1 岁	50	98	2	
2-4 岁	51	98	24	
17-30 岁	50	96	46	

SBA 应答者定义为与接种疫苗前滴度相比 SBA 滴度升高 4 倍或更高的人。

给予婴儿和儿童三剂 Finlay 或对照 (Hib) 疫苗，间隔两个月。

在成人中，前两个剂间隔 2 个月给予。在智利研究中，第三剂在第二剂后 2 个月给予，在冰岛试验中，第三剂在第二剂后一年给予。

在疫苗接种前和第二和第三次疫苗接种后 4-6 周抽取血液样品。

本发明人确定了当比较杀菌活性时，挪威疫苗产生更多菌株特异性应答，而古巴疫苗诱导更多交叉杀菌活性。此外，本发明人相信古巴疫苗具有这种活性，因为它缺乏免疫显性 OMP，尤其是 PorA。尽管缺乏 PorA，也证明古巴疫苗存在足够的同种细菌活性。

本发明人发现包含同种杀菌活性的胞（具有使用国家中流行的血清亚型）和异种杀菌活性的胞的多价疫苗提供了保护抗当地流行流行病菌种的最佳疫苗，也仍提供了异种保护，它降低了新血清型 B 菌种出现的

机会,所述的新血清型 B 菌种的出现可能在执行全国规模免疫运动后流行菌种流行降低时发生。

欧洲和/或新西兰的最佳疫苗将合并两个分开的疤的组合:P1.4 (流行菌种)和 P1.15 (具有异种杀菌活性 - 例如得自用于制备商业化古巴 VA-MENGOC-BC[®]疫苗的菌种 CU-385 的 OMV)。这个组合目的在于提供同种 P1.4 保护,同时保留古巴 P1.15 菌种的异种保护。

实施例 3: 包含得自脑膜炎球菌菌种 CU-385 (B: 4: P1.19, 15), 和 新西兰流行脑膜炎球菌种 (B: 4: P1.7b, 4) 的疤的多价疤疫苗

制备上面的多价疫苗 (每人剂量 25 μ g 每种疤, 氢氧化铝辅佐)。

测试一价和二价疤制剂来检测疤组合在一起是否可以引起任何免疫干扰。

用对小鼠的混合血清样品实施的杀菌测试估计诱导的功能抗体水平。

简言之,在 0 和 21 天,10 只 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄) 的组注射两次等量 10 μ g 蛋白的吸附一价或二价量。在 35 天抽取血液样品。血清中杀菌活性的确定是基于抗体通过补体活化诱导细菌裂解的性能。血清与有活力的脑膜炎球菌 B (检测 CU-385 和 P1.4 新西兰菌种) 共同孵育后,在兔补体存在下,确定血清样品中的集落形成单位 (CFU) 数量。细菌滴度是使得 50% 以上被杀死的最后血清稀释度。

基于这些结果,二价疫苗具有免疫原性并诱导功能抗体。当两个单量混合时,没有免疫干扰的迹象。

实施例 4: 在脑膜炎奈瑟球菌中相对 PorA 表达水平

用 SDS-PAGE 比较来自菌种 CU385, H44/76 和 N150/88 的外膜囊样品 (基本上如 NIPH Annals 1991 14: 67-80 中所述制备) 的 PorA 表达水平。样品在 Novex 4-20% 凝胶上运行。在图 1 中,每孔加样 10 和 20 μ g (Lowry 确定法) 材料,而在图 2 中,对于每个菌种,加样 10 μ g 材料一式两份。考马斯兰染色后,在 3 个菌种中检测到 3 个主要条带: PorA (大约 38kDa) PorB (大约 36kDa) 和 RMP (大约 33kDa)。用两个不同

光密度计扫描负载 10 μ g 材料的泳道上的检测条带：Pharmacia 图像扫描仪光密度计，使用 1D-Elite 软件，和 Biorad 光密度计，使用 MultiAnalyst 软件。为了确定每个菌种 PorA 的相对表达水平，计算 D0 值。对于每个泳道，PorA 水平表示为总检测蛋白的百分比。

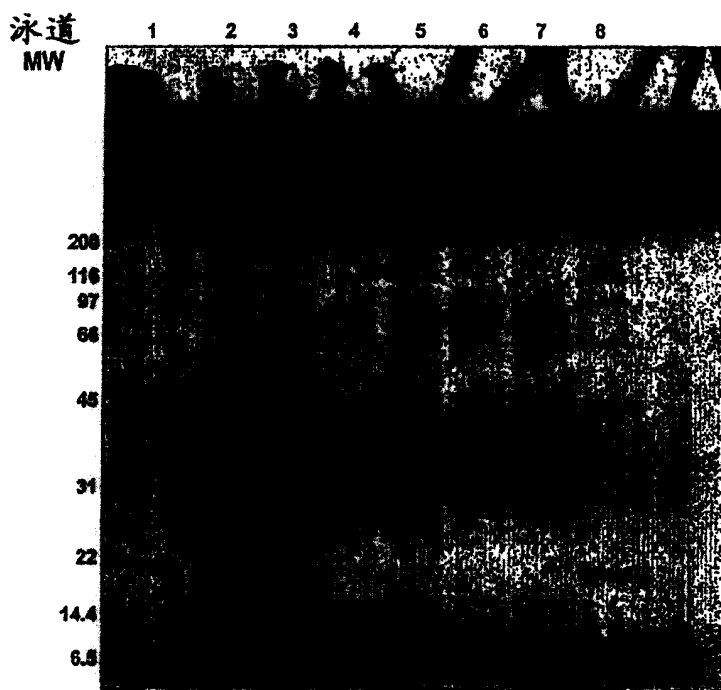
结果（下表 1）表明 CU385 与其它 2 个菌种相比，PorA 表达的相对水平较低：在 CU385 疤中，PorA 仅占总检测蛋白的大约 20%，而来自菌种 N150/88 和 H44/76 中，测定它分别占疤的大约 40 和 30% 的蛋白。

表 1

		MenB 的不同菌种的 SDS-PAGE 中 PorA、PorB 和 RMP 的相对强度									
		Multi-Analset					1D-Elite				
		Fig 1	Fig 2 (ln 1)	Fig 2 (ln 2)	Mean %	Fig 1	Fig 2 (ln 1)	Fig 2 (ln 2)	平均 1 %	平均 %	
N150/88	PorA	41.24	41.55	41.73	42	37.58	35.42	35.33	36	39	
	PorB	22.48	23.97	24.03	23	23.28	21.96	22.55	23	23	
	RMP	12.30	10.90	11.01	11	9.25	9.91	9.97	10	11	
	其它	23.98	23.58	23.23	24	29.88	32.70	32.15	32	28	
				100				100		100	
CU385	PorA	22.22	20.56	20.21	21	23.98	20.19	19.71	21	21	
	PorB	43.74	45.09	45.95	45	46.37	43.97	43.05	44	45	
	RMP	18.62	17.58	17.73	18	13.02	14.38	14.12	14	16	
	其它	15.43	16.77	16.12	16	16.63	21.46	23.12	20	18	
				100				100		100	
H44/76 1706	PorA	29.76	30.25	29.8	30	29.76	27.92	28.31	29	29	
	PorB	39.65	41.43	41.1	41	42.73	42.34	42.29	42	42	
	RMP	16.67	15.66	14.86	16	15.42	15.45	15.29	15	16	
	其它	13.93	12.66	14.24	14	12.11	14.3	14.11	14	14	
				100				100		100	

图 1

Novex 4-20% 10wells 1mm 考马斯亮蓝 G250 Gel n° 3030	Cat n° EC6025 凝胶类型: 还原 (EtSH) 凝胶代号: 2071541-393
------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------

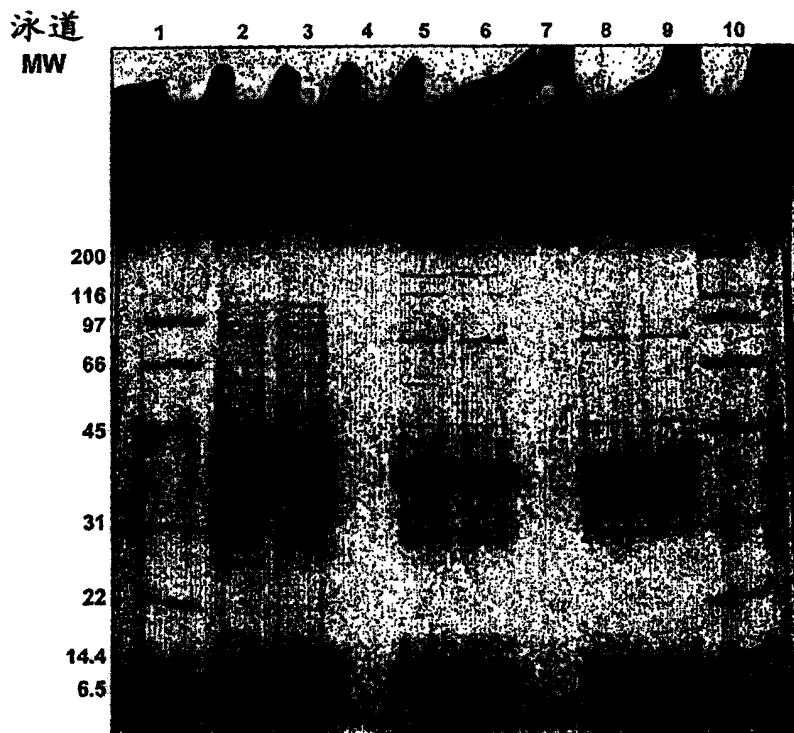


泳道定义

n°	样品	$\mu\text{g dép}$
1	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 KDa)	5 μl
2	N150/88	10
3	N150/88	20
4	CU385	10
5	CU385	20
6	H44/76 1706	10
7	H44/76 1706	20
8	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 KDa)	5 μl

图 2

Novex 4-20% 10wells 1mm	Cat n°EC6025
考马斯亮蓝 G250	凝胶类型: 还原 (EtSH)
Gel n° 3038	凝胶代号: 2071240-1208



泳道定义

n°	样品	µg dép
1	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 KDa)	5µl
2	N150/88	10
3	N150/88	10
4	SB1x	
5	CU385	10
6	CU385	10
7	SB1x	
7	H44/76 1706	10
8	H44/76 1706	10
9	Std BIORAD Broad (200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6.5 KDa)	5µl