

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/095

C12N 1/21

A61P 37/04

A61K 39/102



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823703.2

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1688333A

[22] 申请日 2003.7.31 [21] 申请号 03823703.2

[30] 优先权

[32] 2002. 8. 2 [33] GB [31] 0218037.0

[32] 2002. 8. 2 [33] GB [31] 0218036.2

[32] 2002. 8. 2 [33] GB [31] 0218035.4

[32] 2002. 8. 2 [33] GB [31] 0218051.1

[32] 2002. 8. 30 [33] GB [31] 0220197.8

[32] 2002. 8. 30 [33] GB [31] 0220199.4

[32] 2002. 11. 1 [33] GB [31] 0225524.8

[32] 2002. 11. 1 [33] GB [31] 0225531.3

[32] 2002. 12. 24 [33] GB [31] 0230164.6

[32] 2002. 12. 24 [33] GB [31] 0230168.7

[32] 2002. 12. 24 [33] GB [31] 0230170.3

[32] 2003. 3. 5 [33] GB [31] 0305028.3

[86] 国际申请 PCT/EP2003/008568 2003.7.31

[87] 国际公布 WO2004/014417 英 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.4

[71] 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 R·比曼斯 P·德诺埃 C·费龙

C·戈拉 J·普尔曼 V·魏南茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 5 页 说明书 31 页 附图 5 页

[54] 发明名称 疫苗

[57] 摘要

本发明涉及奈瑟氏球菌疫苗组合物，它们的制备，和这种组合物在医学中的用途。更具体地，本发明涉及产生更适于产生奈瑟氏球菌，尤其是脑膜炎球菌的外膜泡囊(或胞)疫苗的新的工程化脑膜炎球菌菌株的方法。还基于新的 LOS 亚单位或脑膜炎球菌外膜泡囊(或胞)疫苗的用途描述了有利的方法和疫苗产物，该 LOS 亚单位或脑膜炎球菌外膜泡囊(或胞)疫苗可更安全和更有效地用于人受试者中。具体地，描述了基因下调的组合，如：PorA 和 OpA、PorA 和 OpC、OpA 和 OpC、PorA 和 OpA 和 OpC。备选地或额外地，表明 lgtB⁻是为了有效和安全地在奈瑟氏球菌疫苗组合物中使用 L3 和/或 L2 LOS 的最佳突变。还描述了来自 lgtB⁻和荚膜多糖缺陷的脑膜炎球菌突变株的胞疫苗；还描述了制备胞制剂的有利方法，其中 LOS 将作为重要抗原保留。

1. 奈瑟氏球菌胞制剂，其来自具有 L2 LOS 免疫型的奈瑟氏球菌菌株或者具有 L3 LOS 免疫型的奈瑟氏球菌菌株并且其中菌株为 lgtB⁻；或者奈瑟氏球菌胞制剂，其包含来自具有 L2 LOS 免疫型的奈瑟氏球菌菌株和具有 L3 LOS 免疫型的奈瑟氏球菌菌株的胞的组合，任选其中每种菌株为 lgtB⁻。

2. 权利要求 1 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株为脑膜炎球菌的，优选血清群 B。

3. 权利要求 1 或 2 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株不能合成荚膜多糖。

4. 权利要求 3 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株与它们所来自的天然菌株相比，如下荚膜多糖基因之一的表达被下调，优选被缺失：ctrA、ctrB、ctrC、ctrD、synA、synB、synC，或优选 siaD；并且其中当 L2 和 L3 胞都存在时，它们所来自的菌株优选具有相同的荚膜多糖基因在每种菌株中的表达被下调。

5. 权利要求 1-4 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株与它们所来自的天然菌株相比，下面的脂质 A 基因之一或两者表达被下调，优选被缺失：msbB 或 htrB，优选前者；并且其中当 L2 和 L3 胞都存在时，它们所来自的菌株优选具有相同的脂质 A 基因在每种菌株中的表达被下调。

6. 权利要求 1-5 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株与它们所来自的天然菌株相比，一或多种下述外膜蛋白基因的表达被下调，优选被缺失：porA、porB、opA、opC、pilC 或 frpB；并且其中当 L2 和 L3 胞都存在时，它们所来自的菌株优选具有相同的外膜蛋白基因在每种菌株中的表达被下调。

7. 权利要求 6 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株与它们所来自的天然菌株相比，下面的外膜蛋白基因的任一种组合的表达被下调，优选被缺失：PorA 和 OpA、PorA 和 OpC、OpA 和 OpC、PorA 和 OpA 和 OpC、PorA 和 FrpB、OpC 和 FrpB、OpA 和 FrpB、PorA 和 OpA 和 OpC 和 FrpB。

8. 权利要求 1-7 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中奈瑟氏球菌菌株具有一或多种下述外膜蛋白抗原的表达被上调：NspA、TbpA 低、TbpA 高、

Hsf、Hap、OMP85、PilQ、NadA、LbpA、MltA；其中当 L2 和 L3 胞都存在时，它们所来自的菌株优选具有一种或多种不同的外膜蛋白抗原在每种菌株中的表达被上调。

5 9. 来自一种奈瑟氏球菌菌株的奈瑟氏球菌胞制剂，该菌株与它们所来自的天然菌株相比，下面的外膜蛋白的两种或多种表达被下调，优选被缺失：PorA、PorB、OpA、OpC、PilC、或 FrpB。

10. 权利要求 9 的奈瑟氏球菌胞制剂，其中该奈瑟氏球菌菌株与它们所来自的天然菌株相比，下面的外膜蛋白组合的任一种的表达被下调，优选被缺失：PorA 和 OpA、PorA 和 OpC、OpA 和 OpC、PorA
10 和 OpA 和 OpC、PorA 和 FrpB、OpC 和 FrpB、OpA 和 FrpB、PorA 和 OpA 和 OpC 和 FrpB。

11. 权利要求 1-10 的奈瑟氏球菌胞制剂所来源的奈瑟氏球菌菌株。

12. 从权利要求 11 的奈瑟氏球菌菌株分离的 LOS 制剂，其包含免
15 疫型 L2 和/或 L3 LOS。

13. 在脂质体制剂中的权利要求 12 的 LOS 制剂。

14. 权利要求 1-10 任一项的奈瑟氏球菌胞制剂或权利要求 12 或 13 的 LOS 制剂，其中所含 LOS 缀合到 T-辅助表位的来源，优选蛋白或外膜蛋白。

20 15. 权利要求 14 的奈瑟氏球菌胞制剂，其可以通过胞内交联方法得到。

16. 免疫原性组合物或疫苗，其包含权利要求 1-10 或 12-15 任一项的奈瑟氏球菌胞制剂或 LOS 制剂，以及药学上可接受的赋形剂。

25 17. 权利要求 16 的疫苗，进一步包含佐剂，优选氢氧化铝，或者 3D-MPL 和磷酸铝。

18. 权利要求 16 或 17 的疫苗，其另外地包含来自下面的菌株的一种或多种缀合的荚膜多糖或寡糖：脑膜炎球菌血清群 A、脑膜炎球菌血清群 C、脑膜炎球菌血清群 W-135、脑膜炎球菌血清群 Y、和 B 型流感嗜血菌。

30 19. 制备权利要求 16 的奈瑟氏球菌胞制剂疫苗的方法，该方法包含步骤：培养权利要求 11 的奈瑟氏球菌菌株，从中分离胞，任选如果合适组合 L2 和 L3 胞，和将胞与药学上可接受的赋形剂配制。

20. 权利要求 19 的方法，其中通过用 0-0.5、0.02-0.4、0.04-0.3、0.06-0.2、或 0.08-0.15% 的脱氧胆酸盐，优选用大约或精确地 0.1% 脱氧胆酸盐提取来实施分离步骤。

21. 革兰氏阴性细菌菌株的胞制剂，在该菌株的外膜中整合缀合到
5 LOS 的外膜蛋白。

22. 权利要求 21 的胞制剂，其中 10、20、30、40、50、60、70、80、90、95 或 99% 以上的缀合的 LOS 的脂质 A 部分整合到胞的外膜和/或环境中，从而其毒性被减弱或者与其已经施用的宿主屏蔽。

23. 权利要求 21 或 22 的胞制剂，其中胞中 LOS 与具有相同量的
10 未缀合的 LOS 的胞相比毒性减弱。

24. 权利要求 21-23 的胞制剂，其中 10、20、30、40、50、60、70、80、90、95 或 99% 以上的缀合的 LOS 处于当施用于宿主的免疫系统时适于诱导针对该 LOS 的杀细菌抗体应答的天然构象。

25. 权利要求 21-24 的胞制剂，其中缀合的 LOS 具有适于在宿主
15 中引起针对未缀合的 LOS 反应性的免疫应答的构象。

26. 权利要求 21-25 的胞制剂，其中外膜蛋白缀合到 LOS 分子的寡糖或多糖部分。

27. 权利要求 21-26 的胞制剂，其中外膜蛋白和 LOS 分子对产生
胞的革兰氏阴性细菌菌株而言是天然的。

28. 权利要求 21-27 的胞制剂，其可通过胞内交联方法得到。
20

29. 权利要求 21-28 的胞制剂，其中胞中存在的 10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 95% 以上的 LOS 交联或缀合到外膜蛋白。

30. 权利要求 21-29 的胞制剂，其来自不产生荚膜多糖的革兰氏阴
性菌株，或来自不包含荚膜多糖的胞制剂。

31. 权利要求 21-30 的胞制剂，其中荚膜多糖不缀合到整合在胞制
剂中的外膜蛋白。
25

32. 权利要求 21-31 的胞制剂，其从粘膜炎莫拉氏菌或未定型流感嗜血菌菌株得到。

33. 权利要求 21-31 的胞制剂，其从奈瑟氏球菌菌株，优选脑膜炎
奈瑟氏球菌得到。
30

34. 权利要求 33 的胞制剂，其中胞制剂包含缀合的 L2 LOS、缀合的 L3 LOS、或者缀合的 L2 和 L3 LOS 的混合物，优选分别缀合到至

少两种不同胞。

35. 权利要求 33 或 34 的胞制剂,其来自 lgtB⁻菌株,或者其中 LOS 具有截断结构,与来自 lgtB⁻菌株的相一致。

5 36. 权利要求 32-35 的胞制剂,其来自 htrB⁻和/或 msbB⁻菌株,或者其中 LOS 脂质 A 部分缺少仲酰基链,与从 htrB⁻和/或 msbB⁻脑膜炎菌株分离的相一致。

37. 免疫原性组合物或疫苗,其包含权利要求 21-36 的胞制剂和药学上可接受的赋形剂。

10 38. 权利要求 37 的免疫原性组合物或疫苗,其另外包含一种佐剂,优选氢氧化铝,或 3D-MPL 和磷酸铝。

39. 权利要求 37 或 38 的免疫原性组合物或疫苗,其还包含一种或多种来自下面的菌株的缀合的荚膜多糖或寡糖:脑膜炎球菌血清群 A、脑膜炎球菌血清群 C、脑膜炎球菌血清群 W-135、脑膜炎球菌血清群 Y、和 B 型流感嗜血菌。

15 40. 从革兰氏阴性细菌菌株制备胞内缀合的胞制剂的方法,其中该菌株的外膜中整合了缀合到 LOS 的外膜蛋白,该方法包含步骤:

a) 从革兰氏阴性菌株分离胞,

b) 实施适于将存在于胞中的 LOS 的寡糖部分缀合到存在于相同胞上的外膜蛋白的化学方法,

20 c) 分离胞内缀合的胞制剂,和

d) 任选将胞内缀合的胞制剂与通过相同方法制备但是具有不同 LOS 免疫型的另一胞内缀合的胞制剂配制和/或将胞制剂与药学上可接受的赋形剂配制以产生疫苗组合物。

25 41. 权利要求 40 的方法,其中在步骤 a)中胞用低浓度如 0-0.3%,优选大约或精确地 0.1%的脱氧胆酸盐提取。

42. 权利要求 40 或 41 的方法,其中步骤 b)中 pH 保持在 7 到 9 之间,优选约 pH 7.5。

43. 权利要求 40-42 的方法,其中步骤 b)在 1-5%,优选约 3%的蔗糖中实施。

30 44. 权利要求 40-43 的方法,其中步骤 b)在低 NaCl 浓度条件中实施。

45. 权利要求 40-44 的方法,其中步骤 b)用 EDAC/NHS 化学方法

实施。

46. 权利要求 40-45 的方法，其中步骤 a) 中孢分离自奈瑟氏球菌菌株，优选脑膜炎球菌菌株，最优选脑膜炎球菌 B 菌株。

5 47. 权利要求 46 的方法，其中菌株不能产生荚膜多糖，并且优选为 *siaD*⁻ 突变体。

48. 权利要求 46 或 47 的方法，其中菌株是 *lgtB*⁻ 突变体。

49. 权利要求 46-48 的方法，其中菌株是 *msbB*⁻ 和/或 *htrB*⁻。

50. 权利要求 46-49 的方法，其中菌株具有 L2 LOS 免疫型。

51. 权利要求 46-50 的方法，其中菌株具有 L3 LOS 免疫型。

10 52. 权利要求 46-51 的方法，其中在步骤 d) 中通过权利要求 50 的方法产生的具有 L2 免疫型的脑膜炎球菌孢内缀合的孢制剂与另一通过权利要求 51 的方法产生的具有 L3 免疫型的脑膜炎球菌孢内缀合的孢制剂组合。

疫苗

发明领域

5 本发明涉及奈瑟氏球菌疫苗组合物、它们的生产和这些组合物在医学中的用途。更具体地,本发明涉及产生更适于产生奈瑟氏球菌,尤其是脑膜炎球菌的外膜泡囊(或胞)疫苗的新的工程化脑膜炎球菌菌株的方法。还基于新的 LOS 亚单位或脑膜炎球菌外膜泡囊(或胞)疫苗
10 的用途描述了有利的方法和疫苗产物,该 LOS 亚单位或脑膜炎球菌外膜泡囊(或胞)疫苗可更安全和更有效地用于人受试者中。

发明背景

脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)(脑膜炎球菌)是经常从人上呼吸道分离的革兰氏阴性细菌。其可导致严重的侵入性细菌疾病
15 如菌血症和脑膜炎。脑膜炎球菌疾病的发病率显示出地区的、季节的和年度的差异(Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; *Clin. Microbiol. Rev.* 2(增刊), S18-S24, 1989)。该细菌通常根据其荚膜多糖的血清群分类。

气候温和的国家中的多数疾病是由于血清群 B 菌株并且这些疾病的
20 发病率为 1-10/100,000/年总人口——有时达到更高值(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)。

25 血清群 A 脑膜炎球菌占优势的流行病(主要在中非)有时达到高达 1000/100,000/年的发病率水平(Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. *Clin. Microbiol. Rev.* 2(增刊), S18-S24, 1989)。总体上脑膜炎球菌疾病的几乎所有病例都由血清群 A、B、C、W-135 和 Y 脑膜炎球菌导致,且四价 A、C、W-135 和 Y 荚膜多糖疫苗是可得到的(Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., *J. Biol. Stand.* 10:335-339,
30 1982)。

在过去几十年中许多欧洲国家内脑膜炎奈瑟氏球菌感染的频率已

经上升。这归因于由于社会活动(例如,游泳池、戏院,等)增加导致的传播的增加。分离出对一些标准抗生素较不敏感或具有抗性的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株已不罕见。该现象已经产生了对该生物的新的抗菌剂、疫苗、药物筛选方法和诊断试验的未满足的医学需求和需要。

5 现今通过将现有的多糖疫苗化学缀合到载体蛋白改良这些疫苗(Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., 等 JAMA 275:1499-1503, 1996)。

然后,没有得到血清群 B 疫苗。已经发现该血清群 B 荚膜多糖是非免疫原性的——最可能是因为它与宿主组分有结构类似性(Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L.等 J. Infect. Dis. 126:514-522, 10 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355-357, 1983)。因此努力集中在试图开发从外膜泡囊(或疤)或从它们纯化的蛋白组分得到的血清群 B 疫苗。

备选地,用于疫苗开发的脑膜炎球菌抗原是脑膜炎球菌脂寡糖(LOS)。这些是结合外膜的糖脂,它们缺少 O 侧链而与肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的脂多糖类(LPS)不同,并从而像 LPS 的粗糙形式(Griffiss 等, Rev Infect Dis 1988; 10:S287-295)。LOS 的寡糖部分内的异质性导致不同脑膜炎球菌菌株之间的结构和抗原多样性(Griffiss 等, Inf. Immun. 1987; 55:1792-1800)。这已被用于将菌株细分成 12 种免疫型(immunotype)(Scholtan 等, J Med Microbiol 1994, 41:236-243)。免疫性 L3、L7 和 L9 在免疫学上相同并且结构类似(或甚至相同)并因此被指定为 L3、7、9(或者,为了本说明书的目的,通称为“L3”)。脑膜炎球菌 LOS L3、7、9(L3)、L2 和 L5 可以通过唾液酸化,或者通过加入胞嘧啶核苷-5'-一磷酸-N-乙酰基神经氨酸而被修饰。尽管 L2、L4 和 L6 LOS 在免疫学上可区分,它们在结构上类似并且对于此处提到的 L2,在本发明范围内可以任选被 L4 或 L6 代替。已经表明 LOS 的抗体在实验大鼠中保护大鼠抵抗感染并且有助于感染脑膜炎奈瑟氏球菌的儿童中的杀细菌活性(Griffiss 等, J Infect Dis 1984; 150:71-79)。

然而,与 LOS 用于脑膜炎球菌疫苗相关的一个问题是其毒性(由于其脂质 A 部分)。

LOS 还存在于脑膜炎球菌疤的表面上。许多年来的努力主要集中于开发基于脑膜炎球菌外膜泡囊(疤)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)。这些疫苗的优点是包括处于正确折叠构象的几种整合外膜蛋白, 当施用于宿主时它们可引起保护性免疫应答。此外, 奈瑟氏球菌菌株(包括脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B-menB)分泌足够量的外膜泡而可以进行它们的工业规模上的生产。然而, 更通常通过包含以 0.5%去污剂(例如, 脱氧胆酸盐)提取细菌细胞的方法制备泡(例如 EP 11243)。尽管由于上述 LOS 毒性(也称为内毒素)而希望使用该提取方法, 但是该方法也具有从疫苗除去大多数 LOS 抗原的作用。

10 使用 LOS 作为疫苗抗原的另一个问题是 12 种 LPS 免疫型以各种糖类结构存在(M. P. Jennings 等 I, Microbiology 1999, 145, 3013-3021; Mol Microbiol 2002, 43:931-43)。针对一种免疫型产生的抗体不能识别不同的免疫型。尽管努力集中于产生 LOS 免疫型的寡糖部分的一般的“核心”区(例如, WO 94/08021), 但是抗修饰的 LOS 产生的抗体的杀细菌活性丧失了。从而, 疫苗可能需要具有不同免疫型的许多 LOS 组分以达到有效。

使用 LOS(也称作 LPS 或脂多糖)作为人疫苗的抗原的另一个问题是它们携带与人的糖类结构(例如, 人红细胞上)相似的糖类结构, 从而对它们的使用造成安全问题。然后由于 LOS 抗原的杀细菌效力的结构敏感性, 改变 LOS 结构是有问题的。

20 本发明给出了改善一个或多个上面的问题的方法, 并给出了基于脑膜炎球菌 LOS, 尤其存在于外膜泡囊上时的 LOS 作为保护性抗原制备新疫苗的方法。

25 发明描述

本说明书中提到的出版物和专利或专利申请中公开的主题和信息在此处被并入作为参考。

“脂寡糖”(或“LOS”)也可指“脂多糖”或“LPS”。

30 发明人意欲让这里的术语“包含”在每种情况下可以任选被术语“由...组成”代替。

本发明人已经发现缩短 LOS 寡糖结构导致丧失可以引起杀细菌免疫应答的表位。替代地, 本发明人已经发现为了在疫苗制剂中最有效

使用 LOS, LOS 寡糖结构必须尽可能多的保留,但是仅仅 2 种 LOS 抗原的组合可以产生普遍有效的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌)疫苗。本发明的第一方面是用于防止或治疗奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌或脑膜炎球菌 B)疾病,包含免疫型 L2 的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌)LOS 或免疫型 L3 的 LOS 的免疫原性组合物。LOS 可通过公知的纯化步骤分离,或者可存在于来自 L2 和 L3 奈瑟氏球菌菌株的至少两种外膜泡囊(或胞)制剂中。为了从胞制剂除去有毒的结合不紧的 LOS,但是保留胞中整合的 LOS 抗原的高水平,胞优选用低浓度去污剂—0-0.3%,优选 0.05-0.2%,最优选约 0.1%,优选脱氧胆酸盐(或 DOC)提取。LOS 抗原(尤其是胞疫苗中的)的这种组合令人惊奇地优点是有效抗 90%以上的脑膜炎奈瑟氏球菌菌株。

本发明人也发现本发明的上面的胞免疫原性组合物,且实际上任何来自奈瑟氏球菌(优选淋球菌或脑膜炎球菌)的胞免疫原性组合物,可以增强它们的表面上保护性抗原(包括 LOS)的效果,如果免疫优势的外膜蛋白的某些组合在表达中被下调(优选被缺失)的话。因此本发明的另一方面是来自一种奈瑟氏球菌菌株的奈瑟氏球菌胞制剂,与天然的、未修饰的菌株相比,该菌株的下面的外膜蛋白的两种或更多种在表达中被下调(且优选缺失): PorA、PorB、OpA、OpC 或 PilC。优选 PorA 和 OpA、PorA 和 OpC、OpA 和 OpC,或者 PorA 和 OpA 和 OpC 被下调或缺失。FrpB 表达的下调(优选缺失)在交叉保护性抗原——尤其是从铁限制条件下生长的奈瑟氏球菌菌株制备的胞制剂中的交叉保护性抗原——效果的增强中也显示出益处。与 FrpB 下调与上面提到的一种或多种下调的组合得到的胞是本发明的一个实施方案一样,从具有该突变的菌株得到的奈瑟氏球菌胞是本发明的另一个实施方案。优选如果 PorA 被下调,那么 BorB 不被下调,反之亦然。

在产生胞免疫原性组合物的任何奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌,最优选 menB)菌株,尤其此处描述的菌株中,上面的突变是有益的,然而,优选使用 L2 或 L3 免疫型奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌,最优选 menB)菌株,它们一般用此处描述的低 DOC%提取方法提取。优选地,本发明的胞免疫原性组合物含有 L2 和 L3 胞,其中至少一种(优选 2 种)在免疫优势的外膜蛋白(或 OMPs)的上面的组合中缺乏。下调这些基因的技术在 WO 01/09350 中讨论(此处被并入作为参考)。已知在脑膜炎球

菌基因组中存在四种不同的 Opa 基因(Aho 等, 1991 Mol. Microbiol. 5:1429-37), 因此当说 Opa 在表达中被下调时表示优选地, 脑膜炎球菌中存在的 1、2、3 或(优选)所有 4 种基因被这样下调。这些下调可以通过如 WO 01/09350 中描述的通过遗传方法或者通过寻找容易发现的、
5 天然的、稳定的并且在 Opa 基因座没有表达或者有低表达的脑膜炎球菌菌株来实现。使用 Poolman 等(1985 J. Med. Micro. 19:203-209)中描述的技术可以发现这种菌株, 其中 Opa⁻细胞具有与表达 Opa 的细胞不同的表型, 这可通过观察平板上或者显微镜下细胞的外观而发现。一旦发现, 通过发酵建立 Opa 的缺乏后对细胞内含物进行蛋白印迹
10 (Western blot), 该菌株可以显示出稳定的 Opa⁻。

上面的 LOS 免疫原性组合物的安全性

由于存在与人鞘糖脂中存在的乳-N-neotetraose 寡糖基团(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-; 图 1)类似的结构, 已经对针对 L3 或 L2 LOS 产生的抗体的安全性提出了疑问。尽管许多人已经安全地接种含
15 有残留量的 L3 LOS 的用脱氧胆酸盐提取的泡囊疫苗(G. Bjune 等, Lancet(1991), 338, 1093-1096; GVG. Sierra 等, NIPH ann(1991), 14, 195-210), 但是如果 LOS 将保留为此处讨论的抗原, 本发明人已经发现缺失 LOS 糖结构的末端部分有利于抗 LOS 免疫应答与存在于人组织表面的结构的交叉反应。在优选的实施方案中, lgtB 基因的失活导
20 致中间的 LOS 结构, 其中缺少末端半乳糖残基和唾液酸(见图 1 和 2, 突变留下了 L2 和 L3 LOS 中的 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-结构)。这些中间产物可以在 L3 和/或 L2 LOS 菌株中得到。LOS 的备选地和较不优选的(短的)版本可以通过关闭 lgtE 基因得到。LOS 的另一备选的和较不优选的版本可通过关闭 lgtA 基因得到。如果选择了这种 lgtA 突
25 变, 优选还关闭 lgtC 表达以防止形成非免疫原性 L1 免疫型。

LgtB⁻突变体是最优选的, 因为本发明人已经发现这是解决安全问题而仍然保持 LOS 保护性寡糖表位的最佳截断, 该表位仍然可诱导杀细菌(甚至交叉-杀细菌的)抗体应答。

因此, 本发明的上面的 L2 和/或 L3 制剂(纯化的或者在分离的孢中)
30 或脑膜炎球菌孢制剂一般(尤其 L2 和/或 L3)有利地来自奈瑟氏球菌菌株(优选脑膜炎球菌菌株), 该菌株被基因工程化而永久下调来自 lgtB、lgtA 或 lgtE 基因的功能基因产物的表达, 该下调优选通过关闭该基因,

最优选通过缺失该基因的启动子和/或可读框的全部或部分来实现。

优选地，本发明的奈瑟氏球菌菌株合成荚膜多糖有缺陷。

当本发明的上面的疱制剂来自脑膜炎球菌 B 菌株时，尤其优选荚膜多糖(其也含有人-类似的糖结构)也被除去。尽管可以关闭许多基因以实现该目的，但是本发明人已经有利地表明优选疱生产菌株已经被基因工程化而永久下调来自 *siaD* 基因的功能基因产物的表达(即，下调 α -2-8 多唾液酸转移酶活性)，该下调优选通过关闭该基因，最优选缺失该基因的启动子和/或可读框的全部或部分而实现。这种失活在 WO 01/09350 中描述。*siaD*(也称为 *synD*)突变是可导致人类似的表位从荚膜多糖除去的许多突变中最有利的，因为其是对 LOS 的保护性表位的生物合成没有影响，从而在针对最后使用 LOS 作为保护性抗原的方法中有利，并且对细菌的生长影响最小的仅有的突变之一。本发明的一个优选的方面因此是如上描述的疱免疫原性制剂，其来自 *lgtE*⁻*siaD*⁻、*lgtA*⁻*siaD*⁻或，优选地 *lgtB*⁻*siaD*⁻脑膜炎球菌 B 突变菌株。该菌株本身是本发明的另一方面。

尽管因为上面的原因优选 *siaD*⁻突变，但是可以使用关闭脑膜炎球菌 B(或通常脑膜炎球菌)荚膜多糖合成的其他突变。从而疱生产菌株可以被基因工程化而永久下调来自下面基因的一种或多种的功能基因产物的表达：*ctrA*、*ctrB*、*ctrC*、*ctrD*、*synA*(等价于 *synX* 和 *siaA*)、*synB*(等价于 *siaB*)或 *synC*(等价于 *siaC*)基因，该下调优选通过关闭该基因，最优选通过缺失该基因的启动子和/或可读框的全部或部分来实现。*LgtE*⁻突变可以与这些突变的一种或多种组合。优选地，*lgtB*⁻突变与这些突变的一种或多种组合。本发明的另一方面因此为如上描述的疱免疫原性制剂，其来自脑膜炎球菌 B(或一般地脑膜炎球菌)的组合突变菌株。该菌株自身是本发明的一个方面。

含有各种 *lgt* 基因，包括 *lgtB* 和 *lgtE* 的奈瑟氏球菌基因座和其序列是本领域中公知的(见 M. P.Jennings 等，*Microbiology* 1999, 145, 3013-3021 和其中引用的参考文献；*J. Exp. Med.* 180:2181-2190 [1994]；WO 96/10086)。

当终产物中将使用全长(未截断的)LOS 时，希望 LOS 不被唾液酸化(由于这种 LOS 产生针对最具危险性、侵入性并且也未被唾液酸化的脑膜炎球菌 B 菌株的免疫应答)。在这种情况下，使用具有缺失的

synA(等价于 synX 和 siaA)、synB(等价于 siaB)或 synC(等价于 siaC)基因的荚膜阴性菌株是有利的, 因为这种突变也使得 menB LOS 不能被唾液酸化。

5 上面的突变在产生疱免疫原性组合物的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌, 最优选 menB)菌株, 尤其是此处描述的那些菌株中是有益的, 然而, 优选使用 L2 或 L3 免疫型奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌, 最优选 menB)菌株, 它们一般用此处描述的低 DOC%提取方法提取。优选本发明的疱免疫原性组合物含有 L2 和 L3 疱, 其中至少一种(优选两种)来自上面基因的表达中缺陷的菌株。

10 LOS 的毒性

通过下调某些基因所来自的细菌生产菌株中这些基因的表达也可以使本发明上面的纯化的 LOS 或疱免疫原性组合物毒性更小。虽然这些解毒作用对于使用天然 OMV 的鼻内免疫接种是不必要的(J. J. Drabick 等, Vaccine(2000), 18, 160-172), 但是对于肠胃外接种, 解毒作用将具有益处。优选地, 本发明的 LOS 纯化的 LOS 或疱免疫原性组合物通过奈瑟氏球菌生产菌株的基因工程化进行解毒, 该基因工程化为通过突变/修饰/失活参与脂质 A 生物合成的基因, 尤其是参与将仲酰基链加到脂质 A 的那些基因, 具体地通过下调来自 msbB 和/或 htrB 基因的功能基因产物的表达, 优选通过关闭该基因, 最优选通过缺失
15 该基因的启动子和/或可读框的全部或部分。备选地(或额外地)纯化的 LOS 或疱免疫原性组合物可来自奈瑟氏球菌菌株, 其已经被遗传修饰从而下面基因的一种或多种被上调(通过导入更强的启动子或整合该基因的额外拷贝): pmrA、pmrB、pmrE 和 pmrF。备选地(或额外地)纯化的 LOS 或疱免疫原性组合物可通过向该组合物加入与多粘菌素 B(一
25 种对脂质 A 具有高亲和性的分子)功能相当的无毒肽而解毒。

关于上面的解毒方法, 以及相关启动子/基因序列和上调和下调方法的更多细节见 WO 01/09350。奈瑟氏球菌的 msbB 和 htrB 基因也分别称为 lpxL1 和 lpxL2, (见 WO 00/26384), 这些基因的缺失突变在表型上的特征是与野生型相比丧失一条仲酰基链(并保持 4 条伯酰基链和
30 1 条仲酰基链)的 msbB⁻突变的 LOS, 和丧失两条仲酰基链的 htrB⁻突变的 LOS。这些突变优选与确保奈瑟氏球菌生产菌株是荚膜多糖缺陷的(见上面)的突变组合以确保疱上解毒的 LOS 的最佳呈递, 或者有助于

解毒的亚单位 LOS 的纯化。对于可用于本发明组合物中、功能相当于多粘菌素 B 的无毒肽——尤其肽 SAEP2(序列 KTKCKFLKKC, 其中两个半胱氨酸形成二硫键)的用途的细节, 见 WO 93/14115、WO 95/03327、Velucchi 等(1997)J Endotoxin Res 4:1-12, 和 EP 976402。

5 “下调功能基因产物的表达”在这里指对所述基因的启动子或可读框的进行添加、缺失或替代, 从而总基因产物的生物合成活性降低(降低 60、70、80、90、95 或最优选 100%)。显然可导入移码突变, 或者较弱的启动子被替代, 然而, 最优选可读框和/或启动子的大部分或全部被缺失以确保该(活性)基因产物的永久下调(如在 WO 01/09350 中描述的)。

10 上面的突变在产生疤免疫原性组合物的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌, 最优选 menB)菌株, 尤其是此处描述的那些菌株中是有益的, 然而, 优选使用 L2 或 L3 免疫型奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌, 最优选 menB)菌株, 这些菌株一般用此处描述的低 DOC%提取方法提取。优选地, 本发明的疤免疫原性组合物含有 L2 和 L3 疤, 其中至少一种(优选两种)来自上面的基因表达缺陷的菌株。

15 本发明的其他方面包括上面描述的遗传修饰的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌或淋球菌或脑膜炎球菌 B)菌株, 本发明的 LOS 或疤免疫原性制剂可从这些菌株得到。

20 本发明的 LOS 或含 LOS 的疤制剂

本发明的另一方面是从本发明的奈瑟氏球菌菌株分离的 LOS 制剂(尤其上面描述的制剂的任一种)。优选地, 分离的 LOS(或含 LOS 疤)为 L2 或 L3 免疫型, 且本发明的免疫原性组合物优选包含本发明的 L2 和 L3 LOS(或疤)制剂。

25 通过将上面 LOS(纯化的或存在于疤制剂中)的寡糖部分缀合到包含 T-细胞表位来源的载体(从而使得 LOS 成为甚至更好的[依赖 T]的免疫原)也可以改良这些制剂。通过将本发明的纯化的 LOS 制剂呈递到本领域中公知的脂质体制剂中(见例如 WO 96/40063 和其中引用的参考文献)可以备选地(或额外地)使其成为更好的抗原。

30 从细菌分离 LOS 的方法是本领域熟知的(见例如 Wesphal & Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5:83-91]的热水-苯酚方法)。还见 Galanos 等, 1969, Eur J Biochem 9:245-249, 和 Wu 等, 1987, Anal Bio Chem

160:281-289。缀合分离的 LOS 的技术也是公知的(见例如 EP 941738, 其在此处被引入作为参考)。

5 为了本发明的目的,“包含 T-细胞表位来源的载体”通常为肽或, 优选地,多肽或蛋白。缀合技术是本领域中熟知的。一般的载体包括来自未分类的流感嗜血菌(*H. influenzae*)的蛋白 D、破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、或疱(尤其奈瑟氏球菌或脑膜炎球菌)制剂中的外膜蛋白。

10 本发明的优选的分离的 LOS 组合物为:包含 L2 和 L3 分离的 LOS 的组合物,其中每种 LOS 的寡糖部分被任选缀合到包含 T 细胞表位来源的载体;包含 L2 或 L3 LOS 的组合物,该 LOS 具有与来自 lgtB⁻脑膜炎球菌菌株的 LOS 一致的结构,其中每种 LOS 的寡糖部分被任选缀合到包含 T 细胞表位来源的载体;最优选地,包含 L2 和 L3 分离的 LOS 的组合物,这些 LOS 具有与来自 lgtB⁻脑膜炎球菌菌株的 LOS 一致的结构,其中每种 LOS 的寡糖部分被任选缀合到包含 T 细胞表位来源的载体。

15 优选地,本发明的 LOS 组合物已经被解毒。这可以通过胍或碱性水解化学处理的公知技术进行,这些化学处理从该分子除去酰基链(但是可以降低该分子的保护功效),但是解毒优选通过从 htrB⁻或 msbB⁻脑膜炎球菌突变株(如上述;尤其在荚膜多糖负菌株中)分离 LOS 进行,或者通过向该组合物中加入与多粘菌素 B(对脂质 A 具有高亲和性的一种分子)功能等价的无毒肽,尤其是 SAEP 2(如上述)来进行。

20 本发明的 LOS 可以以分离状态(如果脂质 A 部分仍然完整则通常为微团的形式)施用,或者可以以脂质体施用。在该情况下,可将外膜蛋白加入脂质体,并且 LOS 可以在脂质体内被缀合到这些外膜蛋白而使得寡糖成为依赖 T 的抗原。这可以用如下述的关于疱内 LOS 交联所描述的类似化学方法进行。

LOS 的寡糖部分疱内交联(缀合)到疱表面上存在的外膜蛋白

30 当 LOS(尤其是本发明的 LOS)存在于疱制剂中时,LOS 优选被原位缀合,这可通过允许 LOS 缀合到也存在于疱制剂上的一种或多种外膜蛋白(例如脑膜炎球菌的 PorA 或 PorB)的方法实现。从而本发明的另一方面是来自革兰氏阴性细菌菌株的疱制剂,在该菌株的外膜中整合一种缀合到 LOS 的外膜蛋白。尽管 LOS 可以被加到疱制剂中用于缀

合，但是优选 LOS 天然存在于疤制剂的表面上。

5 该方法可有利地增强疤制剂中 LOS 抗原的稳定性和/或免疫原性(提供 T-细胞帮助)和/或抗原性-从而为最具保护性构象中的不依赖 T 的寡糖免疫原提供 T-细胞帮助-如同 LOS 处于外膜表面上的天然环境一样。此外，在疤内缀合 LOS 可导致 LOS 的解毒(不希望被理论束缚，脂质 A 部分如果被缀合可以更稳定地埋在外膜中从而不容易被利用而导致毒性)。这样，可以不需要上面提到的从 htrB⁻或 msbB⁻突变株分离疤，或者通过向组合物中加入与多粘菌素 B 功能等价的无毒肽(但是可以组合加入以更加安全)的解毒方法。

10 本发明的缀合的疤制剂一般为与完全未缀合的 LOS 的相同量的相同疤相比，本发明疤中 LOS 的毒性降低了。通过技术人员，例如使用欧洲药典中的 LOS 兔致热性测定法(见实施例 7)，可以容易地确定 LOS 毒性。

15 本发明的缀合疤制剂是有利地从而缀合的 LOS 具有适于在宿主中引起免疫应答的构象，来自宿主的血清与未缀合的 LOS 有反应性(可以结合)——该未缀合的 LOS 优选存在于用于制备疤制剂的细菌上，最优选在 SBA 测定法中为杀细菌方式。

20 当奈瑟氏球菌疤被缀合到 LOS，并且这些疤来自如此处描述的一种或多种免疫优势的外膜蛋白中被下调的菌株时，优选如果 PorA 被下调，那么 PorB 不被下调，反之亦然。这允许 LOS 的大部分与主要外膜蛋白交联，从而使缀合对疤中存在的交叉保护性的少数外膜抗原的影响最小。

25 具体地，本发明人发现包含疤的组合物，其中疤中的 LOS 已经以疤内方式被缀合到也存在于疤中的外膜蛋白，能够形成治疗或预防该疤所来自的生物导致的疾病的疫苗的基础，其中这种疫苗具有减弱的毒性(优选基本上无毒)并且/或者能够诱导针对天然环境中 LOS 的依赖 T 的杀细菌应答。

30 因此本发明还提供了这种疤内 LOS 缀合的疤制剂。“疤内”指天然存在于疤中的 LOS 被缀合到存在于相同疤上的外膜蛋白。优选地，疤来自可以产生疤的任何革兰氏阴性生物(见 WO 01/09350)，优选粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、未分类的流感嗜血菌或奈瑟氏球菌(最优选脑膜炎球菌)。

这些胞制剂可分离自所讨论的细菌(见 WO 01/09350), 然后用公知的缀合化学方法以将 LOS 寡糖部分上的基团(例如, NH_2 或 COOH)连接到胞外膜蛋白上的基团(例如, NH_2 或 COOH)。也可以使用利用戊二醛、甲醛, 或戊二醛/甲醛混合物的交联技术, 但是优选使用更有选择性的化学方法如 EDAC 或 EDAC/NHS(J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement By N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156:220-222(1986) ; 和 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson(1996)173-176 页)。可用于本发明的能够产生 LOS 和蛋白质分子之间的共价交联的其他缀合化学或处理在 EP 941738 中描述。

优选地, 胞制剂在不产生荚膜多糖时被缀合。胞可以从产生荚膜多糖的菌株(天然地或通过突变)分离, 或者可以被纯化以除去大多数(除去 60、70、80、90 或 99%以上)和优选所有污染的荚膜多糖。这样, 胞内 LOS 缀合反应更有效。

15 优选地, 胞内存在的 LOS 的 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 95%以上被交联/缀合。

20 优选已经制备了本发明的胞使得胞的 LOS 含量为 3-30、5-25、10-25、15-22, 最优选约或精确地 20%, LOS 含量可通过使用纯化的 LOS 作为标准在 SDS-PAGE 电泳后银染测量(见 Tsai, J. Biol. Standardization(1986)14:25-33 的方法)。脑膜炎球菌胞中 20% LOS 可以用 0.1%的低 DOC, 提取实现, 该提取可以除去结合不紧的 LOS 分子, 但是保留大部分抗原。

25 当胞内缀合的胞来自脑膜炎球菌时, 优选胞所来自的菌株是不能产生荚膜多糖的突变菌株(例如, 上述突变菌株的一种, 尤其是 siaD^-)。还优选有效抗脑膜炎球菌疾病的免疫原性组合物包含 L2 和 L3 胞, 其中 L2 和 L3 LOS 都缀合到胞外膜蛋白。此外, 优选胞内缀合的胞内的 LOS 结构与来自 IgtB^- 脑膜炎球菌菌株的 LOS 的结构一致。最优选地免疫原性组合物包含胞内缀合的胞: 来自 L2 或 L3 突变的脑膜炎球菌菌株, 其不能产生荚膜多糖并且是 IgtB^- 的; 包含来自不能产生荚膜多糖的突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞; 包含来自为 IgtB^- 的突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞; 或者最优选地包含来自不能产生荚膜多糖并且为 IgtB^- 的突变脑膜炎球菌菌株的 L2 和 L3 胞。

可用于本发明的一般的 L3 脑膜炎球菌菌株是 H44/76 menB 菌株。一般的 L2 菌株是 B16B6 menB 菌株或者 39E 脑膜炎球菌 C 型菌株或菌株 760676。

如上面陈述的，本发明的疤已经通过缀合作用而被一定程度地解毒，并且不需要进一步解毒，然而为了额外的安全性可以使用进一步的解毒方法，例如，通过使用来自 htrB⁻或 msbB⁻脑膜炎球菌菌株的疤或者通过向疤组合物中加入与多粘菌素 B(一种对脂质 A 具有高亲和性的分子)功能等价的无毒肽(优选 SEAP 2)(如上述)。从而 LOS 的缀合(尤其以疤内方式)与包含相同量的未缀合的 LOS 的制剂相比令人惊奇地显示 10 出 LOS 的更低毒性。这样，通过 LOS 疤内缀合到疤外膜蛋白进一步提供了疤(尤其脑膜炎球菌的)解毒的一般方法，且通过将 LOS 缀合到疤外膜蛋白还提供了 LOS 解毒的方法。

以上面的方法提供了脑膜炎球菌疤和包含疤的免疫原性组合物，它们有作为重要抗原的 LOS，其毒性减弱(优选基本无毒)、没有自身免疫性问题，具有依赖 T 的特征，存在于其天然环境中，并且能够诱导 15 针对潜在的 90%以上脑膜炎球菌菌株的杀细菌抗体应答(对于 L2+L3 组合物而言)。

Men A、C、Y 或 W 荚膜多糖或寡糖的一种或多种(优选至少 MenC，或 MenA 和 MenC，或者 MenC 和 MenY)也可以缀合到本发 20 明的疤的外膜蛋白上。尽管这可以在和 LOS 交联相同的反应中进行，但是优选在单独的(优选后面的)反应中进行。

最佳疤内 LOS 缀合的方法是本发明的另一方面。所述方法应该包括如下步骤：从革兰氏阴性细菌分离疤(优选使用此处描述的低% DOC)，实施适于将存在于疤中的 LOS 缀合(优选通过其寡糖部分)到相 25 同疤上存在的外膜蛋白的化学反应，分离疤内缀合的疤制剂，和任选将疤内缀合的疤制剂与通过相同方法制备的但是具有不同 LOS 免疫型(优选混合 L2 和 L3 奈瑟氏球菌/脑膜炎球菌疤)的另一疤内缀合的疤制剂配制和/或将该疤制剂与药学上可接受的赋形剂配制以形成疫苗组合物。

疤内制剂应该优选包括下面的方法步骤的 1、2 或所有的 3 步：缀合 pH 应该大于 pH 7.0，优选大于或等于 pH 7.5(最优选 pH 9 以下)；在反应过程中应该保持 1-5%，优选 2-4%，最优选约 3%蔗糖的条件； 30

NaCl 应该在缀合反应中最小化, 优选低于 0.1M、0.05M、0.01M、0.005M、0.001M, 最优选根本不存在。所有这些方法特征在于确保在整个缀合过程中疤保持稳定并处于溶液中。

EDAC/NHS 缀合方法是疤内缀合的优选方法。EDAC/NHS 比甲醛
5 优选, 因为甲醛可导致太高程度的交联从而负面地影响滤过率。EDAC 与羧酸(如 LOS 中的 KDO)反应产生活性酯中间产物。存在胺亲核物质(如外膜蛋白如 PorB 中的赖氨酸)时, 形成酰胺键, 释放异脲副产物。然而, 通过形成硫代-NHS 酯中间产物可以增加 EDAC-介导的反应的效率。硫代-NHS 酯比从 EDAC 单独与羧酸盐反应形成的活性酯在水溶
10 液中能存在更长时间。这样, 使用两步方法可以实现酰胺键形成的更高得率。EDAC/NHS 缀合在 J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement By N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156:220-222(1986); 和 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson(1996)173-176 页中讨
15 论。反应中优选使用 0.01-5 mg EDAC/mg 疤, 更优选 0.05-1 mg EDAC/mg 疤。使用的 EDAC 的量依赖于样品中存在的 LOS 的量, 而 LOS 的量又依赖于用于提取疤的脱氧胆酸盐(DOC)%。在低% DOC(例如, 0.1%), 使用高量的 EDAC(1 mg/mg 和更高), 然而在更高% DOC(例如, 0.5%)时, 使用较低量的 EDAC(0.025-0.1 mg/mg)以避免太多的疤
20 间交联。

本发明的优选方法因此是产生疤内缀合的 LOS(优选脑膜炎球菌的)的方法, 该方法包含步骤: 存在 EDAC/NHS, pH 为 pH 7.0 到 pH 9.0(优选约 pH 7.5), 在 1-5%(优选约 3%)蔗糖中, 并且任选在基本无 NaCl(如上述)的条件中缀合疤, 并从反应混合物分离缀合的疤。

25 该反应后可跟随着反应混合物的 Western 分离凝胶, 该方法使用抗-LOS(例如抗 L2 或抗 L3)mAbs 以显示随着反应时间的过去, 疤中更大比例的 LOS 的 LOS 分子量的增加。

使用这种技术可以回收疤, 得率为 99%。

30 发现 EDAC 是优秀的疤内交联剂, 因为其将 LOS 交联到 OMP, 足够提高 LOS 依赖 T 的免疫原性, 但是不将其交联到如此高的程度以致发生像差滤过率、聚集和疤间交联的问题。产生的疤的形态类似于未缀合的疤的形态(通过电子显微镜)。此外, 上面的方案避免了发生过

高交联(其可降低胞表面上天然存在的保护性 OMP, 例如 TbpA 或 Hsf 的免疫原性)。

分离胞的技术

通过许多公知的技术可以分离本发明的外膜泡囊(OMV 或 5 胞)(Fredriksen 等, NIPH Annals(1991), 14, 67-79; Zollinger 等, J. Clin Invest(1979), 63, 836-848; Saunders 等, Infect Immun(1999), 67, 113-119; J. J. Drabick 等, Vaccine(1999), 18, 160-172)。这些技术分为两大类——使用脱氧胆酸盐(约 0.5%)从脑膜炎球菌提取胞的技术, 和使用低水平脱氧胆酸盐(DOC)或根本无脱氧胆酸盐的技术。无 DOC 10 方法的胞具有在 OMV 中保持高水平 LOS 的有趣特征——这在疫苗(其中 LOS 是保护性抗原)中是有利的。与 DOC 提取的胞相比, 通过无 DOC 方法得到的 OMV 中 L3 Ags 的浓度约高 10 倍。因为该原因, 对于本发明方法优选制备胞的无去污剂(优选无 DOC)方法, 尽管用含有低水平去污剂(优选 DOC)的缓冲液提取也可以是有利的, 因为该步骤将把大 15 多数紧密相互作用的 LOS 留在胞中而除去更具毒性的松散保持的 LOS。一般 0-0.5%, 优选 0.02-0.4%、0.04-3%或 0.06-2%的去污剂(优选 DOC)被用于胞提取, 更优选 0.08%-0.15%, 最优选约或者精确地 0.1%被用于获得稳定存在于胞中的 LOS 的最佳量。尤其优选无 DOC(或者低 DOC-0.3% DOC 或以下)的提取方法, 其中 LOS 已经被上 20 面详述的方法的一种或多种解毒。

优选本发明所有实施方案中胞的 LOS 含量为 3-30、5-25、10-25、 15-22、最优选大约或精确地为 20%, LOS 含量可通过使用纯化的 LOS 作为标准在 SDS-PAGE 电泳后银染测量(见 Tsai, J. Biol. Standardization(1986)14:25-33 的方法)。使用 Nmen L3 LOS 作为该方 25 法中的标准, 通常用 0.1% DOC 提取的 Nmen L3 免疫型胞中 LOS 含量为约 20%LOS, 用 0.2% DOC 提取的为约 15%LOS, 用 0.3% DOC 提取的为约 10%LOS, 用 0.5% DOC 提取的为约 5%LOS。

疫苗组合物

本发明的免疫原性组合物通过加入药学上可接受的赋形剂可容易 30 地制备成疫苗组合物。

进一步提供了制备本发明的奈瑟氏球菌(优选脑膜炎球菌的)免疫原性组合物或疫苗的方法, 该方法包含步骤: 分离如上描述的本发明

的纯化的 LOS(优选 L2 或 L3)或者产生如上描述的本发明的分离的疤(优选 L2 或 L3 免疫型), 并与药学上可接受的赋形剂配制 LOS 或疤。优选在混合步骤中组合本发明的免疫型 L2 和 L3 两者的纯化的 LOS, 或者本发明的免疫型 L2 和 L2 两者的疤, 或者 L2 的纯化的 LOS 或 L3 的疤(或反之亦然)。本发明的纯化的 LOS 或疤优选在分离后已经如上描述的缀合。也可以为纯化的 LOS 加入额外的脂质体配制步骤(使用本领域中公知的技术-见例如 WO 96/40063 和其中引用的参考文献)。疤制剂优选通过用低浓度的(或无)DOC 提取进行分离(如上述)。

10 这些 L2 和 L3 组合方法可产生有效针对几乎所有脑膜炎球菌 B 菌株的疫苗。

上面的免疫原性组合物(或方法)可以已经将来自血清群 A、C、Y 或 W 的一种或多种(2、3 或 4 种)脑膜炎球菌多糖或寡糖(简单的或缀合到包含 T 细胞表位的载体, 如上述)加入到组合物中。优选至少加入 C(最优选缀合的), 更优选 A 和 C 或 Y 和 C(优选所有都缀合), 最优选 A、C、Y 和 W(优选所有都缀合)。有利地是, 缀合的流感嗜血菌 B 荚膜多糖或寡糖也被包括在上面的组合物中以产生通用的脑膜炎疫苗。

15 优选由 WO 94/08021 中逐一列举的组合物组成或包含这些组合物的组合物不被本发明中请求保护。

本发明的疫苗制剂

20 本发明的免疫原性组合物可以与适宜的佐剂配制以产生本发明的疫苗组合物。

适宜的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(尤其是碳酸钙)、铁盐或锌盐, 或者可以是酰化酪氨酸, 或者酰化糖、阳离子或阴离子衍生化的多糖, 或者聚磷腈的不溶性悬浮液。

25 可以加入的适宜的 Th1 佐剂系统包括, 单磷酰基脂质 A, 尤其是 3-脱-O-酰化单磷酰基脂质 A(或 LPS 的其他无毒衍生物), 和单磷酰基脂质 A, 优选 3-脱-O-酰化单磷酰基脂质 A(3D-MPL)[或者无毒 LPS 衍生物]与铝盐(优选磷酸铝)的组合。增强系统包括单磷酰基脂质 A 和皂苷衍生物的组合, 尤其是如在 WO 94/00153 中公开的 QS21[或其他皂苷]和 3D-MPL[或无毒 LPS 衍生物]的组合, 或者如 W096/33739 中公开的反应原性较弱的组合物, 其中 QS21[或皂苷]被胆固醇抑制。包含水包

油乳剂中的 QS21、3D-MPL 和生育酚的尤其强的佐剂制剂在 WO 95/17210 中描述并且是可以加入的优选制剂。可以加入的其他佐剂包含皂苷，优选 QS21 和/或水包油乳剂和生育酚。也可以加入含有寡核苷酸的未甲基化的 CpG(WO 96/02555)。

- 5 疫苗制剂通常在 Vaccine Design(“The subunit and adjuvant approach”(编者 Powell M. F. & Newman M. J.)(1995)Plenum Press New York)中描述。

免疫保护剂量的疫苗可以通过全身性或粘膜途径施用。这些施用可包括通过肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射；或者通过粘膜施用于口/消化道(优选鼻内施用)、呼吸道、泌尿生殖道。一般选择每剂疫苗的剂量作为在一般的受接种者中诱导免疫保护性应答而无明显的不利副作用的量。这种量将依赖于使用哪种特定免疫原和其是怎样呈递的而变。通常，预期每剂包含 1-100 μg 每种孢，优选 5-50 μg ，最一般地为 5-25 μg 。

- 15 对本发明的孢免疫原性组合物的进一步改进

本发明上面的孢组合物可以在本发明疫苗的功效方面进一步改进，如果产生该组合物的奈瑟氏球菌菌株(包括淋球菌，优选脑膜炎球菌，最优选脑膜炎奈瑟氏球菌 B)的下面的基因(编码保护性抗原)的一种或多种被上调，该上调通过插入该基因的其他拷贝到基因组中，或者在现有基因的上游导入更强启动子，或者 WO 01/09350 中讨论的其他方法之一，这些方法能够诱导被修饰的菌株产生与未修饰菌株相比超过 1.2、1.5、2、3、5 或 10 倍抗原水平而实现：NspA(WO 96/29412)、Hsf 或其截断物(WO 99/31132 & WO 01/55182；也称为 NhhA)、Hap(PCT/EP99/02766)、OMP85(WO 00/23595)、PilQ(PCT/EP99/25 03603)、PldA(PCT/EP99/06718)、FrpB(WO 96/31618)、TbpA(W092/03467、US5912336、W093/06861 和 EP586266)、TbpB(W093/06861 和 EP586266)、NadA(Comanducci 等, J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454; NMB 1994)、FrpA/FrpC 或者包括 5 个或更多重复序列的这些抗原间的共有部分(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(W098/02547 SEQ ID NO 30 38| 核 苷 酸 3083-9025])、HasR(PCT/EP99/05989)、

lipo02(PCT/EP99/08315)、Tbp2(WO 99/57280; NMB 0460)、MltA(WO 99/57280; NMB 0033)、TspA(WO 00/03003)、TspB(WO 00/03003)、ctrA(PCT/EP00/00135)、MafA(NMB 0652)、MafB(NMB0643)、Omp26(NMB 0181)、粘附素 X(NMB 0315)、粘附素 Y(NMB 0995)、粘附素 Z(NMB 1119)、和 OstA(NMB 0280)。NMB 序列的实例可以在 www.neisseria.org 的数据库中发现。对于此处提到的 Hsf, 该术语可以在各种情况下代替 Hsf 截断物-尤其 WO01/55182 中公开的那些。

尤其优选 Hsf 和 TbpA(低或高分子量形式, 或者均为低和分子量形式[EP 586266]), 或者 Hsf 和 OMP85, 或者 OMP85 和 TbpA(低或分子量形式, 或者均为低和分子量形式), 或者 NspA 和 Hsf, 或者 NspA 和 OMP85, 或者 NspA 和 TbpA(低或分子量形式, 或者均为低和分子量形式)都被上调。当组合物包含 2 种疤时, 优选每种疤具有不同的上调。如果 TbpA 高和低将都被上调, 优选它们在来自天然包含 2 种形式的 TbpA 的 2 种菌株的组合物中存在的 2 中单独的疤中上调。最优选地, 2 种菌株具有 L2 和 L3 LOS 免疫型。通过遗传方法或者通过将奈瑟氏球菌/脑膜炎球菌生产菌株生长于铁限制条件, 例如存在 50-70 μ M Desferal(去铁胺甲磺酸盐, 从 Sigma 得到)可以上调 TbpA。如果采取后一方法, 优选 FrpB 基因表达被下调(优选缺失), 因为该可变抗原可能在从分离自铁限制条件的脑膜炎球菌菌株分离的疤中成为免疫优势的。

在优选的实施方案中, 本发明的组合物包含来自 lgtB⁻荚膜多糖⁻msbB⁻菌株的 L3 疤, 该菌株优选在 TbpA 高和 Hsf 中被上调, 和来自 lgtB⁻荚膜多糖⁻msbB⁻菌株的 L2 疤, 该菌株优选在 TbpA 低和 Omp85 中被上调。更优选地, 两种疤在 PorA 和/或 FrpB 表达, 和任选地 OpC 和/或 OpA 表达中被额外地下调。疤最优选通过如上述的低 DOC 方法分离, 并且两种疤中 LOS 被疤内交联到外膜蛋白。

血影或被杀死的完整细胞疫苗

本发明人设想上面关于疤的组合物和疫苗可以容易地扩充为关于血影或被杀死的完整细胞制剂和疫苗的方法(具有相同的优点)。从革兰氏阴性菌株制备血影制剂(具有完整外膜的空细胞)的方法是本领域熟知的(见例如 WO 92/01791)。杀死完整细胞以制备用于疫苗的失活的细胞制剂的方法也是熟知的。因此, 预见含有该文献的全文描述的疤的

组合物和疫苗可应用于包含相等的本发明血影和被杀死的完整细胞制剂的相同组合物或疫苗。

本发明组合物的血清杀细菌测定法

5 血清杀细菌测定法是在本发明的免疫原性组合物中时评定抗原间协同关系的优选方法。

这种协同应答的特征可以是抗原组合引起的 SBA 比每种抗原单独引起的 SBA 高至少 50%、2 倍、3 倍、优选 4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、最优选 10 倍。优选针对产生抗原的同源菌株，优选还针对一组异源菌株，测量 SBA。(对于代表性组见例如下面的属于 A-4 簇的
10 BZ10(B: 2b: P1. 2)、属于 ET-37 复合物的 B16B6(B: 2a: P1.2)，和 H44/76(B: 15: P1.7, 16))。SBA 是估计脑膜炎球菌疫苗的功效的最常见的被承认的免疫学标记(Perkins 等, J Infect Dis. 1998, 177:683-691)。令人满意的 SBA 可以通过任何公知方法确定。使用从动物模型，或者从人类受试者得到的血清可以实施 SBA。

15 用人血清进行 SBA 的优选方法如下。在第一次接种前、第二次接种后两个月和第三次接种后一个月(一年内的三次接种是一般的人初次接种方案，该方案在例如，第 0、2 和 4 个月，或者第 0、1 和 6 个月执行)采集血样。可以对 1 岁以下的婴儿(例如，在 Hib 接种的同时进行)实施这种人初次接种方案，或者 2-4 岁的幼儿或青少年也可以用这种初
20 次接种方案接种以检验 SBA。如果适用，在初次接种后 6 到 12 个月和激发剂量后 1 个月采集另一血样。

如果第三次疫苗剂量(初次接种方案的)(在 2-4 岁幼儿或青少年中，但是优选在 1 岁内的婴儿中)1 个月后，针对产生本发明的抗原的脑膜炎球菌菌株的 SBA(抗体稀释液)效价(与接种前效价相比)增加 4 倍
25 的受试者的百分比为所有受试者的 30%以上，优选 40%以上，更优选 50%以上，最优选 60%以上，那么 SBA 将可以令人满意地用于具有同源杀细菌活性的抗原或胞制剂。

当然，如果具有同源杀细菌活性的抗原或胞制剂也可以引起针对其所来自的脑膜炎球菌菌株的令人满意的 SBA，那么该抗原或胞制剂
30 也可以组成具有同源杀细菌活性的胞制剂。

如果第三次疫苗剂量(初次接种方案的)(在 2-4 岁幼儿或青少年中，但是优选在 1 岁内的婴儿中)1 个月后，针对 3 种异源脑膜炎球菌

菌株的 SBA(抗体稀释液)效价(与接种前效价相比)增加 4 倍的受试者的百分比为所有受试者的 20%以上, 优选 30%以上, 更优选 35%以上, 最优选 40%以上, 那么 SBA 将可以令人满意地用于具有异源杀细菌活性的抗原或胞制剂。这种试验可有效指示具有异源杀细菌活性的抗原或胞制剂是否能够诱导针对各种脑膜炎球菌菌株的交叉杀细菌抗体。三种异源菌株应该优选具有相互间和优选与具有异源杀细菌活性的抗原或胞制剂所从中制备和得到的菌株不同的电泳型(ET)-复合物或多基因座序列定型(MLST)模式(见 Maiden 等, PNAS USA 1998, 95:3140-5)。技术人员将能够容易地确定具有不同 ET-复合物的三种菌株, 该 ET-复合物反映了脑膜炎球菌, 尤其是脑膜炎球菌 B 型菌株之间所观察到的遗传多样性, 这些菌株被认为是严重的疾病负担的原因并且/或者代表被识别的 MenB 剧毒谱系(见 Maiden 等, 如前)。例如, 可以使用的三种菌株是下面的: 属于 A-4 簇的 BZ10(B: 2b: P1.2); 属于 ET-37 复合物的 B16B6(B: 2a: P1.2); 和属于 ET-5 复合物的 H44/76(B: 15: P1.7, 16), 或者属于相同 ET/簇的其他谱系。这些谱系可用于试验具有异源杀细菌活性的抗原或胞制剂, 该制剂从例如属于 ET-5 复合物的脑膜炎球菌菌株 CU385(B: 4: P1.15)制备或得到。可以使用的另一示例菌株来自谱系 3 流行病克隆(例如, NZ124 [B: 4: P1.7, 4])。另一种 ET-37 菌株是 NGP165(B: 2a: P1.2)。

测量 SBA 活性的方法是本领域公知的。例如, 可以使用的方法在 WO 99/09176 中实施例 10C 中描述。概括地, 所要试验的菌株培养物生长于(优选在铁耗尽条件中-通过向生长培养基中加入铁螯合剂如 EDDA)生长的对数期。这可被悬浮在含有 BSA 的培养基(如含有 0.3%BSA 的 Hanks 培养基)中以得到调节到约 20000 CFU/ml 的工作细胞悬浮液。将所要试验的血清的一系列两倍稀释液(优选在 56℃热失活 30 分钟)[例如在 50 μl/孔体积]和将要试验的 20000 CFU/ml 脑膜炎球菌菌株悬浮液[例如 25 μl/孔体积中]混合可以得到一些列反应混合物。应该温育(例如, 37℃15 分钟)并摇动(例如, 在 210 rpm)反应小瓶。最终反应混合物[例如在 100 μl 体积中]额外地含有补充来源[如 25%终体积的预试验的幼兔血清, 或者用于人血清学的人血清], 并如上温育[例如, 37℃ 60 分钟]。无菌聚苯乙烯 U 形底 96 孔微量滴定板可用于该测定法。可以使用多道移液器从每孔吸取等分试样[例如 10 μl], 然后将

其滴到 Mueller-Hinton 琼脂板上(优选含有 1% Isovitalex 和 1% 热失活的马血清)并温育(例如在 5% CO₂ 中 37°C 18 小时)。优选地, 单个菌落可以计数高达 80CFU/等分试样。下面的三种试样可用作对照: 缓冲液+细菌+补充物; 缓冲液+细菌+失活的补充物; 血清+细菌+失活的补充物。使用程序可以直接计算 SBA 效价, 该程序通过回归计算处理数据得到相应于细胞杀死 50% 的稀释液的量度。

该专利说明书中引用的所有参考文献或专利申请在这里并并入作为参考。

10 实施例

除了另有详细描述之外, 下面的实施例使用标准技术实施, 这些技术是本领域技术人员熟知并且常规的。这些实施例是阐明性的, 但是不限制本发明。

实施例 1

15 在 WO 01/09350 中描述了描述缺失编码参与脑膜炎球菌 B 的 B 荚膜多糖产生的蛋白的基因、缺失 PorA 基因、脑膜炎球菌 B 的表面各种保护性外膜蛋白的上调、免疫优势蛋白或生物合成酶的下调, 和分离荚膜的方法的实例。

实施例 2: LOS: 关键的交叉保护性抗原

20 为了为了评价 LOS 作为潜在的交叉保护性抗原的角色, 根据两种不同方法使用 H44/76 野生型(WT)脑膜炎球菌 B 菌株(表达 L3 LOS)和表达“类 galE⁻样 LOS”(关于 lgtE⁻LOS 的短结构)的修饰的 H44/76 菌株产生荚膜。第一种方法使用 0.1% DOC 以产生荚膜中高水平的 LOS, 第二种方法使用 0.5% DOC 以在所得荚膜中具有低水平的 LOS。

25 小鼠接受每剂通过 IM 途径三次注射的(在第 0、21 和 28 天)吸附在 Al³⁺ 盐(磷酸铝)和 3D-MPL 上的 5 μg 荚膜。在第三次注射后 14 天采集血样。

30 抗 L3 LOS ELISA 在合并的血清中使用纯化的 L3 LOS 进行。图 3A 中的结果清楚地表明 0.1% DOC 方法产生了能够引起小鼠中抗 LOS 应答的荚膜。这表明 galE⁻LOS 和 L3 LOS 能够诱导抗体的产生。另一方面 0.5% DOC 提取了太多的 LOS 以使其作为荚膜疫苗中的关键抗原。

血清杀细菌测定法

使用不同的 NmenB 菌株: 同源 WT H44/76 菌株、PorA(-)H44/76 菌株、和两种异源菌株(基于血清亚型)Cu385 和 NZ124 对各自血清进行 SBA。这四种菌株表达一种 L3 LOA。加入第五种菌株。与 H44/76 相比, 该菌株(B16B6)不仅对于 PorA, 而且对于 LOS 都是异源的(它是一种免疫型 L2 菌株)。

图 3B 中的结果指出仅针对 L3 菌株但是仅仅对于 DOC 0.1% WT 疤的交叉杀细菌应答。对于 DOC 0.1% galE⁻疤和 DOC 0.5% WT 疤没有观察到交叉杀细菌应答。此外, 熟知 PorA 抗体诱导的杀细菌应答是依赖血清型的。在该实验中对于 DOC 0.5% WT 疤或 galE⁻疤和用 PorA(-)H44/76 菌株得到的 SBA 数据也观察到该情况。

所有这些结果表明含有高百分比 L3 LOS 的疤诱导的交叉杀细菌应答是由于针对 LOS 抗原的 Abs 的产生。

仅仅 L3 LOS(不是 galE⁻ LOS)能够引起杀细菌抗体的产生。尽管, 在 ELISA 中对于 DOC 0.1% galE⁻疤中观察到良好的抗-LOS 应答, 但是该应答不是生物学相关的(无 SBA)。

此外, 由于抗 L3 LOS Abs 仅仅杀死 L3 菌株而不杀死 L2 菌株, 似乎该应答是 LOS 免疫型特异的, 显示最佳的疫苗应该理想地含有 L3 和 L2 LOS 以实现最佳覆盖。

耗尽实验

为了阐明 WT DOC 0.1%疤诱导的应答主要是由于抗-LOS 抗体, 用不同浓度的纯化的 L3 LOS 耗尽血清库。耗尽后, 血清用于针对同源 WT H44/76 菌株的杀细菌测定法中。

用针对 DOC 0.1% WT 疤产生的血清得到的结果(见图 3C)显示出明显的剂量-范围抑制, 表明该制剂诱导的大多数抗体针对 LOS(证实用 PorA(-)H44/76 菌株产生的 SBA 结果)。相反, WT DOC 0.5%诱导的应答不像用 PorA(-)H44/76 菌株进行的 SBA 所阐明的针对 LOS 并且也通过 LOS 耗尽指示。

对于 L2 LOS 可能得到该结果。

实施例 3: 用 L3 和中间产物(lgtB⁻)DOC 自由疤(未解毒的 LOS)诱导的交叉杀细菌抗体进行的实验

所用的 MC58 脑膜炎球菌衍生菌株为 B: P1.7.16, opc⁻, siaD⁻。该菌株被遗传修饰以表达 L3(菌株 2G2)或中间表位(菌株 2G EcoN1b-

1, 像 2G2 但是额外地 lgtB⁻)或者短版本的 LPS(菌株 C6, 其为 lgtE⁻)。根据正常的高(0.5%)DOC 方法或者无 DOC 方法产生 OMV。

通过肌肉途径在第 0、20 和 28 天免疫接种小鼠(每组 10 只)3 次。它们接受 1 或者 10 μg(蛋白含量)在 Al(OH)₃ 上配制的疤。在第 28 天(post II)和第 42 天(post III)采集血样。

在合并的血清上并使用以幼兔血清作为外源补充物来源的同源菌株(MC58 和 H44/76)和两种异源菌株(M97250687 和 M9725078)进行杀细菌分析。

下表概述了结果(50%杀灭的杀细菌效价):

10

抗原	血样	菌株和血清型			
		MC58 P1.7.16	H44/76TT P1.7.16	M97250687 P1.19.15	M97252078 P1.4
c6 no doc 10ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	98
c6 no doc 10ug IM	Post III	1 353	>2560	>2560	90
c6 no doc 1ug IM	Post II	247	620	247	<20
c6 no doc 1ug IM	Post III	411	878	748	<20
2g2 no doc 10ug IM	Post II	>320	>2560	>2560	>2560
2g2 no doc 10ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	1407
2g2 no doc 1ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	118
2g2 no doc 1ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	348
2gecon1b-1 no doc 10ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	1162
2gecon1b-1 no doc 10ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	1213
2gecon1b-1 no doc 1ug IM	Post II	1 151	>2560	1 696	22
2gecon1b-1 no doc 1ug IM	Post III	2 220	>2560	1 947	135
c6 doc 10ug IM	Post II	308	248	341	<20
c6 doc 10ug IM	Post III	189	104	400	<20
c6 doc 1ug IM	Post II	33	43	63	<20
c6 doc 1ug IM	Post III	NC (>20)	24	156	<20
2g2 doc 10ug IM	Post II	NC (>20)	25	360	<20
2g2 doc 10ug IM	Post III	201	<20	647	<20
2g2 doc 1ug IM	Post II	275	<20	299/644	<20
2g2 doc 1ug IM	Post III	237	<20	728	<20
2gecon1b-1 doc 10ug IM	Post II	573	31	685	<20
2gecon1b-1 doc 10ug IM	Post III	NC (>40)	21	1 140	<20
2gecon1b-1 doc 1ug IM	Post II	261	NC	118	<20
2gecon1b-1 doc 1ug IM	Post III	348	NC	692	<20

显然, L3(2g2)或中间(2gecon1b-1)表位的存在诱导了交叉杀细菌抗体, 而来自截断的 LPS 菌株(C6)的疤诱导较低水平的交叉反应抗体。当注射 1 μg OMV 时尤其证明了这一点。

15

此外, 如用以 DOC 纯化的 OMV 所表明的, 减少疤的 LPS 含量降低了交叉杀细菌抗体的诱导。除了 LPS 增加, 可能无 DOC 的疤也可以有利地保留与 OMV 如脂蛋白松散地相互作用的一些蛋白。

实施例 4: L3 LOS 和外膜蛋白的胞内交联

所用的 MenB 胞来自 H44/76 菌株(LOS 免疫型 L3), 该菌株为 SiaD⁻(从而不表达荚膜多糖)和 PorA⁻。使用两种不同的菌株: 完整的 L3(菌株 B1717, siad(-)PorA(-)Full L3)和截断的 L3(菌株 B 1727, siad(-)PorA(-)lgtB(-)TrL3)。

根据公知方法使用 EDAC/NHS 缀合方法交联胞内的 LOS 和 OMP 使得 LOS 的寡糖组分为依赖 T 的抗原(EDAC/NHS 比甲醛优选, 发现甲醛交联程度太高从而不利地影响滤过率)。EDAC 与羧酸反应产生活化酯中间产物。存在胺亲核物质时, 形成酰胺键并释放异脲副产物。然而, 通过形成硫代-NHS 酯中间产物可以增加 EDAC-介导的反应的效率。硫代-NHS 酯比仅 EDAC 与羧酸盐反应形成的活性酯在水溶液中存在更长时间。这样, 使用两步方法可以实现酰胺键形成的更高得率。EDAC/NHS 缀合在 J. V. Staros, R. W. Wright 和 D. M. Swingle. Enhancement By N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156:220-222(1986); 和 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson(1996)173-176 页中讨论

反应混合物含有体积为 1 mL 的 3%蔗糖(用于胞稳定)中的 1.5 mg 硫代-NHS 和 5 mg EDAC。胞以 0.025 mg EDAC/mg 胞的比率存在。胞以 2 mg/ml 的浓度存在并用 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 调节 pH 到 7.5。

反应物在室温放置 4 小时, 并将混合物对含有 3%蔗糖, pH 7.5 的 2 mM 磷酸缓冲液透析。混合物然后经 Sterivex G10 0.22 μ m 过滤。回收胞的得率为 99%。

反应后可以紧接着使用抗 L3-mAb 的蛋白印迹。通过该反应, 低 MW LOS 变得更暗淡而新的更高 MW 带出现在带上。该更高的 MW 带似乎占优势并可以代表共价连接到 PorB 的被缀合的 LOS 的大多数。

发现 EDAC 是优秀的胞内交联剂, 因为其将 LOS 不可逆地交联到 OMP, 并足够提高 LOS 依赖 T 的免疫原性, 但是不交联到如此高的程度使得产生如差的滤过率、聚集和胞间交联的问题。产生的胞的形态类似于未交联的胞产生的形态(通过电子显微照片观察)。此外, 上面的方案避免了发生过高交联(其可降低胞表面上天然存在的保护性

OMP, 例如 TbpA 的免疫原性)。

实施例 5: L3 和截断的(中间的, lgtB-)L3 可诱导产生识别截断的(中间的 lgtB-; TrL3)L3 LOS 的杀细菌 Abs

5 OMV(疤)从 MenB 菌株 H44/76 siaD-PorA-L3 或 H44/76siaD-porA-TrL3 产生。进行两种不同的提取; 所用的 DOC 百分比为 0.1 或 0.5%。还评价了两种不同的佐剂制剂: Al(OH)₃ 或磷酸铝+ 3D-MPL。小鼠(OF1 雌性小鼠, 6-8 周龄, 每组 30 只)通过 IM 途径(5 μg 疤/注射)注射 3 次(第 0、21 和 28 天)。从 II 后(第 28 天)和 III 后(第 42 天)的血清(合并的血清或各自的血清)收集 SBA。

10 用 0.1% DOC 提取的疤诱导的血清的 50% 细胞杀死的几何平均效价和合并的血清效价比用 0.5% DOC 提取的要大。这可能通过如下事实解释: 0.1% DOC 提取的疤诱导的血清中 LOS 是用 0.5% DOC 提取的疤诱导的血清中 LOS 的 2.5 倍。用含有完整 L3 LOS 或截断的 L3 LOS 的疤诱导的血清的 SBA 之间没有显著差异。如果疤用磷酸铝+3D-MPL
15 作为佐剂, 与用氢氧化铝作为佐剂相比, SBA 增加。

还进行了血清耗尽实验。血清用 1 mg/mL 纯化的 L3 或 trL3 LOS 耗尽然后对这些耗尽的血清实施 SBA。结果表明杀细菌的 Abs(含有抗-L3 抗体)可以几乎完全被血清的 trL3 LOS 预处理耗尽, 且杀细菌 Abs(含有抗-trL3 抗体)可以几乎完全被血清的 L3 LOS 预处理耗尽。从
20 而抗-L3 杀细菌 Abs 能够与 trL3 LOS 反应, 并且抗-trL3 杀细菌 Abs 能够与 L3 LOS 反应。此外, 从而已经阐明了杀细菌 Abs 对存在于 L3 和 trL3 LOS 中的 LOS 结构的专一性。

总之, 我们已经阐明 trL3 结构(OMVs 中)能够诱导产生针对 L3 菌株的杀细菌 Abs。结合耗尽实验, 我们已经证明 TrL3 和 L3 LOS 是免疫学基础上非常接近的结构, 并且 trL3 可用于产生能够杀死 L3 菌株的 Ab。
25

实施例 6: TrL3 解决了使用完整 L3 结构的自身免疫的潜在问题

如果 L3 和 trL3 结构关于保护性抗体在免疫学上是如此密切相关, 那么这两种结构关于与 L3(和 L2)LOS 相关的可能的自身免疫问题
30 是否存在不同[通过乳-N-neotetraose 部分]? 我们通过是否冷凝集素能够识别 trL3 LOS 已经着手解决该问题。

已知 MA1B2-1B7(J Bio Chem 256(1981)10967-10972; 和 ATCC

保藏号 TIB-189)在低温凝集人成年红细胞(RBC)并与 LNnT(乳-N-neotetraose)反应。其是一般的凝集素。

该单克隆抗体与 MabL3.7.9 单克隆抗体联合用于下面的实验中, MabL3.7.9 单克隆抗体能够杀死 L3 脑膜炎球菌菌株。

- 5 这两种 Abs 用于 ELISA, 微量滴定板用聚-L-赖氨酸(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 小时)预涂, 然后用纯化的 L3 或纯化的 TrL3 LOS(5 μg , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜)涂布。然后将板用 BSA(1%, 室温 30 分钟)饱和。之后用 2 种抗体的每一种实施标准 ELISA。

10 结果(图 4)清楚地表明 Mab L379 与 L3 和 TrL3 反应(图 4B)但是 1B2-1B7 仅仅与 L3 LOS 反应(图 4A)。从而, 我们可以说 TrL3 不被冷凝集素识别, 该冷凝集素与含有 LNnT 四糖的结构(如 L3 LOS 和人红细胞)反应。

从而, TrL3 LOS 具有足够长而保留保护性表位, 但是足够短而丧失可能具有人自身免疫问题的表位的最佳特征。

- 15 没有理由认为对于本专利申请中提出的截断的 L2(lgtB⁻)LOS 结构也是这样的。

实施例 7: 交联对 B 1820 DOC 0.1% 疤的致热性/抗原性的影响

20 使用不同浓度的 EDAC(存在的 EDAC 越多, 越多的疤被交联)交联疤(来自菌株 B1820; 其来自 siaD(-)PorA(-)FrpB(-)截断的 Hsf 被上调的 H44/76, 通过 lgtB(-)突变截断的 L3 菌株, 存在 desferral 的条件下培养, 疤用 DOC 0.1% 提取)。交联为疤内的, 这通过疤的无菌过滤证明。

使用纯化的 Mmen L3 LOS 作为标准, SDS-PAGE 电泳后通过银染测量得到疤中 LOS 含量为 18%(Tsai, J. Biol. Standardization(1986)14:25-33)。通常用 0.1% DOC 提取的疤中 LOS 25 含量为约 20%, 使用 0.2% DOC 的为约 15% LOS, 使用 0.3% DOC 的为约 10% LOS, 使用 0.5% DOC 的为约 5% LOS。通常, 包含 10% 未缀合的 LOS 或更多的疤是不可接受的致热的。

兔中的致热性

30 试验了两种制剂(吸附在 Al(OH)₃ 或 AlPO₄ 上的疤)并且如欧洲药典中描述的, 致热性试验中兔通过 IV 途径接受 500 ng/kg。

结果清楚地表明(下表中)疤内交联对疤的致热性的正影响。相同批的疤用作对照或与不同浓度的 EDAC 交联。疤被交联地越多(更多

EDAC), 它们的致热性越小。对两种不同制剂都观察到该结果。

处理	制剂		
	Al(OH) ₃	AlPO ₄	两种制剂 ⁵
未交联	3.1*	2.8	5.9
EDAC 0.05 [†]	2.7	2.2	4.9
EDAC 0.2	1.7	1.7	3.4
EDAC 1	1.5	1.4	2.9

[†]EDAC 浓度: mg EDAC/mg 疤

5 *各自温度(°C)增加的和(每组 3 只兔)

[‡]6 只兔的和(3 只来自 Al(OH)₃组, 3 只来自 AlPO₄组)

交联疤的抗原性

10 评定上面的疤(未吸附的)的抗原性以确定交联是否对疤的抗原性有影响。疤的不同制剂(交联的或未交联的)涂布在微量滴定板上(10 μg/ml, 4°C 过夜)。洗涤和饱和后, 将来自用 B1820 DOC 0.1 或 0.5% 免疫接种的小鼠的 MAb L379 或血清的连续稀释液加到板中(室温摇动 30 分钟)。使用偶联到生物素的抗小鼠 Ig 然后使用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物, 之后通过 OPD 和 H₂O₂ 显示来揭示被涂布的疤上抗体的固定。使用微量滴定板读出器测量每个微孔的密度。

20 结果表明 MAb L379(针对 L3 LOS 但是还能够与 TrL3 LOS(lgtB⁻ 突变体)反应和针对 L3 菌株的杀细菌活性)同等地识别未处理的(未缀合的)B1820 疤和不同的交联疤(无论所用 EDAC 的浓度怎样)。见图 5A。用 EDAC 0.2 和 1 得到的更高应答可以反应疤中 LOS 的更好的锚定或者至少这些 EDAC 浓度下交联疤中 LOS 的更高的稳定性。

25 还使用小鼠血清评定这些疤的抗原性。使用两种不同血清; 第一种来自用 B 1820 DOC 0.5% 疤(低 LOS 含量 < 8% 的疤, 主要诱导抗蛋白抗体)免疫接种的小鼠。第二种血清来自用 B1820 DOC 0.1% 疤(LOS 含量 ≥ 15% 的疤, 主要诱导针对 LOS 的交叉杀细菌 Abs)免疫接种的小鼠。如用 L379 MAb 所观察到的, 用这两种血清得到的结果(分别为图 5B 和 5C)不显示出未处理的(未缀合的)疤和交联的疤(无论所用的 EDAC 浓度如何)之间的任何差异。

总之, 似乎 LOS 的抗原性不受交联影响并且疤的“总”抗原性不

被 EDAC 处理所改变。正在进行小鼠中免疫原性实验以证明交联(与高浓度 EDAC)不破坏关键保护性抗原的免疫原性。然而,初步结果(实施例 8)表明当用 EDAC 0.025 对 DOC 0.5%提取的疤进行交联时,表现出 EDAC 处理后这些疤的免疫原性增强。

5 **实施例 8: 交联的疤(EDAC 0.025 mg 化学)的免疫原性**

在该实验中疤从 B1727 菌株产生。该菌株是遗传修饰的 H44/76 菌株,其是 siaD(-)PorA(-)trL3(lgtB⁻)Hsf+TbpA 上调的。这些疤使用 0.5% DOC 提取。小鼠通过 IM 途径免疫接种 3 次(在第 0、21 和 28 天)。每次注射,它们接受吸附在 Al(OH)₃ 上的 5μg 疤。

10 对第三次注射后 14 天采集的单独血清进行针对 H44/76 菌株的血清杀细菌分析。结果显示出 EDAC 处理对反应者数目(SBA 效价>100 的小鼠数目)的正影响:对于 EDAC 处理的疤的反应者为 37%,而未修饰疤的反应者仅为 17%。

15 制剂中不存在 3D-MPL, 以及 0.5% DOC 提取后疤制剂中 LOS 的相对低的百分比(约 5%)解释了该低应答。

小鼠	B1727SiaD(-)PorA(-) TrL3 TbpA-Hsf 交联 "EDAC"	疤 B1727 SiaD(-)PorA(-) TrL3 TbpA-Hsf 无处理
GMT	52	27
库的 SBA	249	60
反应者	11/30	5/30

20 还进行了抗 Hsf-ELISA 以确定是否交联对该蛋白的免疫原性有影响。结果(用合并的血清得到的)表明交联对 IgG 抗-Hsf 应答没有影响。没有检测到 IgM。

	抗 Hsf ELISA	
	IgM	IgG
B1727Sia α (-)PorA(-) TbpA-Hsf TrL3 交联 EDAC	50	18140
B1727Sia α (-)PorA(-) TbpA-Hsf TrL3	50	15627
负对照	50	50

实施例 9: TrL3 LOS 数据

评价了下面的实验:

- 5 - TrL3(lgtB(-)L3 LOS)对诱导能够与 LNnT(乳-N-neotetraose)反应的 Abs 的影响;
- 上面构建体的杀细菌抗体的诱导。

10 从两种遗传修饰的 H44/76 菌株产生胞。两种都是 siaD()PorA(-)但是一种产生 WT L3 LOS 而另一种产生 TrL3 LOS(lgtB(-))。这些胞根据不同方法产生以具有高 LOS 含量(约 18%，使用 DOC 0.1%提取)或低 LOS 含量(接近 5%，使用 DOC 0.5%提取)。

 通过 IM 途径用吸附在有或没有 3D-MPL 的 Al(OH)₃ 上的 5 μ g 胞(每次注射)免疫接种三次(在第 0、21 和 28 天)。

抗 LNnT ELISA

15 方法: 微量滴定板用通过间隔区(ADH)缀合到人血清清蛋白的 LNnT 涂布(PBS 中 5 μ g 缀合物/ml, 100 μ l/微孔)。4 $^{\circ}$ C 过夜温育后, 将板用 PBS-BSA 1%洗涤并饱和(室温下 40 分钟)。洗涤后, 在 PBS-0.2% BSA-0.05% Tween20 中连续稀释(室温下 30 分钟)。通过偶联到过氧化物酶(Jackson)的抗小鼠-IgG 然后与 OPDA 和 H₂O₂ 温育显示 IgG 在

20 LNnT 上的固定。

 结果: 正对照是 1B2-1B7 Mab。该 MAb 与 LNnT 并且与 L3LOS(但是不与 TrL3 LOS)反应(见前面的实施例)并且其凝集人红细胞。负对照(-)是来自只用佐剂免疫接种的小鼠的血清。

结果(图 6)清楚地表明仅仅具有高 LOS 含量(DOC 0.1%)的 L3 疤诱导产生能够与 LNnT 反应的 IgG。具有类似 LOS 含量的 Tr L3 疤不诱导针对 LNnT 的 IgG 的产生,就像含有低含量 LOS(DOC 0.5%)的两种疤制剂也不诱导针对 LNnT 的 IgG 的产生一样。

5 H44/76 菌株的 SBA

对第三次注射后 14 天采集的单独的血清进行针对 H44/76 菌株的 SBA 分析。下面的结果清楚地表明 trL3(lgtB(-))LOS 疤诱导和 L3 LOS 类似的杀细菌抗体水平(见 GMT 和 SBA 效价>1/100 的小鼠的数目(=SC))。

10

制剂		L3 疤		TrL3 疤	
		DOC	DOC	DOC	DOC
		0.5%	0.1%	0.5%	0.1%
Al(OH) ₃ +MPL	GMT	331	4125	1029	3204
	SC	19/30	29/30	27/30	30/30
Al(OH) ₃	GMT	169	2029	138	828
	SC	14/30	29/30	13/30	30/30

实施例 10: FrpB 敲除

下面的数据是两个临床前实验的概述。

在这些实验中,两种遗传修饰的 H44/76 菌株用于使用 0.1% DOC 产生疤。通过该方法得到的疤的 LOS 含量接近 20%。

15

这两种 H44/76 菌株如下:

- B1733: siaD(-)PorA(-)Tr(截断的)Hsf 上调的 lgtB(-)
- B1820: siaD(-)PorA(-)TrHsf 上调的 lgtB(-)FrpB(-)

菌株在存在 desferral 时生长后产生疤,该 desferral 用于上调依赖铁的蛋白如 LbpA/B、TbpA/B、FrpB(B 1733 中)等的产生。

20

这些不同的疤制剂吸附在 Al(OH)₃ 上并每隔三周通过 IM 途径两次注射到小鼠中。在第二次施用后 7 天采集血样。小鼠每次注射接受 5 μg 疤。

SBA 结果

对三种 L3 菌株(同源野生型菌株 H44/76 和两种异源 L3 菌株:

25

NZ124 和 M97250687)实施杀细菌测定法。结果清楚地表明 FrpB(-)(敲除)(B1820)疤比 FrpB(+)(B1733)诱导更好的异源交叉杀细菌应答(高效价和更好的血清转变 SC)。异源应答, 尽管通过 FrpB 耗尽被降低, 但是仍然令人满意。

- 5 这些数据表明 FrpB 是疤引起的免疫应答中的主要驱动者, 但是, 由于该外膜蛋白高度可变, 针对该蛋白的抗体仅能够诱导同源菌株的杀灭。疤生产菌株中 FrpB 的缺失因此是提高疤疫苗产生的覆盖的有利方法。

疤	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

10

实施例 11: msbB(lpxL 1)突变对疤的致热性的影响

两种 NmenB 菌株用于该评价:

- 对照菌株, 其是 galE(-)[从而不能产生荚膜多糖]
- msbB 突变菌株: 其是 galE(-)和 msbB(-)

15

使用 0.1% DOC 从这两种菌株产生疤以便在 OMVs(疤)中具有 15%以上的 LOS 含量。如在前面实施例中陈述的, 具有高于 10% LOS 含量的疤制剂从致热性观点看是不令人满意的并且在欧洲药典的兔致热性测定法中失败。

20

上面的疤在 Al(OH)₃(50 μg OMVs/500 μg Al³⁺盐)上配制以用于的兔的致热性测定法中(通过 IV 途径注射 500 ng 疤/kg)。

结果清楚地表明 msbB 的缺失(尤其在不能产生荚膜多糖的菌株中)使得能够产生即使在 LOS 含量大于 15%时也在兔中为非致热性的疤。

疤	稀释	单独的 t°增加(°C)	t°的和	结论
对照 DOC 0.1%	0.5 μg/kg	0.7-1.4-1.2	3.3	失败
MsbB(-)DOC 0.1%	0.5 μg/kg	0.1-0.2-0.2	0.5	通过

欧洲药典标准:

- 如果单独的 t° 的和 $<1.15^{\circ}\text{C}$ ，则“通过”
- 如果单独的 t° 的和在 1.15°C 和 2.65°C 之间，则“如果不重复，则失败”
- 如果单独的 t° 的和 $>2.65^{\circ}\text{C}$ ，则“失败”

5

结论:

包含来自具有 $\text{lgtB}(-)$ 和 $\text{msbB}(-)$ 突变并且用较低(例如 0.1%)脱氧胆酸盐浓度提取的脑膜炎球菌菌株的 L3 和 L3 疤的组合物提供了针对脑膜炎球菌 B 的有效、安全的疫苗的坚实基础。该疤生产菌株是理想的荚膜多糖合成缺陷的，并且疤具有疤内交联到外膜蛋白的 LOS。和 Hsf 和/或 TbpA 抗原上调一样， $\text{PorA}(-)$ 和 $\text{FrpB}(-)$ 的之一或两者在提高交叉杀细菌有效性方面也是有用的。

10

图1: L3和L2免疫型 (H44/76, MC58菌株)

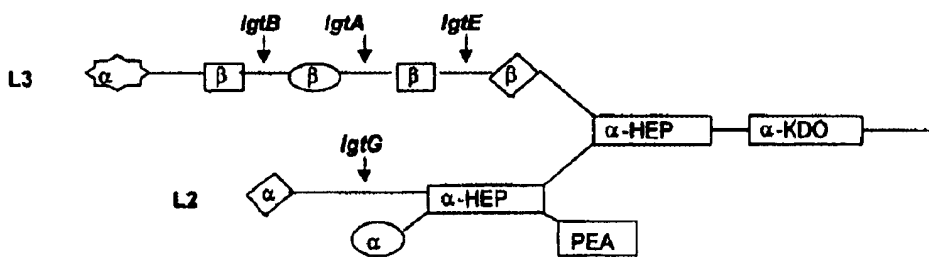
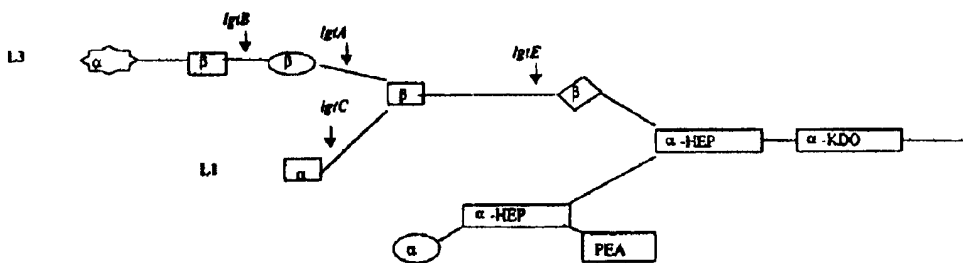


图2: L3和L1免疫型 (如126E菌株)



- | | |
|--------------|------------------|
| α 唾液酸 | α 乙酰氨基葡萄糖 |
| β 葡萄糖 | PEA 磷酸乙醇胺 |
| β 半乳糖 | |

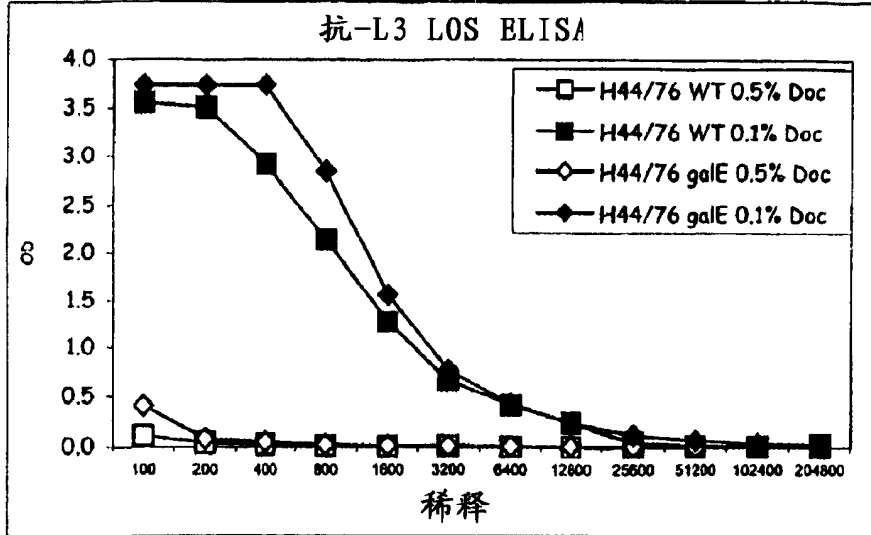


图 3A

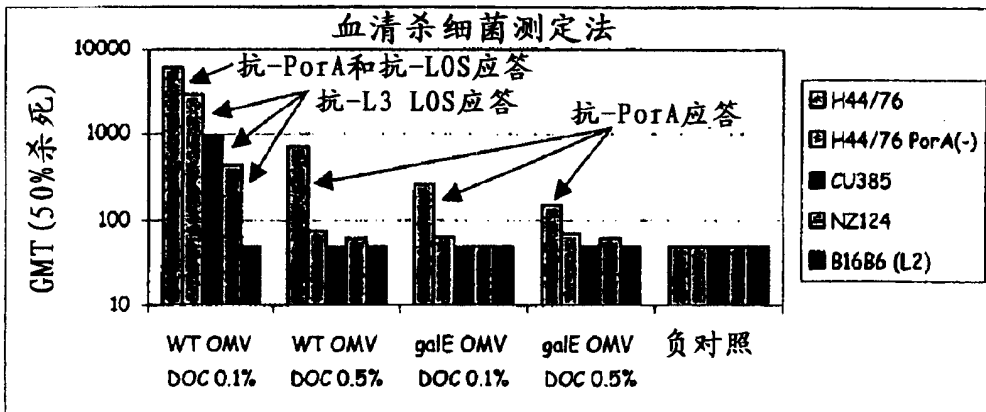


图 3B

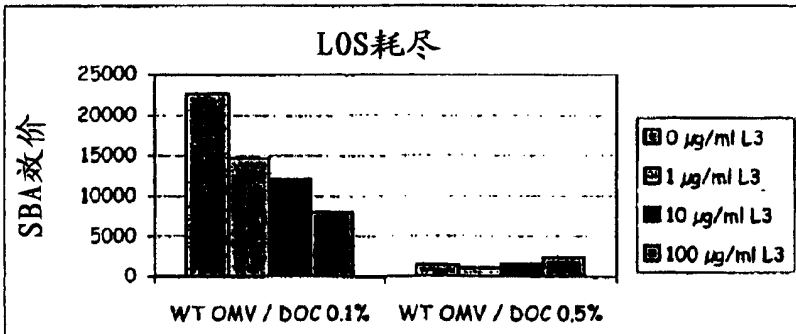


图 3C

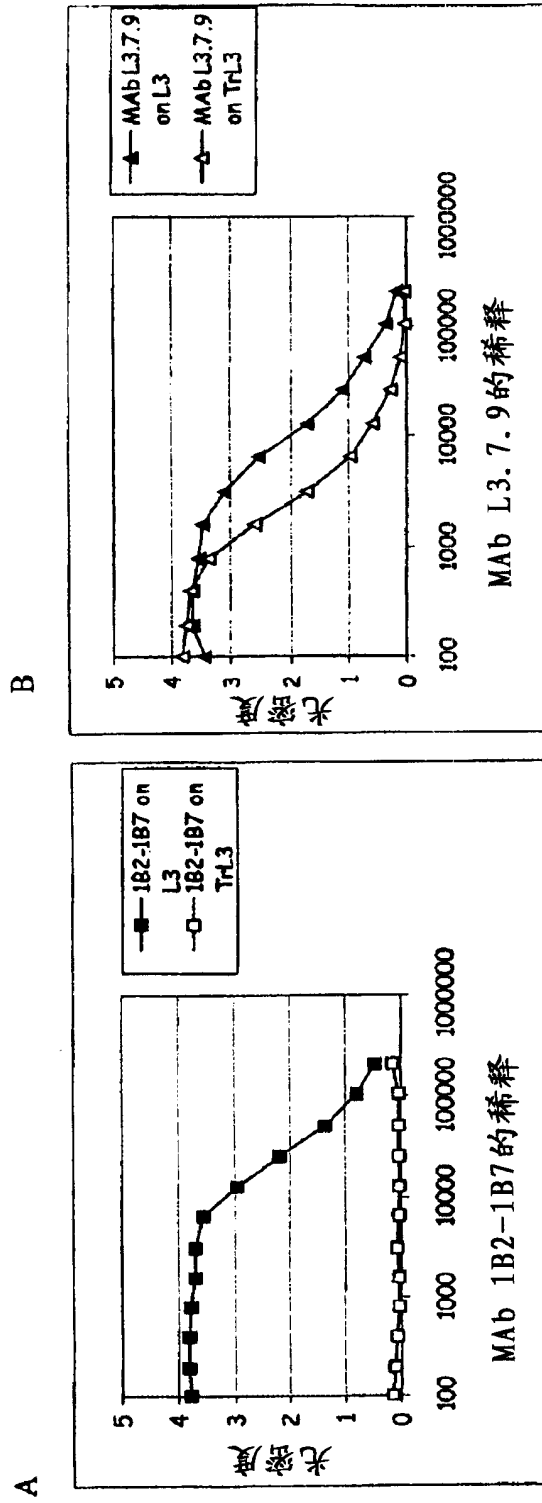


图 4

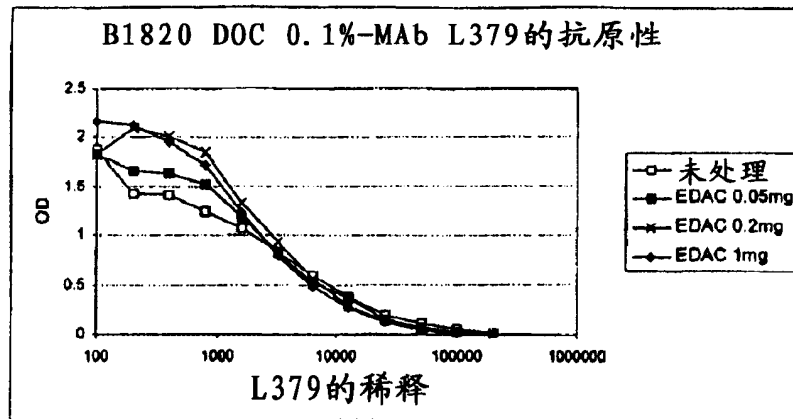


图 5A

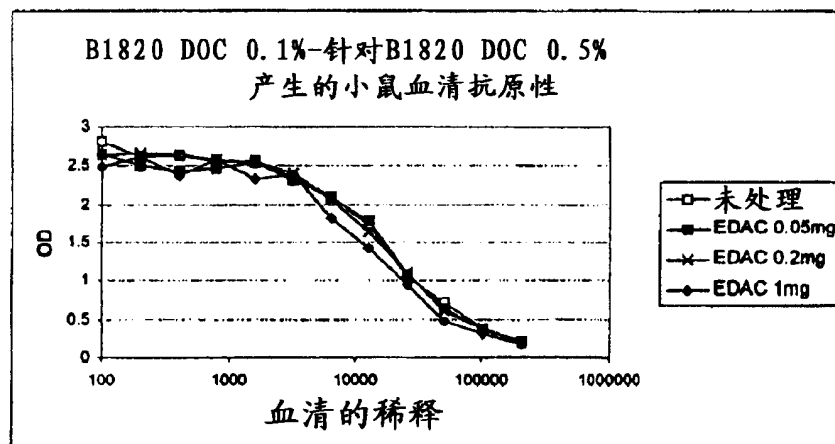


图 5B

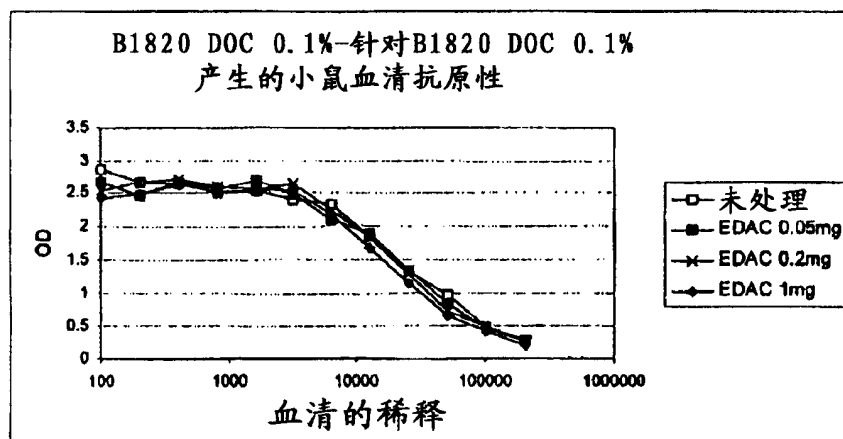


图 5C

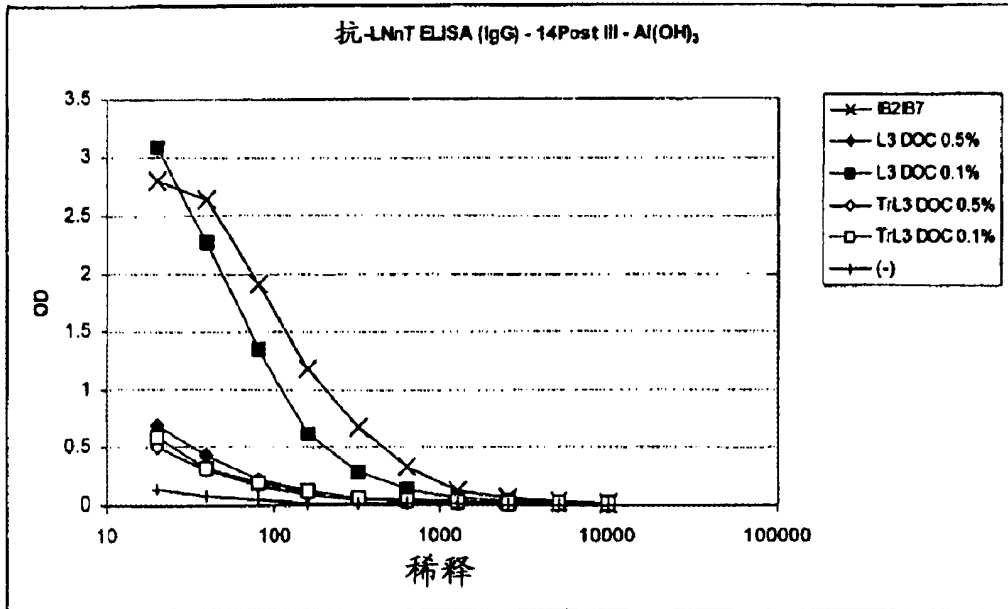


图 6A

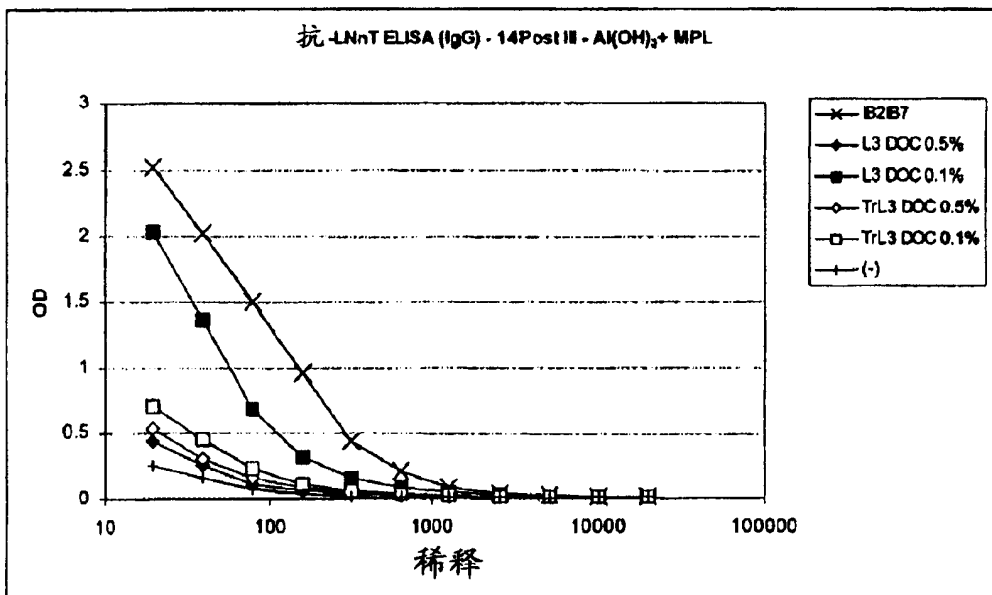


图 6B