

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

专利号 ZL 01815748.3

[45] 授权公告日 2006年4月26日

[11] 授权公告号 CN 1253205C

[22] 申请日 2001.9.12 [21] 申请号 01815748.3

[30] 优先权

[32] 2000.9.15 [33] GB [31] 0022742.1

[86] 国际申请 PCT/EP2001/010568 2001.9.12

[87] 国际公布 WO2002/022167 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.17

[71] 专利权人 史密斯克莱·比奇曼生物公司

地址 比利时里克林萨斯

[72] 发明人 克雷格·A·J·拉弗里尔

简·普尔曼

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 29 页

[54] 发明名称

疫苗

[57] 摘要

本发明涉及细菌多糖抗原疫苗领域。具体是，本发明涉及包含肺炎球菌多糖抗原并任选包含Th1 诱导型佐剂的疫苗，所述多糖抗原主要是肺炎链球菌的肺炎球菌多糖偶联物抗原，其选自：PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133。

1. 一种免疫原性组合物，其包含至少一种肺炎链球菌多糖抗原和至少一种选自下组的肺炎链球菌蛋白抗原：PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, 5 LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133, 或其免疫功能等效物。
2. 权利要求 1 的免疫原性组合物，其中所述多糖抗原以多糖-蛋白载体偶联物的形式存在。
3. 权利要求 2 的免疫原性组合物，其中所述载体蛋白选自下组：白喉 10 类毒素，破伤风类毒素，CRM197，匙孔血蓝蛋白(KLH)，结核菌素的蛋白衍生物(PPD)和流感嗜血杆菌蛋白 D。
4. 权利要求 2 的免疫原性组合物，其中所述载体蛋白是选自下组的肺炎链球菌蛋白抗原 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133, 或其免疫功能等效物。
- 15 5. 权利要求 1 至 4 任一项的免疫原性组合物，其中所述疫苗包含至少 4 种来源于不同血清型的肺炎球菌多糖抗原。
6. 权利要求 1 至 5 任一项的免疫原性组合物，其中所述肺炎链球菌蛋白抗原之一是 PhtD 或其免疫功能等效物。
7. 权利要求 1 至 6 任一项的免疫原性组合物，其还包含肺炎球菌溶血 20 素。
8. 权利要求 1 至 7 任一项的免疫原性组合物，还包含佐剂。
9. 权利要求 8 的免疫原性组合物，其中所述佐剂包含铝盐。
10. 权利要求 8 的免疫原性组合物，其中所述佐剂是 TH1 应答的优先诱导剂。
- 25 11. 权利要求 10 的免疫原性组合物，其中所述佐剂包含至少一种选自下组的物质：3D-MPL, 皂苷免疫刺激物，或免疫刺激性 CpG 寡核苷酸。
12. 权利要求 11 的免疫原性组合物，其中所述佐剂包含选自下组的载体：水包油乳剂，脂质体和铝盐。
13. 权利要求 1 - 12 任一项的免疫原性组合物，其用作药物。
- 30 14. 包含权利要求 1-12 的免疫原性组合物的疫苗。
15. 与肺炎链球菌蛋白抗原组合并任选还与 TH1 诱导型佐剂组合的肺

炎球菌多糖抗原的用途,用于制备预防或治疗 55 岁以上患者的肺炎的药物,所述肺炎链球菌蛋白抗原选自 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133。

5 16. 与肺炎链球菌蛋白抗原组合并任选还与 TH1 诱导型佐剂组合的肺炎球菌多糖抗原的用途,用于制备预防或治疗婴幼儿的中耳炎的药物,所述肺炎链球菌蛋白抗原选自 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133。

17. 一种制备本发明权利要求的免疫原性组合物的方法,该方法包含:  
选择一种或多种肺炎球菌多糖抗原;  
10 选择一种或多种选自下组的肺炎球菌蛋白抗原: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133;  
和

将上述多糖,蛋白抗原和适当的赋形剂混合。

## 疫苗

## 5 发明领域

本发明涉及细菌多糖抗原疫苗，其制备以及这种多糖在医学中的应用。

具体地，本发明涉及包含肺炎球菌多糖抗原并任选包含 Th1 诱导型佐剂的疫苗，所述多糖抗原通常是肺炎球菌多糖偶联物抗原，与肺炎链球菌蛋白抗原一起配制。

10

## 发明背景

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是革兰氏阳性细菌，由其所致的发病率和死亡率相当高(尤其是在年幼和年迈群体中)。该细菌可导致侵袭性疾病如肺炎，菌血症和脑膜炎，以及与菌群定居(colonization)有关的疾病，  
15 如急性中耳炎。在美国 60 岁以上的人中，肺炎球菌性肺炎的发病率估计是每 100,000 人中共约 3 到 8 例。有 20% 的病例可导致菌血症和以下的表现如脑膜炎，即使在抗菌素治疗的情况下其死亡率也接近 30%。

肺炎球菌由化学连接的多糖包裹，所述多糖赋予了该细菌的血清型特异性。肺炎球菌有 90 种已知血清型，而荚膜是决定其毒力的主要物质，因为荚膜不但可以保护细菌的内表面不受补体的影响，而且其本身的免疫原性极弱。多糖是 T 非依赖性抗原，不能被加工或在 MHC 分子上呈递，从而  
20 不能与 T 细胞相互作用。然而，它们通过另一机制刺激免疫系统，所述机制涉及 B 细胞表面受体的交联。

多项试验已显示，抗御侵袭性肺炎疾病的保护作用与荚膜的特异性抗体极为相关，且所述保护是血清型特异性的。  
25

以多糖抗原为基础的疫苗是本领域熟知的。有四种已获批准用于人类，包括伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)的 Vi 多糖，流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)的 PRP 多糖，四价脑膜炎球菌疫苗(由血清型 A, C, W135 和 Y 构成)，以及 23 价肺炎球菌疫苗(由对应于血清型 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 30 23F, 和 33 的多糖组成，占肺炎球菌血清分离物的至少 90%)。

后三种疫苗针对在儿童中引起极高发病率和死亡率的呼吸道感染细菌提供对机体的保护作用，然而这些疫苗还没有被批准用于2岁以下的儿童，因为其免疫原性对该年龄组而言不足[Peltola et al.(1984), N. Engl. J. Med. 310:1561-1566]。肺炎链球菌是婴幼儿和年幼儿童中侵袭性细菌疾病和中耳炎的最常见的原因。同样，老年人对肺炎球菌疫苗的应答较弱[Roghamann et al., (1987), J. Gerontol. 42:265-270]，因此，在该群体中细菌性肺炎的发病率增加[Vergheese and Berk,(1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285]。

已设计出解决婴幼儿中上述免疫原性缺乏的策略，包括将多糖与大的免疫原性蛋白连接，以提供对T细胞的旁路辅助，并诱导针对所偶联的多糖抗原的免疫记忆。目前，正在对肺炎球菌糖蛋白偶联物疫苗在各个年龄组中的安全性，免疫原性和效力进行评估。

已知23价非偶联肺炎球菌疫苗的临床疗效差异较大，从0%到81%不等(Fedson et al. (1994) Arch Intern Med. 154:2531-2535)。所述效力似乎与正接受免疫的危险人群相关，如老年人，Hodgkin's患者，脾切除者，镰刀型细胞病(sickle cell disease)和无丙种球蛋白血症(agammaglobulinemics)患者(Fine et al. (1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677)，还与疾病的表现有关。23价疫苗没有显示出针对肺炎球菌性肺炎(在某些高危人群如老年人中)和中耳炎疾病的保护作用。

因此需要改进的肺炎球菌疫苗组合物，尤其是那些能更有效地预防或缓解老年人和儿童的肺炎球菌病的疫苗组合物。

本发明即提供这样的改进的疫苗。

### 发明简述

本发明提供了疫苗组合物，其包括至少一种肺炎链球菌多糖抗原(优选与一种蛋白载体偶联)和选自以下的肺炎链球菌蛋白抗原：多组氨酸三联体(Poly Histidine Triad)家族(Pht; 如 PhtA, PhtB, PhtD, 或 PhtE), Lyt 家族(例如 LytA, LytB, 或 LytC), SpsA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 和 Sp133, 或其截短物或其免疫功能等效物，任选地，还包括 Th1 佐剂(诱导明显的 Th1 型免疫应答的佐剂)。优选肺炎链球菌蛋白和 Th1 佐剂都包括。有利的组合物包括上述本发明的肺炎链球菌蛋白相互之间的组合，以及与其它肺炎链球菌蛋白的组合。本发明的组合物尤其适用于对老年肺炎患者的治疗。

肺炎球菌多糖疫苗(偶联型或非偶联型)不能针对老年人群的肺炎起保护作用,而在该群体中该病的发病率非常高。抗御肺炎球菌的关键机制是调理吞噬作用(通过产生抗肺炎球菌多糖抗体而导致体液 B 细胞/中性粒细胞介导的事件,细菌最终被吞噬),然而所涉及的调理机制有一部分在老年人中变弱,即 PMN(多形核细胞)的超氧化物的产生,其它活性氧物质的产生,PMN 的移动,PMN 的凋亡,PMN 的变形性减弱。在老年人中抗体应答也可能减弱。

与一般认识相反,正常水平的抗荚膜多糖抗体不能有效彻底地清除细菌,因为肺炎球菌可以侵入宿主细胞以躲避免疫系统的该种免疫作用。

令人惊奇的是,本发明人发现在刺激免疫系统的体液免疫(B 细胞介导的免疫)的同时刺激免疫系统的细胞免疫(例如 T 细胞介导的免疫)能产生协同作用(或协作),它增强肺炎球菌从宿主中被清除。这一发现在一般意义上可指导对肺炎球菌感染的预防(或治疗),而对基于多糖的疫苗无效的老年人肺炎的预防(或治疗)尤其重要。

在不受任何理论限制的情况下,本发明发现,如果将肺炎球菌多糖(优选与蛋白载体偶联的)与选自如下的肺炎球菌蛋白: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133(能被加工并呈递在感染的哺乳动物细胞表面的 MHCI 和 MHCII 中)一起给药,免疫系统的两种免疫效应可协同。尽管这些肺炎球菌蛋白自身可激发一种或多种由细胞介导的免疫,但本发明人也发现在疫苗制品中存在 Th1 诱导型佐剂可帮助免疫系统的该种免疫,并且惊讶地发现它还可加强免疫系统的两种免疫之间的协同作用。

#### 发明详述

本发明提供改进的疫苗,尤其是用于预防或缓解老年人(和/或婴幼儿)的肺炎球菌感染疫苗。

在本发明中,年龄在 55 或 55 岁以上的患者可视为是老年患者,主要是 60 岁,更主要是 60 岁以上的患者。

因此,在本发明的一个实施方案中提供了一种疫苗组合物,其适合老年患者(和/或婴幼儿)应用,该疫苗组合物包含至少一种肺炎链球菌多糖抗原和至少一种选自下组的肺炎链球菌蛋白抗原: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE,

SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133。所述疫苗可任选包含 Th1 佐剂。

在第二个优选实施方案中本发明提供了一种疫苗(适用于预防老年患者的肺炎),其包含至少一种(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 种)肺炎链球菌多糖抗原和至少一种选自下组的肺炎链球菌蛋白抗原: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133, 优选还包括 Th1 佐剂。

在以上实施方案中,所述疫苗优选包括本发明的上述肺炎球菌蛋白相互之间的组合,以及与其它肺炎球菌蛋白之间的组合,如下所述。

10 所述疫苗还可以用于治疗其它高危人群如婴幼儿中的肺炎球菌感染(例如中耳炎)。

#### 本发明的肺炎链球菌多糖抗原

通常本发明的肺炎链球菌疫苗包含多糖抗原(优选与载体蛋白偶联),其中所述多糖来源于至少四种肺炎球菌血清型。优选,所述四种血清型包括 6B, 14, 19F 和 23F。更优选,所述组合物中至少包括 7 种血清型,例如来源于血清型 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 和 23F 的那些。还更优选所述组合物中包括至少 11 种血清型,例如在一个实施方案中,所述组合物包括来源于血清型 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 和 23F 的荚膜多糖(优选与载体蛋白偶联)。在本发明的一个优选实施方案中,至少包括 13 种多糖抗原(优选与载体蛋白偶联),但还可以包括另外的多糖抗原,例如 23 价体(如血清型 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 和 33F)也包括在本发明的范围内。

对于老年人的疫苗接种(例如用于预防肺炎)而言,优选在上述 11 价抗原组合物中,包括血清型 8 和 12F(最优选还包括血清型 15 和 22)以形成 15 价疫苗,而对于婴幼儿而言(这时主要考虑中耳炎),优选包括血清型 6A 和 19A 以便形成 13 价疫苗。

尽管上述多糖可以应用其全长天然形式,但应该理解,降低了大小但仍然具备免疫原性的多糖也可以应用(参见例如 EP497524 和 497525)。

为了预防/缓解老年患者(+55 岁)的肺炎、婴儿(最大至 18 个月)和幼儿(通常是 18 个月到 5 岁)的中耳炎,本发明的优选实施方案将本发明所述多价肺炎链球菌多糖组合了选自如下的肺炎链球菌蛋白: PhtA, PhtD, PhtB,

PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133, 或其免疫功能等效物。肺炎球菌蛋白的联合应用还优选如下进行。

#### 本发明的肺炎球菌蛋白

基于本发明的目的, “免疫功能等效物”是指包含本发明所述蛋白的至少一种保护性表位的蛋白的肽。所述表位的特征是暴露于表面, 高度保守, 且可在宿主中引发杀菌性的抗体应答或可阻止毒性作用。优选, 所述功能等效物含有本发明蛋白的至少 15 个, 优选 30 个或更多个连续的氨基酸。最优选, 可使用所述蛋白的片段, 有缺失的蛋白如其跨膜缺失变体(即应用所述蛋白的胞外区), 融合体, 通过化学方法或遗传学方法脱毒的衍生物等, 只要它们能激发基本上与天然蛋白等同的免疫应答。蛋白序列中潜在的 B 细胞表位的位置可通过两种方法的联合应用鉴定既是表面暴露又具抗原性的肽来确定, 所述方法是 2D 结构预测法和抗原性指数预测法。用 PSIPRED 程序(来自 David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)可进行 2D 结构预测。抗原性指数可根据 Jameson 和 Wolf 描述的方法(CABIOS 4:181-186[1988])进行计算。

本发明的蛋白是以下蛋白, 它们都暴露于肺炎球菌的外表面(至少能在肺炎球菌生活周期的某一阶段被宿主免疫系统识别), 或它们都是肺炎球菌所分泌或释放的蛋白。

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 基序的蛋白(其中 X 是任何氨基酸), 具有 II 型信号序列基序 LXXC 的蛋白(其中 X 是任何氨基酸), 和具有 I 型信号序列基序的蛋白。这些种类(或基序)中的优选实例是如下蛋白(或其截短物或免疫功能等效物):

Pht(多组氨酸三联体)家族包含蛋白 phtA, PhtB, PhtD 和 PhtE。该家族具有以下特征: 脂质化序列(lipidation sequence), 由脯氨酸丰富区和几个组氨酸三联体分隔开的两个区(可能与金属或核苷的结合或酶的活性有关), (3-5)卷曲螺旋区, 保守的 N 末端和异源的 C 末端。它存在于已检验的所有肺炎球菌菌株中。其同源蛋白可见于其它链球菌和奈瑟氏球菌属。该家族优选的成员包括 PhtA, PhtB 和 PhtD。更优选, 其包括 PhtA 或 PhtD。可以理解, 术语 PhtA, B, D 和 E 是指具有在以下引用文献中公开的序列的蛋白, 以及其天然(和人工制备的)变体, 所述变体与参考蛋白有至少 90% 的序列同



源性, 优选至少 95% 相同, 最优选至少 97% 相同。

对于 Pht 蛋白而言, PhtA 公开于 WO98/18930, 还可称作 Sp36。如上所述, 其是一种多组氨酸三联体家族的蛋白, 且具有 II 型信号基序 LXXC。

PhtD 公开于 WO 00/37105, 也可称作 Sp036D。如上所述, 它也是多组氨酸三联体家族的一种蛋白, 也具有 II 型信号基序 LXXC。

PhtB 公开于 WO 00/37105, 也称作 Sp036B。PhtB 家族的另一成员是降解 C3 的多肽, 公开于 WO 00/17370。该蛋白也是多组氨酸三联体家族成员, 具有 II 型信号基序 LXXC。优选的免疫功能等效物是蛋白 Sp42, 公开于 WO98/18930。PhtB 截短物(约 79kD)公开于 WO 99/15675, 它也被认为是 PhtX 家族成员。

PhtE 公开于 WO00/30299, 称作 BVH-3。

SpsA 是胆碱结合蛋白(Cbp), 公开于 WO98/39450。

Lyt 家族是膜结合蛋白, 与细胞裂解有关。N 末端区包含胆碱结合区, 而 Lyt 家族不包含在胆碱结合蛋白家族(Cbp)发现的如下所述所有特征, 因此, 本发明中, Lyt 家族被认为不同于 Cbp 家族。与 Cbp 家族不同, C 末端区包含 Lyt 蛋白家族的催化区。该家族包括 LytA, B 和 C。对于 Lyt 家族而言, LytA 公开于 Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624(1987)。LytB 公开于 WO98/18930, 也称作 Sp46。LytC 也公开于 WO98/18930, 也称作 Sp91。该家族的优选成员是 LytC。

另一优选实施方案是 Lyt 家族截短物, 其中“Lyt”如上定义, “截短物”是指缺失胆碱结合区的 50% 或更多部分的蛋白。优选这类蛋白缺失整个胆碱结合区。

Sp125 是肺炎球菌表面蛋白的一个实例, 具有细胞壁锚定基序 LPXTG(其中 X 是任何氨基酸)。已发现, 这类肺炎球菌表面蛋白中具有该基序的任何蛋白在本发明中是有用的, 从而被认为是本发明的另一蛋白。Sp125 本身公开于 WO 98/18930, 也称作 ZmpB, 即一种锌金属蛋白酶。

Sp101 公开于 WO 98/06734(其参考名称为 # y85993)。其特征在于 I 型信号序列。

Sp133 公开于 WO 98/06734(其参考名称为 # y85993)。其特征也是 I 型信号序列。

Sp128 和 Sp130 公开于 WO 00/76540。

本发明所使用的蛋白优选选自 PhtD 和 PhtA, 或者是这两种蛋白的组合。

本发明的一种或多种肺炎球菌蛋白与其它肺炎球菌蛋白的有利组合

在本发明的疫苗中, 还优选将本发明上述蛋白中的每一种蛋白(优选  
5 PhtD 和/或 PhtA)与来自下组的一种或多种肺炎球菌蛋白组合: 肺炎球菌溶  
血素(也称为 Ply; 优选通过化学处理或突变而脱毒)[WO96/05859,  
WO90/06951, WO99/03884], PsaA 和其跨膜缺失变体(Berry and Paton, Infect  
Immun 1996 Dec; 64(12):5255-62), PspA 和其跨膜缺失变体(US 5804193, WO  
92/14488, WO99/53940), PspC 和其跨膜缺失变体(WO97/09994,  
10 WO99/53940), 胆碱结合蛋白(Cbp)家族成员[例如 CbpA 和其跨膜缺失变体  
(WO97/41151; WO99/51266)], 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Infect. Immun. 1996  
64:3544), HSP70(WO96/40928), PcpA(Sanchez-Beato et al. FEMS Microbiol  
Lett 1998, 164:207-14), M 样蛋白(SB 专利申请号 EP0837130), 和粘附素  
18627(SB 专利申请号 EP0834568)。本发明还包含上述蛋白的免疫功能等效  
15 物或截短物(如上定义)。

关于胆碱结合蛋白家族, 该家族的成员最初被鉴定为可通过胆碱亲和  
层析纯化的肺炎球菌蛋白。所有胆碱结合蛋白都是非共价结合于细胞壁磷  
壁酸和膜结合型脂磷壁酸的磷脂酰胆碱部分。在结构上, 有数个区域在整  
个家族所有成员中是共有的, 但这些蛋白的实际特性(氨基酸序列, 长度等  
20 等)是不同的。通常, 胆碱结合蛋白家族包含 N 末端区(N), 保守重复区(R1  
和/或 R2), 脯氨酸丰富区(P)和保守的胆碱结合区(C), 这些区域多倍重复,  
约构成该蛋白的一半。正如本申请中所用的, 术语“胆碱结合蛋白家族(Cbp)”  
选自在 WO97/41151 中鉴定的下组胆碱结合蛋白: PbcA, SpsA, PspC, CbpA,  
CbpD, 和 CbpG。CbpA 公开于 WO/41151, CbpD 和 CbpG 公开于  
25 WO00/29434。PspC 公开于 WO97/09994。PbcA 公开于 WO98/21337。优选  
胆碱结合蛋白选自: CbpA, PbcA, SpsA 和 PspC。

如果 Cbp 是上文所述的另一种蛋白, 那么它可以是 Cbp 截短物, 其中  
“Cbp”如上定义, “截短物”是指缺失胆碱结合区(C)的 50% 或更多的蛋白。  
优选这类蛋白缺失整个胆碱结合区。更优选, 这类蛋白截短物缺失(i)胆碱  
30 结合区和(ii)该蛋白的 N 末端一半的一部分, 但仍保留至少一个重复区(R1  
或 R2)。还更优选, 所述截短物具有 2 个重复区(R1 和 R2)。这类优选实施

方案的实例是 NR1xR2 和 R1xR2, 描述于 WO99/51266 或 WO99/51188, 但缺失类似胆碱结合区的其它胆碱结合蛋白也包括在本发明的范围内。

Cbp 截短物-Lyt 截短物嵌合蛋白(或融合体)也可用于本发明的疫苗中。优选其包括 Cbp 的 NR1xR2(或 R1xR2)和 Lyt 的 C 末端区(Cterm, 即缺失了胆碱结合区)(例如, LytCCterm 或 Sp91Cterm)。更优选 Cbp 选自 CbpA, PbcA, SpsA 或 PspC。还更优选, 其是 CbpA。优选 Lyt 是 LytC(也可称作 Sp91)。

也可应用 PspA 或缺失了胆碱结合区(C)并表达为与 Lyt 的融合蛋白的 PsaA 截短物。优选, Lyt 是 LytC。

#### 用于本发明目的的肺炎球菌蛋白的优选组合

10 优选本发明蛋白的组合选自 2 种或多种(3 或 4 种)不同种类, 如具有? 型信号序列基序 LXXC 的蛋白(其中 X 是任何氨基酸, 例如, 多组氨酸三联体家族(Pht)), 胆碱结合蛋白家族(Cbp), 具有 I 型信号序列基序的蛋白(例如, Sp101), 具有 LPXTG 基序的蛋白(其中 X 是任何氨基酸, 例如, Sp128, Sp130), 毒素(例如, Ply), 等等。在这些种类(或基序)中优选的实例是以上

15 所提到的蛋白, 或其免疫功能等效物。毒素 + Pht, 毒素 + Cbp, Pht+Cbp, 和毒素 + Pht+Cbp 是优选的种类组合。

优选的有利的组合包括, 但不限于 PhtD+NR1xR2, PhtD+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合蛋白或融合蛋白, PhtD+Ply, PhtD+Sp128, PhtD+PsaA, PhtD+PspA, PhtA+NR1xR2, PhtA+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合蛋白或融合蛋白, PhtA+Ply, PhtA+Sp128, PhtA+PsaA, PhtA+PspA, NR1xR2+LytC, NR1xR2+PspA, NR1xR2+PsaA, NR1xR2+Sp128, R1xR2+LytC, R1xR2+PspA, R1xR2+PsaA, R1xR2+Sp128, R1xR2+PhtD, R1xR2+PhtA。优选, NR1xR2(或 R1xR2)来自 CbpA 或 PspC, 更优选它来自 CbpA。

25 肺炎球菌蛋白的尤其优选组合包括 Ply(或其截短物或免疫功能等效物)+PhtD(或其截短物或免疫功能等效物)+ NR1xR2(或 R1xR2)。优选 NR1xR2(或 R1xR2)来自 CbpA 或 PspC, 更优选它来自 CbpA。

不希望受任何理论的限制, 在组合物中, 本发明的肺炎球菌蛋白(或上述组合)可帮助诱导抗御肺炎球菌疾病, 尤其是抗御肺炎所需的 T 细胞介导的应答, 该应答与免疫系统的体液免疫协同作用, 抑制肺炎球菌的侵袭,

所述蛋白还可帮助刺激调理吞噬作用。将蛋白抗原包括在内的另一优点是呈递其它抗原以便进行调理吞噬。

因此，在本发明的一个实施方案中提供了肺炎链球菌疫苗，其包括肺炎球菌多糖偶联疫苗，该偶联疫苗包括来自至少 4 种血清型的多糖抗原，  
5 优选至少 7 种血清型，更优选至少 11 种血清型，还包括至少一种，优选 2, 3 或 4 种选自下组的肺炎链球菌蛋白：PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133(或如上所述的肺炎球菌蛋白组合)。优选所述蛋白中的一种蛋白是 PhtA(或其免疫功能等效物)。更优选所述蛋白中的一种蛋白是 PhtD(或其免疫功能等效物)。

10 如上所述，与接种多糖的方法有关的问题是多糖本身免疫原性弱。为克服这一问题，可将多糖与蛋白载体偶联，所述载体可对 T 细胞提供旁路辅助。所以，优选本发明所用的多糖与这样的蛋白载体偶联。目前常用来制备多糖免疫原的这类载体的实例包括白喉类毒素和破伤风类毒素(分别为 DT, DT CRM197 和 TT)，匙孔血蓝蛋白(KLH)，来自脑膜炎奈瑟氏球菌  
15 (N.meningitidis)的 OMPC，以及结核菌素的纯蛋白衍生物(PPD)。

基于肺炎球菌多糖的免疫原性组合物(或疫苗)的优选载体是来自流感嗜血菌的蛋白 D(EP594610-B)，或其片段。适合应用的片段包括包含 T 辅助细胞的表位的那些片段。具体地，蛋白 D 片段优选包含所述蛋白的 N 末端  
20 1/3。令人惊奇的是蛋白 D 载体可作为载体用在偶联了多价肺炎球菌多糖抗原的疫苗中。如果每种多糖都用同样的载体，通常可能会发生表位的抑制。令人惊奇的是，本发明者发现在组合疫苗中蛋白 D 尤其适合减小这种表位抑制作用。在组合中一种或多种肺炎球菌多糖可有利地偶联到蛋白 D 上，且优选所有抗原在这种组合疫苗中都偶联到蛋白 D 上。

25 用于肺炎球菌多糖的另一种优选载体是肺炎球菌蛋白本身(如上在“本发明的肺炎球菌蛋白”章节中定义的)。

所述多糖可通过任何已知方法与载体蛋白偶联(例如，通过 Likhite, 美国专利号 4,372,945 和 Armor et al., 美国专利号 4,474,757)。优选可进行 CDAP 偶联(WO95/08348)。

30 优选，所述偶联物的蛋白：多糖的比例(重量：重量)是 0.3:1 到 1:1，更优选 0.6:1 到 0.8:1，且最优选约 0.7:1。

本发明的疫苗优选是含有佐剂的。适当的佐剂包括铝盐如氢氧化铝胶

(明矾)或磷酸铝,但也可以是钙盐,镁盐,铁盐或锌盐,或可以是不溶性的酰化酪氨酸悬浮物,或酰化的糖,多糖的阳离子或阴离子衍生物或聚磷腈。

优选所述佐剂是 TH1 型应答的优先诱导剂,以帮助细胞介导的免疫应答。

## 5 本发明的 TH1 佐剂

高水平的 Th1 型细胞因子针对给定抗原更倾向于诱导细胞介导的免疫应答,而高水平的 Th2 型细胞因子倾向于诱导针对该抗原的体液免疫应答。

重要的是记住 Th1 型和 Th2 型免疫应答之间的不同并不是绝对的。实际上,个体的免疫应答可以以 Th1 为主,或以 Th2 为主。但通常为方便起见以 Mosmann 和 Coffman 针对鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞克隆的描述来判断细胞因子家族(Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) Th1 and TH2 cells: different patterns of lymphocine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)。通常, Th1 型应答与 T 淋巴细胞产生 INF- $\gamma$ 和 IL-2 细胞因子有关。一般情况下直接同 Th1 型免疫应答的诱导有关的其它细胞因子不是由 T 细胞产生的,如 IL-12。相反, Th2 型应答与 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 的分泌有关。促进显著的 Th1 应答的适当佐剂系统包括:单磷脂酰脂质 A 或其衍生物,特别是 3-脱氧酰化单磷脂酰脂质 A(3D-MPL)(其制备参见 GB2220211A);以及单磷脂酰脂质 A,优选 3-脱氧酰化单磷脂酰脂质 A,与铝盐(例如磷酸铝或氢氧化铝)的组合,或者与水包油乳剂组合。在所述组合中,抗原和 3D-MPL 共同包含在同一微粒结构中,使抗原信号和免疫刺激性信号的传输更为有效。研究显示,3D-MPL 能进一步提高吸附了明矾的抗原的免疫原性 [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14;EP689454-B1]。

一个提高系统涉及单磷脂酰脂质 A 与皂苷(saponin)衍生物的组合,尤其是 QS21 和 3D-MPL 的组合,其公开于 WO94/00153,或者涉及一种低反应性的组合物,其中 QS21 用胆固醇淬灭,见 WO96/33739。

一种特别强效的佐剂制品涉及在水包油乳剂中含有 QS21, 3D-MPL 和生育酚(tocopherol),描述于 WO95/17210,该种制剂是优选的制剂。

优选,疫苗还包含皂苷,更优选 QS21。所述制剂还可包含水包油乳剂和生育酚(WO95/17210)。

本发明还提供一种制备疫苗制剂的方法,该方法包含将本发明的蛋白

与可药用赋形剂，如 3D-MPL 混合。

包含非甲基化 CpG 的寡核苷酸(WO96/02555)也是 TH1 应答的优先诱导剂，适合用于本发明。

5 本发明特别优选的组合物包含一种或多种偶联的肺炎球菌多糖，一种或多种本发明的肺炎球菌蛋白和 Th1 佐剂。不希望受任何理论的限制，肺炎球菌蛋白对细胞介导的应答的诱导(如上所述)和免疫系统两种免疫之间的协作可采用上述 Th1 佐剂进行辅助，从而产生抗御一般性肺炎球菌疾病，更重要的是抗御老年患者肺炎球菌性肺炎的特别有效的疫苗。

10 本发明另一方面提供了如本文所述的用于医学的免疫原或疫苗。

在一个实施方案中，本发明提供了一种预防或缓解老年人(+55 岁)肺炎的方法，该方法包含对所述老年患者给药安全和有效的量的疫苗(如本文所述)，所述疫苗包含肺炎链球菌多糖抗原和选自下组的肺炎球菌蛋白，还任选包含 Th1 佐剂：PhtA，PhtD，PhtB，PhtE，SpsA，LytB，LytC，LytA，

15 Sp125，Sp101，Sp128，Sp130 和 Sp133。

在另一实施方案中，本发明提供了一种预防或缓解婴儿(最大至 18 月)或幼儿(通常是 18 个月到 5 岁)的中耳炎的方法，其包含对所述婴儿或幼儿给药安全和有效的量的疫苗，所述疫苗包含肺炎链球菌多糖抗原和选自下组的肺炎链球菌蛋白，还任选包含 Th1 佐剂：PhtA，PhtD，PhtB，PhtE，

20 SpsA，LytB，LytC，LytA，Sp125，Sp101，Sp128，Sp130 和 Sp133。

优选在本发明上述方法中，所述多糖抗原以多糖蛋白偶联物的形式存在。

#### 本发明疫苗的制备

25 本发明的疫苗制品可通过全身或粘膜途径给药来保护或治疗易受感染的哺乳动物。这些给药方式包括肌肉内注射，腹膜内注射，皮内或皮下途径；或通过粘膜给药到口腔/消化道，呼吸道，生殖道。用于治疗肺炎或中耳炎的疫苗的鼻内给药是优选的(因为可以更有效预防鼻咽部携带肺炎球菌，因此在最早期便可减轻感染)。尽管本发明的疫苗可以单剂给药，但其成分也可同时联合给药，或在不同时间联合给药(例如，为了使免疫应答之  
30 间能更好地协调，肺炎球菌多糖抗原可以在疫苗的细菌蛋白成分给药的同时或 1-2 周后分别给药)。在联合给药时，任何一次或每一次给药时都可以

有备选的 Th1 佐剂，但优选其与疫苗的细菌蛋白成分进行组合。除了单一给药途径以外，还可以应用 2 条不同的给药途径。例如，任何病毒抗原都可以通过皮内给药(ID)，而细菌蛋白可通过肌肉内给药(IM)或鼻内给药(IN)。多糖可以肌肉内给药(或皮内给药)，细菌蛋白可以鼻内给药(或皮内给药)。

- 5 另外，本发明的疫苗可以肌肉内给药进行初次免疫，鼻内给药进行加强免疫。

每剂典型疫苗中偶联的抗原的量应能诱导出免疫保护性应答，而没有明显的副作用。该量将根据所使用的特异性免疫原和给药途径的不同而变化。通常，每剂应包含多糖 0.1-100 $\mu$ g，优选 0.1-50 $\mu$ g，优选 0.1-10 $\mu$ g，最  
10 优选 1-5 $\mu$ g。

疫苗中蛋白抗原的含量通常在 1-100 $\mu$ g 的范围内，优选 5-50 $\mu$ g，通常最优选 5-25 $\mu$ g。

对具体的疫苗来说，各成分的最佳的量可通过标准研究确定，所述研究涉及观察受试者的相应免疫应答。第一次接种后，以充足的时间间隔对  
15 受试者进行一次或多次的加强免疫。

疫苗制品通常描述于 Vaccine Design(“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M.F. and Newman M.J.)(1995) Pleun Press New York)。Fullerton 描述了用脂质体进行胶囊化(美国专利号 4235877)。

尽管本发明的疫苗可通过任何途径给药，但所描述的疫苗进行皮内(ID)  
20 给药构成了本发明的一个实施方案。人皮肤包含外部“角质”表皮层，称为角质层，它覆盖了表皮。此表皮下是真皮层，真皮层覆盖了皮下组织。研究者发现皮内注射疫苗，特别是真皮内注射疫苗可刺激免疫应答，还伴随其他多种优点。此处所述的皮内接种疫苗构成了本发明的一个优选特征。

皮内注射的常规技术“芒图试验(mantoux procedure)”包括以下步骤：清  
25 洁皮肤，展开一只手，然后使小号针头(26-31 号)的斜面朝上，以 10 - 15 度的角度将针插入。一旦针的斜面插入后，针筒下降，进一步推进的同时略施压力使其在皮下抬起。然后将液体非常缓慢地注入，在皮肤表面形成包或隆起，然后缓慢将针退出。

近来，皮内或穿皮给与液体制剂的特定装置已被公开，例如：该装置  
30 公开于 WO 99/34850 和 EP 1092444，喷射注射装置公开于 WO 01/13977，US 5,480,381，US 5,599,302，US 5,334,144，US 5,993,412，US 5,649,912，US

5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 和 WO 97/13537。该疫苗制剂的真皮内给药替代方法包括常规注射器和针，或固体疫苗 5 的弹道式给药装置(WO 99/27961)，或经皮贴剂(WO 97/48440; WO 98/28037); 或皮肤表面给药(经皮给药 WO 98/20734; WO 98/28037)。

当本发明的疫苗是给至皮肤时，更具体地说是真皮时，给与小量液体疫苗，具体约为 0.05ml-0.2ml。

10 本发明皮肤或皮内疫苗中抗原含量可以类似于肌肉内疫苗常规的剂量(如上所述)。但所述皮肤或皮内疫苗为“小剂量”制剂。因此在此“小剂量”疫苗中每剂含有的蛋白抗原量优选为 0.1-10 $\mu$ g，优选每剂含有蛋白抗原 0.1-5 $\mu$ g；且每剂含有的多糖(优选偶联型)抗原的量为 0.01-1 $\mu$ g，优选 0.01-0.5 $\mu$ g。

15 此处所用的术语“皮内给药”是指将疫苗给至皮肤的真皮区域，但疫苗不一定仅存在于真皮内。真皮层是距离人体皮肤表面约 1.0mm-约 2.0 mm 的皮肤层，但个体之间和同一个体的不同部位之间存在差异。一般地，预计距离皮肤表面 1.5mm 的深度达到真皮层。真皮上面为角质层和表皮，下面为皮下层。根据给药模式的不同，可以使该疫苗最终仅存在于或主要存在于真皮内，或最终分布于表皮和真皮。

20

本发明也涉及组合型疫苗，所述疫苗可提供抗御不同病原体的保护作用。目前，许多儿科疫苗以组合疫苗的形式提供以降低儿童注射的次数。因此，来源于其他病原体的其他抗原也可以与本发明的疫苗配制成儿科疫苗。例如，本发明的疫苗可与以下物质一起配制(或同一时间分别给药)：公 25 知的“三价”组合疫苗，包含白喉类毒素(DT)，破伤风类毒素(TT)，和百日咳成分[通常是脱毒的百日咳类毒素(PT)，丝状血凝素(FHA)和备选的 pertactin(PRN)和/或凝集素 1+2]，例如，包含 DT, TT, PT, PHA 和 PRN 抗原的市售疫苗 INFANRIX - DTPa<sup>TM</sup>(SmithKlineBeecham Biologicals)，或百日咳完整细胞成分，如 SmithklineBeecham Biologicals 出售的 Tritanrix<sup>TM</sup>。 30 所述组合疫苗也可以包含其它抗原，如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)，脊髓灰质炎病毒抗原(例如灭活的三价脊髓灰质炎病毒 - IPV)，粘膜炎莫拉氏



菌(*Moraxella catarrhalis*)外膜蛋白,不能确定型别的(non-typeable)流感嗜血菌的蛋白,脑膜炎奈瑟氏球菌 B 的外膜蛋白。

可以包含在组合疫苗中的优选粘膜炎莫拉氏菌蛋白抗原的实例(尤其对于预防中耳炎)是: OMP106[WO97/417319(Antex)和 WO96/34960(PMC)];

5 OMP21; LbpA 和 / 或 LbpB[WO98/55606(pmc)]; TbpA 和 / 或 TbpB[WO97/13785 和 WO97/32980(PMC)]; CopB[Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 和/或 UspA2[WO93/03761(得克萨斯大学)]; OmpCD; HasR(PCT/EP99/03824); PilQ(PCT/EP99/03823); OMP85(PCT/EP00/01468); lipo06(GB9917977.2); lipo10(GB9918208.1);

10 lipo11(GB9918302.2); lipo18(GB9918038.2); P6(PCT/EP99/03038); D15(PCT/EP99/03822); OmpA1(PCT/EP99/06781); Hly3(PCT/EP99/03257); 和 OmpE。可以包含在组合疫苗中的不能确定型别的流感嗜血菌的抗原实例(尤其用来预防中耳炎)包括: 丝束蛋白[(US5766608 Ohio State Research Foundation)]和包含来该蛋白的肽的融合体[例如 LB1(f)肽融合体;

15 US5843464(OSU) 或 WO99/64067]; OMP26[WO97/01638(Cortecs)]; P6[EP281673(State University of New York)]; TbpA 和/或 TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15(WO94/12641); 蛋白 D(EP594610); P2; 和 P5(WO94/26304)。

其它组合是肺炎球菌 PS 和本发明蛋白与病毒抗原的组合,所述病毒抗原例如来自流感病毒(减毒型,解体型(split)或其亚单位)[例如,表面糖蛋白神经氨酸酶(NA)和血凝素(HA)。参见,例如 Chaloupka I. et al., Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV(例如 F 和 G 抗原或 F/G 融合体,参见例如, Schmidt A.C. et al, J. Virol, May 2001, p4594-4603), PIV3(例如, HN 和 F 蛋白,参见 Schmidt et al. 同上), 水痘病毒(Varicella)(例如减毒型,糖蛋白 I-V, 等), 和 MMR(麻疹病毒,腮腺炎病毒,风疹病毒)的任何(或全部)成分。

25

本发明用于全球治疗或预防中耳炎的优选的儿科组合疫苗包括: 一种或多种肺炎链球菌多糖抗原(优选与蛋白 D 偶联的), 一种或多种选自下组的肺炎球菌蛋白: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125,

30 Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133(或其免疫功能等效物), 和一种或多种表面暴露的抗原, 其来源于粘膜炎莫拉氏菌和/或不能确定型别的流感嗜血菌。

蛋白 D 优选用作肺炎球菌多糖的蛋白载体，以克服表位抑制问题(如上所述)，并且该蛋白本身也是免疫原，能产生 B 细胞介导的抗御不定型流感嗜血菌(ntHi)的保护作用。粘膜炎莫拉氏菌或不定型流感嗜血菌抗原可以亚单位的形式包含在疫苗中，或可以是在用细菌制作的囊泡外膜表面展示的抗原。

5 优选上述抗原组合物(和疫苗)是冻干的，直到使用时才临时用稀释剂重建。更优选它们在 3D-MPL 的存在下冻干，并在临用前用盐水溶液重建。或者，所述蛋白和多糖分别保存在疫苗接种的试剂盒中(任一成分或两者都被冻干)，临用前将所述成分重建，并混合或分别给予患者。Th 1 佐剂  
10 (优选 3D-MPL)可与上述任何一种成分一起存在，或可与上述两种成分一起存在。

疫苗的冻干是本领域公知的。通常在抗结块剂如蔗糖或乳糖等糖类物质(最初的浓度为 10 mg/ml 到 200mg/ml)的存在下冻干液体疫苗。冻干通常需要一系列步骤，例如需进行这样一个循环：开始时的温度为 69°C，3 小  
15 小时内逐渐调至-24°C，维持 6 小时，然后 1 个小时内逐渐将温度调节到 -16°C，然后维持该温度 6 个小时，在 3 小时内将温度渐渐上调到 +34°C，最后保持该温度 9 小时。

冻干使组合物更加稳定(例如它可阻止多糖抗原的降解)。令人惊奇的是，这个过程还可以提高抗肺炎球菌多糖的抗体滴度。这对 PS 6B 偶联物  
20 尤其明显。因此本发明的另一方面提供冻干的抗原组合物，其包含以 3D-MPL(优选不使用以铝为基础的佐剂)为佐剂并与其偶联的 PS 6B 偶联物，还包含选自下组的肺炎球菌蛋白：PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 和 Sp133。

## 25 实施例

以下实施例用来对本发明进行说明，而非用以限制本发明。

### 实施例 1

#### 肺炎链球菌荚膜多糖

30 11 价的候选疫苗包括荚膜多糖血清型 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 和 23F, 它们的制备基本上如 EP72513 中所述。每种多糖都用 CDAP

化学法活化和衍生(WO95/08348), 并偶联到蛋白载体上。所有的多糖都以它们的天然形式进行偶联, 只有血清型 3 例外(为降低粘度, 需降低其大小)。

#### 蛋白载体:

所选的蛋白载体是重组蛋白 D(PD), 其来自不定型流感嗜血菌, 在大肠杆菌中表达。

#### 蛋白 D 的表达

##### 流感嗜血菌蛋白 D

##### 用于蛋白 D 表达的基因构建

##### 起始物质

#### 10 编码蛋白 D 的 DNA

蛋白 D 在流感嗜血菌的所有血清型和不定型菌株中是高度保守的。包含编码整个蛋白 D 基因的 DNA 序列的载体 pHIC348 从 Dr.A.Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Sweden 获得。蛋白 D 的 DNA 序列已由 Janson 等(1991) Infect. Immun. 59:119-125 公布。

#### 表达载体 pMG1

表达载体 pMG1 由 pBR322 衍生而来(Gross et al., 1985), 其中插入了噬菌体  $\lambda$  来源的转录和翻译外来插入基因的调控序列(Shatzman et al., 1983)。另外, 氨苄青霉素抗性基因被更换为卡那霉素抗性基因。

#### 20 大肠杆菌菌株 AR58

大肠杆菌菌株 AR58 通过用 P1 噬菌体原种转导 N99 而制备, 所述噬菌体原种以前培养在 SA500 衍生物(*galE::TN10*,  $\lambda$ Kil<sup>-</sup> cI857  $\Delta$  H1)。N99 和 SA500 是大肠杆菌 K12 菌株, 来源于国立健康研究所(the National Institute of Health)的 Dr.Martin Rosenberg 实验室。

#### 25 表达载体 pMG1

为制备蛋白 D, 将编码该蛋白的 DNA 克隆到表达载体 pMG1 中。该质粒利用来自  $\lambda$  噬菌体 DNA 的信号驱动插入的外源基因的转录和翻译。所述载体包含启动子 PL, 操纵子 OL 和两个利用位点(NutI 和 NutR)以解除有 N 蛋白时的转录极性效应(Gross et al., 1985)。将包含 PL 启动子的载体导入到大肠杆菌溶源性宿主中, 以稳定质粒 DNA。溶源性宿主菌株包含已整合到基因组中的复制缺陷型  $\lambda$  噬菌体 DNA(Shatzman et al., 1983)。染色体上的  $\lambda$  噬



将最后的构建体 pMG-MDPPrD 通过 37°C 热休克导入到 AR58 宿主菌株中。包含质粒的细菌在有卡那霉素的条件下筛选。用选定的内切核酸酶对分离出的质粒 DNA 进行消化来证明编码蛋白 D 的 DNA 插入子的存在。该重组大肠杆菌菌株称作 ECD4。

- 5 蛋白 D 的表达受  $\lambda P_L$  启动子/ $O_L$  操纵子的控制。宿主菌株 AR58 在基因组中包含温度敏感性 cI 基因，它可通过结合  $O_L$  来阻止在低温下从  $\lambda P_L$  启动表达。一旦温度升高，cI 从  $O_L$  释放，蛋白 D 表达。发酵后将细胞浓缩并冻存。

- 10 从收获的细胞中提取和纯化蛋白 D，操作如下进行：融化冰冻的培养细胞，将其重悬在细胞破碎液中(柠檬酸盐缓冲液 pH6.0)，至  $OD_{650} = 60$ 。在  $p = 1000$  巴的条件下，使该悬液两次通过高压匀浆器。离心澄清上述细胞培养物的匀浆物，过滤除去细胞碎片。在第一个纯化步骤中，将过滤后的裂解物上样至阳离子交换层析柱(SP Sepharose Fast Flow)。PD 通过离子间相互作用结合到凝胶基质上，通过逐步增加洗脱缓冲液的离子强度将其洗脱下来。

15 在第二步纯化中，杂质仍保留在阴离子交换基质(Q Sepharose Fast Flow)上。PD 不结合凝胶，因而能在流出液中将其收集。

在上述两个柱层析步骤中，可用 OD 值监测所收集的级分。包含纯化的蛋白 D 的阴离子交换柱层析流出液，通过超滤浓缩。

- 20 最后使包含超滤滞留物的蛋白 D 过  $0.2\mu\text{m}$  的膜。

#### 化学反应：

##### 活化和偶联的化学反应：

活化和偶联的条件对每一多糖是特异性的。这些条件在表 1 中列出。

- 25 将天然多糖(除了 PS3)溶解在 NaCl 2M 或用于注射的水中。评估所有血清型的最佳多糖浓度。

- 30 将 100mg/ml CDAP 的乙腈储存液(CDAP/PS 的比例是 0.75mg/mg PS)加入多糖溶液中。1.5 分钟后，加入 0.2M 三乙基胺，以获得特定的活化 pH 值。在 25°C 2 分钟内，在该 pH 条件下活化多糖。向被活化的多糖中加入蛋白 D(它的量根据最初的 PS/PD 的比值决定)，在该 pH 偶联 1 小时。然后用甘氨酸在 25°C 30 分钟且 4°C 过夜淬灭该反应。

用 0.2M NaCl 平衡过的 Sephacryl 500HR 凝胶过滤柱通过凝胶过滤纯化上述所得偶联物。

确定洗脱级分中的糖和蛋白含量。收集偶联物并用 0.22 $\mu$ m 的无菌膜过滤除菌。确定偶联物制品中的 PS/蛋白比例。

5

鉴定:

对每一偶联物进行鉴定,它们都符合表 2 所列的所有条件。用 Resorcinol 检测法检测多糖的含量( $\mu$ g/ml),用 Lowry 检测法检测蛋白的含量( $\mu$ g/ml)。用浓度比值确定最终的 PS/PD 的比值(w/w)。

10 

*DMAP* 的残余量( $ng/\mu$ gPS):

用 CDSP 活化多糖会在多糖中引入氰酸根基团,释放出 DMAP(4-二甲氨基吡啶)。用 SB 开发的特异性检测法检测 DMAP 的残余量。

游离多糖的含量(%):

15 

将一直在 4 $^{\circ}$ C 保存或在 37 $^{\circ}$ C 储存了 7 天的偶联物与  $\alpha$ -PD 抗体和饱和硫酸铵温育后进行离心,得到上清液,确定该上清液中的游离多糖的含量。

用  $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS ELISA 对上清液中的游离多糖定量。偶联物的缺乏也通过  $\alpha$ -PD/ $\alpha$ -PS ELISA 控制。降低游离多糖的量可改进偶联疫苗。

抗原性:

20 

用夹心 ELISA 分析同一偶联物的抗原性,其中抗体的捕获和检测分别用  $\alpha$ -PS 和  $\alpha$ -PD 进行。

游离蛋白含量(%):

25 

“游离的”蛋白 D 的残余水平在用 SDS 处理样品后检测。在 0.1% 的 SDS 存在的情况下,在 100 $^{\circ}$ C 将偶联物加热 10 分钟,再注射到 SEC-HPLC 凝胶过滤柱(TSK3000-PWXL)上。因为蛋白 D 是二聚体,所以用 SDS 解离该蛋白的结构有可能会过高估计“游离的”蛋白 D 的水平。

分子大小( $K_{av}$ ):

在 SEC-HPLC 凝胶过滤柱(TSK5000-PWXL)上确定分子的大小。

稳定性:

30 

在 HPLC-SEC 凝胶过滤柱(TSK6000-PWXL)上检测一直 4 $^{\circ}$ C 保存或在 37 $^{\circ}$ C 储存了 7 天的偶联物的稳定性。

对 11 价的鉴定列于表 2 中。

蛋白偶联物可被吸附到磷酸铝上，并被收集，形成最终的疫苗。

结论:

制备出免疫原性偶联物，该偶联物显示可作为具有发展前景的疫苗的成分。针对 11 价的每一价都找到了最优质量的最终偶联型肺炎球菌多糖产物的最佳 CDAP 条件。

表 1

PS 肺炎链球菌-蛋白 D 偶联物的特定活化/偶联/淬灭条件

血清型	1	3( $\mu$ fluid.)	4	5	6B	7F
PS 浓度(mg/ml)	2.0	3.0	2.0	7.5	5.4	3.0
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
PS/PD 起始比(w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mgPS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

血清型	9V	14	18C	19F	23F
PS 浓度(mg/ml)	2.5	2.5	2.0	4.0	3.3
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H <sub>2</sub> O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
PS/PD 起始比(w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1	1/0.5	1/1
CDAP 浓度 (mg/mgPS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	10/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

表 2: 11 价肺炎球菌 PS-PD 疫苗的详细说明  
(第一排批号代码表示血清型)

指标	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209
PS/蛋白比例(w/w)	1/0.66	1/1.09	1/0.86	1/0.86	1/0.69
游离多糖的含量(%)<10%	1	1	7	9	0
游离蛋白的含量(%)<15%	8	<1	19	21	9
DMAP 含量(ng/μgPS)	0.2	0.6	0.4	1.2	0.3
<0.5ng/μgPS 分子量(K <sub>av</sub> )	0.18	0.13	0.12	0.11	0.13
稳定性	无漂移	无漂移	无漂移	低漂移	无漂移

	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
PS/ 蛋白 比例 (w/w)	1/0.58	1/0.80	1/0.68	1/0.62	1/0.45	1/0.74
游离多糖的含量 (%)<10%	1	<1	<1	4	4	0
游离蛋白的含量 (%)<15%	8	0.3	3	21	10	12
DMAP 含 量 (ng/μgPS)	0.1	0.6	0.3	0.2	0.1	0.9
<0.5ng/μg PS 分子量(K <sub>av</sub> )	0.14	0.14	0.17	0.10	0.12	0.12
稳定性	无漂移	无漂移	无漂移	无漂移	漂移	无漂移

## 5 实施例 2

添加一种或多种本发明的肺炎球菌蛋白+/- 3D-MPL 对 PD 偶联型 11 价多糖疫苗抗御小鼠中肺炎球菌肺定居的保护效力的有利影响

免疫指标

肺炎球菌蛋白特异性血清 IgG 的 ELISA 定量

- 10 将 2μg/ml 蛋白的 PBS 液以 100μl/孔 37℃ 包被 Maxisorp Nunc 免疫反应板 2 小时。用 NaCl 0.9% Tween-20 0.05% 缓冲液洗板 3 次。然后将抗蛋白血清参照物(用于制作标准曲线)(从 670ng/ml IgG 开始)和血清样品(从 1/10 稀



释液开始)的连续 2 倍稀释液(在 PBS/Tween20 0.05%中, 每孔 100 $\mu$ l)在搅拌下 20 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。如前述洗板, 之后加入 PBS/Tween20 0.05%中 5000x 稀释的过氧化物酶偶联型山羊抗小鼠 IgG(Jackson)(100 $\mu$ l/孔)搅拌下 20 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。洗板后, 加入 100 $\mu$ l/孔的显影缓冲液(revelation buffer)(100mM pH4.5 的柠檬酸盐缓冲液中含 OPDA 0.4mg/ml 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05%), 室温温育这些免疫反应板 15 分钟。加入 50 $\mu$ l/孔 HCl 1N 终止显影。用 Emax immunoreader (Molecular Devices)在 490nm 和 620nm 读取光密度。用 SoftMaxPro 软件通过 4 参数数学计算法计算抗体滴度。

#### 调理吞噬试验

10 该试验的目的是可重现性地检测待检血清样品针对肺炎链球菌血清型 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 或 23F 的调理能力, 所用检测方法是基于已公开的 CDC 标准方法(Steiner et al, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4:415.1997)而修改的。

15 该试验在体外再现体内所发生的清除入侵的肺炎链球菌或肺炎球菌的主要机制。那就是对肺炎球菌进行调理, 然后进行吞噬和杀伤。“吞噬”是细胞吞入物质, 并将其包裹在细胞质中的囊泡(吞噬体)中的过程。当肺炎球菌被健康的哺乳动物吞噬细胞吞噬后便被杀死。“调理”是通过调理素如抗体和补体在抗原上沉积而促进吞噬的过程。

20 文献已报道过许多调理吞噬试验。CDC 标准检测法已在多种实验室条件下进行了检验(Steiner et al, ICAAC, Sept 16-20, 2000, Toronto)。这后一种试验在 SB 得到修改, 因为它提供了可与其它实验室进行比较的基础, 它使用通常可获得的试剂和对照, 并且其结果表示为能促进杀死 50%活肺炎球菌的血清滴度(稀释度), 这种单位是这类检测常用的。事实上, 修改后的试验得到的结果能与其它 4 个实验室极好地吻合(Steiner et al, ICAAC, Sept 16-20, 25 2000, Toronto)。

在上述试验中所用的吞噬细胞是 HL60 细胞系, 其来源于有早幼粒细胞白血病的个体, 由 Collins 等于 1977 年建立为连续传代的细胞系(Nature 270:347-9)。该细胞系由未分化的造血细胞组成, 即 85%的干细胞和早幼粒细胞, 6%的中幼粒细胞和 9%的已分化的细胞。极性化合物能诱导这些细胞分化成至少二种不同谱系。N,N 二甲基甲酰胺诱导粒细胞分化, 产生多形核-样细胞(polymorphonuclear-like cells)(44%的中幼粒细胞和晚幼粒细胞和 30

53%的带状和节片状的PMN)。

在本试验的 A2 版本中，待检血清经过热灭活，并在 96 孔微量滴定板中，用包含 0.3%BSA 的 HBSS 培养基从 1/4 开始进行 8 次的连续 2 倍稀释。稀释后的血清的最终体积为每孔 25 $\mu$ l。

- 5 4 个体积的 HL60 细胞( $10^7$  细胞/ml)(用二甲基甲酰胺分化后 5 或 6 天)，2 个体积的肺炎链球菌(适当稀释的)和 1 个体积的幼兔补体在临用前混合，将 25 $\mu$ l 的该混合液加入到包含稀释血清的 96 孔微量滴定板的每个孔中。对血清型 1 和 6B，补体的量增加到 12.5%的最终浓度，进行 A3 版本的试验。

- 10 在环形摇动下 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时后，将反应板放到冰上，以终止调理吞噬反应。

在 37 $^{\circ}$ C 过夜温育，评估每孔中的集落形成单位(CFU)。“调理滴度”(OT)确定为能使孔中肺炎链球菌数量减少至少 50% (即 50% 杀伤)的血清稀释度的倒数。% 杀伤通过下面的等式计算：

$$\text{杀伤 \%} = (\text{CFU 对照孔均值} - \text{CFU 样品}) / \text{CFU 对照孔的均值} \times 100$$

15

*在 OF1 小鼠中肺炎球菌的鼻内攻击*

- 20 用  $5 \cdot 10^5$  CFU 的适合小鼠的肺炎链球菌血清型 2, 4 或 6B 在麻醉下鼻内接种 7 周龄的 OF1 雌性小鼠。在攻击后 6 小时摘出小鼠的肺脏，在 Todd Hewith Broth (THB, Gico) 培养基中匀浆(Ultramax, 24000rpm, 4 $^{\circ}$ C)。用连续 10 倍稀释的肺匀浆物铺板在含补充了酵母提取物的 THB 琼脂的 Petri 盘上，37 $^{\circ}$ C 过夜。肺炎球菌的肺感染表示为 CFU 数/小鼠，它是对数权重的均值(logarithmic weighted-average)。检测极限是 2.14 logCFU/小鼠。

**实施例 2A 3D - MPL 佐剂针对抗蛋白免疫应答的作用**

- 25 在本实施例中，我们评估了 3D - MPL 佐剂对于针对本发明蛋白的免疫应答的影响。

- 30 用 1 $\mu$ g 包含在 A: AlPO<sub>4</sub> 100 $\mu$ g; 或 B: AlPO<sub>4</sub> 100 $\mu$ g+5 $\mu$ g 3D - MPL (3 脱氧酰化单磷脂酰脂质 A, 由 Ribi Immunochem 提供)中的蛋白在第 0 天，14 天和 21 天肌肉内免疫 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠，每组 10 只。在 post-III 血清中用 ELISA 检测 IgG。

无论是哪一种抗原，用补充有 3D - MPL 的制剂免疫动物都显示出可诱

导最好的免疫应答。

5 **实施例 2B** 添加本发明蛋白+/- 3D -MPL 佐剂对 PD 偶联型 11 价多糖疫苗抗御血清型 2、4 或 6B 鼻内攻击过的 OF1 小鼠中肺炎球菌的肺定居的有利影响。

在本实施例中，同传统的 AlPO4 吸附型 11 价多糖 - 蛋白 D 偶联物制品相比较，我们能评估包含 11 价多糖 - 蛋白 D 偶联物，本发明蛋白和 AlPO4 + 3D - MPL 佐剂的疫苗的预防效力。

10 用包含 A: 50 $\mu$ g AlPO4; B: 0.1 $\mu$ g PS/血清型的 PD 偶联型 11 价多糖疫苗 + 50 $\mu$ g AlPO4 ; 或 C: 0.1 $\mu$ g PS/血清型的 PD 偶联型 11 价多糖疫苗 + 10 $\mu$ g 本发明蛋白 + 50 $\mu$ g AlPO4 + 5 $\mu$ g 3D - MPL(由 Ribic Immunochem 提供)的制剂，在第 0 天和 14 天对 4 周龄的雌性 OF1 小鼠皮下免疫，每组 12 只小鼠，在第 21 天如上所述进行攻击。

15 用该方法可发现，用补充有本发明蛋白和 AlPO4 + MPL 佐剂的 11 价多糖偶联物疫苗可得到明显的保护作用。相反，用 11 价多糖偶联物/AlPO4 制剂免疫动物没有观察到明显的保护作用。该结果证明添加本发明蛋白和 3D - MPL 佐剂可提高 11 价多糖偶联物疫苗抗御肺炎的效果。

**实施例 2C**，免疫与实施例 2B 中显示的保护作用相关

20 为确立免疫与实施例 2B 中用补充有本发明蛋白和 3D - MPL 的 11 价多糖偶联物疫苗产生的保护作用相关，如上所述检测对多糖 2，4 或 6B 和本发明蛋白的攻击前血清抗体应答。

然后比较抗体滴度与攻击后 6 小时收集的相应动物的肺脏中检测到的细菌集落数。根据 log/log 线性回归计算 R<sup>2</sup>。

25 计算出的 R<sup>2</sup> 显示体液免疫应答与针对两种抗原的保护作用之间不存在相关关系。抗 6B(或 2 或 4)抗体滴度在用 11 价偶联物免疫或用补充有本发明蛋白和 3D - MPL 的相同疫苗免疫的组之间没有明显差异。所以说，用制剂 C 所观察到的保护作用的改善不仅仅归因于对多糖 6B(或 2 或 4)的较高抗体应答。

30 综上所述，上述结果提示所述保护作用不仅仅是由体液免疫应答介导，还有由蛋白抗原所诱导的细胞介导的免疫(优选在 3D - MPL 的存在下)。该

结果为以下做法提供了额外的支持：为协调免疫系统的两种免疫以获得最佳保护，可向肺炎球菌多糖偶联物疫苗中加入蛋白抗原和强效佐剂。

5 **实施例 3 - 用本发明蛋白主动免疫并用抗肺炎球菌 PS 的抗体被动免疫的小鼠体内免疫系统的两种免疫之间的协调作用**

**实施例 3A - 找出被动给予抗-6B-多糖(抗-PS)抗体能抗御肺炎的浓度**

方法

10 疫苗组：4 组小鼠，每组 16 只，在第-1 天用 100 $\mu$ l 未经稀释的大鼠抗多糖抗血清如下进行被动免疫(i.p.)(共 64 只小鼠)：

组别	特异性	抗血清中的 IgG 浓度
G1	$\alpha$ -PS-6B	5 $\mu$ g/ml
G2	$\alpha$ -PS-6B	2 $\mu$ g/ml
G3	$\alpha$ -PS-6B	0.75 $\mu$ g/ml
G4	对照	0 $\mu$ g/ml

15 动物：64 只雄性 CD-1 小鼠，来自 Charles River, Canada, 重约 35g(约 10 周龄)。

麻醉：用异氟醚(isoflurane)(3%)加 O<sub>2</sub>(1L/分钟)麻醉小鼠。

20 生物：肺炎链球菌 N1387(血清型 6)收获自补充有 5% 马血的胰酪豆胨琼脂(TSA)培养物，并悬浮在 6ml PBS 中。即将进行感染时，将 1ml 细菌悬液稀释在 9ml 冷却融化的营养培养基(BBL)中，并维持在 41 $^{\circ}$ C。给予小鼠 50 $\mu$ l 容积中的约 6.0 log<sub>10</sub> cfu/小鼠。

感染：在如上所述麻醉小鼠的当天，用非手术的气管内插管经气管内灌输肺炎链球菌 N1387(50 $\mu$ l 冷却的细菌悬液)。该方法由 Woodnut 和 Berry 描述(Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29(1999))。

25 样品：感染后的第三天，用过量的 CO<sub>2</sub> 处死 8 只小鼠/组，切下肺脏并在 1ml PBS 中进行匀浆。然后用 PBS 进行连续的 10 倍稀释以产生多个不同的活细菌数。在进行评估前，将样品一式三份注入(20 $\mu$ l)到补充有 5% 马血

的 TSA 培养板上, 37°C 温育过夜。其它组小鼠在第 7 天处死, 如上所述制作样品。

**结果:**

大鼠血清中的 IgG 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	感染后不同天数时的细菌数 ( $\log_{10}$ cfu/肺)	
	3	8
5	6.7 $\pm$ 0.7(1/7)	7.2 $\pm$ 0.7(5/8)
2	6.5 $\pm$ 0.7(1/7)	6.9 $\pm$ 1.8(4/7)
0.75	7.7 $\pm$ 0.5(5/8)	4.8 $\pm$ 1.4(2/8)
0	6.7 $\pm$ 1.5(3/6)	6.3 $\pm$ 1.5(3/9)

圆括号中的数字表示在制作样品之前已死的动物数。

- 5 **结论:** 总的来说, 分离自任何治疗组的细菌数没有明显的区别。这提示抗多糖抗体在浓度高达 5 $\mu\text{g/ml}$ (包括 5 $\mu\text{g/ml}$ )时没有可检测到的保护作用。

该结果与某些人类临床试验中观察的结果类似, 即抗多糖抗体不足以预防某些人群中的肺炎球菌性肺炎。

- 10 **实施例 3B** - 确定用或没用佐剂的情况下主动给药本发明的蛋白针对肺炎所引起的预防作用, 和与亚最适量抗 PS 抗体的协同作用。

**方法:** 动物: 128 只雄性 CD-1 小鼠(在 6 周龄时免疫, 感染时 10 周龄), 来自 Charles River, St. Constant, Quebec, Canada。6 周龄时动物重约 20 克, 10 周龄时 38 克。

- 15 **免疫:** 6 组, 每组 16 只小鼠用 100 $\mu\text{l}$  疫苗在第 -22 天和 -14 天如下进行皮下注射免疫(共 128 只小鼠)。3D-MPL 得自 Ribic/Corixa。

在第 -1 天, 用 4.26 $\mu\text{g/ml}$ (4ml 的 5 $\mu\text{g/ml}$  + 1.3ml 的 2 $\mu\text{g/ml}$ )的小鼠抗多糖抗体对特定组(见下表)进行被动免疫(i.p.100 $\mu\text{l}$ )。

组别	主动注射的 体积	-22 天, -14 天给予的疫苗 (剂量 $\mu\text{g}$ )	被动注射的 体积	被动注射的 IgG (第-1 天)
1-1	100 $\mu\text{l}$ s.c.	蛋白/AIPO4(10/50)		无
1-2	100 $\mu\text{l}$ s.c.	蛋白/MPL/AIPO4(10/5/50)		无
1-3	100 $\mu\text{l}$ s.c.	蛋白/AIPO4(10/50)	100 $\mu\text{l}$ i.p.	$\alpha$ -PS
1-4	100 $\mu\text{l}$ s.c.	蛋白/MPL/AIPO4(10/5/50)	100 $\mu\text{l}$ i.p.	$\alpha$ -PS
1-5	100 $\mu\text{l}$ s.c.	MPL/AIPO4(5/50)	100 $\mu\text{l}$ i.p.	$\alpha$ -PS
1-6	100 $\mu\text{l}$ s.c.	MPL/AIPO4(5/50)		无

5 感染：当天对小鼠进行麻醉(3%的异氟醚加 1L/分钟  $\text{O}_2$ )。肺炎链球菌 N1387(血清型 6)收获自补充有 5% 马血的胰酪胨琼脂(TSA)培养物，并悬浮在 6ml PBS 中，得到细菌接种物。即将进行感染时，在冷却融化的营养琼脂中(维持在  $41^\circ\text{C}$ )制备 10 倍稀释液(1ml 加 9ml)。用气管内插管经气管内灌输法感染小鼠，并给予小鼠 50 $\mu\text{l}$  容积中的约  $6.0 \log_{10} \text{cfu/小鼠}$ 。该方法由 Woodnut 和 Berry 描述(Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29(1999))。

10 样品：感染后 72 小时，用过量的  $\text{CO}_2$  处死 8 只小鼠/组，切下肺脏并在 1ml PBS 中进行匀浆。然后用 PBS 进行连续 10 倍稀释以产生多个不同的活细菌数。在进行评估前，将样品一式三份接种(20 $\mu\text{l}$ )到补充有 5% 马血的 TSA 培养板上， $37^\circ\text{C}$  温育过夜。其它组小鼠在感染后第 8 天处死，如上所述制作样品。

#### 数据的分析

15 以感染后 3 天和 7 天肺脏中的细菌数量来比较治疗的结果。所述结果表示为组平均值和标准差。用 Student t 检验进行统计学分析，其中 P 值小于 0.05 认为是显著性。

20 如上所述，仅仅使用抗多糖抗体(1-5 组)不能针对肺炎球菌在肺脏中的生长提供保护作用。肺炎球菌蛋白加佐剂 AIPO4(1-1 组)也不能引起保护作用，但所述蛋白与 3D - MPL 组合(1-2 组)的情况要好一些。

抗多糖抗体加蛋白组可观察到最明显的保护作用，尤其在有所有三种成分，即蛋白，3D - MPL 以及被动给药的抗多糖抗体的组(1-4 组)。该结论也得到死亡率的支持。1-3 组，特别是 1-4 组与其它组相比死亡率低。

**结论:**

正如用被动免疫动物所作的试验所示, 另外用蛋白(+/-MPL)主动免疫的协同效应不是由于抗多糖抗原的抗体的水平增加。

在用蛋白加被动给予抗多糖抗体进行免疫的组, 尤其当 3D-MPL 也存在时, 可观察到对肺炎球菌肺炎有明显的保护作用, 这提示上述组合的协同作用。

如果抗多糖免疫是主动免疫(优选偶联的多糖), 上述作用将更明显, 因为 B 细胞有记忆效应, 抗 PS 抗体在整个试验过程中的水平保持不变, 都导致免疫应答的协作。

10

**实施例 4 - 通过与保护作用的相关性确定协同作用**

人体用来清除感染的肺炎球菌的主要保护机制是抗体介导的调理吞噬作用(Bruyn et al. Clin. Infect. Dis. 14:251(1992))。目前已建立了数种 ELISA 方法, 以检测荚膜多糖抗体的浓度, 作为保护作用的相关指标, 很明显, 体外调理吞噬试验是更好的保护作用相关指示(Musher et al. J. Infect. Dis. 182:158(2000))。

本发明肺炎球菌蛋白可提供针对肺炎球菌感染的保护作用, 其机制不同于抗体介导的调理吞噬作用。在实施例 2 中, 偶联物和蛋白共同进行主动免疫能产生协同作用, 而这种协同作用不能用抗体浓度的差异来解释, 因为在所涉及的两组试验中, 抗体的浓度相同。因此, 能观察到的另一部分保护作用一定来自协同效应。同样, 因抗体是被动加入的, 故在实施例 3 中也获得了同样的结论。

在许多情况下, 本发明的肺炎球菌蛋白是表面结合蛋白, 预计它们本身即可提供一些调理活性。在这种情况下, 通过定量检测抗肺炎球菌蛋白的调理活性来区别保护机制是可能的, 所述检测可用来评估调理活性对保护作用的其它协同机制所起相对作用。

在小鼠肺定居模型中, 每种疫苗的相对保护可用对肺脏中细菌的清除来评估。或者, 用通常对疫苗评估所用的, 以病例率(case rates)来评估疫苗的效力。

30 % 保护 = (CPU/对照肺脏 - CPU/疫苗肺脏)/(CPU/肺脏对照)

% 效力 = (对照病例 - 疫苗病例)/(对照病例)

为确定来源于协同效应的保护或效力所占的部分，关键是确定哪一部分效力是基于调理滴度的比率而产生的。

在实施例3中，通过组合产生的%保护是由于蛋白/抗体成分之间的协同而产生的，因为所述蛋白或所述抗多糖抗体单独都不能提供更多的保护。

- 5 在相对调理活性的基础上评估协同效应的保护程度是可能的。如抗荚膜多糖抗体所赋予的调理活性是 X，抗肺炎球菌蛋白抗体所赋予的活性是 Y，则总调理活性可表示为  $X + Y$ ，蛋白的调理活性的相对比例可表示为  $Y/X + Y$ 。将其与疫苗的相对保护效力相比较，其中疫苗的抗多糖部分提供的保护效力是 A%，多糖加蛋白的疫苗的保护效力是 B%。那些并非由调理活性
- 10 所致的额外效力即可计为剩余保护活性(协同作用) =  $B\% - A\% - B\% * (Y/X + Y)$ 。

该实施例无意于限制评估协同作用的方式。一旦发现保护作用的其它相关指标，便可用这些相关指标来评估协同作用。

- 15 正如对每篇文献分别引入作参考的说明一样，本发明引用的所有出版物，包括但不限于专利和专利申请都纳入本文作参考。