



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103585623 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201310103804. X

代理人 梁谋

(22) 申请日 2006. 12. 20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

0526232. 4 2005. 12. 22 GB

0607088. 2 2006. 04. 07 GB

0607087. 4 2006. 04. 07 GB

0609902. 2 2006. 05. 18 GB

0620336. 8 2006. 10. 12 GB

0620337. 6 2006. 10. 12 GB

0620816. 9 2006. 10. 19 GB

0620815. 1 2006. 10. 19 GB

PCT/GB2006/004634 2006. 12. 12 GB

*A61K 39/09* (2006. 01)

*A61K 47/48* (2006. 01)

*A61P 31/04* (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200680052954. 0 2006. 12. 20

(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. L. 比曼斯 N. M. -J. 加孔

P. V. 赫尔曼德 J. 普尔曼

M. P. 范梅歇伦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

权利要求书1页 说明书52页 附图5页

(54) 发明名称

含有肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的疫苗

(57) 摘要

本发明公开了含有血清型 19A 和 19F 肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 荚膜糖缀合物的免疫原性组合物, 其中 19A 与第一种细菌类毒素缀合, 19F 与第二种细菌类毒素缀合。还描述了制备疫苗的方法和疫苗的用途。

1. 一种含有血清型 19A 和 19F 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 荚膜糖缀合物的免疫原性组合物, 其中 19A 与第一种细菌类毒素缀合, 19F 与第二种细菌类毒素缀合。
2. 权利要求 1 的免疫原性组合物, 其中所述第一种细菌类毒素为不同于第二种细菌毒素的蛋白质。
3. 权利要求 1 或 2 的免疫原性组合物, 其中第一种细菌类毒素选自破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、百日咳类毒素、细菌溶细胞素和肺炎链球菌溶血素。
4. 权利要求 1-3 中任一项的免疫原性组合物, 其中所述第二种细菌类毒素选自破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、百日咳类毒素、细菌溶细胞素和肺炎链球菌溶血素。
5. 权利要求 1-4 中任一项的免疫原性组合物, 其中第一种细菌类毒素为肺炎链球菌溶血素。
6. 权利要求 1-5 中任一项的免疫原性组合物, 其中所述第二种细菌类毒素为白喉类毒素。
7. 权利要求 1-6 中任一项的免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 4、6B、9V、14、18C 和 23F 的缀合物。
8. 权利要求 1-7 中的免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 1、5 和 7F 的缀合物。
9. 权利要求 1-8 中的免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 22F 的缀合物。
10. 权利要求 1-9 中的免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 3 缀合物。

## 含有肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的疫苗

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 12 月 20 日,申请号为 200680052954.0 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及改进的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 疫苗。

[0003] 发明背景

[0004] 不到 2 岁的儿童对大多数多糖疫苗不产生免疫应答,所以一直以来必须通过与蛋白载体进行化学缀合使多糖成为免疫原性的。将为非 T 细胞依赖性抗原的多糖与为 T 细胞依赖性抗原的蛋白偶联赋予多糖 T 细胞依赖性特性,包括同种型转换、亲和力成熟和记忆诱导。

[0005] 然而,重复给予多糖-蛋白缀合物或将多糖-蛋白缀合物联合成多价疫苗可能有问题。例如,已有报道指出在一定剂量范围内测试了使用破伤风类毒素 (TT) 作为蛋白载体的乙型流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 多糖 (PRP) 疫苗,该疫苗与 (游离的) TT 和肺炎链球菌多糖-TT 缀合疫苗按照标准婴儿免疫程序同时免疫。当肺炎链球菌疫苗的剂量增加时,对 Hib 缀合疫苗的 PRP 多糖部分的免疫应答降低,这表明很可能是通过使用相同载体蛋白引起的多糖免疫干扰 (Dagan 等, *Infect Immun.* (1998); 66:2093-2098)。

[0006] 已证实载体-蛋白剂量针对蛋白自身的体液免疫应答的影响是多方面的。据报道在人类婴儿中增加四价破伤风类毒素缀合物的剂量导致对破伤风载体的应答下降 (Dagan 等, 出处同上)。对于联合疫苗的这些效应的经典分析一直被描述为载体诱导的表位抑制,这一点还没有完全弄清楚,但一般认为是由过量的载体蛋白引起的 (Fattom, *vaccine* 17:126 (1999))。这似乎导致针对载体蛋白的 B 细胞和针对多糖的 B 细胞竞争 Th 细胞。如果针对载体蛋白的 B 细胞占优势,则没有足够的 Th 细胞可用于为多糖特异性 B 细胞提供必需的辅助。然而,观察到的免疫效果一直不一致,载体蛋白的总量在某些情况下增加免疫应答,而在另一些情况下降低免疫应答。

[0007] 因此,将多种多糖缀合物组合成单一的、有效的疫苗制剂仍有技术难度。

[0008] 肺炎链球菌为革兰氏阳性细菌,可导致相当高的发病率和死亡率 (尤其是对年纪小的人和上年纪的人),引起诸如肺炎、菌血症和脑膜炎等侵袭性疾病以及与定植相关的疾病,如急性中耳炎。在美国,60 岁以上的人患有肺炎链球菌性肺炎的比例估计为十万分之 3-8。其中 20% 的病例中会引发菌血症,其它则表现为例如脑膜炎,即便采用抗生素治疗死亡率也接近 30%。

[0009] 肺炎链球菌被赋予血清型特异性的化学连接的多糖包裹。有 90 种公知的肺炎链球菌血清型,荚膜是肺炎链球菌毒力的主要决定因素,因为荚膜不但保护细菌内表面不受补体影响,而且其本身是弱免疫原性的。多糖是非 T 细胞依赖性抗原,不能被加工或呈递到 MHC 分子上,从而不能与 T 细胞相互作用。但它们能通过一种涉及 B 细胞表面受体交联的替代机制来刺激免疫系统。

[0010] 一些实验表明,对侵袭性肺炎链球菌疾病的防护作用与荚膜特异性抗体最为相

关,且该防护作用具有血清型特异性。

[0011] 肺炎链球菌是婴儿和儿童侵袭性细菌疾病和中耳炎的最常见致病因素。同样,老年人对肺炎链球菌疫苗的应答较弱 [Roghmann 等, (1987), J. Gerontol. 42:265-270], 因此,在该人群中细菌性肺炎的发病率升高 [Verghese 和 Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285]。

[0012] 因此,本发明的目的是开发一种改进的多种血清型肺炎链球菌多糖缀合疫苗的制剂。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1 在老年猕猴中的缀合物免疫原性 (在第 II 剂 II 剂后的抗 PS IgG 水平)。显示老年猕猴 (Rhesus monkeys) 中的 11 价缀合物免疫原性的条形图。浅色条代表用在磷酸铝佐剂中的 11 价缀合物 2 次接种后的 GMC。深色条代表用在佐剂 C 中的 11 价缀合物 2 次接种后的 GMC。

[0015] 图 2 在老年猕猴中的缀合物免疫原性 (在第 II 剂后的抗 PS3 记忆 B 细胞频率)。显示用在佐剂 C 或磷酸铝佐剂中的 11 价缀合物接种后针对 PS3 的记忆 B 细胞的条形图。

[0016] 图 3 在 Balb/c 小鼠中的 PS19F 免疫原性 (在第 III 剂后的 IgG 水平)。显示 Balb/c 小鼠中 4 价普通多糖和 4 价 dPly 缀合物的抗多糖 19F 免疫原性的条形图。

[0017] 图 4 在 Balb/c 小鼠中的 PS22F 免疫原性 (在第 III 剂后的 IgG 水平)。显示 Balb/c 小鼠中 4 价普通多糖和 4 价 PhtD 缀合物的抗多糖 22F 免疫原性的条形图。

[0018] 图 5 血清抗 PS IgG 抗体水平。显示 Balb/c 小鼠中的抗 22F IgG 应答的条形图。

[0019] 图 6 调理吞噬效价。显示 Balb/c 小鼠中的抗 22F 调理吞噬效价的条形图。

[0020] 图 7 用新佐剂诱导的 IgG 应答与用 AlPO<sub>4</sub> 激发的应答的比较。比较在 C57B1 幼龄小鼠中用以不同佐剂配制的 13 价缀合疫苗免疫后诱导的 IgG 应答的条形图。

[0021] 图 8 在猕猴中 PhtD+dPly 蛋白组合物抗 19F 型肺炎链球菌定居的保护效力。显示不同疫苗组合在猴肺炎模型中的保护效力的条形图。

[0022] 图 9 血清抗 PhtDIgG 应答。显示 Balb/c 小鼠中用 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD 缀合物免疫后的抗 PhtDIgG 应答的条形图。

[0023] 图 10 在小鼠中抗 4 型肺炎链球菌挑战的保护作用。在小鼠中用 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD 免疫后的抗 4 型肺炎链球菌挑战的保护作用。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明提供含有血清型 19A 和 19F 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 荚膜糖缀合物的免疫原性组合物,其中 19A 与为第一种细菌类毒素的载体蛋白缀合,19F 与为第二种细菌类毒素的载体蛋白缀合。

[0026] 术语荚膜糖包括荚膜多糖和可来源于荚膜多糖的寡糖。寡糖包含至少 4 个糖残基。术语缀合物和缀合的涉及与载体蛋白共价键合的荚膜糖。

[0027] 就本发明而言,“免疫人类宿主以抵御 COPD 恶化”或“治疗或预防 COPD 恶化”或“减轻 COPD 恶化严重性”是指 COPD 恶化的发生率或速率下降 (例如速率下降 0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、20% 或以上),例如在用本发明的组合物或疫苗免疫的患者组中。

[0028] 术语细菌类毒素包括通过遗传突变、化学处理或缀合失活的细菌毒素。适宜的细菌类毒素包括破伤风类毒素、白喉类毒素、百日咳类毒素、细菌溶细胞素或肺炎链球菌溶血

素。业已描述了降低肺炎链球菌溶血素毒性的肺炎链球菌溶血素 (Ply) 突变 (W090/06951、W099/03884)。同样, 知晓降低其毒性的白喉毒素遗传突变 (参见下文)。白喉毒素的遗传学上的解毒类似物包括 CRM197 和其它突变体, 参见 US4, 709, 017、US5, 843, 711、US5, 601, 827 和 US5, 917, 017。CRM197 是无毒形式的白喉毒素, 但在免疫学上与白喉毒素没有区别。CRM197 由不产毒噬菌体  $\beta$  197tox 感染的白喉棒杆菌 (*C. diphtheriae*) 产生, 而  $\beta$  197tox 是通过对产毒棒状噬菌体 b 进行亚硝基胍诱变产生的 (Uchida 等, *NatureNewBiology* (1971) 233;8-11)。CRM197 蛋白与白喉毒素具有相同分子量, 但由于 1 个碱基变化而在结构基因方面不同。这导致 52 位的氨基酸从甘氨酸变为谷氨酰胺, 使 A 片段不能结合 NAD, 因此无毒 (Pappenheimer 1977, *AnnRev, Biochem.* 46 ;69-94, Rappuoli *AppliedandEnvironmentalMicrobiology*, 1983 年 9 月, 560-564 页)。

[0029] 第一种和第二种细菌类毒素可相同或不同。当第一种和第二种细菌类毒素不同时, 意味着它们具有不同的氨基酸序列。

[0030] 例如, 19A 和 19F 可分别与破伤风类毒素和破伤风类毒素、白喉类毒素和白喉类毒素、Crm197 和 CRM197、肺炎链球菌溶血素和肺炎链球菌溶血素、破伤风类毒素和白喉类毒素、破伤风类毒素和 CRM197、破伤风类毒素和肺炎链球菌溶血素、白喉类毒素和破伤风类毒素、白喉类毒素和 CRM197、白喉类毒素和肺炎链球菌溶血素、CRM197 和破伤风类毒素、CRM197 和白喉类毒素、CRM197 和肺炎链球菌溶血素、肺炎链球菌溶血素和破伤风类毒素、肺炎链球菌溶血素和白喉类毒素或者肺炎链球菌溶血素和 CRM197 缀合。

[0031] 在一个实施方案中, 除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物以外, 免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 4、6B、9V、14、18C 和 23F 的缀合物。

[0032] 在一个实施方案中, 除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物以外, 免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C 和 23F 的缀合物。

[0033] 在一个实施方案中, 除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物以外, 免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0034] 在一个实施方案中, 除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物以外, 免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0035] 在一个实施方案中, 除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物以外, 免疫原性组合物还包含肺炎链球菌荚膜糖 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0036] 通常, 本发明的肺炎链球菌疫苗含有荚膜糖抗原 (任选缀合的), 其中所述糖来源于至少 10 种肺炎链球菌血清型。肺炎链球菌荚膜糖的数量可在 10 种不同血清型 (或“V”, 价) 至 23 种不同血清型 (23V) 的范围内。在一个实施方案中, 有 10、11、12、13、14 或 15 种不同血清型。在本发明的另一个实施方案中, 疫苗可含有缀合的肺炎链球菌糖和未缀合的肺炎链球菌糖。任选地, 糖血清型的总数少于或等于 23。例如, 本发明可包含 10 种缀合的血清型和 13 种未缀合的糖。以类似的方式, 疫苗可分别含有 11、12、13、14 或 16 种缀合的糖以及 12、11、10、9 或 7 种未缀合的糖。

[0037] 在一个实施方案中, 本发明的多价肺炎链球菌疫苗选自以下血清型: 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F, 但要认识到的是, 根据接受疫苗的接受者的年龄和将给予疫苗的地理位置, 可以 1 种或 2 种其它血清型替代。例如, 10 价疫苗可含有血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的多糖。11

价疫苗还可以包含血清型 3 的糖。12 价或 13 价儿科（婴儿）疫苗还可以包括补加血清型 6A 和 19A、或 6A 和 22F、或 19A 和 22F、或 6A 和 15B、或 19A 和 15B、或 22F 和 15B 的 11 价制剂，而 13 价老年疫苗可以包括补加血清型 19A 和 22F、8 和 12F、或 8 和 15B、或 8 和 19A、或 8 和 22F、或 12F 和 15B、或 12F 和 19A、或 12F 和 22F、或 15B 和 19A、或 15B 和 22F 的 10 或 11 价制剂。14 价儿科疫苗可包括补加血清型 3、6A、19A 和 22F；血清型 6A、8、19A 和 22F；血清型 6A、12F、19A 和 22F；血清型 6A、15B、19A 和 22F；血清型 3、8、19A 和 22F；血清型 3、12F、19A 和 22F；血清型 3、15B、19A 和 22F；血清型 3、6A、8 和 22F；血清型 3、6A、12F 和 22F；或血清型 3、6A、15B 和 22F 的上述 10 价制剂。

[0038] 在一个实施方案中，组合物包含来源于血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F（任选缀合的）的荚膜糖。在本发明的又一个实施方案中，包含至少 11 种糖抗原（任选缀合的），例如来源于血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的荚膜糖。在本发明的又一个实施方案中，包含至少 12 种或 13 种糖抗原，例如疫苗可含有来源于血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 的荚膜糖，或者来源于血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F 的荚膜糖，但本发明还包括其它糖抗原，例如 23 价（例如血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F）。

[0039] 本发明的疫苗可含有流感嗜血菌的 D 蛋白（PD）（参见例如 EP0594610）。流感嗜血菌是中耳炎的关键致病生物，本发明人已表明，将该蛋白纳入肺炎链球菌疫苗中将提供针对流感嗜血菌相关性中耳炎的保护水平（参考 POET 出版物）。在一个实施方案中，疫苗组合物含有 D 蛋白。一方面，PD 作为一种或多种糖的载体蛋白存在。另一方面，D 蛋白可作为游离蛋白存在于疫苗组合物中。又一方面，D 蛋白作为载体蛋白和游离蛋白这二者存在。D 蛋白可用作全长蛋白或片段（W00056360）。又一方面，D 蛋白作为大部分糖的载体蛋白存在，例如 6、7、8、9 种或更多种的糖可与 D 蛋白缀合。在该方面，D 蛋白也可作为游离蛋白存在。

[0040] 本发明的疫苗含有 1 种、2 种或更多种不同类型的载体蛋白。每类载体蛋白均可用作 1 种以上的糖的载体，所述糖可为相同的或不同的。例如，血清型 3 和 4 可缀合相同载体蛋白，或者缀合同一载体蛋白分子，或者缀合相同载体蛋白的不同分子。在一个实施方案中，2 种以上的不同的糖可与相同载体蛋白缀合，或者缀合同一载体蛋白分子，或者缀合相同载体蛋白的不同分子。

[0041] 除 19A 和 19F 以外存在于本发明的免疫原性组合物中的任何肺炎链球菌荚膜糖都可与独立地选自以下的载体蛋白缀合：TT、DT、CRM197、TT 的片段 C、PhtD、PhtBE 或 PhtDE 融合蛋白（尤其是在 W001/98334 和 W003/54007 中描述的那些）、解毒的肺炎链球菌溶血素和 D 蛋白。以下提供了可用于本发明缀合物的蛋白载体的更完整清单。

[0042] 与本发明的免疫原性组合物中存在的缀合物中的一种或多种肺炎链球菌荚膜糖缀合的载体蛋白任选地为聚组氨酸三联体家族（Pht）蛋白成员、其片段或融合蛋白。PhtA、PhtB、PhtD 或 PhtE 蛋白可具有与 W000/37105 或 W000/39299 中公开的序列（例如与 W000/37105 中关于 PhtD 的 SEQIDNO:4 的氨基酸序列 1-838 或 21-838）共有 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。例如，融合蛋白由 PhtA、PhtB、PhtD、PhtE 中的 2、3 或 4 种的全长或片段组成。融合蛋白的实例为 PhtA/B、PhtA/D、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/D、PhtB/E、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/E、PhtE/A、PhtE/B 和 PhtE/D，其中所述蛋白在 N 末端与

首先提到的连接（参见例如 W001/98334）。

[0043] 在使用 Pht 蛋白片段（独立的或作为融合蛋白的一部分）时，每个片段任选地含有一个或多个组氨酸三联体基序和 / 或这些多肽的卷曲螺旋区。组氨酸三联体基序是多肽的一部分，具有序列 HxxHxH，其中 H 为组氨酸，x 为非组氨酸的氨基酸。卷曲螺旋区是 Lupus, A 等, (1991) Science 252 ; 1162-1164 通过“Coils”算法预测的区域。在一个实施方案中，该片段或每个片段含有一个或多个组氨酸三联体基序以及至少一个卷曲螺旋区。在一个实施方案中，该片段或每个片段含有恰好或至少 2、3、4 或 5 个组氨酸三联体基序（任选地，在 2 个或多个三联体之间具有天然 Pht 序列，或者具有三联体内序列，该三联体内序列与天然肺炎链球菌三联体内 Pht 序列—例如示于 W000/37105 的 SEQIDNO:4 的三联体内 PhtD 序列超过 50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 相同）。在一个实施方案中，该片段或每个片段含有恰好或至少 2、3 或 4 个卷曲螺旋区。在一个实施方案中，本文公开的 Pht 蛋白包括具有连接的信号序列的全长蛋白、信号肽（例如在 N-末端的 20 个氨基酸）已被去除的成熟全长蛋白、Pht 蛋白的天然变体和 Pht 蛋白的免疫原性片段（例如上述片段，或含有 W000/37105 或 W000/39299 中的氨基酸序列的至少 15 个或 20 个连续氨基酸的多肽，其中所述多肽能够激发对 W000/37105 或 W000/39299 中所述氨基酸序列特异性的免疫应答）。

[0044] 具体地说，本文使用的术语“PhtD”包括具有连接的信号序列的全长蛋白、信号肽（例如在 N-末端的 20 个氨基酸）已被去除的成熟全长蛋白、PhtD 的天然变体和 PhtD 的免疫原性片段（例如上述片段，或含有 W000/37105 或 W000/39299 中的 PhtD 氨基酸序列的至少 15 个或 20 个连续氨基酸的多肽，其中所述多肽能够激发对 W000/37105 或 W000/39299 中所述 PhtD 氨基酸序列（例如 W000/37105 中针对 PhtD 的 SEQIDNO:4）特异性的免疫应答）。

[0045] 如果蛋白载体与组合物中的 2 种以上的糖相同，则糖可与同一蛋白载体分子缀合（载体分子具有 2 个以上与其缀合的不同糖）[参见例如 W004/083251]。或者，所述糖可各自独立缀合不同的蛋白载体分子（每个蛋白载体分子均仅具有 1 类与其缀合的糖）。

[0046] 可用于本发明的载体蛋白的实例为 DT（白喉类毒素）；TT（破伤风类毒素）或 TT 的 C 片段；DTCRM197（DT 突变体），其它 DT 点突变，例如 CRM176、CRM228、CRM45（Uchida 等, J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973）；CRM9、CRM45、CRM102、CRM103 和 CRM107 以及由 Nicholls 和 Youle 在 Genetically Engineered Toxins, Frankel 编辑, Maecel Dekker Inc, 1992 中描述的其它突变；Glu-148 缺失或突变为 Asp、Gln 或 Ser，和 / 或 Ala158 缺失或突变为 Gly，以及在 US4709017 或 US4950740 中公开的其它突变；Lys516、Lys526、Phe530 和 / 或 Lys534 中至少一个或多个残基的突变，以及在 US5917017 或 US6455673 中公开的其它突变；或者在 US5843711 中公开的片段；肺炎链球菌性肺炎链球菌溶血素（Kuo 等, (1995) Infect Immun 63; 2706-13），包括以某些方式解毒的 pIy，例如 dPLY-GMBS（W004081515、PCT/EP2005/010258）或 dPLY-甲醛、PhtX，包括 PhtA、PhtB、PhtD、PhtE 以及 Pht 蛋白的融合体，例如 PhtDE 融合体、PhtBE 融合体（W001/98334 和 W003/54007）、（PhtA-E 详述于下文）；OMPC（脑膜炎球菌外膜蛋白 - 通常由脑膜炎奈瑟氏球菌（N. meningitidis）血清群 B 提取 - EP0372501）；PorB（得自脑膜炎奈瑟氏球菌）；PD（流感嗜血菌 D 蛋白 - 参见例如 EP0594610B）或其免疫学功能等同物；合成肽（EP0378881、EP0427347）；热激蛋白（W093/17712、W094/03208）；百日咳蛋白（W098/58668、EP0471177）；细胞因子；淋巴因

子;生长因子或激素(W091/01146);含有来自多种病原体衍生抗原的多个人CD4+T细胞表位的人工蛋白(Falugi等,(2001)EurJImmunol31;3816-3824),例如N19蛋白(Baraldoi等,(2004)InfectImmun72;4884-7);肺炎链球菌表面蛋白PspA(W002/091998);铁吸收蛋白(W001/72337);艰难梭菌(*C. difficile*)的毒素A或B(W000/61761)。

[0047] Nurkka等,PediatricInfectiousDiseaseJournal. 23(11):1008-14,2004年11月描述了所有血清型均缀合PD的11价肺炎链球菌疫苗。然而,本发明人已表明,相比于缀合PD的19F,用具有缀合DT的19F的缀合物诱导的抗体的调理吞噬活性被改善。另外,本发明人已表明,用缀合DT的19F观察到对19A的更大交叉反应性。因此,本发明组合物的特征在于血清型19F与细菌类毒素如TT、肺炎链球菌溶血素、DT或CRM197缀合。一方面,血清型19F与DT缀合。血清型19A与细菌类毒素如TT、肺炎链球菌溶血素、DT或CRM197缀合也是本发明的特征。免疫原性组合物余下的糖血清型可全部与一种或多种不是DT的载体蛋白缀合(即仅有19F缀合DT),或者可以在不是DT和为DT自身的一种或多种载体蛋白之间分摊。在一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,所有余下的血清型缀合PD。在又一个实施方案中,19F缀合DT或CRM197,余下的血清型在PD和TT或者DT或CRM197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,仅1种糖缀合TT。在该实施方案的一方面,所述1种糖为18C或12F。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,仅2种糖与TT缀合。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,余下的血清型在PD、TT和DT或CRM197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,余下的血清型在PD、TT和肺炎链球菌溶血素之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,余下的血清型在PD、TT和CRM197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,余下的血清型在PD、TT、肺炎链球菌溶血素和任选的PhtD或PhtD/E融合蛋白之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎链球菌溶血素或TT缀合,余下的血清型在PD、TT、肺炎链球菌溶血素和任选的PhtD或PhtD/E融合蛋白之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎链球菌溶血素或TT缀合,还有1种糖缀合TT,还有1种糖缀合PhtD或PhtD/E,所有其余的糖缀合PD。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎链球菌溶血素缀合,还有1种糖缀合TT,还有1种糖缀合肺炎链球菌溶血素,还有2种糖缀合PhtD或PhtD/E,所有其余的糖缀合PD。

[0048] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物含有来自流感嗜血菌的D蛋白。在该实施方案中,如果PD不是其中一种用于缀合非19F的任何糖的载体蛋白,例如19F与DT缀合,而其它血清型与一种或多种不是PD的不同载体蛋白缀合,那么PD将在疫苗组合物中作为游离蛋白存在。如果PD是其中一种用于缀合非19F的糖的载体蛋白,则PD可任选地作为游离蛋白存在于疫苗组合物中。

[0049] 术语“糖”在整个本说明书中可指示多糖或寡糖,并包括这二者。多糖分离自细菌,并可以在某种程度上通过已知方法(参见例如EP497524和EP497525)并任选地通过微流化调整大小。可对多糖调整大小,以便降低多糖样品的粘度和/或改善缀合产物的过滤性。寡糖具有少量重复单元(通常5-30个重复单元),并通常为水解的多糖。

[0050] 肺炎链球菌的荚膜多糖包含可含有达8个糖残基的重复寡糖单元。关于关键肺炎链球菌血清型的寡糖单元的综述,参见JONES, Christopher. Vaccinebasedonthecellsurfacecarbohydratesof pathogenicbacteria. An. Acad. Bras. Ciênc., 2005年6月,第77卷,



第 2 册, 293-324 页, ISSN0001-3765。在一个实施方案中, 荚膜糖抗原可为全长多糖, 但是在其它实施方案中其可为一个寡糖单元, 或者比重寡糖单元的天然长度的糖链短。在一个实施方案中, 疫苗中存在的所有糖都是多糖。全长多糖可被“调整大小”, 即它们的大小可通过多种方法降低, 例如酸解处理; 过氧化氢处理; 通过 **emulsiflex®** 调整大小, 然后经过过氧化氢处理, 以产生寡糖片段; 或者微流化。

[0051] 本发明人还注意到, 本技术的核心是使用易于生产缀合物的寡糖。本发明人已发现, 通过使用天然的或稍微调整大小的多糖缀合物, 可实现一个或多个以下优势: 1) 具有高免疫原性的可过滤的缀合物, 2) 可改变缀合物中多糖对蛋白的比率, 使得缀合物中多糖对蛋白的比率 (重量 / 重量) 可被增加 (其可对载体抑制作用有影响), 3) 倾向于水解的免疫原性缀合物可通过使用较大的糖进行缀合来稳定。使用较大的多糖可导致与缀合物载体更加交联, 并可以减少由缀合物释放游离的糖。在先有技术中描述的缀合疫苗倾向于在缀合前解聚多糖, 以便改善缀合。本发明人已发现, 保留较大尺寸糖的糖缀合疫苗可提供抵御肺炎链球菌疾病的良好免疫应答。

[0052] 本发明的免疫原性组合物因此可以包含一种或多种糖缀合物, 其中在缀合前每种糖的平均尺寸 (重均分子量; Mw) 在 80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa 或 1000kDa 以上。在一个实施方案中, 缀合后的缀合物应可容易地通过 0.2  $\mu$ m 过滤器过滤, 使得与过滤前样品相比在过滤后获得 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 以上的产量。

[0053] 就本发明而言, “天然的多糖”是指未经处理的多糖, 处理的目的是减小糖的尺寸。在常规纯化工艺中多糖的尺寸可被轻微减少。这样的糖仍是天然的。只要多糖经过调整大小的工艺, 该多糖就不被认为是天然多糖。

[0054] 就本发明而言, “以达到 x2 的因数调整大小”是指糖经过处理, 目的是降低糖大小, 但仍保留超过天然多糖大小的一半的大小。x3、x4 等等以相同的方式解释, 即对糖进行处理, 以减少多糖的大小, 但仍保留天然多糖大小的 1/3、1/4 等等以上的大小。

[0055] 在本发明的一方面, 免疫原性组合物包含至少 10 种血清型的缀合载体蛋白的肺炎链球菌糖, 其中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 种或每种肺炎链球菌糖为天然多糖。

[0056] 在本发明的一方面, 免疫原性组合物包含来自至少 10 种血清型的缀合载体蛋白的肺炎链球菌糖, 其中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 种或每种肺炎链球菌糖被达到 x2、x3、x4、x5、x6、x7、x8、x9 或 x10 的因数调整大小。在该方面的一个实施方案中, 大部分糖, 例如 6、7、8 种或更多种的糖被达到 x2、x3、x4、x5、x6、x7、x8、x9 或 x10 的因数调整大小。

[0057] 糖的分子量或平均分子量在本文是指在缀合前检测的糖的重均分子量 (Mw), 通过 MALLS 来检测。

[0058] MALLS 技术在本领域众所周知, 通常如实施例 2 所述进行。就肺炎链球菌糖的 MALLS 分析而言, 可组合使用两种柱子 (TSKG6000 和 5000PWx1), 并用水洗脱糖。用光散射检测器 (例如配有 10mW488nm 氩激光器的 WyattDawnDSP) 和干涉仪折射计 (例如装备 P100 光电元件和 498nm 红光过滤的 WyattOtilabDSP) 检测糖。

[0059] 在一个实施方案中, 肺炎链球菌糖为天然多糖, 或者为在常规提取步骤中已经减小了尺寸的天然多糖。

[0060] 在一个实施方案中, 通过机械裂解, 例如通过微流化或超声, 调整肺炎链球菌糖的大小。微流化和超声具有充分减小较大天然多糖大小从而提供可过滤缀合物的优点。调整

大小以不超过  $x_{20}$ 、 $x_{10}$ 、 $x_8$ 、 $x_6$ 、 $x_5$ 、 $x_4$ 、 $x_3$  或  $x_2$  的因数进行。

[0061] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含肺炎链球菌缀合物,该缀合物由天然多糖和以不超过  $x_{20}$  的因数调整大小的糖的混合物制备。在该实施方案的一个方面,大部分糖,例如 6、7、8 种或更多种糖以达到  $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$ 、 $x_5$  或  $x_6$  的因数调整大小。

[0062] 在一个实施方案中,肺炎链球菌糖通过接头如双功能接头与载体蛋白缀合。任选地,接头为异双功能或同双功能接头,具有例如 1 个反应性氨基和 1 个反应性羧基、2 个反应性氨基或者 2 个反应性羧基。例如,接头具有 4-20、4-12、5-10 个碳原子。可能的接头是 ADH。其它接头包括 B-丙酰胺基 (W000/10599)、硝基苯-乙胺 (Gever 等, (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165 ;171-288)、卤代烷基卤 (US4057685)、糖苷键 (US4673574、US4808700)、己烷二胺和 6-氨基己酸 (US4459286)。在一个实施方案中,ADH 用作缀合血清型 18C 的糖的接头。

[0063] 在本发明的免疫原性组合物中存在的糖缀合物可用任何已知的偶联技术制备。缀合方法可依赖于用四氟硼酸 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓 (CDAP) 活化糖而形成氰酸酯。由此,活化的糖可直接或经由间隔臂(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基。例如,间隔臂可以是脒胺或半脒胺,以得到硫醇化多糖,硫醇化多糖可经由与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如使用 GMBS) 或卤乙酰载体蛋白(例如使用碘乙酰亚胺[例如乙基碘乙酰亚胺 HCl] 或 N-琥珀酰亚胺基溴乙酸盐或 SIAB、或 SIA、或 SBAP) 反应后所获得的硫醚键与载体偶联。任选地,氰酸酯(任选地以 CDAP 化学法制备)可与己二胺或 ADH 偶联,并采用碳二亚胺(例如 EDAC 或 EDC) 化学法经蛋白载体上的羧基使氨基衍生化的糖与载体蛋白缀合。这样的缀合物描述于 PCT 公开申请 W093/15760 (Uniformed Services University) 以及 W095/08348 和 W096/29094。

[0064] 其它的合适技术使用碳二亚胺、碳亚胺、酰肼、活化酯、降冰片烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多都描述于 W098/42721。缀合可涉及羰基接头,其可如下形成:糖的游离羟基先与 CDI 反应 (Bethell 等, J. Biol. Chem. 1979, 254 ; 2572-4, Hearn 等, J. Chromatogr. 1981. 218 ;509-18), 再与蛋白反应,形成氨基甲酸酯键。该过程可涉及异头末端还原成伯羟基,任选地,涉及伯羟基与 CDI 反应的伯羟基的保护/去保护,以形成 CDI 氨基甲酸酯中间体,并将 CDI 氨基甲酸酯中间体与蛋白的氨基偶联。

[0065] 缀合物也可通过如 US4365170 (Jennings) 和 US4673574 (Anderson) 所述的直接还原胺化法制备。其它方法描述于 EP-0-161-188、EP-208375 和 EP-0-477508。

[0066] 进一步的方法涉及通过碳二亚胺缩合 (Chu C. 等, Infect. Immunity, 1983 245256), 例如使用 EDAC, 将溴化氰(或 CDAP) 活化的、被己二酰肼 (ADH) 衍生化的糖与蛋白载体偶联。

[0067] 在一个实施方案中,糖上的羟基(任选活化的羟基,例如被活化以制备氰酸酯的羟基(例如使用 CDAP)) 直接或间接(通过接头)与蛋白的氨基或羧基连接。当存在接头时,糖上的羟基任选地与接头上的氨基连接,例如通过使用 CDAP 缀合。接头如 ADH 中的其余氨基可缀合蛋白上的羧酸基团,例如通过使用碳二亚胺化学,例如通过使用 EDAC。在一个实施方案中,肺炎链球菌荚膜糖在接头与载体蛋白缀合之前先与接头缀合。或者,接头可在与糖缀合之前与载体缀合。

[0068] 还可以使用技术组合,一些糖-蛋白缀合物通过 CDAP 制备,一些通过还原胺化法

制备。

[0069] 通常,蛋白载体上可用于偶联/缀合的化学基团的类型如下:

[0070] A) 羧基(例如经天冬氨酸或谷氨酸)。在一个实施方案中,该基团直接与糖上的氨基连接,或者用碳二亚胺化学(例如用 EDAC)与接头上的氨基连接。

[0071] B) 氨基(例如经由赖氨酸)。在一个实施方案中,该基团直接与糖上的羧基连接,或者用碳二亚胺化学(例如用 EDAC)与接头上的羧基连接。在另一个实施方案中,该基团直接与糖上用 CDAP 或 CNBr 活化的羟基连接,或者与接头上的这些基团连接;与具有醛基的糖或接头连接;与具有琥珀酰亚胺酯基团的糖或接头连接。

[0072] C) 巯基(例如经由半胱氨酸)。在一个实施方案中,该基团与溴乙酰糖或氯乙酰糖连接,或者用马来酰亚胺化学与接头连接。在一个实施方案中,该基团用双二重氮联苯胺活化/改性。

[0073] D) 羟基(例如经由酪氨酸)。在一个实施方案中,该基团用双二重氮联苯胺活化/改性。

[0074] E) 咪唑基(例如经由组氨酸)。在一个实施方案中,该基团用双二重氮联苯胺活化/改性。

[0075] F) 胍基(例如经由精氨酸)。

[0076] G) 吲哚基(例如经由色氨酸)。

[0077] 在糖上,能够用于偶联的通常是以下基团:OH、COOH 或 NH<sub>2</sub>。醛基能够在本领域已知的不同处理后产生,所述处理例如:高碘酸盐、酸解、过氧化氢等。

[0078] 直接偶联法:

[0079] 糖-OH + CNBr 或 CDAP → 氰酸酯 + NH<sub>2</sub>-Prot → 缀合物

[0080] 糖-醛 + NH<sub>2</sub>-Prot → 席夫碱 + NaCNBH<sub>3</sub> → 缀合物

[0081] 糖-COOH + NH<sub>2</sub>-Prot + EDAC → 缀合物

[0082] 糖-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC → 缀合物

[0083] 通过间隔臂(接头)间接偶联的方法:

[0084] 糖-OH + CNBr 或 CDAP → 氰酸酯 + NH<sub>2</sub> → 糖-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC → 缀合物

[0085] 糖-OH + CNBr 或 CDAP → 氰酸酯 + NH<sub>2</sub> → 糖-SH + SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白,或是通过例如 SPDP 将蛋白的氨基改性后获得的) → 糖-S-S-Prot

[0086] 糖-OH + CNBr 或 CDAP → 氰酸酯 + NH<sub>2</sub> → 糖-SH + 马来酰亚胺-Prot(氨基的改性物) → 缀合物

[0087] 糖-OH + CNBr 或 CDAP → 氰酸酯 + NH<sub>2</sub> → 糖-SH + 卤代乙酰胺-Prot → 缀合物

[0088] 糖-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> → 糖-NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot → 缀合物

[0089] 糖-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> → 糖-SH + SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白,或是通过例如 SPDP 将蛋白的氨基改性后获得的) → 糖-S-S-Prot

[0090] 糖-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> → 糖-SH + 马来酰亚胺-Prot(氨基的改

性物)----> 缀合物

[0091] 糖-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH----> 糖-SH + 卤代乙酰胺-Prot----> 缀合物

[0092] 糖-醛 + NH<sub>2</sub>-----NH<sub>2</sub>----> 糖-----NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot----> 缀合物

[0093] 注意:除了以上的EDAC,还可以使用任何合适的碳二亚胺。

[0094] 总之,通常可以用于与糖偶合的蛋白载体化学基团的类型是氨基(例如赖氨酸残基上的)、COOH基团(例如天冬氨酸和谷氨酸残基上的)和SH基团(如果能够获得的话)(例如半胱氨酸残基上的)。

[0095] 任选地,载体蛋白对肺炎链球菌糖的比率在1:5至5:1(重量/重量)之间;1:2至2.5:1(重量/重量)之间;1:1至2:1(重量/重量)之间。在一个实施方案中,大部分缀合物,例如6、7、8、9种或更多种缀合物,具有大于1:1的载体蛋白对糖的比率,例如1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1或1.6:1。

[0096] 在一个实施方案中,使用CDAP和EDAC使至少一种肺炎链球菌糖经接头与载体蛋白缀合。例如,可使用如上所述的CDAP和EDAC使18C经接头(例如在其末端具有两个酰肼基团的那些接头,例如ADH)与蛋白缀合。在使用接头时,CDAP可用于使糖与接头缀合,然后可使用EDAC使接头与蛋白缀合,或者可首先使用EDAC使接头与蛋白缀合,此后可使用CDAP使接头与糖缀合。

[0097] 通常,本发明的免疫原性组合物可含有在0.1-20 μg、1-10 μg或1-3 μg糖之间的每种糖缀合物的剂量。

[0098] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物含有为0.1-20 μg、0.5-10 μg、0.5-5 μg或1-3 μg糖剂量的每种肺炎链球菌荚膜糖。在一个实施方案中,荚膜糖可以不同剂量存在,例如某些荚膜糖可以恰好1 μg的剂量存在,或者某些荚膜糖可以恰好3 μg的剂量存在。在一个实施方案中,血清型3、18C和19F(或者4、18C和19F)的糖以高于其它糖的剂量存在。在该实施方案的一个方面,血清型3、18C和19F(或4、18C和19F)以近似或恰好3 μg的剂量存在,而免疫原性组合物中的其它糖以近似或恰好1 μg的剂量存在。

[0099] “约”或“近似”就本发明而言被定义为在给定值的10%左右。

[0100] 在一个实施方案中,至少一种肺炎链球菌荚膜糖与载体蛋白直接缀合。任选地,至少一种肺炎链球菌荚膜糖通过CDAP直接缀合。在一个实施方案中,大部分荚膜糖,例如5、6、7、8、9种或更多种,通过CDAP与载体蛋白连接(参见W095/08348和W096/29094)。

[0101] 免疫原性组合物可包含肺炎链球菌蛋白,本文称为本发明的肺炎链球菌蛋白。这些蛋白可用作载体蛋白,或者可作为游离蛋白存在,或者可作为载体蛋白和游离蛋白这两者存在。本发明的肺炎链球菌蛋白或者为表面暴露的,至少在肺炎链球菌部分生命周期当中,或者为由肺炎链球菌分泌或释放的蛋白。任选地,本发明的蛋白选自以下类别,例如具有LXXC的II型信号序列基序的蛋白(其中X为任何氨基酸,例如聚组氨酸三联体家族(PhtX))、胆碱结合蛋白(CbpX)、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为任何氨基酸,例如Sp128、Sp130)和毒素(例如Ply)。这些类别(或基序)中的实例为以下蛋白或其免疫学功能等效物。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物含有至少一种蛋白,所述蛋白选自:聚组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、CbpX截短物、LytX家族、LytX截短物、CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)。肺炎链球菌溶血素(Ply)、PspA、

PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125 和 Sp133。在又一个实施方案中,免疫原性组合物含有 2 种或多种蛋白,所述蛋白选自聚组氨酸三联体家族 (PhtX)、胆碱结合蛋白家族 (CbpX)、CbpX 截短物、LytX 家族、LytX 截短物、CbpX 截短物-LytX 截短物嵌合蛋白(或融合体)、肺炎链球菌溶血素 (Ply)、PspA、PsaA 和 Sp128。在又一个实施方案中,免疫原性组合物含有 2 种或多种蛋白,所述蛋白选自聚组氨酸三联体家族 (PhtX)、胆碱结合蛋白家族 (CbpX)、CbpX 截短物、LytX 家族、LytX 截短物、CbpX 截短物-LytX 截短物嵌合蛋白(或融合体)、肺炎链球菌溶血素 (Ply) 和 Sp128。

[0103] Pht(聚组氨酸三联体)家族包括蛋白 PhtA、PhtB、PhtD 和 PhtE。该家族具有以下特征:脂质化序列;由脯氨酸富集区和几个组氨酸三联体分隔开的两个结构域,可能涉及金属或核苷的结合或酶活性;(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链球菌菌株中。同源蛋白已在其它链球菌和奈瑟氏球菌属中发现。在本发明的一个实施方案中,本发明的 Pht 蛋白为 PhtD。然而,要理解的是,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,所述变体与参比蛋白具有至少 90% 的序列同源性。任选地为至少 95% 相同或至少 97% 相同。

[0104] 对于 PhtX 蛋白而言,PhtA 在 W098/18930 中公开,也称作 Sp36。如上所述,其是聚组氨酸三联体家族蛋白,并具有 II 型信号基序 LXXC。PhtD 在 W000/37105 中公开,也称为 Sp036D。如上所述,它也是聚组氨酸三联体家族蛋白,并具有 II 型 LXXC 信号基序。PhtB 在 W000/37105 中公开,也称为 Sp036B。PhtB 家族的另一成员是 C3-降解多肽,在 W000/17370 中公开。该蛋白也来自聚组氨酸三联体家族 (triadfamily),并具有 II 型 LXXC 信号基序。例如,免疫功能等效物为在 W098/18930 中公开的蛋白 Sp42。PhtB 截短物(约 79kD)在 W099/15675 中公开,它也被认为是 PhtX 家族成员。PhtE 在 W000/30299 中公开,称作 BVH-3。当本文提到任何 Pht 蛋白时,意味着可使用 Pht 蛋白的免疫原性片段或其融合体。例如,提到的 PhtX 包括来自任何 Pht 蛋白的免疫原性片段或其融合体。提到 PhtD 或 PhtB 也就提到了可见于例如 W00198334 的 PhtDE 或 PhtBE。

[0105] 肺炎链球菌溶血素是一种具有独特的溶细胞(溶血)作用和补体活化活性的多功能毒素(Rubins 等, *Am. Respi. CitCareMed*, 153:1339-1346(1996))。该毒素不由肺炎链球菌分泌,而是在肺炎链球菌于自溶素影响下裂解时释放。其作用包括例如:刺激人体单核细胞产生炎性细胞因子,抑制人体呼吸上皮纤毛颤动,降低嗜中性粒细胞的杀菌活性和迁移性。肺炎链球菌溶血素最明显的作用在于红细胞裂解方面,该作用涉及与胆固醇结合。因为肺炎链球菌溶血素是一种毒素,因此在其可以体内给药前必须脱毒(即以适于保护的剂量提供时对人无毒)。在本领域已知野生型或天然肺炎链球菌溶血素的表达和克隆。参见例如 Walker 等 (*InfectImmun*, 55:1184-1189(1987)), Mitchell 等 (*BiochimBiophysActa*, 1007:67-72(1989) 和 Mitchell 等 (*NAR*, 18:4010(1990))。Ply 的脱毒可以用化学方法进行,例如进行福尔马林或戊二醛处理或二者的组合(W004081515, PCT/EP2005/010258)。这些方法在本领域众所周知用于多种毒素。或者,ply 可以用基因方法脱毒。因此,本发明包括肺炎链球菌蛋白衍生物,该衍生物可为例如突变蛋白。术语“突变的”在本文用于指已使用公知的定点诱变技术或任何其它常规方法缺失、增加或取代一个或多个氨基酸的分子。例如:如上所述,突变型 ply 蛋白可以被改变,以使其生物失活,但仍保持其致免疫表位,参见例如 W090/06951, Berry 等, (*InfectImmun*, 67:981-985(1999)) 和 W099/03884。

[0106] 要理解的是,此处所用的术语“Ply”是指适于医用的突变或脱毒的(即无毒的)肺炎链球菌溶血素。

[0107] 关于胆碱结合蛋白家族(CbpX),该家族的成员最初被鉴定为能用胆碱亲和层析纯化的肺炎链球菌蛋白。所有胆碱结合蛋白都非共价结合于细胞壁磷壁酸和膜结合脂磷壁酸的磷酸胆碱部分。虽然该蛋白质的确切性质(氨基酸序列、长度等)可以不同,但整个家族具有数个在结构上相同的区域。一般来说,胆碱结合蛋白包含N末端区(N)、保守重复区(R1和/或R2)、脯氨酸富集区(P)和保守的胆碱结合区(C),该胆碱结合区由多个重复序列组成,约占该蛋白的一半。本申请中所用的术语“胆碱结合蛋白家族(CbpX)”选自W097/41151中所鉴定的胆碱结合蛋白、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD和CbpG。CbpA公开于W097/41151,CbpD和CbpG公开于W000/29434,PspC公开于W097/09994,PbcA公开于W098/21337。SpsA为W098/39450中公开的胆碱结合蛋白。该胆碱结合蛋白任选地选自CbpA、PbcA、SpsA和PspC。

[0108] 本发明的一个实施方案包括CbpX截短物,其中“CbpX”在上文定义,“截短物”指缺少50%或更多的胆碱结合区(C)的CbpX蛋白。任选地,这样的蛋白质没有整个胆碱结合区。任选地,这样的蛋白截短物没有(i)胆碱结合区和(ii)该蛋白质的N末端一半的一部分,但至少保留一个重复区(R1或R2)。任选地,该截短物具有两个重复区(R1和R2)。这些实施方案的实例是在W099/51266或W099/51188中举例说明的NR1xR2和R1xR2,但是,其它没有相似的胆碱结合区的胆碱结合蛋白也包含在本发明的范围内。

[0109] LytX家族是与细胞裂解有关的膜结合蛋白。N末端结构域包含胆碱结合域,但是,LytX家族并不具有在上述CbpA家族中发现的所有特征,因此,对于本发明来说,LytX家族被认为不同于CbpX家族。与CbpX家族相比,LytX的C末端结构域包含LytX蛋白家族的催化域。该家族包含LytA、B和C。对于LytX家族而言,LytA公开于Ronda等,EurJBiochem,164:621-624(1987)。LytB公开于W098/18930,也被称为Sp46。LytC也公开于W098/18930,也被称为Sp91。本发明的实施方案包含LytC。

[0110] 另一个实施方案包含LytX截短物,其中“LytX”在上文定义,“截短物”指没有50%或更多胆碱结合区的LytX蛋白。任选地,这样的蛋白质没有整个胆碱结合区。本发明的又一个实施方案包含CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)。任选地,该蛋白包含CbpX的NR1xR2(或R1xR2)和LytX的C末端部分(Cterm,即没有胆碱结合域)(例如LytCCterm或Sp91Cterm)。任选地,CbpX选自CbpA、PbcA、SpsA和PspC。任选地其为CbpA。任选地LytX为LytC(也被称为Sp91)。本发明的另一个实施方案为PspA或PsaA截短物,其没有胆碱结合域(C),并与LytX一起表达为融合蛋白。任选地,LytX为LytC。

[0111] PsaA和PspA这二者在本领域都是已知的。例如,Berry和Paton, Infect Immun 1996年12月;64(12):5255-62已描述了PsaA和其跨膜缺失变体。例如US5804193、W092/14488和W099/53940公开了PspA和其跨膜缺失变体。

[0112] Sp128和Sp130公开于W000/76540。Sp125是带有细胞壁锚定基序LPXTG(其中X为任何氨基酸)的肺炎链球菌表面蛋白的实例。具有此基序的这类肺炎链球菌表面蛋白中的任何蛋白在本发明范围内都已被发现是有用的,因此将其视为本发明的另一种蛋白。Sp125本身公开于W098/18930,也称为ZmpB-锌金属蛋白酶。Sp101公开于W098/06734(其中它的索引为#y85993)。其特征为I型信号序列。Sp133公开于W098/06734(其中它的索

引为 #y85992)。其也以 I 型信号序列为特征。

[0113] 可包含在联合疫苗(尤其是用于预防中耳炎的联合疫苗)中的卡他莫拉菌(*Moraxellacatarrhalis*)蛋白抗原的实例为:OMP106[W097/41731(Antex)和 W096/34960(PMC)];OMP21或其片段(W00018910);LbpA和/或LbpB[W098/55606(PMC)];TbpA和/或TbpB[W097/13785和W097/32980(PMC)];CopB[HelminenME等,(1993) *Infect. Immun.* 61:2003-2010];UspA1和/或UspA2[W093/03761(德克萨斯大学)];OmpCD;HasR(PCT/EP99/03824);PilQ(PCT/EP99/03823);OMP85(PCT/EP00/01468);lipo06(GB9917977.2);lipo10(GB9918208.1);lipo11(GB9918302.2);lipo18(GB9918038.2);P6(PCT/EP99/03038);D15(PCT/EP99/03822);Omp1A1(PCT/EP99/06781);Hly3(PCT/EP99/03257);和OmpE。可包含在联合疫苗(尤其是用于预防中耳炎的联合疫苗)中的不可分型流感嗜血菌抗原或其片段的实例包括:丝束蛋白[(US5766608-俄亥俄州研究基金会)]和含有来自其的肽的融合体[例如LB1(f)肽融合体;US5843464(OSU)或W099/64067];OMP26[W097/01638(Cortecs)];P6[EP281673(纽约州立大学)];TbpA和/或TbpB;Hia;Hsf;Hin47;Hif;Hmw1;Hmw2;Hmw3;Hmw4;Hap;D15(W094/12641);P2;和P5(W094/26304)。

[0114] 本发明的蛋白也可以进行有益的组合。所述组合的是指免疫原性组合物包含来自以下组合中的所有蛋白,其或者为载体蛋白,或者为游离蛋白,或者为二者的混合物。例如,在后文陈述的两种蛋白的组合中,两种蛋白都可以用作载体蛋白,或者两种蛋白都可以作为游离蛋白存在,或者两种蛋白都可以作为载体蛋白和游离蛋白存在,或者一个可作为载体蛋白和游离蛋白存在,而另一个仅作为载体蛋白或仅作为游离蛋白存在。当给出3种蛋白的组合时,存在类似的可能性。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。任选地,NR1xR2(或R1xR2)来自CbpA或PspC。任选地,其来自CbpA。其它组合包括3种蛋白组合,例如PhtD + NR1xR2 + Ply以及PhtA + NR1xR2 + PhtD。在一个实施方案中,疫苗组合物包含解毒的肺炎链球菌溶血素以及PhtD或PhtDE作为载体蛋白。在又一个实施方案中,疫苗组合物包含解毒的肺炎链球菌溶血素以及PhtD或PhtDE作为游离蛋白。

[0115] 在一个独立方面,本发明提供包含至少4种肺炎链球菌荚膜糖缀合物的免疫原性组合物,所述缀合物含有不同肺炎链球菌血清型的糖,其中至少一种糖与PhtD或其融合蛋白缀合,免疫原性组合物能够激发抗PhtD的有效免疫应答。

[0116] 例如通过保护测定,如在实施例15中描述的测定,检测抗PhtD或其融合蛋白的有效免疫应答。有效的免疫应答在用异源菌株挑战后7天提供至少40%、50%、60%、70%、80%或90%的存活。假定挑战菌株是异源的,则提供的保护归因于抗PhtD或其融合蛋白的免疫应答。

[0117] 或者,抗PhtD的有效免疫应答通过如在实施例14中描述的ELISA检测。有效的免疫应答产生的抗PhtDIgG应答至少为250、300、350、400、500、550或600 $\mu$ g/mlGMC。

[0118] 例如,免疫原性组合物包含来自不同血清型的缀合 PhtD 或其融合蛋白的至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种肺炎链球菌荚膜糖。例如,血清型 22F 和另外选自血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、23F 和 33F 的 1、2、3、4、5、6 或 7 种缀合 PhtD。在一个实施方案中,血清型 3、6A 和 22F 中的 2 种或 3 种与 PhtD 或其融合蛋白缀合。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种经接头(例如 ADH)与 PhtD 或其融合蛋白缀合的肺炎链球菌荚膜糖。在一个实施方案中,使用以下列出的其中一种缀合化学物质。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种缀合 PhtD 或其融合蛋白的肺炎链球菌荚膜糖,其中缀合物中 PhtD 对糖的比率在 6:1 至 1:5、6:1 至 2:1、6:1 至 2.5:1、6:1 至 3:1、6:1 至 3.5:1(重量/重量)之间,或者大于 2.0:1、2.5:1、3.0:1、3.5:1 或 4.0:1(重量/重量)(即包含较大比例的 PhtD)。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含肺炎链球菌溶血素。

[0122] 本发明还提供含有本发明的免疫原性组合物和药学上可接受的赋形剂的疫苗。

[0123] 本发明的疫苗可被佐剂化,尤其是在计划用于老年人群而且用于婴儿人群时。适宜的佐剂包括铝盐,例如氢氧化铝凝胶或磷酸铝或明矾,而且可以为其它金属盐,例如钙盐、镁盐、铁盐或锌盐,或者可为酰化酪氨酸或酰化糖、阳离子或阴离子衍生化糖或聚磷腈的不溶性混悬液。

[0124] 任选地选择为 Th1 型应答的优先诱导物的佐剂。这些高水平的 Th1 型细胞因子倾向于支持诱导针对给定抗原的细胞介导的免疫应答,而高水平的 Th2 型细胞因子倾向于支持诱导针对抗原的体液免疫 应答。

[0125] Th1 和 Th2 型免疫应答的区别不是绝对的。实际上,个体将支持被描述为以 Th1 为主或以 Th2 为主的免疫应答。然而,经常便利地根据 Mosmann 和 Coffman 在鼠 CD4+veT 细胞克隆中所描述的 (Mosmann, T. R. 和 Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, 145-173 页) 考虑细胞因子家族。传统上, Th1 型应答与 T 淋巴细胞生产 INF- $\gamma$  和 IL-2 细胞因子有关。经常与 Th1 型免疫应答的诱导直接相关的其它细胞因子不由 T 细胞产生,例如 IL-12。相比之下, Th2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 的分泌有关。主要促进 Th1 应答的适宜佐剂系统包括:单磷酸脂质 A 或其衍生物(或通常为解毒的脂质 A - 参见例如 W02005107798),尤其是 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL)(关于其制备参见 GB2220211A);以及单磷酸脂质 A、任选的 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A 连同铝盐(例如磷酸铝或氢氧化铝)或水包油乳剂的组合。在这些组合中,抗原和 3D-MPL 包含在相同的颗粒结构中,允许更有效地传递抗原性和免疫刺激性信号。研究表明,3D-MPL 能够进一步增强明矾吸附抗原的免疫原性 [Thoelen 等, Vaccine (1998) 16:708-14; EP689454-B1]。

[0126] 增强的系统包括单磷酸脂质 A 和皂苷衍生物的组合物,尤其是如在 W094/00153 中公开的 QS21 和 3D-MPL 的组合,或者如在 W096/33739 中公开的较少反应原性的组合物,其中 QS21 用胆固醇猝灭。在 W095/17210 中描述了一种特别有效的佐剂制剂,其包含在水包油乳剂中的 QS21、3D-MPL 和生育酚。在一个实施方案中,免疫原性组合物另外含有皂苷,其可为 QS21。制剂还可以包含水包油乳剂和生育酚 (W095/17210)。含有寡核苷酸的未甲基化



CpG(W096/02555) 和其它免疫调节性寡核苷酸(W00226757 和 W003507822) 也是 TH1 应答的优先诱导物,适用于本发明。

[0127] 具体的佐剂选自:金属盐、水包油乳剂、To11 样受体激动剂(尤其是 To11 样受体 2 激动剂、To11 样受体 3 激动剂、To11 样受体 4 激动剂、To11 样受体 7 激动剂、To11 样受体 8 激动剂和 To11 样受体 9 激动剂)、皂苷或其组合。

[0128] 可用于本发明的疫苗组合物的佐剂为革兰氏阴性细菌菌株的小泡或外膜囊泡制备物,例如由 W002/09746 教导的那些—尤其是脑膜炎奈瑟氏球菌小泡。小泡的佐剂特性可通过在其表面上保留 LOS(脂多糖)(例如通过用低浓度去污剂[例如 0-0.1% 脱氧胆酸盐]提取)而改善。LOS 可通过 W002/09746 所论述的 msbB(-) 或 htrB(-) 突变解毒。佐剂特性还可以通过保留脑膜炎球菌小泡的 PorB(和任选地去除 PorA)而改善。佐剂特性还可以通过截短脑膜炎球菌小泡上的 LOS 的外核糖结构而改善—例如经由 W02004/014417 所论述的 lgtB(-) 突变。或者,前述 LOS(例如分离自 msbB(-) 和 / 或 lgtB(-) 菌株)可被纯化并用作本发明组合物中的佐剂。

[0129] 可用于本发明组合物的其它佐剂选自:皂苷、脂质 A 或其衍生物、免疫刺激性寡核苷酸、烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯、水包油乳剂或其组合。可用于本发明组合物的其它佐剂为与另一种佐剂组合的金属盐。在一个实施方案中,佐剂为 To11 样受体激动剂,尤其是 To11 样受体 2、3、4、7、8 或 9 的激动剂,或皂苷,尤其是 Qs21。在一个实施方案中,佐剂系统包括前面所列的两种或多种佐剂。具体而言,组合任选地包含皂苷(尤其是 Qs21)佐剂和 / 或 To11 样受体 9 激动剂,例如含有 CpG 的免疫刺激性寡核苷酸。其它组合包含皂苷(尤其是 QS21) 和 To11 样受体 4 激动剂,例如单磷酸脂质 A 或其 3 脱酰衍生物 3D-MPL,或皂苷(尤其是 QS21) 和 To11 样受体 4 配体,例如烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯。

[0130] 在一个实施方案中,佐剂为 3D-MPL 和 QS21 的组合(EP0671948B1)、含有 3D-MPL 和 QS21 的水包油乳剂(W095/17210、W098/56414)或者与其它载体一起配制的 3D-MPL(EP0689454B1)。在一个实施方案中,佐剂系统包含如在 US6558670、US6544518 中描述的 3DMPL、QS21 和 CpG 寡核苷酸的组合。

[0131] 在一个实施方案中,佐剂为 To11 样受体(TLR)4 配体,任选地为激动剂,例如脂质 A 衍生物,尤其是单磷酸脂质 A,或者更具体地说为 3 脱酰单磷酸脂质 A(3D-MPL)。

[0132] 3D-MPL 可得自北美葛兰素史克生物制品公司(GlaxoSmithKline BiologicalsNorthAmerica),主要促进具有 IFN-g(Th1) 表型的 CD4+T 细胞反应。其可依据 GB2220211A 中公开的方法生产。在化学上,3D-MPL 是具有 3、4、5 或 6 条酰化链的 3-脱酰单磷酸脂质 A 的混合物。在一个实施方案中,本发明的组合物使用小颗粒 3D-MPL。小颗粒 3D-MPL 的粒径使得其可通过 0.22 μm 滤器除菌过滤。在国际专利申请号 W094/21292 中描述了这些制备物。脂质 A 的合成衍生物是已知的,并被认为是 TLR4 激动剂,其包括但不限于:

[0133] OM174(2-脱氧-6-o-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二酰氧十四酰基氨基]-4-o-磷酸基-β-D-吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]-α-D-吡喃葡萄糖基二氢磷酸酯), (W095/14026)

[0134] OM294DP(3S, 9R)-3-[(R)-十二酰氧十四酰基氨基]-4-氧-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]癸-1,10-二醇,1,10-双(二氢磷酸酯),

(W099/64301 和 W000/0462)

[0135] OM197MP-AcDP(3S-, 9R)-3-[(R)-十二酰氧十四酰基氨基]-4-氧-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰基氨基]癸-1, 10-二醇, 1-二氢磷酸酯 10-(6-氨基己酸酯)(W001/46127)

[0136] 其它可用的 TLR4 配体是烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯 (AGP), 如在 W09850399 或 US6303347 中公开的那些 (还公开了用于制备 AGP 的方法), 或如在 US6764840 中所公开的 AGP 的药学上可接受的盐。有些 AGP 是 TLR4 激动剂, 而有些是 TLR4 拮抗剂。两者都被认为可用作佐剂。

[0137] 另一个用于本发明的免疫刺激剂是 QuilA 及其衍生物。QuilA 是从南美奎拉雅属皂树 (QuilajaSaponariaMolina) 中分离出来的皂苷制剂, 并且由 Dalsgaard 等在 1974 年首次描述为具有佐剂活性 (“Saponin adjuvants”, Archiv. fürdiegesamteVirusforschung, 44 卷, Springer Verlag, Berlin, 243-254 页)。通过 HPLC 已经分离了 QuilA 的纯化片段, 其保留了佐剂活性, 没有与 QuilA 相关的毒性 (EP0362278), 例如 QS7 和 QS21 (也称为 QA7 和 QA21)。QS-21 是来源于奎拉雅属皂树树皮的天然皂苷, 其诱导 CD8+ 细胞毒性 T 细胞 (CTL)、Th1 细胞和主要的 IgG2a 抗体反应, 在本发明背景下为优选皂苷。

[0138] 已经描述了为本发明实施方案的具体 QS21 制剂, 这些制剂还包括固醇 (W096/33739)。本发明的皂苷形成部分可以是独立的胶束形式、混合的胶束 (任选地具有胆汁盐) 形式, 或者当用胆固醇和脂质制备时可以是 ISCOM 基质 (EP0109942B1)、脂质体或相关胶体结构的形式, 如似螺旋形或环形多聚体复合物或者油脂 / 分层的结构和薄片, 或者是水包油乳剂形式 (例如 W095/17210)。皂苷可与金属盐结合, 诸如氢氧化铝或磷酸铝 (W098/15287)。

[0139] 任选地, 皂苷以脂质体、ISCOM 或水包油乳剂的形式存在。

[0140] 增强的系统包括单磷酰脂质 A (或解毒的脂质 A) 和皂苷衍生物的组合, 尤其是在 W094/00153 中公开的 QS21 和 3D-MPL 的组合, 或如在 W096/33739 中公开的其中 QS21 用胆固醇猝灭的较少反应原性的组合物。在 W095/17210 中描述了一种特别有效的佐剂制剂, 其在水包油乳剂中包含生育酚, 有或没有 QS21 和 / 或 3D-MPL。在一个实施方案中, 免疫原性组合物另外含有皂苷, 其可为 QS21。

[0141] 还可以使用免疫刺激性寡核苷酸或任何其它的 Toll 样受体 (TLR)9 激动剂。用于本发明佐剂或疫苗的寡核苷酸任选地为包含 CpG 的寡核苷酸, 任选地包含两个或更多个二核苷酸 CpG 基序, 这些基序由至少三个、任选地至少六个或更多个核苷酸分隔。CpG 基序是胞嘧啶核苷酸后接鸟嘌呤核苷酸。本发明的 CpG 寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在一个实施方案中, 寡核苷酸内核苷酸间是二硫代磷酸酯键或硫代磷酸酯键, 但磷酸二酯键和其它核苷酸间键也在本发明范围内。还包括 在本发明范围内的是具有混合的核苷酸间键的寡核苷酸。用于生产硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法描述于 US5, 666, 153、US5, 278, 302 和 W095/26204。

[0142] 寡核苷酸的实例具有以下序列。这些序列任选地包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键。

[0143] OLIG01 (SEQIDNO:1) :TCCATGACGTTCTGACGTT (CpG1826)

[0144] OLIGO2 (SEQIDNO:2) :TCTCCCAGCGTGCGCCAT (CpG1758)

[0145] OLIGO3 (SEQIDNO:3) :ACCGATGACGTGCGCCGGTGACGGCACCACG

[0146] OLIGO4 (SEQIDNO:4) :TCGTTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (CpG2006)

[0147] OLIGO5 (SEQIDNO:5) :TCCATGACGTTCCCTGATGCT (CpG1668)

[0148] OLIGO6 (SEQIDNO:6) :TCGACGTTTTTCGGCGCGCGCCG (CpG5456)

[0149] 备选的 CpG 寡核苷酸可包含以上序列,因为它们具有序列内无关紧要的缺失或添加。

[0150] 本发明所用的 CpG 寡核苷酸可通过本领域已知的任一方法合成(例如参见 EP468520)。为方便起见,这些寡核苷酸可利用自动合成仪合成。

[0151] 佐剂可为水包油乳剂,或者可以包含与其它佐剂组合的水包油乳剂。乳剂系统的油相任选地含有可代谢油。术语可代谢油的含义在本领域众所周知。可代谢油可被定义为“能够通过代谢转化的”(道兰氏图解医学词典,W. B. Sanders Company, 第 25 版,(1974))。所述油可为任何植物油、鱼油、动物油或合成油,其对接受者无毒,能够通过代谢转化。坚果、种子和谷物是常见的植物油来源。合成油也是本发明的一部分,可包括市售油,例如 **NEOBEE®** 等。鲨烯(2, 6, 10, 15, 19, 23- 六甲基 -2, 6, 10, 14, 18, 22- 二十四碳六烯)是不饱和油,大量存在于鲨鱼肝油中,少量存在于橄榄油、麦胚芽油、米糠油和酵母中,是用于本发明的油。鲨烯是可代谢油依据以下事实:其是胆固醇生物合成的中间体(默克索引,第 10 版,编目流水号 8619)。

[0152] 母育酚(例如维生素 E)也经常用于油性乳化佐剂(EP0382271B1 ;US5667784 ;W095/17210)。用于本发明的油性乳剂(任选地为水包油乳剂)的母育酚可以如 EP0382271B1 所述配制,即母育酚可为母育酚液滴分散液,任选地含有乳化剂,任选地低于 1  $\mu$ m 直径。或者,母育酚可与另一种油联合使用,以形成油性乳剂的油相。本文描述了可与母育酚联合使用的油性乳剂的实例,例如上述可代谢油。

[0153] 业已表明,水包油乳剂佐剂自身可用作佐剂组合物(EP0399843B),水包油乳剂和其它活性物质的组合也已被描述为疫苗佐剂(W095/17210 ;W098/56414 ;W099/12565 ;W099/11241)。已表述了其它油性乳化佐剂,例如油包水乳剂(US5, 422, 109 ;EP0480982B2)和水包油包水乳剂(US5, 424, 067 ;EP0480981B)。所有这些都构成了油性乳剂系统(尤其是在掺入母育酚时),以形成本发明的佐剂和组合物。

[0154] 在一个实施方案中,油性乳剂(例如水包油乳剂)还包含乳化剂,例如吐温 80 和 / 或固醇,例如胆固醇。

[0155] 在一个实施方案中,油性乳剂(任选地水包油乳剂)含有可代谢油;无毒性油,例如角鲨烷、鲨烯或生育酚,例如  $\alpha$  生育酚(和任选地鲨烯和  $\alpha$  生育酚这二者),以及任选的乳化剂(或表面活性剂),例如吐温 80。还可以包括固醇(例如胆固醇)。

[0156] 生产水包油乳剂的方法是本领域技术人员熟知的。一般来说,该方法包括:将含母育酚的油相与表面活性剂如 PBS/ 吐温 80™ 溶液混合,然后用匀浆器进行匀浆,对本领域技术人员应显而易见的是,包括将混合物两次通过注射器针头的方法应适于匀化小体积液体。同样地,本领域技术人员可修改在微射流仪(M110S 微流体机器,最多为 50 个通道,在 6 巴的最大压力输入下 2 分钟的时间段(输出压力为约 850 巴))中的乳化方法,以产生更小体积或更大体积的乳剂。该修改可通过常规实验完成,包括测量所得乳剂,直到得到具有

所需直径的油滴的制剂。

[0157] 在水包油乳剂中,油和乳剂应处于水性载体中。水性载体可为例如磷酸缓冲盐水。

[0158] 在稳定的水包油乳剂中存在的油滴大小任选地可小于 1 微米,可基本上在 30-600 纳米的范围内,任选地基本约 30-500 纳米直径,任选地基本 150-500 纳米直径,尤其是约 150 纳米直径,如按光子相关光谱学所测量的。在这点上,以数目计 80% 的油滴应在该范围内,任选地以数目计超过 90% 的油滴和任选地以数目计超过 95% 的油滴在限定的尺寸范围内。按照常规,本发明的油性乳剂中存在的组分为 0.5-20% 或 2-10% 的油(总剂量体积),例如鲨烯;且如果有  $\alpha$  生育酚则为 2-10%;以及 0.3-3% 的表面活性剂,如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。任选地,油(例如鲨烯):母育酚(例如  $\alpha$ -生育酚)的比率等于或小于 1,因为这样提供了更稳定的乳剂。诸如吐温 80 或司盘 85 的乳剂也可以以约 1% 的水平存在。在某些情况下,本发明的疫苗还包含有稳定剂可能是有利的。

[0159] 乳化系统的实例描述于 W095/17210、W099/11241 和 W099/12565,其公开了基于鲨烯、 $\alpha$  生育酚和吐温 80 的乳化佐剂,其任选地与免疫刺激剂 QS21 和 / 或 3D-MPL 一起配制。因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的佐剂可另外含有其它的免疫刺激剂,例如 LPS 或其衍生物,和 / 或皂苷。其它免疫刺激剂的实例描述于本文和“Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach”1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第 6 卷, Powell, M. F. 和 Newman, M. J. 编辑, Plenum Press, New York and London, ISBN0-306-44867-X。

[0160] 在一个实施方案中,本发明的佐剂和免疫原性组合物包含在上述油性乳剂中的皂苷(例如 QS21)和 / 或 LPS 衍生物(例如 3D-MPL),任选地具有固醇(例如胆固醇)。另外,油性乳剂(任选地水包油乳剂)可含有司盘 85 和 / 或卵磷脂和 / 或三辛酸甘油酯。含有水包油乳剂、固醇和皂苷的佐剂描述于 W099/12565。

[0161] 通常,对于人类给药而言,皂苷(例如 QS21)和 / 或 LPS 衍生物(例如 3D-MPL)在人类免疫原性组合物剂量中以  $1 \mu\text{g}$ - $200 \mu\text{g}$ /剂存在,例如  $10$ - $100 \mu\text{g}$  或  $10 \mu\text{g}$ - $50 \mu\text{g}$ /剂。通常,油性乳剂(任选地为水包油乳剂)包含 2-10% 可代谢油。任选地,其包含 2-10% 鲨烯、2-10%  $\alpha$  生育酚和 0.3-3% (任选地 0.4-2%) 乳剂(任选地吐温 80 [聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯])。在鲨烯和  $\alpha$  生育酚这二者均存在时,任选地鲨烯与  $\alpha$  生育酚的比率等于或小于 1,因为这提供了更稳定的乳剂。司盘 85 (山梨糖醇酐三油酸酯)也可以在用于本发明的乳剂中以 0.5-1% 的水平存在。在某些情况下,本发明的免疫原性组合物和疫苗还包含稳定剂可能是有利的,所述稳定剂例如为其它乳化剂 / 表面活性剂,包括辛酸(默克索引第 10 版,编目流水号 1739),例如三辛酸甘油酯。

[0162] 在含有鲨烯和皂苷(任选地为 QS21)时,制剂还包含固醇(任选地为胆固醇)是有益的,因为这允许降低乳剂中的总油量。这导致生产成本降低,接种的总体舒适性改善,还定量和定性地改善了所获免疫应答,例如改善了 IFN- $\gamma$  生产。因此,本发明的佐剂系统通常包含在 200:1-300:1 范围内的可代谢油:皂苷(重量/重量)比率,还可以以“低油”形式使用本发明,其任选的范围为 1:1-200:1,任选地为 20:1-100:1,或者基本上为 48:1,该疫苗保留了所有组分的有益佐剂特性和显著减少的反应原性谱。因此,某些实施方案具有的鲨烯:QS21(重量/重量)比率在 1:1-250:1 或 20:1-200:1 或 20:1-100:1 范围内,或者基本上为 48:1。任选地,还包括以如本文所述的皂苷:固醇比率存在的固醇(例如胆固醇)。

[0163] 本发明的乳化系统任选地具有在亚微米范围内的小油滴尺寸。任选地，油滴尺寸为直径 120-750nm，或直径 120-600nm。

[0164] 特别有效的佐剂制剂（用于在本发明的免疫原性组合物中与 AlPO<sub>4</sub> 最终组合）包括皂苷（例如 QS21）、LPS 衍生物（例如 3D-MPL）和油性乳剂（例如在水包油乳剂中的鲨烯和  $\alpha$  生育酚），其描述于 W095/17210 或 W099/12565（尤其是在实施例 2 表 1 中的佐剂制剂 11）。

[0165] TLR2 激动剂的实例包括肽聚糖或脂蛋白。咪唑并喹啉，例如咪唑莫特和雷西莫特，是已知的 TLR7 激动剂。单链 RNA 也是已知的 TLR 激动剂（在人中的 TLR8 和在小鼠中的 TLR7），而双链 RNA 和聚合 IC（聚肌苷酸 - 聚胞嘧啶核苷酸，其为市售的病毒 RNA 的合成模拟物）是 TLR3 激动剂的示例。3D-MPL 是 TLR4 激动剂的实例，而 CPG 是 TLR9 激动剂的实例。

[0166] 免疫原性组合物可以包含吸附在金属盐上的抗原和免疫刺激物。其中抗原和免疫刺激物 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL) 吸附到相同颗粒上的基于铝的疫苗制剂描述于 EP0576478B1、EP0689454B1 和 EP0633784B1。那么，在这些情况下，抗原首先吸附到铝盐上，之后将免疫刺激剂 3D-MPL 吸附到相同铝盐颗粒上。这些方法首先包括在水浴中通过超声悬浮 3D-MPL，直至颗粒达到 80-500nm 的尺寸。抗原典型地在搅拌下于室温在铝盐上吸附 1 小时。然后将 3D-MPL 悬浮液加入至吸附的抗原，制剂于室温温育 1 小时，然后保持于 4°C，直至使用。

[0167] 在另一种方法中，免疫刺激物和抗原在单独的金属颗粒上，如在 EP1126876 中所述。改善的方法包括将免疫刺激物吸附到金属盐颗粒上，接着将抗原吸附到另一种金属盐颗粒上，之后混合单独的金属颗粒，以形成疫苗。用于本发明的佐剂可为包含免疫刺激物的佐剂组合物，其吸附到金属盐颗粒上，特征在于金属盐颗粒基本没有其它抗原。此外，疫苗由本发明提供，特征在于免疫刺激物吸附到基本没有其它抗原的金属盐颗粒上，以及特征在于吸附抗原的金属盐颗粒基本没有其它免疫刺激物。

[0168] 因此，本发明提供含有免疫刺激物的佐剂制剂，其已吸附到金属盐颗粒上，特征在于组合物基本没有其它抗原。此外，该佐剂制剂可为中间体，如果使用这样的佐剂，则其是生产疫苗所必需的。因此，提供一种生产疫苗的方法，包括将为一种或多种吸附到金属颗粒上的免疫刺激物的佐剂组合物与抗原混合。任选地，抗原可预先吸附到金属盐上。所述金属盐可与吸附到免疫刺激物上的金属盐相同或相似。任选地，金属盐为铝盐，例如磷酸铝或氢氧化铝。

[0169] 本发明还提供一种疫苗组合物，其含有吸附到第一种金属盐颗粒上的免疫刺激物和吸附到金属盐上的抗原，其特征不在于第一种和第二种金属盐颗粒为单独的颗粒。

[0170] 本文描述的 LPS 或 LOS 衍生物或突变或脂质 A 衍生物设计得比天然脂多糖毒性低（例如 3D-MPL），就本文描述的这些部分的任何用途而言是可互换的等效物。

[0171] 在一个实施方案中，用于本发明的组合物的佐剂包含脂质载体（通过已知技术由磷脂（例如二油酰磷脂酰胆碱 [DOPC]）和任选的固醇 [例如胆固醇] 制备）。这些脂质载体可携带脂质 A 衍生物 [例如 3D-MPL，参见上文] 和 / 或皂苷（例如 QS21，参见上文）。在一个实施方案中，佐剂含有（每 0.5mL 剂量）0.1-10mg、0.2-7mg、0.3-5mg、0.4-2mg 或 0.5-1mg（例如 0.4-0.6mg、0.9-1.1mg、0.5mg 或 1mg）磷脂（例如 DOPC）；0.025-2.5mg、

0.05-1.5mg、0.075-0.75mg、0.1-0.3mg 或 0.125-0.25mg(例如 0.2-0.3mg、0.1-0.15mg、0.25mg 或 0.125mg) 固醇(例如胆固醇);5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL);以及 5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 皂苷(例如 QS21)。

[0172] 该佐剂尤其适合于老年疫苗制剂。在一个实施方案中,含有此佐剂的疫苗组合物包含来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并还可以包含来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的一种或多种糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或全部)疫苗组分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显劣于 **Prevnar®** 疫苗诱导的抗体效价。

[0173] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的佐剂包含由可代谢油(例如鲨烯)、乳剂(例如吐温 80)和任选的母亲育酚(例如 $\alpha$ 生育酚)制备的水包油乳剂。在一个实施方案中,佐剂含有(每 0.5mL 剂量)0.5-15mg、1-13mg、2-11mg、4-8mg 或 5-6mg(例如 2-3mg、5-6mg 或 10-11mg)可代谢油(例如鲨烯);0.1-10mg、0.3-8mg、0.6-6mg、0.9-5mg、1-4mg 或 2-3mg(例如 0.9-1.1mg、2-3mg 或 4-5mg)乳剂(例如吐温 80);和任选的 0.5-20mg、1-15mg、2-12mg、4-10mg、5-7mg(例如 11-13mg、5-6mg 或 2-3mg)母亲育酚(例如 $\alpha$ 生育酚)。

[0174] 该佐剂任选地还可以包含 5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

[0175] 这些佐剂尤其适合于婴儿或老年疫苗制剂。在一个实施方案中,含有此佐剂的疫苗组合物包含来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并还可以包含来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的一种或多种糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或全部)疫苗组分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显劣于 **Prevnar®** 疫苗诱导的抗体效价。

[0176] 该佐剂任选地可含有 0.025-2.5mg、0.05-1.5mg、0.075-0.75mg、0.1-0.3mg 或 0.125-0.25mg(例如 0.2-0.3mg、0.1-0.15mg、0.25mg 或 0.125mg) 固醇(例如胆固醇);5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL);和 5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 皂苷(例如 QS21)。

[0177] 该佐剂尤其适合于老年疫苗制剂。在一个实施方案中,含有此佐剂的疫苗组合物包含来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并还可以包含来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的一种或多种糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或全部)疫苗组分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显劣于 **Prevnar®** 疫苗诱导的抗体效价。

[0178] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的佐剂包含磷酸铝和脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。该佐剂可包含(每 0.5mL 剂量)100-750 $\mu$ g、200-500 $\mu$ g 或 300-400 $\mu$ g 为磷酸铝的 Al<sub>1</sub>,和 5-60 $\mu$ g、10-50 $\mu$ g 或 20-30 $\mu$ g(例如 5-15 $\mu$ g、40-50 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g、40 $\mu$ g 或 50 $\mu$ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

[0179] 该佐剂尤其适合于老年或婴儿疫苗制剂。在一个实施方案中,含有此佐剂的疫苗组合物包含来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、

7F( 并还可以包含来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的一种或多种糖缀合物), 其中在人类接种者中针对一种或多种( 或全部) 疫苗组分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显劣于 **Prevnar®** 疫苗诱导的抗体效价。

[0180] 通过将含有本发明的免疫原性组合物的疫苗制备物经系统或粘膜途径给药, 所述疫苗可用于保护或治疗对感染易感的哺乳动物。这些给药可包括经肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射; 或经粘膜给予至口 / 消化道、呼吸道、泌尿生殖道。鼻内给予疫苗有可能用于治疗肺炎或中耳炎( 由于能更有效地阻止肺炎链球菌的鼻咽携带, 因此能在其最早期减弱感染)。尽管本发明的疫苗可作为单剂给予, 但其组分也可以同时或在不同时间一起共给予( 例如肺炎链球菌糖缀合物可单独给予、同时给予或在给予疫苗的任何细菌蛋白组分之后 1-2 周给予, 用于彼此之间免疫应答的最佳协调)。对于共给予, 任选的 Th1 佐剂可存在于任意的或全部的不同给药中。除了单一给药途径之外, 还可使用 2 种不同的给药途径。例如, 糖或糖缀合物可 IM( 或 ID) 给予, 细菌蛋白可 IN( 或 ID) 给予。另外, 本发明的疫苗可 IM 给予初次剂量, IN 给予加强剂量。

[0181] 疫苗中的蛋白抗原的含量通常在 1-100  $\mu$ g 的范围内, 任选地为 5-50  $\mu$ g, 最通常在 5-25  $\mu$ g 的范围内。在初始接种后, 受试者可接受 1 次或数次足够间隔的加强免疫。

[0182] 疫苗制剂一般描述于 Vaccine Design( “Thesubunitandadjuvant approach” (Powell M. F. 和 Newman M. J. 编辑) (1995) Plenum Press New York)。在脂质体中的囊化描述于 Fullerton, 美国专利 4, 235, 877。

[0183] 本发明的疫苗或免疫原性组合物可储存在溶液中或冻干储存。在一个实施方案中, 溶液在用作无定形冻干保护剂的糖存在下冻干, 所述糖例如为蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖或乳糖。在一个实施方案中, 溶液在用作无定形冻干保护剂的糖和提供改善的块状结构的填充剂( 例如甘氨酸或甘露醇) 存在下冻干。晶体填充剂的存在允许在高盐浓度存在下缩短冻干周期。用于冻干本发明的免疫原性组合物或疫苗的这些混合物的实例包括蔗糖 / 甘氨酸、海藻糖 / 甘氨酸、葡萄糖 / 甘氨酸、甘露糖 / 甘氨酸、麦芽糖 / 甘氨酸、蔗糖 / 甘露醇 / 海藻糖 / 甘露醇、葡萄糖 / 甘露醇、甘露糖 / 甘露醇以及麦芽糖 / 甘露醇。典型地, 两种成分的摩尔比率任选地为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 或 1:6。本发明的免疫原性组合物任选地含有上述冻干试剂。

[0184] 上述稳定剂和稳定剂的混合物还可以包括能够增加制剂的玻璃化温度 ( $T_g'$ ) 的聚合物, 例如聚( 乙烯吡咯烷酮) (PVP)、羟乙基淀粉或葡聚糖, 或者用作晶体填充剂的聚合物, 例如聚乙二醇 (PEG), 例如具有 1500-6000 分子量的聚乙二醇, 和葡聚糖。

[0185] 本发明的免疫原性组合物任选地被冻干, 并在使用前临时重配。冻干可产生更稳定的组合物( 疫苗), 并在存在 3D-MPL 和没有基于铝的佐剂的情况下可能产生更高的抗体效价。

[0186] 在本发明的一个方面, 提供一种疫苗药盒, 其包括含有本发明的免疫原性组合物( 任选地为冻干形式) 的小瓶, 并还包括含有本文所述佐剂的小瓶。可预见的是, 在本发明的该方面, 佐剂将用于重配冻干的免疫原性组合物。

[0187] 尽管本发明的疫苗可通过任何途径给予, 但将所述疫苗给予到皮肤中 (ID) 构成了本发明的一个实施方案。人皮肤含有外“角状”表皮, 叫做角质层, 其覆盖表皮。在此表皮下面是叫做真皮的层, 其又覆盖皮下组织。研究者已表明, 将疫苗注射到皮肤中, 尤其是

真皮中,刺激免疫应答,其还可能与许多其它优势有关。用本文所述疫苗皮内接种构成了本发明的可选特征。

[0188] 皮内注射的常规技术“芒图操作 (mantoux procedure)”包括下述步骤:清洁皮肤,然后伸出一只手,使小号针(26-31号)的斜面朝上,以 $10-15^{\circ}$ 的角度将针插入。一旦针斜面被插入,就降低针管并前推,同时轻压使其在皮肤下抬高。然后将液体非常缓慢地注入,这样便在皮肤表面上形成一个大包或肿块,接着缓慢抽出针。

[0189] 近来,已描述了特别设计用于皮内或通过皮肤给予液体制剂的装置,例如在 W099/34850 和 EP1092444 中描述的装置,以及例如在 W001/13977、US5,480,381、US5,599,302、US5,334,144、US5,993,412、US5,649,912、US5,569,189、US5,704,911、US5,383,851、US5,893,397、US5,466,220、US5,339,163、US5,312,335、US5,503,627、US5,064,413、US5,520,639、US4,596,556、US4,790,824、US4,941,880、US4,940,460、W097/37705 和 W097/13537 中描述的喷射注射装置。疫苗制剂的真皮内给药替代方法可包括常规注射器和针,或设计用于固体疫苗的弹道式给药的装置(W099/27961),或透皮贴剂(W097/48440;W098/28037);或皮肤表面给药(经真皮或经皮传送,W098/20734;W098/28037)。

[0190] 当本发明的疫苗给予皮肤时,或更具体地说给予到真皮中时,疫苗为小液体体积,具体地说为约 0.05ml 至 0.2ml 的体积。

[0191] 本发明皮肤或皮内疫苗中的抗原含量可类似于肌内疫苗中存在的常规剂量(参见上文)。然而,皮肤或皮内疫苗的一个特点是制剂可以为“低剂量”。因此,“低剂量”疫苗中的蛋白抗原任选地以低至每剂 0.1-10  $\mu$ g 或 0.1-5  $\mu$ g 存在;糖(任选缀合的)抗原可以每剂 0.01-1  $\mu$ g 或 0.01-0.5  $\mu$ g 糖存在。

[0192] 此处所用的术语“皮内传送”是指将疫苗给至皮肤的真皮区域。然而,疫苗不一定定位于真皮内。真皮层是距离人体皮肤表面约 1.0mm 至约 2.0mm 的皮层,但个体之间和机体的不同部位之间存在一定量的差异。一般地,预计疫苗可以通过进入皮肤表面下 1.5mm 达到真皮层。真皮位于在表面的角质层和表皮与下面的皮下层之间。根据给药模式,可以使疫苗最终仅存在于或主要存在于真皮内,或最终可分布于表皮和真皮内。

[0193] 本发明还通过加入为游离或缀合形式的流感嗜血菌蛋白如 D 蛋白提供预防或减轻流感嗜血菌所致中耳炎的改良疫苗。另外,本发明还通过依靠向本发明的肺炎链球菌缀合物加入为游离或缀合蛋白的一种或两种肺炎链球菌蛋白提供在婴儿中预防或减轻肺炎链球菌感染(例如中耳炎)的改良疫苗。所述肺炎链球菌游离蛋白可与用作载体蛋白的任何肺炎链球菌蛋白相同或不同。一种或多种卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)蛋白抗原也可以游离或缀合形式包含在联合疫苗中。因此,本发明为在婴儿中激发抵御中耳炎的(保护性)免疫应答的改良方法。

[0194] 在另一个实施方案中,本发明为通过给予安全有效量的本发明疫苗[儿科疫苗]在婴儿(在本发明背景下定义为 0-2 岁)中激发(保护性)免疫应答的改良方法。此外,本发明的实施方案包括提供用于药物的本发明的抗原性肺炎链球菌缀合物以及本发明的肺炎链球菌缀合物在制造用于预防(或治疗)肺炎链球菌疾病的药物中的用途。

[0195] 在又一个实施方案中,本发明为通过给予安全有效量的本发明疫苗,任选地连同一种或两种作为游离或缀合蛋白存在的肺炎链球菌蛋白,在老年人群(在本发明背景下患



者如果为 50 岁或以上、通常超过 55 岁以及更通常超过 60 岁,则被视为老年人)中激发(保护性)免疫应答的改良方法,所述游离的肺炎链球菌蛋白可与用作载体蛋白的任何肺炎链球菌蛋白相同或不同。

[0196] 本发明的又一方面是免疫人类宿主抵御肺炎链球菌和任选地流感嗜血菌感染所致疾病的方法,该方法包括给予宿主免疫保护剂量的 本发明的免疫原性组合物或疫苗或药盒。

[0197] 本发明的又一方面为用于治疗或预防肺炎链球菌和任选地流感嗜血菌感染所致疾病的免疫原性组合物。

[0198] 本发明的又一方面为本发明的免疫原性组合物或疫苗或药盒在制造用于治疗或预防肺炎链球菌和任选的流感嗜血菌感染所致疾病的药物中的用途。

[0199] 在所有情况下,本发明人都意欲用术语“由……组成”分别任选地取代本文的术语“包含”、“含有”和“包括”。

[0200] 涉及本发明的“疫苗组合物”的本文的实施方案也适用于与本发明的“免疫原性组合物”相关的实施方案,反之亦然。

[0201] 在本专利说明书中提及的所有参考文献或专利申请都通过引用结合到本文中。

[0202] 为了可更好地理解本发明,提供以下实施例。这些实施例仅是为了阐述目的,无意以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

[0203] 实施例 1 :D 蛋白的表达

[0204] 流感嗜血菌 D 蛋白

[0205] 用于 D 蛋白表达的遗传构建

[0206] 起始物质

[0207] 编码 D 蛋白的 DNA

[0208] D 蛋白在所有血清型以及非分型的流感嗜血菌菌株中都高度保守。含有整个 D 蛋白基因编码 DNA 序列的载体 pHIC348 由 A. Forsgren 博士, Department of Medical Microbiology, University of Lund, **Malmö** General Hospital, **Malmö**, Sweden 处获得。D 蛋白的 DNA 序列由 Janson 等, (1991) *Infect. Immun.* 59:119-125 发表。

[0209] 表达载体 pMG1

[0210] 表达载体 pMG1 为 pBR322 衍生物 (Gross 等, 1985), 其中导入了来源于噬菌体  $\lambda$  的控制元件, 该控制元件用于外源插入基因的转录和翻译 (Shatzman 等, 1983)。此外, 氨苄青霉素抗性基因被替换成卡那霉素抗性基因。

[0211] 大肠杆菌菌株 AR58

[0212] 用预先在 SA500 衍生物 (galE::TN10,  $\lambda$  Ki1<sup>-</sup>cI857  $\Delta$ H1) 中生长的 P1 噬菌体原液转导 N99 产生大肠杆菌菌株 AR58。N99 和 SA500 为大肠杆菌 K12 菌株, 得自国立卫生研究所 (NIH) 的 Martin Rosenberg 博士实验室。

[0213] 表达载体 pMG1

[0214] 为生产 D 蛋白, 将编码该蛋白的 DNA 克隆到表达载体 pMG1 中。该质粒使用  $\lambda$  噬菌体 DNA 的信号来驱动插入的外源基因的转录和翻译。该载体含有启动子 PL、操纵子 OL 和

2 个可用位点 (NutL 和 NutR), 从而在提供 N 蛋白时缓解转录极性效应 (Gross 等, 1985)。将含有 PL 启动子的载体引入一种大肠杆菌溶原性宿主, 以稳定质粒 DNA。溶原性宿主菌株含有整合到基因组中的复制缺陷型  $\lambda$  噬菌体 DNA (Shatzman 等, 1983)。染色体中的  $\lambda$  噬菌体 DNA 可引导 cI 阻抑蛋白的合成, cI 蛋白结合载体的 O<sub>L</sub> 阻抑物, 阻止 RNA 聚合酶与 PL 启动子结合, 从而防止插入基因转录。表达菌株 AR58 的 cI 基因含有温度敏感性突变, 使得可通过温度变化来调控 PL 引导的转录, 即提高培养温度可使阻抑物失活, 并开始合成外源蛋白。该表达系统可使外源蛋白 (尤其是可能对细胞有毒性的那些外源蛋白) 受控合成 (Shimatata 和 Rosenberg, 1981)。

[0215] 大肠杆菌菌株 AR58

[0216] 用于产生 D 蛋白载体的 AR58 溶原性大肠杆菌菌株为标准 NIH 大肠杆菌 K12 菌株 N99 (F<sup>-</sup>su<sup>-</sup>galK2, lacZ<sup>-</sup>thr<sup>-</sup>) 的衍生物。它含有缺陷型溶原性  $\lambda$  噬菌体 (galE::TN10,  $\lambda$  Ki1<sup>-</sup>cI857  $\Delta$  H1)。Ki1<sup>-</sup> 表型防止宿主停止合成大分子。cI857 突变赋予 cI 阻抑物温度敏感性损伤。 $\Delta$  H1 缺失去除  $\lambda$  噬菌体的右侧操纵子以及宿主的 bio、uvr3 和 chlA 基因座。用预先在 SA500 衍生物 (galE::TN10,  $\lambda$  Ki1<sup>-</sup>cI857  $\Delta$  H1) 中生长的 P1 噬菌体原液转导 N99 产生 AR58 菌株。由于 galE 基因附近存在编码四环素抗性的 TN10 转座子, 因而可利用四环素对 N99 中缺陷型溶菌原的导入情况进行选择。

[0217] 载体 pMGMDPPrD 的构建

[0218] 使用含有流感病毒非结构 S1 蛋白编码基因的 pMG1 载体 (pMGNS1) 构建 pMGMDPPrD。利用在 5' 和 3' 端分别含有 NcoI 与 XbaI 限制位点的 PCR 引物经 PCR 由 pHIC348 载体 (Janson 等, 1991, Infect. Immun. 59:119-125) 扩增 D 蛋白基因。然后将 NcoI/XbaI 片段引入到 pMGNS1 的 NcoI 与 XbaI 之间, 由此产生含有 NS1 蛋白的 N 端 81 个氨基酸并后接 PD 蛋白的融合蛋白。该载体称为 pMGNS1PrD。

[0219] 基于上述构建体产生用于 D 蛋白表达的最终构建体。从 pMGNS1PrD 中去除 BamHI/BamHI 片段。该 DNA 水解反应去除除前 3 个 N 端残基之外的 NS1 编码区。在该载体重新连接时, 产生编码具有以下 N 端氨基酸序列的融合蛋白的基因:

[0220] -----MDPSSHSSNMANT-----

[0221] NS1 D 蛋白

[0222] D 蛋白不含有前导肽或通常连接有脂链的 N 端半胱氨酸。因此, 该蛋白不会被分泌到周质中, 也不会被脂化, 而是以可溶形式保留在细胞质中。

[0223] 通过于 37°C 热激将最终构建体 pMG-MDPPrD 导入到 AR58 宿主菌株中。在卡那霉素存在下选择含有质粒的细菌。用选定的内切核酸酶消化分离的质粒 DNA 来证实编码 DNA 插入序列的 D 蛋白的存在。重组的大肠杆菌菌株称为 ECD4。

[0224] D 蛋白的表达处于  $\lambda$  P<sub>L</sub> 启动子 / O<sub>L</sub> 操纵子控制之下。宿主菌株 AR58 的基因组中含有温度敏感性 cI 基因, 该基因在低温下可通过与 O<sub>L</sub> 结合来阻断由  $\lambda$  P<sub>L</sub> 启动的表达。一旦温度提高, cI 就由 O<sub>L</sub> 释放, D 蛋白得以表达。

[0225] 小规模制备

[0226] 在发酵结束时, 可将细胞浓缩并冷冻。

[0227] 如下进行收集细胞的提取和 D 蛋白纯化。将冷冻的细胞培养物解冻, 并重悬于细胞裂解液 (柠檬酸盐缓冲液, pH6.0) 中, 使最终 OD<sub>650</sub> = 60。使该悬浮液两次流经 P =

1000bar 的高压匀浆器。通过离心澄清细胞培养物匀浆,并过滤去除细胞碎片。在第一个纯化步骤中,将过滤的裂解物上样于阳离子交换层析柱 (SPSephарoseFastFlow)。PD 可通过离子作用与凝胶基质结合,并可通过增加洗脱缓冲液的离子强度的步骤洗脱 PD。

[0228] 在第二个纯化步骤中,杂质保留在阴离子交换基质 (QSepарose FastFlow) 上。PD 未结合到凝胶上,并可收集在流出物中。

[0229] 两个柱层析步骤均利用 OD 监测分部收集物。通过超滤浓缩含有纯化的 D 蛋白的阴离子交换柱层析的流出物。

[0230] 最后,使含有 D 蛋白的超滤保留物通过 0.2 μm 膜。

[0231] 大规模制备

[0232] 如下进行收集细胞的提取和 D 蛋白的纯化。冷却收集的培养液,并直接通过约 800bar 压力的高压匀浆器 2 次。

[0233] 在第一个纯化步骤中,稀释细胞培养物匀浆物,并上阳离子交换层析柱 (SPSephарoseBigbeads)。PD 通过离子作用结合凝胶基质,通过增加洗脱缓冲液的离子强度的步骤洗脱 PD,并过滤。

[0234] 在第二个纯化步骤中,杂质保留在阴离子交换基质 (QSepарose FastFlow) 上。PD 未结合到凝胶上,并可收集在流出物中。

[0235] 两个柱层析步骤均利用 OD 监测分部收集物。通过超滤浓缩并渗滤含有纯化的 D 蛋白的阴离子交换柱层析的流出物。

[0236] 最后,使含有 D 蛋白的超滤保留物通过 0.2 μm 膜。

[0237] 实施例 1b :PhtD 的表达

[0238] PhtD 蛋白是肺炎链球菌组氨酸三联体 (Pht) 蛋白家族的成员,其特征存在于存在组氨酸三联体 (HXXHXH 基序)。PhtD 是 838 个氨基酸的分子,具有 5 个组氨酸三联体 (参见 MedImmuneW000/37105SEQIDNO:4 的氨基酸序列和 SEQIDNO:5 的 DNA 序列)。PhtD 还在中部 (氨基酸位置 348-380) 含有富集脯氨酸的区域。PhtD 具有 20 个氨基酸的 N 末端信号序列和 LXXC 基序。

[0239] 遗传构建体

[0240] 使用携带 pλ 启动子的自制 pTCMP14 载体将成熟的 MedImmune PhtD 蛋白 (由氨基酸 21 至氨基酸 838) 的基因序列重组转移到大肠杆菌中。大肠杆菌宿主菌株为 AR58,其携带 cI857 热敏感性阻抑物,允许热诱导启动子。

[0241] 实施聚合酶链式反应,以由 MedImmune 质粒扩增 phtD 基因 (携带肺炎链球菌菌株 Norway4 (血清型 4) 的 phtD 基因 - 如在 W000/37105 中所述的 SEQIDNO:5)。仅对 phtD 基因特异性的引物用于扩增两个片段中的 phtD 基因。引物携带 NdeI 和 KpnI 限制位点或 KpnI 和 XbaI 限制位点。这些引物不与该载体的任何核苷酸杂交,而是仅与 phtD 特异性基因序列杂交。使用携带 NdeI 限制位点的第一个引物插入人工 ATG 起始密码子。然后将产生的 PCR 产物插入到 pGEM-T 克隆载体 (Promega) 中,并检验 DNA 序列。然后使用标准技术在 TCMP14 表达载体中实现片段亚克隆,并将载体转化入 AR58 大肠杆菌中。

[0242] PhtD 纯化

[0243] 如下实现 PhtD 纯化:

[0244] □在卡那霉素存在下大肠杆菌细胞的生长:于 30°C 生长 30 小时,然后于 39.5°C 温

育 18 小时。

[0245] □在作为蛋白酶抑制剂的 5mMEDTA 和 2mMPMSF 存在下以 OD±115 由完整培养物破碎大肠杆菌细胞;Rannie, 2 次通过, 1000bar。

[0246] □于室温 (20° C) 用膨胀床模式 StreamlineQXL 层析去除抗原捕获物和细胞碎片;柱子用 NaCl150mM + Empigen0.25%pH6.5 洗涤, 并用 NaCl400mM + Empigen0.25% 的 25mM 磷酸钾缓冲液 pH7.4 溶液洗脱。

[0247] □用 Sartobran150 滤器 (0.45 + 0.2 μ m) 过滤。

[0248] □在 5mM 咪唑存在下于 4°C 抗原结合在螯合 Zn<sup>++</sup> 的 SepharoseFFIMAC 层析柱 pH7.4 上;该柱用 5mM 咪唑和 1%Empigen 洗涤, 并用 50mM 咪唑洗脱, 二者均在 25mM 磷酸钾缓冲液 pH8.0 中。

[0249] □以阳离子模式在 FractogelEMDDEAEpH8.0 (25mM 磷酸钾) 上于 4°C 进行弱阴离子交换层析;该柱用 140mMNaCl 洗涤, 并用 200mMNaCl 洗脱, 同时杂质 (蛋白和 DNA) 仍吸附在交换剂上。

[0250] □用 50kDa 膜以 2mM 磷酸钠 / 钾 pH7.15 浓缩和超滤。

[0251] □纯化的半成品经 0.2 μ mMillipak-20 滤器除菌过滤。

[0252] 实施例 1c :肺炎链球菌溶血素的表达

[0253] 如在 W02004/081515 和 W02006/032499 中所述制备和解毒肺炎链球菌性肺炎链球菌溶血素。

[0254] 实施例 2:

[0255] 缀合物的制备

[0256] 在本领域众所周知如何制备纯化的肺炎链球菌多糖。就这些实施例而言, 多糖基本如 EP072513 所述制备, 或者通过紧密相关的方法制备。在缀合前, 多糖可通过如下所述的微流化调整大小。

[0257] 活化和偶联条件对每一种多糖都是特异性的。这些条件在表 1 中给出。将调整过大小的多糖 (PS5、6B 和 23F 除外) 溶解在 2MNaCl、0.2MNaCl 或注射用水 (WFI) 中。评估所有血清型的最佳多糖浓度。除血清型 18C 之外的所有血清型都如下详述与载体蛋白直接缀合。产生 2 种替代血清型 22F 缀合物, 1 种直接缀合, 1 种通过 ADH 接头缀合。

[0258] 将 100mg/mlCDAP 在乙腈或乙腈 / 水 50%/50% 溶液中的母液 (CDAP/PS 比率为 0.5-1.5mg/mgPS) 加入多糖溶液。1.5 分钟后, 加入 0.2M-0.3MNaOH, 以获得特定活化 pH。在此 pH 于 25° C 在 3 分钟内进行多糖的活化。将纯化的蛋白 (D 蛋白、PhtD、肺炎链球菌溶血素或 DT) (其量取决于初始 PS/ 载体蛋白的比值) 加入活化的多糖中, 在该特定 pH 于 pH 调节下进行偶联反应达 2 小时 (取决于血清型)。为了猝灭未反应的氰酸酯基团, 然后将 2M 甘氨酸溶液加入混合物。调节 pH 至猝灭 pH(pH9.0)。于 25°C 搅拌溶液 30 分钟, 然后在持续的缓慢搅拌下于 2-8° C 过夜。

[0259] 18C 的制备:

[0260] 18C 经接头己二酸二酰肼 (ADH) 与载体蛋白连接。多糖血清型 18C 在缀合前被微流化。

[0261] 用 EDAC 衍生化破伤风类毒素

[0262] 为衍生化破伤风类毒素, 用 0.2MNaCl 将纯化的 TT 稀释至 25mg/ml, 加入 ADH 间隔

臂,以便达到 0.2M 终浓度。当间隔臂完全溶解时,将 pH 调节至 6.2。然后加入 EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺),以达到 0.02M 终浓度,在 pH 调节下搅拌混合物 1 小时。通过于 25° C 增加 pH 至 9.0 达至少 30 分钟终止缩合反应。

[0263] 然后渗滤衍生化的 TT(10kDaCO 膜),以便去除残余的 ADH 和 EDAC 试剂。

[0264] 最后除菌过滤 TT<sub>AH</sub> 半成品,直至偶联步骤,并储存于 -70° C。

[0265] TT<sub>AH</sub> 与 PS18C 的化学偶联

[0266] 详细的缀合参数可见于表 1。

[0267] 以限定的浓度用水稀释 2g 微流化 PS,并通过加入 NaCl 粉末调节至 2MNaCl。

[0268] 加入 CDAP 溶液(100mg/ml,在 50/50 体积/体积乙腈/WFI 中新鲜制备),以达到适宜的 CDAP/PS 比率。

[0269] 通过加入 0.3MNaOH 将 pH 升高至活化 pH9.0,并在此 pH 稳定,直至加入 TT<sub>AH</sub>。

[0270] 3 分钟后,加入衍生化的 TT<sub>AH</sub>(20mg/ml 的 0.2MNaCl 溶液),以使 TT<sub>AH</sub>/PS 比率达到 2;将 pH 调节至偶联 pH9.0。在 pH 调节下静置溶液 1 小时。

[0271] 对于猝灭,向混合物 PS/TT<sub>AH</sub>/CDAP 加入 2M 甘氨酸溶液。

[0272] 调节 pH 至猝灭 pH(pH9.0)。

[0273] 溶液于 25°C 搅拌 30 分钟,然后在连续缓慢搅拌下于 2-8° C 静置过夜。

[0274] PS22F<sub>AH</sub>-PhtD 缀合物

[0275] 在用于该糖的第二种缀合方法(第一种为表 1 中显示的直接 PS22-PhtD 缀合方法)中,22F 与载体蛋白经接头己二酸二酰肼(ADH)连接。多糖血清型 22F 在缀合前被微流化。

[0276] PS22F 衍生化

[0277] 活化和偶联在连续搅拌下于 25°C 在控温水浴中进行。

[0278] 稀释微流化的 PS22F,以获得在 0.2MNaCl 中 6mg/ml 的最终 PS 浓度,用 0.1NHCl 将该溶液调节至 pH6.05±0.2。

[0279] 加入 CDAP 溶液(100mg/ml,在 50/50 的乙腈/WFI 中新鲜制备),以达到适宜的 CDAP/PS 比率(1.5/1 重量/重量)。

[0280] 通过加入 0.5MNaOH 将 pH 升高至活化 pH9.00±0.05,并稳定在此 pH,直至加入 ADH。

[0281] 3 分钟后,加入 ADH,以达到适宜的 ADH/PS 比率(8.9/1 重量/重量);将 pH 调节至偶联 pH9.0。在 pH 调节下静置溶液 1 小时。

[0282] 浓缩并渗滤 PS<sub>AH</sub> 衍生物。

[0283] 偶联

[0284] 向 PS22F<sub>AH</sub> 衍生物加入 10mg/ml 在 0.2MNaCl 中的 PhtD,以便达到 4/1(重量/重量)的 PhtD/PS22F<sub>AH</sub> 比率。用 HCl 将 pH 调节至 5.0±0.05。在 10 分钟内(250 μ l/分钟)手动加入 EDAC 溶液(20mg/ml 的 0.1MTris-HCl 溶液, pH7.5),以达到 1mgEDAC/mgPS22F<sub>AH</sub>。所获溶液在搅拌和 pH 调节下于 25°C 温育 150 分钟(尽管也可以使用 60 分钟)。通过加入 1MTris-HClpH7.5(1/10 终体积)中和溶液,并于 25° C 静置 30 分钟。

[0285] 在 SephacrylS400HR 上洗脱前,使用 5 μ mMinisart 滤器澄清缀合物。

[0286] 获得的缀合物具有 4/1(重量/重量)的最终 PhtD/PS 比率,游离 PS 含量在 1% 以

下,抗原性 ( $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS) 为 36.3%,抗 PhtD 抗原性为 7.4%。

[0287] 缀合物的纯化:

[0288] 使用用 0.15MNaCl (对于 18C 为 S500HR) 平衡的 Sephacryl S400HR 凝胶过滤柱通过凝胶过滤柱纯化缀合物,以去除小分子 (包括 DMAP) 和未缀合的 PS 和蛋白。基于反应组分的不同分子量大小,首先洗脱出 PS-PD、PS-TT、PS-PhtD、PS-肺炎链球菌溶血素或 PS-DT 缀合物,之后洗脱出游离 PS,然后洗脱出游离 PD 或游离 DT,最后洗脱出 DMAP 和其它盐 (NaCl、甘氨酸)。

[0289] 含有缀合物的级分通过  $UV_{280nm}$  检测。按照其  $K_d$  合并级分,除菌过滤 (0.22  $\mu$ m),并储存于 +2-8 $^{\circ}$ C。测定缀合制备物中的 PS/蛋白比率。

[0290] PS 肺炎链球菌 -D 蛋白 /TT/DT/PhtD/Plv 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0291] 其中出现在行标题中的“ $\mu$ fluid”表示糖在缀合前通过微流化调整大小。微流化后的糖的尺寸在表 2 中给出。

[0292] 表 1 PS 肺炎链球菌 -D 蛋白 /TT/DT/PhtD/Plv 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0293]

血清型	1 $\mu$ fluid	4 $\mu$ fluid	5	6A	6B	7F $\mu$ fluid
PS 浓度 (mg/ml)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS 溶解	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
初始 PD/PS 比 率(重量/重量)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
$pH_a = pH_c =$ $pH_g$	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

[0294]

血清型	9V μfluid	14 μfluid	18C μfluid	19A μfluid	19F μfluid	22F μfluid	23F
PS 浓度(mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0(TT)	10.0(Ply)	20.0(DT)	10.0(PhTD)	5.0
初始载体蛋白 /PS 比率(重量/ 重量)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH <sub>a</sub> = pH <sub>c</sub> = pH <sub>q</sub>	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

[0295] 备注 :pH<sub>a</sub>、c、q 分别对应于活化 pH、偶联 pH 和猝灭 pH。

[0296] 鉴定 :

[0297] 对每一缀合物进行鉴定,它们都符合表 2 中描述的标准。用 Resorcinol 检测法检测多糖含量 (μg/ml),用 Lowry 检测法检测蛋白含量 (μg/ml)。用浓度比值确定最终的 PS/PD 比值 (重量 / 重量)。

[0298] 游离多糖含量 (%) :

[0299] 将缀合物与 α-载体蛋白抗体和饱和硫酸铵温育,之后离心,得到上清液,确定该上清液保持于 4° C 或在 37° C 储存 7 天时缀合物的游离多糖含量。

[0300] 用 α-PS/α-PSELISA 定量上清液中的游离多糖。没有缀合物也通过 α-载体蛋白 /α-PSELISA 控制。

[0301] 抗原性 :

[0302] 用夹心型 ELISA 分析同一缀合物的抗原性,其中捕获抗体和检测抗体分别为 α-PS 和 α-蛋白。

[0303] 游离蛋白含量 (%) :

[0304] 未缀合的载体蛋白可在纯化步骤中由缀合物分离。游离的残余蛋白的含量使用大小排阻层析 (TSK5000-PWXL) 继之以 UV 检测 (214nm) 来测定。洗脱条件允许分离游离载体蛋白和缀合物。然后相对于校准曲线 (由 0 至 50 μg/ml 载体蛋白) 测定缀合物原液中的游离蛋白含量。游离载体蛋白 % 如下获得 :% 游离载体 = (游离载体 (μg/ml) / (通过 Lowry 法检测的对应载体蛋白的总浓度 (μg/ml) \* 100%)。

[0305] 稳定性 :

[0306] 对于保持于 4° C 和于 37° C 储存 7 天的缀合物,用 HPLC-SEC 凝胶过滤 (TSK5000-PWXL) 检测分子量分布 (K<sub>av</sub>) 和稳定性。

[0307] 10/11/13/14 价特征在表 2 中给出 (参见其下的注释)。

[0308] 蛋白缀合物可吸附到磷酸铝上,并合并,以形成最终疫苗。

[0309] 结论 :

[0310] 已生产出免疫原性缀合物,以后表明其为有前景的疫苗的组分。

[0311] 表 2- 缀合物的表征

[0312]

缀合物	PS 大小 (Dax10 <sup>3</sup> )	载体/PS 比率	游离 PS (Elisa)	游离载体	PS 抗原性 (Elisa)	缀合物大 小(kDa)
PS1-PD	349-382*	1.5-1.6	1.0%-1.2%	3.9%-4.8%	87%-95%	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7-6.5%	3.2%-4.0%	90%-96%	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0.80	8.7-11.2%	2.2%-3.8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0.61	4.5%	未进行	45.9%	未进行
PS6B-PD***	1069-1391	0.7-0.8	1.3-1.6%	<2.0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430-3779
PS18C-TT <sup>-</sup>	89-97*	2.2-2.4	1.5-2.2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3.2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1.4-1.5	4.1%-5.9%	<1.2%-<1.3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2.17	5.8	未进行	37%	未进行
PS22F-AHPhtD*159-167		3.66-4.34	<1%	未进行	未进行	未进行
PS23F-PD***	914-980	0.5	1.4-1.9%	3.7%-4.9%	137%-154%	2933-3152

\* 天然 PS 微流化后的 PS 大小

[0313]

[0314] 通过混合血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 缀合物（例如以每份人剂量分别 1、3、1、1、1、1、1、3、3、1 μg 糖的剂量）制备 10 价疫苗。通过又加入表 5 的血清型 3 缀合物（例如以每份人剂量 1 μg 糖）制备 11 价疫苗。通过又加入以上的血清型 19A 和 22F 缀合物（22F 直接连接至 PhtD，或者通过 ADH 接头连接）[例如以每份人剂量各 3 μg 糖的剂量] 制备 13 价疫苗。可以通过又加入以上的血清型 6A 缀合物 [例如以每份人剂量 1 μg 糖的剂量] 制备 14 价疫苗。实施例 3：在本发明的免疫原性组合物中包含流感嗜血菌 D 蛋白的证据可提供抵御急性中耳炎 (AOM) 的改善的保护作用

[0315] 研究设计

[0316] 研究使用 11Pn-PD 疫苗，其含有血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F，每种血清型均缀合流感嗜血菌的 D 蛋白（参阅实施例 4 中的表 5）。将受试者随机分为 2 组，以在约 3、4、5 和 12-15 月龄时接受 4 剂 11Pn-PD 疫苗或 Havrix。所有受试者都在 3、4 和 5 月龄时伴随接受 GSK 生物制品公司的 Infanrix-hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib) 疫苗。Infanrix-hexa 是在给药前混合的 Pediarix 和 Hib 的组合。在给予第 3 剂疫苗后 2 周开始“依照方案”的随访效力分析，并持续至 24-27 月龄。在选定的受试者亚组中评价肺炎链球菌和流感嗜血菌的鼻咽携带情况。

[0317] 如果孩子生病、耳痛、鼓膜自发穿孔或自发耳溢液，则建议孩子的双亲咨询研究者。如果研究者怀疑 AOM 事件，则立即将孩子转移至耳鼻喉 (ENT) 专业医师处证实诊断结



果。

[0318] AOM 的临床诊断基于目测鼓膜外观（即发红、膨胀、失去光反射）或存在中耳液体渗漏（通过简易耳镜或气式耳镜或通过显微镜证实）。另外，必须存在以下几项体征或症状中的至少两种：耳痛、耳溢液、听力丧失、发烧、嗜睡、过敏、食欲不振、呕吐或腹泻。如果 ENT 专业医师证实临床诊断结果，则通过鼓膜穿刺术收集中耳液的标本进行细菌学检验。

[0319] 对于因复发疾病就诊的受试者，如果自先前的事件开始以后已过去了 30 天以上，则认为新的 AOM 事件已开始。另外，如果分离的细菌 / 血清型不同于先前的分离株，则 AOM 事件被认为是新细菌事件，无论两个联系事件之间的间隔是多少。

[0320] 试验结果

[0321] 招募了总共 4968 名婴儿，11Pn-PD 组中 2489 名，对照组中 2479 名。两组之间的个人背景特征或风险因素没有显著差异。

[0322] 临床事件和 AOM 病例定义

[0323] 在依照方案的随访期当中，在 11Pn-PD 组中记录到总共 333 件临床 AOM 事件，在对照组中记录到 499 件。

[0324] 表 3 提供了 11Pn-PD 疫苗和先前在芬兰测试的两种 7 价疫苗 (Eskola 等, NEngl J Med 2001 ;344:403-409 和 Kilpi 等, Clin Infect Dis 2003;37:1155-64) 抗任何 AOM 事件和由不同肺炎链球菌血清型、流感嗜血菌、NTHi 和卡他莫拉菌 (*M. catarrhalis*) 所致的 AOM 的保护效力。采用 11Pn-PD, 统计学显著性和临床相关性降低至整体 AOM 疾病负荷的 33.6%, 与病因无关 (表 3)。

[0325] 归于 11Pn-PD 疫苗中包含的 11 种肺炎链球菌血清型中的任一种的抗 AOM 事件的整体效力为 57.6% (表 3)。

[0326] 该研究的另一个重要发现是由 11Pn-PD 疫苗提供的抗流感嗜血菌所致 AOM 的 35.6% 的保护作用 (具体地说由 NTHi 提供 35.3% 的保护作用)。该发现具有重要的临床意义, 给出了在肺炎链球菌缀合物接种世代作为 AOM 主因的流感嗜血菌的重要性增加。与抗 AOM 提供的保护作用相一致, 11Pn-PD 疫苗也降低了在生命的第 2 年在加强剂量后的流感嗜血菌的鼻咽携带情况。这些发现与先前在芬兰的观察结果相反, 在芬兰, 对于两种 7 价肺炎链球菌缀合疫苗, 观察到归因于流感嗜血菌的 AOM 事件增加, (Eskola 等和 Kilpi 等), 以病因取代之证。

[0327] 在归于 Hi 的抗 AOM 事件的保护作用与抗载体蛋白 D 的抗体水平之间不能建立清晰关联, 因为在仍无 HiAOM 事件的 11Pn-PD 接种者中的初免后抗 PD IgG 抗体浓度与在效力随访期当中发展出至少一种 HiAOM 事件的 11Pn-PD 接种者中的初免后抗 PD IgG 抗体水平基本相同。然而, 尽管在疫苗的生物影响和初免后 IgG 抗 PD 免疫原性之间不能建立关联, 但可以合理地假定在流感嗜血菌之间高度保守的 PD 载体蛋白较大程度地有助于诱导抗 Hi 的保护作用。

[0328] 对 AOM 疾病的作用伴随着对鼻咽携带的作用, 后一作用对于疫苗血清型肺炎链球菌和流感嗜血菌具有相似的程度 (图 1)。在 PD 缀合物接种者中流感嗜血菌的鼻咽携带情况的这种下降支持以下假设: PD 缀合疫苗具有抗流感嗜血菌的直接保护作用, 即便这种保护作用与通过 ELISA 检测的抗 PD IgG 免疫应答没有关联。

[0329] 在以下的试验中, 使用栗鼠中耳炎模型和用该实施例的 11 价制剂或实施例 2 的 10

价疫苗（另参见表 1 和 2 及其下的备注）免疫的婴儿的血清合并液。两种合并液诱导的患有中耳炎的动物百分率显著低于免疫前血清合并液。在 10 价和 11 价免疫合并液之间没有显著差异。这表明两种疫苗在该模型中诱导抗非分型流感嗜血菌所致中耳炎的保护作用的潜力相似。

表 3

AOM 事件类型	11Pn-PD					在 FinOM 中的 Prevnar <sup>(Eschols*)</sup>					在 FinOM 中的 7v-OMP <sup>(Kamp*)</sup>				
	n		VE			n		VE			n		VE		
	11Pn-PD	对照	%	95%CI		7v-CRM	对照	%	95%CI		7v-OMP	对照	%	95%CI	
			LL	UL				LL	UL				LL	UL	
N	2455	2452				786	794				805	794			
任何 AOM	333	499	33.6	20.8	44.3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10
具有 MEF 的任何 AOM	322	474	32.4	19.0	43.6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10
证实为肺炎链球菌的培养物	92	189	51.5	36.8	62.9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37
疫苗肺炎链球菌血清型(*)	60	141	57.6	41.4	69.3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66
其它细菌病原体															
流感嗜血菌	44	68	35.6	3.8	57.0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10
非分型流感嗜血菌 (NTHI)	41	63	35.3	1.8	57.4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NC	NP	NP
卡他莫拉菌	31	34	9.4	-52.5	46.1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2

NP = 未公开; N = 在 ATP 效力队列中的受试者数目; n = 事件数目

\*疫苗肺炎链球菌血清型: 对于 11Pn-PD = 11 种血清型, 对于 Prevnar 和 7v-OMP = 7 种血清型

MEF = 中耳液体

[0330] 实施例 4 :

[0331] 用于血清型 19F 的载体蛋白的选择

[0332] 使用的 ELISA 测定

[0333] 22F 抑制 ELISA 方法基本上基于 Concepcion 和 Frascch 在 2001 年所提出的测定, 并由 Henckaerts 等, 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360 报道。简而言之, 纯化的肺炎链球菌多糖与甲基化人血清白蛋白混合, 并于 4° C 过夜吸附到 NuncMaxisorp<sup>TM</sup> (Roskilde, DK) 高结合免疫滴定板。该板用 10% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 溶液在搅拌下于室温封闭 1 小时。血清样品用含 10%FBS、10 μg/mL 细胞壁多糖 (SSI) 和 2 μg/mL 肺炎链球菌多糖血清型 22F (ATCC) 的 PBS 稀释, 并在微量滴定板上用相同缓冲液进一步稀释。以相同方式处理内标并纳入每块板, 内标在 89-SF 中使用血清型特异性 IgG 浓度对标准血清 89-SF 校准。在洗涤后, 使用缀合过氧化物酶的抗人 IgG 单克隆抗体 (StratechScientific Ltd., Soham, UK) 检测结合抗体, 所述单克隆抗体用 10%FBS (在 PBS 中) 稀释, 并在搅拌下于室温温育 1 小时。使用现成的单组分四甲基联苯胺过氧化物酶免疫测定底物试剂盒 (BioRad, Hercules, CA, US) 在暗室中于室温显色。用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M 终止反应, 于 450nm 读取光密度。通过参比内标血清曲线的限定限度内的光密度点计算样品中血清型特异性 IgG 浓度 (μg/mL), 该内标血清曲线通过用 SoftMaxPro<sup>TM</sup> (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 软件计算的 4 参数逻辑斯蒂对数方程建立。在考虑检测限度和定量限度的情况下, 对所有血清型的 ELSIA 截取值都为 0.05 μg/mL IgG。

[0334] 调理吞噬测定

[0335] 在 2003 年 6 月的 WHO 磋商会上, 推荐使用如 Romero-Steiner 等, *ClinDiagnLab Immunol* 200310 (6):1019-1024 页陈述的 OPA 测定。该方案用于在以下测试中检验血清型的 OPA 活性。

[0336] 缀合物的制备

[0337] 在研究 11Pn-PD&Di-001 和 11Pn-PD&Di-007 中,包括 3 种 11 价疫苗制剂 (表 4),其中 3  $\mu$ g 的 19F 多糖缀合白喉类毒素 (19F-DT),而不是 1  $\mu$ g 多糖缀合 D 蛋白 (19F-PD)。用于研究 11Pn-PD、11Pn-PD&Di-001 和 11Pn-PD&Di-007 的缀合参数分别公开于表 5、6 和 7。

[0338] 在用这些 19F-DT 制剂初免后 1 个月的抗肺炎链球菌抗体应答和抗血清型 19F 的 OPA 活性分别示于表 8 和 9。表 10 显示了在 23 价普通多糖加强接种之前和之后达到 0.2  $\mu$ g/mL 的受试者的 22F-ELISA 抗体浓度和百分率。

[0339] 已表明用这些 19F-DT 制剂诱导的抗体的调理吞噬活性被明显改善,这由初免接种后 1 个月较高的血清阳性率 (调理吞噬效价  $\geq$  1:8) 和 OPAGMT 得以证实 (表 9)。在 23 价普通多糖加强接种之后 1 个月,19F 抗体的调理吞噬活性仍显著好于用 19F-DT 制剂初免的儿童 (表 11)。

[0340] 表 12 提供了与连续第 4 剂 *Prevnar*<sup>®</sup> 相比较在预先用 19F-DT 或 19F-PD 缀合物初免的学步儿童中在 11Pn-PD 加强剂量之后的免疫原性数据。已知在美国引入 *Prevnar*<sup>®</sup> 后报告的成就,在血清型 19F 缀合 DT 载体蛋白时抗血清型 19F 的改善的调理吞噬活性可能对候选疫苗有利。

[0341] 表 13 提供了 19F-DT 缀合物相对于交叉反应性血清型 19A 的 ELISA 和 OPA 数据。发现 19F-DT 相对于 19A 诱导低但显著的 OPA 活性。

[0342] 表 4 在临床研究中使用的肺炎链球菌缀合疫苗制剂

[0343]

制剂	肺炎链球菌血清型 $\mu$ g/载体蛋白											Al <sup>3+</sup> mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	<0.8
19F-DT 制剂 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DI	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DI	5/DI	$\leq$ 0.35
19F-DT 制剂 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DI	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DI	5/DI	$\leq$ 0.35
19F-DT 制剂 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DI	3/PD	=0.5

[0344] 表 5PS 肺炎链球菌 D 蛋白 /TT/DI 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0345]

血清型	1 天然的	3 μfluid	4 天然的	5 天然的	6B 天然的	7F 天然的
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS 溶解	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初始 PS/PD 比率 (重量/重量)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	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	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	40 分钟	60 分钟	60 分钟

[0346]

血清型	9V 天然的	14 天然的	18C 天然 的	19F 天然的	23F 天然的
PS 浓度(mg/ml)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初始 PS/PD 比率 (重量/重量)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	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	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	30 分钟	60 分钟

[0347]

[0348] 表 6 用于 11Pn-PD&Di-001 研究的 PS 肺炎链球菌 D 蛋白 /DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0349]

血清型	1 μfluid	3 μfluid	4 μfluid	5 μfluid	6B μfluid	7F 天然 的
PS 浓度 (mg/ml)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
初始 PS/PD 比 率(重量/重量)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
pH <sub>a</sub> = pH <sub>c</sub> = pH <sub>q</sub>	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
偶联时间	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟

[0350]

血清型	9V 天然的	14 天然的	18C μfluid	19F μfluid	23F μfluid
PS 浓度(mg/ml)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
初始载体蛋白 /PS 比率(重量/ 重量)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	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	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	30 分钟	60 分钟	60 分钟

[0351] 表 7 用于 11Pn-PD&Di-007 研究的 PS 肺炎链球菌 D 蛋白 /DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0352]

血清型	1天然的	3 μfluid	4天然的	5天然的	6B天然 的	7F μfluid
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS 溶解	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
初始 PD/PS 比 率(重量/重量)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	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	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	40 分钟	60 分钟	60 分钟

[0353]

血清型	9V μfluid	14 μfluid	18C天然 的	19F μfluid	19F μfluid	23F μfluid
PS 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
初始载体蛋白 /PS 比率(重量/ 重量)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> = pH <sub>c</sub> = pH <sub>q</sub>	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	120 分钟	120 分钟	60 分钟

[0354] 表 8 在 1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT 或 Prevnar (2 μg 19F-CRM) 初免接种后 1 个月 19F 抗体浓度 ≥ 0.20 μg/mL 的受试者百分率和 19F 抗体几何平均抗体浓度 (GMC 和 95%CI ; μg/mL) (总队列)

[0355]

组别	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% $\geq$ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (95% CI)	N	% $\geq$ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (95% CI)
11Pn-PD	152	<b>98.7</b> (95.3-99.8)	<b>1.93</b> (1.67-2.22)	50	<b>100</b> (92.9-100)	<b>2.78</b> (2.31-3.36)
19F-DT 制剂 1 <sup>r</sup>	146	<b>99.3</b> (96.2-100)	<b>2.88</b> (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	150	<b>96.0</b> (91.5-98.5)	<b>2.43</b> (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT 制剂 3 <sup>r</sup>	-	-	-	50	<b>96.0</b> (86.3-99.5)	<b>3.70</b> (2.58-5.30)
<i>Prevnar</i>	148	<b>98.6</b> (95.2-99.8)	<b>2.98</b> (2.60-3.41)	41	<b>97.6</b> (87.1-99.9)	<b>2.91</b> (2.15-3.94)

[0356] <sup>r</sup> 在表 4 中提供不同制剂的组成。

[0357] 表 9 在用 1  $\mu\text{g}$  19F-PD、3  $\mu\text{g}$  19F-DT 或 *Prevnar* (2  $\mu\text{g}$  19F-CRM) 初免接种后 1 个月 19FOPA 效价  $\geq$  1:8 的受试者百分率和 19FOPAGMT (总队列)

[0358]

组别	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	$\geq$ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	$\geq$ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	<b>84.6</b> (77.4-90.2)	<b>77.8</b> (58.1-104.4)	46	<b>95.7</b> (85.2-99.5)	<b>167.8</b> (118.1-238.6)
19F-DT 制剂 1 <sup>r</sup>	137	<b>95.6</b> (90.7-98.4)	<b>263.2</b> (209.4-330.7)	-	-	-
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	139	<b>92.1</b> (86.3-96.0)	<b>218.9</b> (166.5-287.9)	-	-	-
19F-DT 制剂 3 <sup>r</sup>	-	-	-	49	<b>91.8</b> (80.4-97.7)	<b>403.1</b> (225.7-719.9)
<i>Prevnar</i>	131	<b>86.3</b> (79.2-91.6)	<b>82.6</b> (61.1-111.6)	38	<b>81.6</b> (65.7-92.3)	<b>65.0</b> (37.7-112.2)

[0359]

<sup>r</sup> 在表 4 中提供不同制剂的组成。

[0360] 表 10 在用 1  $\mu\text{g}$  19F-PD、3  $\mu\text{g}$  19F-DT 或 *Prevnar* (2  $\mu\text{g}$  19F-CRM) 初免接种的儿童中于 23 价普通多糖加强接种之前和之后 1 个月 19F 抗体浓度  $\geq$  0.20  $\mu\text{g/mL}$  的受试者百分率

和 19F 抗体 GMC ( $\mu\text{g/ml}$ ) (总队列)

[0361]

初免组别	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	在加强接种之前			在 23 价 PS 加强接种后 1 个月		
	N	% $\geq$ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/ml}$ ) (95% CI)	N	% $\geq$ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/ml}$ ) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT 制剂 1 <sup>r</sup>	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
<i>Prevnar</i>	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

[0362] <sup>r</sup> 在表 4 中提供不同制剂的组成。

[0363] 表 11 在用 1  $\mu\text{g}$  19F-PD、3  $\mu\text{g}$  19F-DT 或 Prevnar (2  $\mu\text{g}$  19F-CRM) 初免接种的儿童中于 23 价普通多糖加强接种之前和之后 1 个月 19FOPA 效价  $\geq$  1:8 的受试者百分率和 19FOPAGMT (总队列)

[0364]

初免组别	11Pn-PD&Di-002					
	在加强接种之前			在 23 价 PS 加强接种后 1 个月		
	N	% $\geq$ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% $\geq$ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT 制剂 1 <sup>r</sup>	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
<i>Prevnar</i>	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

[0365]

<sup>r</sup> 在表 4 中提供不同制剂的组成。

[0366] 表 12 在用 1  $\mu\text{g}$  19F-PD、3  $\mu\text{g}$  19F-DT 或 Prevnar (2  $\mu\text{g}$  19F-CRM) 初免接种的儿童中



于 11Pn-PD 或 Prevnar 加强接种后 1 个月抗体浓度  $\geq 0.2 \mu\text{g/mL}$ 、OPA  $\geq 1:8$  的受试者百分率和抗 19F 肺炎链球菌的 GMC/GMT (总队列)

[0367]

初免组别	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA 测定			OPA 测定		
	N	% $\geq 0.20$ $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	<b>100</b> (94.9-100)	<b>4.52</b> (3.7-5.5)	21	<b>100</b> (83.9-100)	<b>255.6</b> (135.5-481.9)
19F-DT 制剂 1 <sup>r</sup>	66	<b>98.5</b> (91.8-100)	<b>3.45</b> (2.8-4.3)	23	<b>95.7</b> (78.1-99.9)	<b>374.0</b> (192.6-726.2)
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	70	<b>98.6</b> (92.3-100)	<b>3.80</b> (2.9-4.9)	29	<b>96.6</b> (82.2-99.9)	<b>249.1</b> (144.7-428.7)
<i>Prevnar</i>	69	<b>97.1</b> (89.9-99.6)	<b>2.56</b> (2.0-3.3)	31	<b>96.8</b> (83.3-99.9)	<b>528.7</b> (319.4-875.2)

<sup>r</sup> 在

表 4 中提供不同制剂的组成。

[0368] 表 13 在用  $1 \mu\text{g}$  19F-PD、 $3 \mu\text{g}$  19F-DT 或 Prevnar ( $2 \mu\text{g}$  19F-CRM) 初免接种后 1 个月抗体浓度  $\geq 0.2 \mu\text{g/mL}$ 、OPA  $\geq 1:8$  的受试者百分率和抗 19A 肺炎链球菌的 GMC/GMT (总队列)

[0369]

组别	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA 测定			OPA 测定		
	N	% $\geq 0.20$ $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	<b>28.9</b> (16.4-44.3)	<b>0.09</b> (0.07-0.11)	52	<b>7.7</b> (2.1-18.5)	<b>5.2</b> (4.0-6.8)
19F-DT 制剂 2 <sup>r</sup>	51	<b>29.4</b> (17.5-43.8)	<b>0.11</b> (0.08-0.16)	59	<b>27.1</b> (16.4-40.3)	<b>12.4</b> (7.6-20.3)
<i>Prevnar</i>	55	<b>18.2</b> (9.1-30.9)	<b>0.10</b> (0.08-0.12)	61	<b>3.3</b> (0.4-11.3)	<b>4.6</b> (3.8-5.6)

[0370] <sup>r</sup> 在表 4 中提供不同制剂的组成。

[0371] 实施例 5: 在预临床模型中的佐剂试验: 对老年猕猴中的肺炎链球菌 11 价多糖缀合物的免疫原性的影响

[0372] 为优化在老年群体中针对缀合的肺炎链球菌疫苗激发的应答, GSK 配制了一种具

有新型佐剂—佐剂 C 的 11 价多糖 (PS) 缀合疫苗制剂, 参见下文。

[0373] 在 0-28 天用 500 μ l 吸附到 315 μ gAlPO4 上的 11 价 PS 缀合物或与佐剂 C 混合的 11 价 PS 缀合物肌内 (IM) 免疫 5 只老年猕猴 (14-28 岁) 的组别。

[0374] 在两种疫苗制剂中, 11 价 PS 缀合物各自由以下缀合物组成: PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-PD、PS19F-PD、PS23F-DT 和 PS6B-DT。所用疫苗为按照表 6 条件 (实施例 4) 缀合的人用疫苗剂量的 1/5 剂量 (每人用剂量每种糖 5 μ g, 6B 除外 [10 μ g]), 只有 19F 按照以下 CDAP 方法条件制备: 调整大小的糖为 9mg/ml、PD 为 5mg/ml、初始 PD/PS 比率为 1.2/1、CDAP 浓度为 0.75mg/mgPS, pH<sub>a</sub> = pH<sub>c</sub> = pH<sub>q</sub>9.0/9.0/9.0, 偶联时间为 60 分钟。

[0375] 定量在第 42 天收集的血清中的抗 PSELISA IgG 水平和调理吞噬效价。通过 Elispot 由在第 42 天收集的外周血细胞检测抗 PS3 记忆 B 细胞频率。

[0376] 按照下文所示结果, 佐剂 C 在老年猴子中显著改善 11 价 PS 缀合物相对于采用 AlPO4 的缀合物的免疫原性。新佐剂增强针对 PS 的 IgG 应答 (图 1) 和调理吞噬抗体效价 (表 14)。还有支持性证据表明使用佐剂 C 增强了 PS3 特异性记忆 B 细胞的频率 (图 2)。

[0377] 表 14, 在老年猕猴中的缀合物免疫原性 (第 II 剂后的调理吞噬效价)

[0378]

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11 价 AlPO4	免疫前	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	免疫后 14 天	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 价 佐剂 C	免疫前	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	免疫后 14 天	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

[0379] B 细胞 Elispot

[0380] 测定的原则依赖于以下事实: 在与 CpG 培养 5 天后记忆 B 细胞在体外成熟为浆细胞。体外产生的抗原特异性浆细胞可易于检测, 并因此使用 B 细胞 elispot 测定计数。特异性浆细胞数反映出在培养开始时的记忆 B 细胞频率。

[0381] 简而言之, 体外产生的浆细胞在用抗原包被的培养板中温育。抗原特异性浆细胞

形成抗体 / 抗原斑点,其通过常规免疫 - 酶促方法检测,并作为记忆 B 细胞计数。在本研究中,多糖已用于包被培养板,以便计数对应的记忆 B 细胞。结果表示为 1 百万记忆 B 细胞中 PS 特异性记忆 B 细胞的频率。

[0382] 研究表明,佐剂 C 能够减轻已知的 PS3 加强能力问题(参见关于肺炎链球菌和肺炎链球菌疾病的第 5 届国际讨论会,2006 年 4 月 2-6 日,AliceSprings, CentralAustralia, 抗血清型 3 肺炎链球菌缀合物的免疫应答的特异性。SchuermanL, PrymulaR, PoolmanJ. Abstractbook245 页, P010.06)。

[0383] 实施例 6, 解毒的肺炎链球菌溶血素 (dPly) 作为蛋白载体在幼龄 Balb/c 小鼠中增强 PS19F 的免疫原性的有效性

[0384] 于 0、14 和 28 天用 50  $\mu$  l 的 4 价普通 PS 或 4 价 dPly 缀合 PS(二者均与佐剂 C 混合)IM 免疫 40 只雌性 Balb/c 小鼠(4 周龄)的组别。

[0385] 两种疫苗制剂均由 0.1  $\mu$  g(糖的量)的以下 PS 中的每一种组成:PS8、PS12F、PS19F 和 PS22F。

[0386] 定量在第 42 天收集的血清的抗 PSELISAIgG 水平。

[0387] 与用普通 PS 免疫的小鼠相比,在给予 4 价 dPly 缀合物的小鼠中的抗 PS19F 应答(作为图 3 的实例显示)被强烈增强。对于抗 PS8、12F 和 22FIgG 应答观察到相同的改善(未显示数据)。

[0388] 实施例 7,肺炎链球菌组氨酸三联体 D 蛋白 (PhtD) 作为蛋白载体在幼龄 Balb/c 小鼠中增强 PS22F 的免疫原性的有效性

[0389] 于 0、14 和 28 天用 50  $\mu$  l 的 4 价普通 PS 或 4 价 PhtD 缀合 PS(二者均与佐剂 C 混合)IM 免疫 40 只雌性 Balb/c 小鼠(4 周龄)的组别。

[0390] 两种疫苗制剂均由 0.1  $\mu$  g(糖的量)的以下 PS 中的每一种组成: PS8、PS12F、PS19F 和 PS22F。

[0391] 定量在第 42 天收集的血清的抗 PSELISAIgG 水平。

[0392] 与用普通 PS 免疫的小鼠相比,在给予 4 价 PhtD 缀合物的小鼠中的抗 PS22F 应答(作为图 4 的实例显示)被强烈增强。对于抗 PS8、12F 和 19FIgG 应答观察到相同的改善(未显示数据)。

[0393] 实施例 8, 含有 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13-价 PS 缀合物在老年 C57B1 小鼠中的免疫原性

[0394] 于 0、14 和 28 天用 50  $\mu$  l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物(二者均与佐剂 C 混合)IM 免疫 30 只老年 C57B1 小鼠(> 69 周龄)的组别(参见下文)。

[0395] 11 价疫苗制剂由以下缀合物中的每一种的 0.1  $\mu$  g 糖组成:PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD(参见表 1 和表 2 下讨论的关于 11 价疫苗的备注)。13 价疫苗制剂另外包含 0.1  $\mu$  gPS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物(参见表 1 和表 2 下讨论的关于 13 价疫苗的备注[使用直接缀合的 22F])。在第 2 组和第 4 组中,肺炎链球菌溶血素载体用 GMBS 处理解毒,在第 3 组和第 5 组中其用甲醛进行。在第 2 组和第 3 组中, PhtD 用于缀合 PS22F,在第 4 组和第 5 组中,使用 PhtD\_E 融合体(W003/054007 的构建体 VP147)。在第 6 组中,19A 与白喉类毒素缀合,22F 与 D 蛋白缀合。

[0396] 定量在第 42 天收集的单独血清的抗 PS19A 和 22FELISAIgG 水平。检测合并血清针对其它 PS 产生的 ELISAIgG 应答。

[0397] 在 13 价缀合疫苗制剂中给予的 19A-dPly 和 22F-PhdD 在老年 C57B1 小鼠中显示出免疫原性（表 15）。与用 11 价制剂免疫的小鼠相比，在给予 13 价制剂的小鼠中针对其它 PS 诱导的免疫应答没有受到负面影响。

[0398] 表 15, 在老年 C57B1 小鼠中的 PS 免疫原性（第 III 剂后的 IgG 水平）

[0399]

老年 C57 黑鼠						
ELISA	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组
	11V 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲 醛 22F-PhtD-E 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1µg/50µl 佐剂 C
1	平均值 合并	19.30	20.20	24.40	12.80	13.60
3	平均值 合并	6.32	4.84	5.21	6.74	2.54
4	平均值 合并	60.9	67.1	51.4	47.4	41.1
5	平均值 合并	1.34	3.81	3.06	2.75	1.23
6B	平均值 合并	4.41	4.12	5.88	1.58	5.64
7F	平均值 合并	0.83	0.81	1.65	1.98	0.99
9V	平均值 合并	13.8	23.7	20.0	13.1	9.6
14	平均值 合并	25.73	42.96	34.12	32.53	15.60
18C	平均值 合并	13.4	20.1	11.9	9.1	8.4
19F	平均值 合并	57.5	90.0	63.8	36.5	69.1

[0400]

<b>23F</b>	平均值 合并	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>
<b>19A</b>	<b>GMC</b>	<b>0.06</b>	<b>0.09</b>	<b>0.25</b>	<b>0.08</b>	<b>0.23</b>	<b>0.19</b>
	<b>IC</b>	0.04-0.1	0.05-0.14	0.15-0.41	0.06-0.12	0.14-0.38	0.09-0.3
	<b>%阳性</b>	33%	47%	83%	53%	80%	73%
<b>22F</b>	<b>GMC</b>	<b>NR</b>	<b>5.81</b>	<b>3.76</b>	<b>0.54</b>	<b>0.85</b>	<b>2.02</b>
	<b>IC</b>		3.2-10.6	1.8-7.9	0.3-1.1	0.4-1.7	1.2-3.4
	<b>%阳性</b>	0%	97%	90%	77%	87%	97%

[0401] 实施例 9, 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在幼龄 Balb/c 小鼠中的免疫原性

[0402] 于 0、14 和 28 天用 50  $\mu$ l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物（二者均与佐剂 C 混合）IM 免疫 30 只幼龄 Balb/c 小鼠（4 周龄）的组别（参见下文）。

[0403] 11 价疫苗制剂由以下缀合物中的每一种的 0.1  $\mu$ g 糖组成：PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD（参见表 1 和表 2 下讨论的关于 11 价疫苗的备注）。13 价疫苗制剂另外包含 0.1  $\mu$ g PS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物（参见表 1 和表 2 下讨论的关于 13 价疫苗的备注 [使用直接缀合的 22F]）。在第 2 组和第 4 组中，肺炎链球菌溶血素载体用 GMBS 处理解毒，在第 3 组和第 5 组中其用甲醛进行。在第 2 组和第 3 组中，PhtD 用于缀合 PS22F，在第 4 组和第 5 组中，使用 PhtD\_E 融合体（W003/054007 的构建体 VP147）。在第 6 组中，19A 与白喉类毒素缀合，22F 与 D 蛋白缀合。

[0404] 定量在第 42 天收集的单独血清的抗 PS19A 和 22FELISAIgG 水平。检测合并血清针对其它 PS 产生的 ELISAIgG 应答。

[0405] 在 13 价缀合疫苗制剂中给予的 19A-dPly 和 22F-PhtD 在幼龄 Balb/c 小鼠中显示出免疫原性（表 16）。与用 11 价制剂免疫的小鼠相比，在给予 13 价制剂的小鼠中针对其它 PS 诱导的免疫应答没有受到负面影响。

[0406] 表 16, 在幼龄 Balb/c 小鼠中的 PS 免疫原性（在第 III 剂后的 IgG 水平）

[0407]

BalbC 小鼠							
ELISA	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组	
	11V 0.1μg/50μl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲 醛 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲 醛 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐剂 C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1μg/50μl 佐剂 C	
1	平均值 合并	131.70	101.20	83.00	82.40	67.90	85.50
3	平均值 合并	21.85	10.38	12.53	8.83	8.73	14.98
4	平均值 合并	147.4	127.0	104.4	95.0	113.6	114.2
5	平均值 合并	21.38	20.29	18.26	18.95	18.02	23.04
6B	平均值 合并	1.97	4.76	3.72	2.35	1.43	1.05
7F	平均值 合并	7.69	4.58	4.77	4.24	3.92	3.94
9V	平均值 合并	30.1	30.7	26.5	21.4	23.4	28.3
14	平均值 合并	28.78	27.67	26.23	21.54	24.34	13.73
18C	平均值 合并	53.4	52.37	46.5	57.8	47.8	75.8
19F	平均值 合并	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2

[0408]

<b>23F</b>	<b>平均值 合并</b>	<b>4.98</b>	<b>3.9</b>	<b>5.11</b>	<b>0.57</b>	<b>3.13</b>	<b>4.57</b>
<b>19A</b>	<b>GMC</b>	<b>0.4</b>	<b>32.8</b>	<b>25.1</b>	<b>21.6</b>	<b>18.9</b>	<b>23.5</b>
	<b>IC</b>	0.2-0.6	26.4-40.7	20.6-30.6	17.5-26.7	15.1-23.5	19.5-28.5
	<b>%阳性</b>	93%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>22F</b>	<b>GMC</b>	<b>NR</b>	<b>3.99</b>	<b>3.76</b>	<b>6.27</b>	<b>8.70</b>	<b>18.76</b>
	<b>IC</b>		1.9-8.42	1.8-8	3.8-10.4	5.4-13.9	15.2-23.1
	<b>%阳性</b>	0%	93%	100%	100%	100%	100%

[0409] 实施例 10, 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在豚鼠中的免疫原性

[0410] 于 0、14 和 28 天用 125 μ l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物 (二者均与佐剂 C 混合) IM 免疫 20 只幼龄豚鼠 (Hartley Strain ;5 周龄) 的组别 (参见下文)。

[0411] 11 价疫苗制剂由以下缀合物中的每一种的 0.25 μ g 糖组成 :PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD (参见表 1 和表 2 下讨论的关于 11 价疫苗的备注)。13 价疫苗制剂另外包含 0.1 μ g PS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物 (参见表 1 和表 2 下讨论的关于 13 价疫苗的备注 [使用直接缀合的 22F])。在第 2 组和第 4 组中,肺炎链球菌溶血素载体用 GMBS 处理解毒,在第 3 组和第 5 组中其用甲醛进行。在第 2 组和第 3 组中, PhtD 用于缀合 PS22F,在第 4 组和第 5 组中,使用 PhtD\_E 融合体 (W003/054007 的构建体 VP147)。在第 6 组中,19A 与白喉类毒素缀合,22F 与 D 蛋白缀合。

[0412] 定量在第 42 天收集的单独血清的抗 PS19A 和 22F ELISA IgG 水平。检测合并血清针对其它 PS 产生的 ELISA IgG 应答。

[0413] 表 17, 在幼龄 Balb/c 小鼠中的 PS 免疫原性 (在第 III 剂后的 IgG 水平)

[0414]

豚鼠						
ELISA	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组

[0415]



		<b>11V</b>  0.1µg/50µl 佐剂 C	<b>11V</b> <b>19A-dPly</b> <b>gmbs</b> <b>22F-PhtD</b> 0.1µg/50µl 佐剂 C	<b>11V</b> <b>19A-dPly</b> <b>甲醛</b> <b>22F-PhtD</b> 0.1µg/50µl 佐剂 C	<b>11V</b> <b>19A-dPly</b> <b>gmbs</b> <b>22F-PhtD-E</b> 0.1µg/50µl 佐剂 C	<b>11V</b> <b>19A-dPly 甲</b> <b>醛</b> <b>22F-PhtD-E</b> 0.1µg/50µl 佐剂 C	<b>11V</b> <b>19A-DT</b> <b>22F-PD</b> 0.1µg/50µl 佐剂 C
<b>1</b>	平均值 合并	<b>78.00</b>	<b>77.21</b>	<b>76.15</b>	<b>68.77</b>	<b>68.59</b>	<b>81.04</b>
<b>3</b>	平均值 合并	<b>7.75</b>	<b>9.31</b>	<b>12.73</b>	<b>7.94</b>	<b>4.75</b>	<b>9.59</b>
<b>4</b>	平均值 合并	<b>130.7</b>	<b>94.4</b>	<b>132.6</b>	<b>166.8</b>	<b>85.0</b>	<b>101.3</b>
<b>5</b>	平均值 合并	<b>109.10</b>	<b>117.10</b>	<b>110.70</b>	<b>158.40</b>	<b>74.10</b>	<b>100.40</b>
<b>6B</b>	平均值 合并	<b>3.14</b>	<b>4.26</b>	<b>14.4</b>	<b>7.63</b>	<b>6.3</b>	<b>7.52</b>
<b>7F</b>	平均值 合并	<b>154.2</b>	<b>216.0</b>	<b>240.0</b>	<b>181.0</b>	<b>142.0</b>	<b>179.1</b>
<b>9V</b>	平均值 合并	<b>90.69</b>	<b>105.45</b>	<b>98.20</b>	<b>93.45</b>	<b>54.12</b>	<b>73.05</b>
<b>14</b>	平均值 合并	<b>71.19</b>	<b>77.18</b>	<b>46.53</b>	<b>59.67</b>	<b>38.47</b>	<b>53.69</b>
<b>18C</b>	平均值 合并	<b>109.4</b>	<b>122.3</b>	<b>137.1</b>	<b>79.9</b>	<b>73.7</b>	<b>83.1</b>
<b>19F</b>	平均值	<b>73.9</b>	<b>102.5</b>	<b>112.2</b>	<b>75.5</b>	<b>62.3</b>	<b>72.1</b>

[0416]

	合并						
<b>23F</b>	平均值 合并	<b>19.19</b>	<b>30.74</b>	<b>29.44</b>	<b>31.52</b>	<b>19.13</b>	<b>24.94</b>
<b>19A</b>	<b>GMC</b>	<b>0.4</b>	<b>25.58</b>	<b>41.49</b>	<b>14.25</b>	<b>27.49</b>	<b>6.74</b>
	<b>IC</b>	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
	%阳性	75%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>22F</b>	<b>GMC</b>	<b>0.12</b>	<b>2.51</b>	<b>3.67</b>	<b>45.74</b>	<b>30.68</b>	<b>96.38</b>
	<b>IC</b>	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
	%阳性	10%	95%	95%	100%	100%	100%

[0417] 实施例 11 :要制备和检验的制剂

[0418] a) 制备以下制剂 (使用表 1 的 13 价疫苗和表 5 的血清型 3- 参见在表 2 下论述的关于 14 价疫苗的备注 [使用直接缀合的 22F 或通过 ADH 接头])。如下文所示将糖与磷酸铝和 3D-MPL 一起配制。

[0419]

14V <u>25 µg MPL</u> BAC 铝含量的总和 → FF 每剂:					
PS	载体	µg PS	µg MPL	比率 PS/Al 1/x	µg Al
1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10
18C	TT <sub>AH</sub>	3		15	45

[0420]

19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100
FF 铝含量				总和 =	355

[0421]

14V <u>10 µg MPL</u> BAC 铝含量的总和 → FF 每剂:					
PS	载体	µg PS	µg MPL	比率 PS/Al 1/x	µg Al
1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10
18C	TT <sub>AH</sub>	3		15	45
19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			10	4	40
FF 铝含量				总和 =	295

[0422] b) 用以下的每一种佐剂进行佐剂化的相同糖制剂：

[0423] - 在下表中显示了每 500 µl 剂量的乳剂组分的浓度。

[0424]

	佐剂A1	佐剂A2	佐剂A3
成分	250 $\mu$ l o/w乳剂	125 $\mu$ l o/w乳剂	50 $\mu$ l o/w乳剂
$\alpha$ 生育酚	11.88 mg	5.94 mg	2.38 mg
鲨烯	10.7 mg	5.35 mg	2.14 mg
吐温80	4.85 mg	2.43 mg	0.97 mg

[0425]

	佐剂A4	佐剂A5	佐剂A6	佐剂A7
成分	250 $\mu$ l o/w 乳剂	250 $\mu$ l o/w乳 剂	125 $\mu$ l o/w 乳 剂	50 $\mu$ l o/w 乳剂
$\alpha$ 生育酚	11.88 mg	11.88 mg	5.94 mg	2.38 mg
鲨烯	10.7 mg	10.7 mg	5.35 mg	2.14 mg
吐温80	4.85 mg	4.85 mg	2.43 mg	0.97 mg
3D-MPL	50 $\mu$ g	25 $\mu$ g	25 $\mu$ g	10 $\mu$ g

[0426] c) 糖还与两种基于脂质体的佐剂一起配制：

[0427] 佐剂 B1 的组成

[0428] 定性定量（每 0.5mL 剂量）

[0429] 脂质体：

[0430] -DOPC1mg

[0431] -胆固醇 0.25mg

[0432] 3DMPL50  $\mu$  g[0433] QS2150  $\mu$  g[0434]  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.124mg 缓冲液[0435]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.290mg 缓冲液

[0436] NaCl 2.922mg

[0437] (100mM)

[0438] 足够量的 WFI 调到 0.5ml 溶剂

[0439] pH6.1

[0440] 1. 总  $\text{PO}_4$  浓度 = 50mM

[0441] 佐剂 B2 的组成

[0442] 定性定量（每 0.5mL 剂量）

[0443] 脂质体：

[0444] -DOPC0.5mg

[0445] -胆固醇 0.125mg

[0446] 3DMPL25  $\mu$  g[0447] QS2125  $\mu$  g

- [0448]  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.124mg 缓冲液
- [0449]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.290mg 缓冲液
- [0450] NaCl 2.922mg
- [0451] (100mM)
- [0452] 足够量的 WFI 调到 0.5ml 溶剂
- [0453] pH6.1
- [0454] d) 糖还用佐剂 C 配制 (参见上文其中已使用该佐剂的其它组合物) :
- [0455] 定性定量 (每 0.5mL 剂量)
- [0456] 水包油乳剂 :50  $\mu$  l
- [0457] - 鲨烯 2.136mg
- [0458] -  $\alpha$  生育酚 2.372mg
- [0459] - 吐温 800.97mg
- [0460] - 胆固醇 0.1mg
- [0461] 3DMPL 50  $\mu$  g
- [0462] QS2150  $\mu$  g
- [0463]  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.470mg 缓冲液
- [0464]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.219mg 缓冲液
- [0465] NaCl 4.003mg
- [0466] (137mM)
- [0467] KCl 0.101mg
- [0468] (2.7mM)
- [0469] 足够量的 WFI 调到 0.5ml 溶剂
- [0470] pH6.8
- [0471] 实施例 12, 缀合化学对 Balb/c 小鼠中 22F-PhtD 缀合物免疫原性的影响
- [0472] 于 0、14 和 28 天用含有 PS1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F (剂量 : 对于 PS4、18C、19A、19F 和 22F 为 0.3  $\mu$  g 糖 / 缀合物, 对于其它 PS 为 0.1  $\mu$  g 糖 / 缀合物) 的 13 价 PS 制剂通过肌肉 (IM) 途径免疫 30 只雌性小鼠的组别。
- [0473] PS18C 与破伤风类毒素缀合, 19F 与白喉类毒素缀合, 19A 与甲醛解毒的 Ply 缀合, 22F 与 PhtD 缀合, 其它 PS 与 PD 缀合。
- [0474] 比较由通过直接 CDAP 化学制备的 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD (ADH 衍生化的 PS) 构成的两种制剂。参见实施例 2、表 1 和表 2 下关于用 22F 直接缀合或经由 ADH 间隔臂制备的 13 价疫苗特征的备注。疫苗制剂补加佐剂 C。
- [0475] 检测在第 42 天收集的血清的抗 PS22FELISA IgG 水平和调理吞噬效价。
- [0476] 就 IgG 水平 (图 5) 和调理吞噬效价 (图 6) 这二者而言, 22F-AH-PhtD 显示出远强于 22F-PhtD 的免疫原性。
- [0477] 实施例 13, 新佐剂对肺炎链球菌荚膜 PS 缀合物的免疫原性的影响
- [0478] 于 0、14 和 28 天用含有 PS1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F (剂量 : 对于 PS4、18C、19A、19F 和 22F 为 0.3  $\mu$  g 糖 / 缀合物, 对于其它 PS 为 0.1  $\mu$  g 糖 / 缀合物) 的 13 价 PS 制剂 通过肌肉 (IM) 途径免疫 40 只雌性 Balb/c 小鼠的组别。

[0479] PS18C 与破伤风类毒素缀合,19F 与白喉类毒素缀合,19A 与甲醛解毒的 P1y 缀合,22F 与 PhtD 缀合,其它 PS 与 PD 缀合。参见实施例 2、表 1 和表 2 下关于用直接缀合的 22F 制备的 13 价疫苗特征的备注。

[0480] 比较补加  $AlPO_4$ 、佐剂 A1、佐剂 A4 或佐剂 A5 的 4 种制剂。

[0481] 检测在第 42 天收集的和每组合并的血清的抗 PS、P1y、PhtD 和 PDELISAIgG 水平。计算每种抗原的以下比率:用测试的新佐剂诱导的 IgG 水平 / 用  $AlPO_4$  诱导的 IgG 水平。

[0482] 与经典的  $AlPO_4$  制剂相比,测试的所有新佐剂将针对 13 价缀合物的免疫应答提升至少 2 倍(图 7)。

[0483] 实施例 14, 在猴子肺炎链球菌性肺炎模型中 PhtD/ 解毒的 P1y 组合的保护效力

[0484] 选择 6 只猕猴(3-8 岁)的组别作为具有预先存在的最低抗 19F 抗体水平的组别,于 0 和 28 天用 11 价 PS 缀合物(即  $1 \mu g$  PS1、3、5、6B、7F、9V、14 和 23F,  $3 \mu g$  PS4、18C 和 19F[糖])或 PhtD( $10 \mu g$ ) + 甲醛解毒的 P1y( $10 \mu g$ ) 或单独的佐剂肌内免疫该组别。

[0485] PS18C 与破伤风类毒素缀合,19F 与白喉类毒素缀合,其它 PS 与 PD 缀合。参见实施例 2、表 1 和表 2 下关于 11 价疫苗特征的备注。所有疫苗制剂均补加佐剂 C。

[0486] 在第 42 天将 19F 型肺炎链球菌( $5 \cdot 10^8$ cfu)接种在右肺中。计数在挑战后第 1、3 和 7 天收集的支气管肺泡灌洗液的菌落。结果表示为在挑战后第 7 天每组的死亡动物数、肺定居动物数或清除的动物数。

[0487] 如在图 8 中所示,与单独的佐剂组相比,用 11 价缀合物和 PhtD + dP1y 组合物( $p < 0.12$ , Fisher 确切检验)获得了接近于统计学显著性的良好保护作用(尽管使用的动物数少)。

[0488] 实施例 15, 缀合化学对抗 PhtD 抗体应答和针对 22F-PhtD 缀合物诱导的 4 型挑战的保护效力的影响

[0489] 在第 0 和 14 天用  $3 \mu g$  22F-PhtD(通过直接 CDAP 化学制备)或 22F-AH-PhtD(AH 衍生化的 PS)或单独的佐剂肌内免疫 20 只雌性 OF1 小鼠的组别。两种单价 22F 缀合物均通过实施例 2 的方法制备(另参见表 1 和表 2)。每种制剂均补加佐剂 C。

[0490] 检测在第 27 天收集的血清的抗 PhtDELISAIgG 水平。

[0491] 在第 28 天用  $5 \cdot 10^6$ cfu 的 4 型肺炎链球菌(即测试的疫苗制剂中存在的 PS 潜在地没有涵盖的肺炎链球菌血清型)鼻内挑战小鼠。监测诱导的死亡率,直至挑战后的第 8 天。

[0492] 与 22F-PhtD 相比 22F-AH-PhtD 诱导显著较高的抗 PhtDIgG 应答和更好的抗 4 型挑战的保护作用。

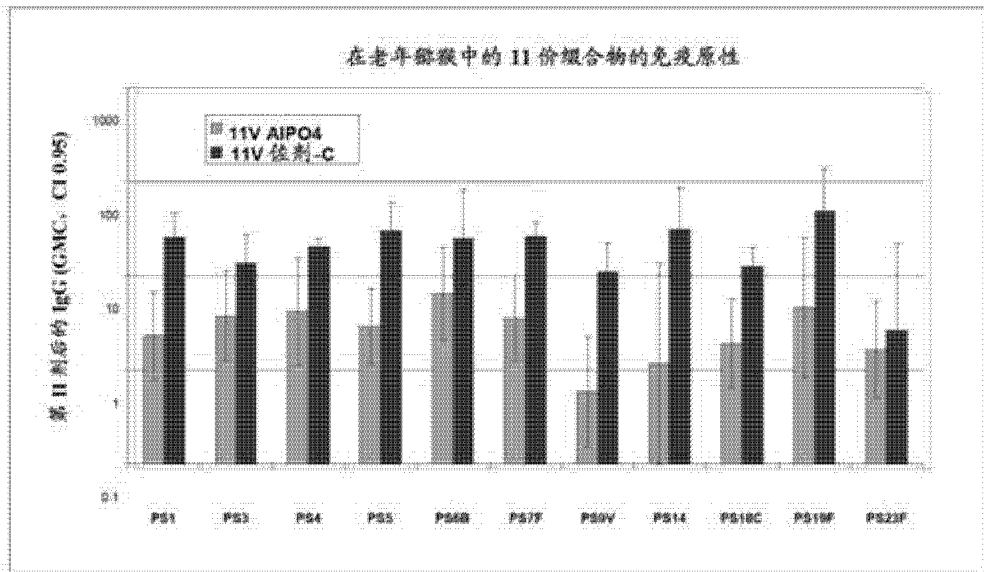


图 1

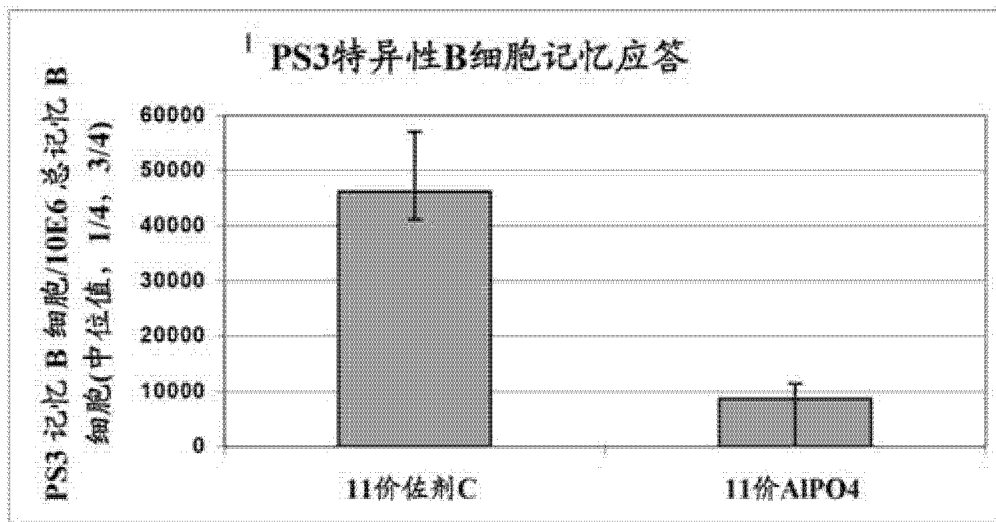


图 2

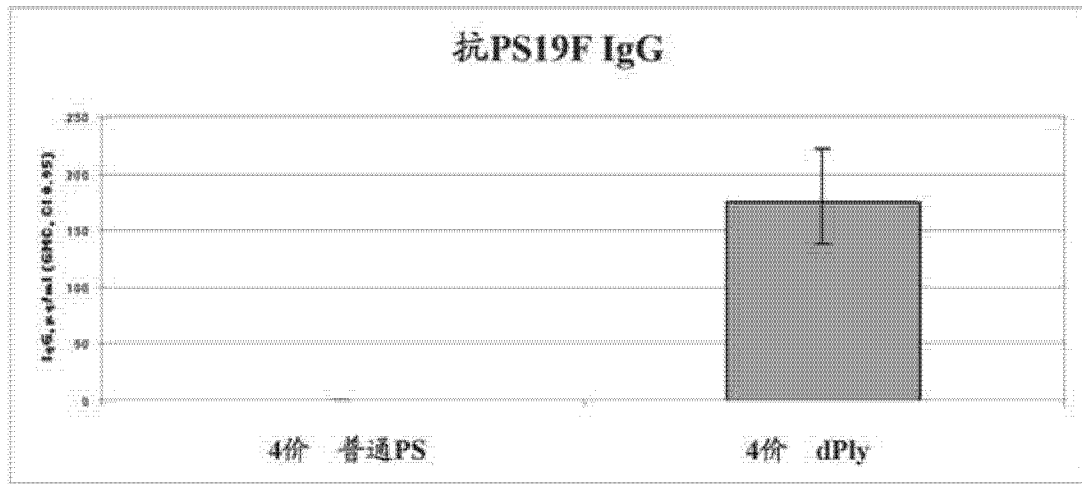


图 3

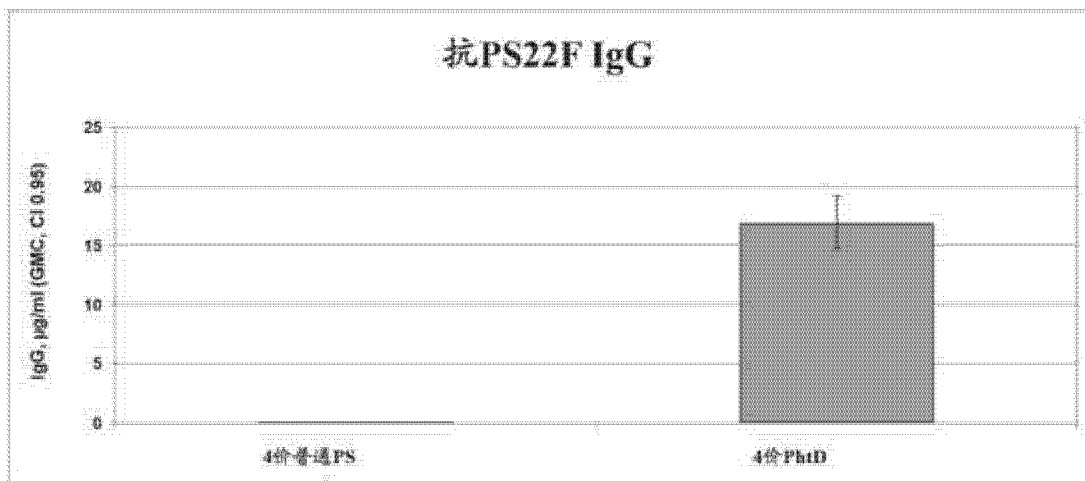


图 4



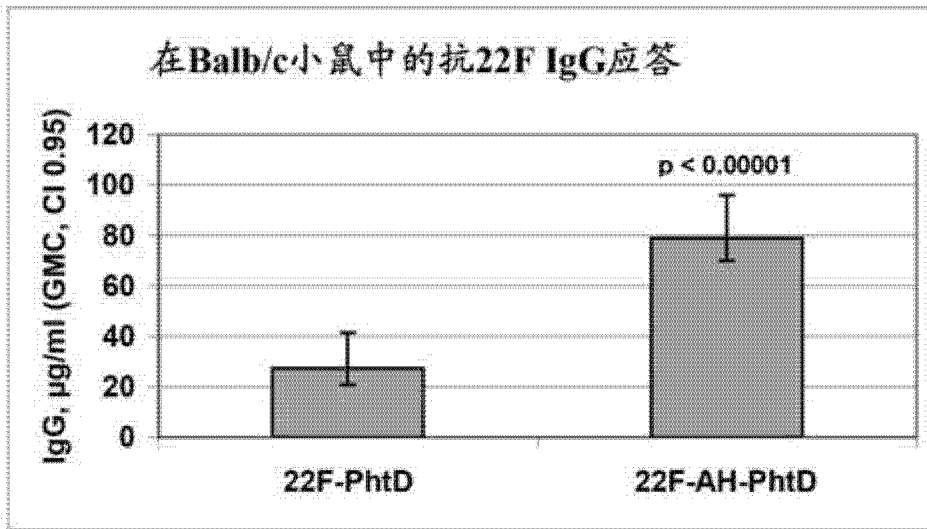


图 5

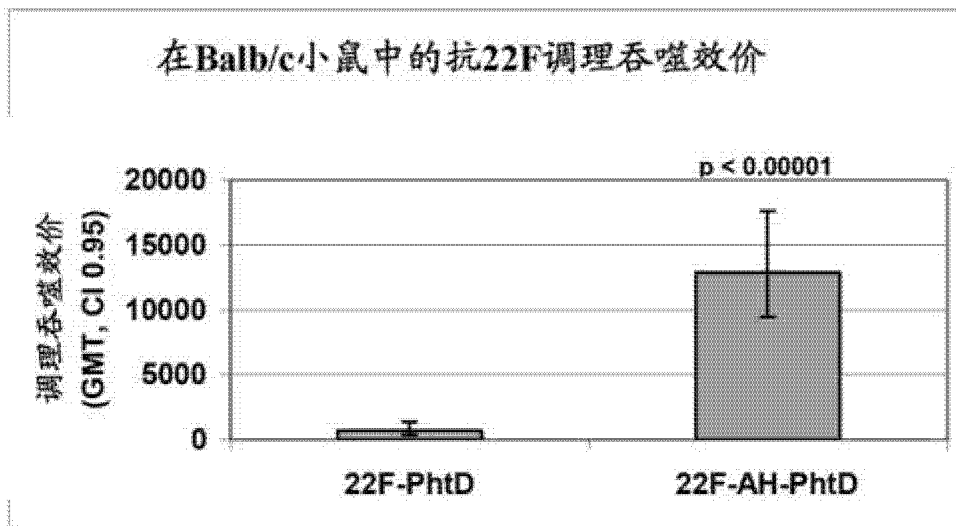


图 6

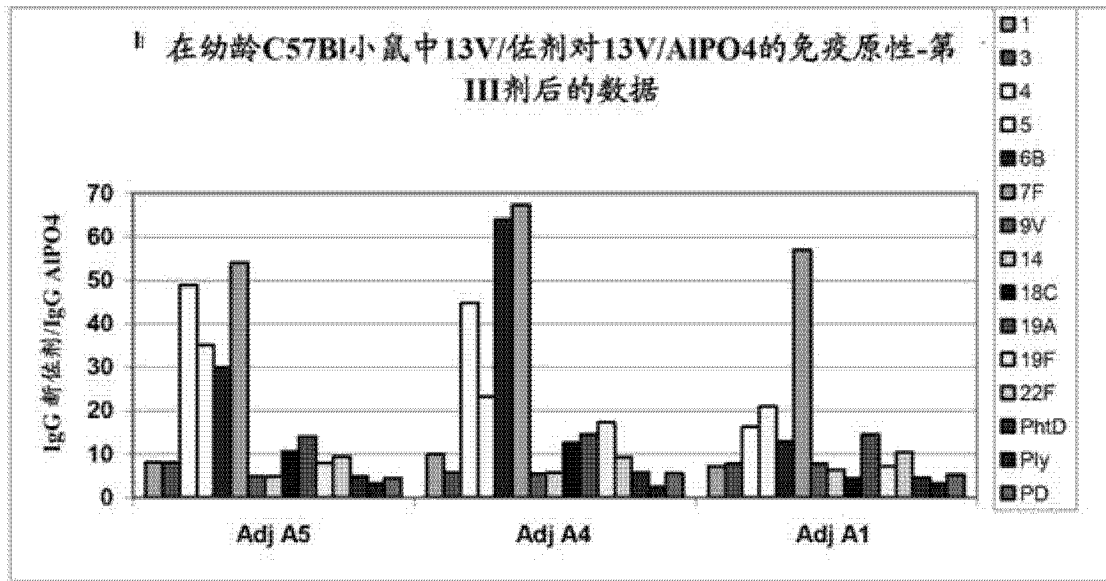


图 7

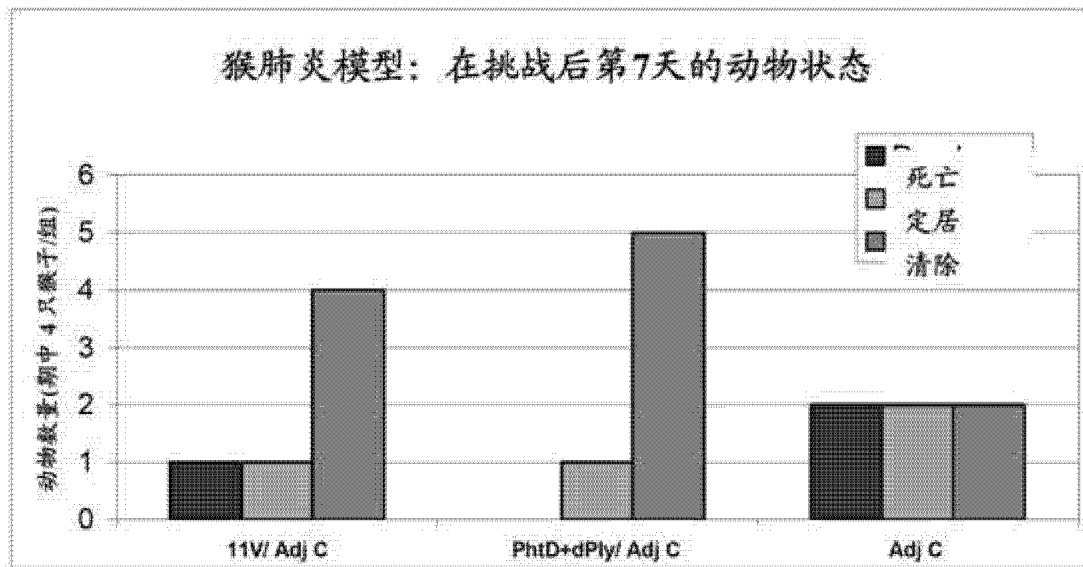


图 8

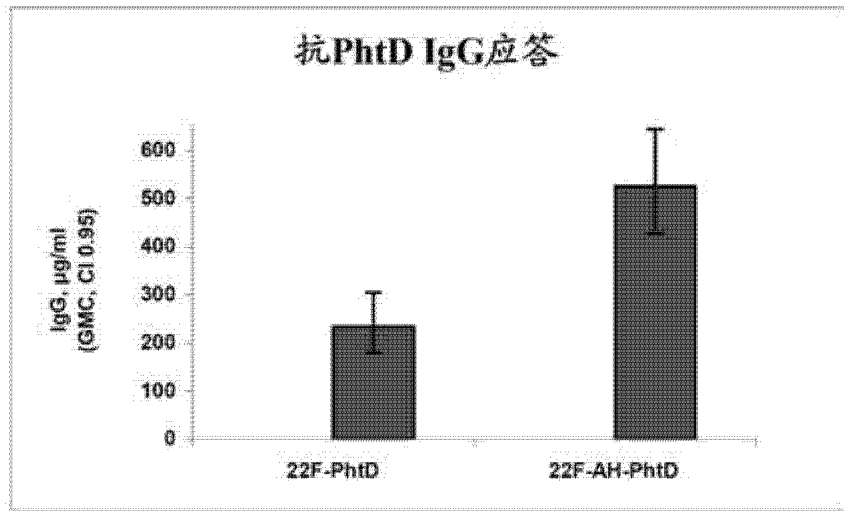


图 9

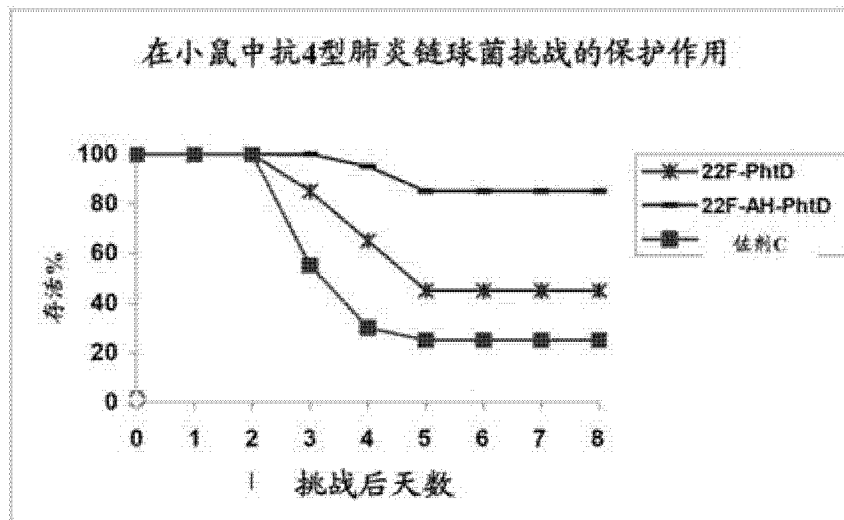


图 10