



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101583629 B

(45) 授权公告日 2013.08.21

(21) 申请号 200880002201.8

(22) 申请日 2008.01.11

(30) 优先权数据

0700562.2 2007.01.11 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.07.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/001116 2008.01.11

(87) PCT申请的公布数据

W02008/084411 EN 2008.07.17

(73) 专利权人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·巴多蒂 F·伯尔蒂

P·科斯坦蒂诺

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C07H 13/00(2006.01)

C08B 37/00(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 39/02(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004019992 A1, 2004.03.11, 图2, 流程图1, 第5页第2-5行, 第6页第27行第9页第1-2行, 第7页.

WO 2006120576 A2, 2006.11.16, 实施例.

审查员 朱芳

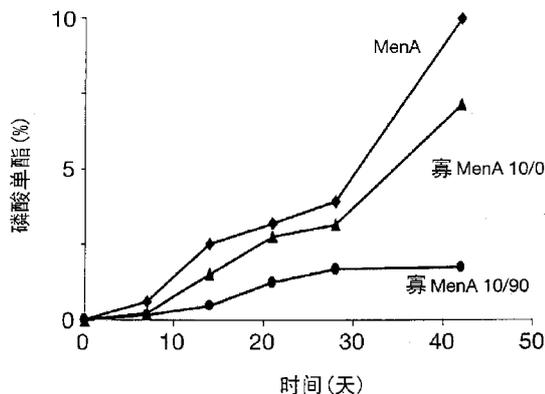
权利要求书6页 说明书49页 附图8页

(54) 发明名称

修饰的糖类

(57) 摘要

在相应天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置包含封端基团的修饰的荚膜糖, 其中所述封端基团具有式 (Ia) 或 (Ib) : -O-X-Y (Ia) 或 -O-R<sup>1</sup> (Ib), 其中 X 是 C(O)、S(O) 或 SO<sub>2</sub>; Y 是 NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> 或 R<sup>3</sup>; R<sup>1</sup> 是被 1、2 或 3 个独立选自羟基、巯基或胺的基团取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基; R<sup>2</sup> 是 H 或 C<sub>1-6</sub> 烷基; R<sup>3</sup> 是 C<sub>1-6</sub> 烷基; 用封端基团修饰荚膜糖的方法; 包含所述修饰的荚膜糖的糖-蛋白质偶联物; 制造所述糖-蛋白质偶联物的方法, 包含所述修饰的荚膜糖和 / 或糖-蛋白质偶联物的药物组合物; 以及其方法和用途。



1. 一种修饰的荚膜糖,其在相应的天然荚膜糖至少 80% 单糖单元的羟基位置包含封端基团,其中所述封端基团具有式(Ia):



其中

X 是 C(O);

Y 是 R<sup>3</sup>;和

R<sup>3</sup> 是 C<sub>1-6</sub> 烷基,

并且所述修饰的荚膜糖中至少四个单糖单元具有封端基团。

2. 如权利要求 1 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,R<sup>3</sup> 是 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 烷基。

3. 如权利要求 2 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,R<sup>3</sup> 是 C<sub>2</sub> 烷基或 C<sub>3</sub> 烷基。

4. 如权利要求 2 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,R<sup>3</sup> 是 CH<sub>3</sub>。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述糖中至少 90% 的单糖单元具有封端基团。

6. 如权利要求 5 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述糖中所有单糖单元具有封端基团。

7. 如权利要求 1-4 中任一项所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述相应的天然荚膜糖包含通过磷酸二酯键连接的单糖单元。

8. 如权利要求 7 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述相应的天然荚膜糖是脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 糖类。

9. 如权利要求 8 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述封端基团位于相应的脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 糖类的任何 4- 和 / 或 3- 位。

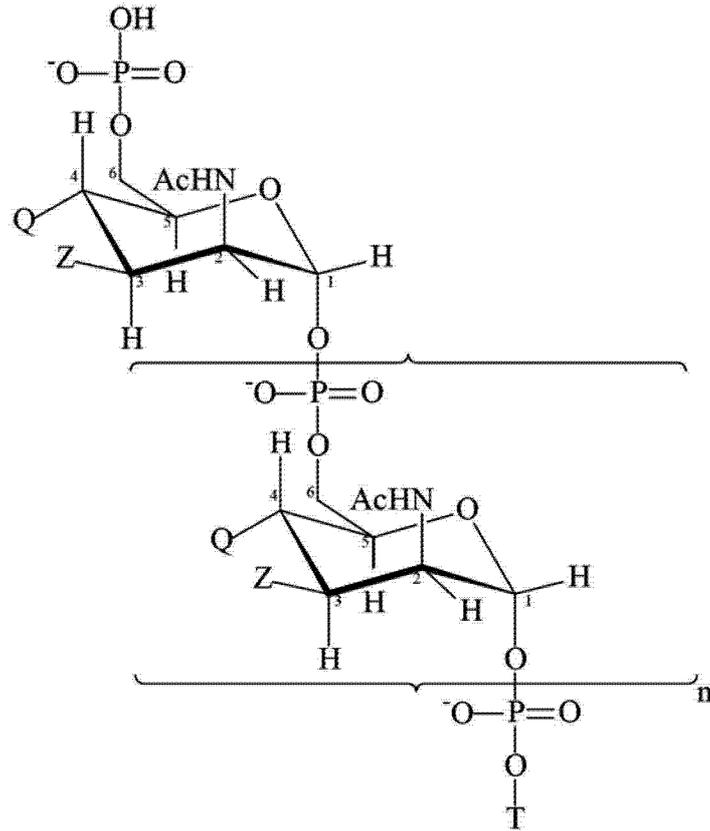
10. 如权利要求 9 所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述封端基团位于相应的脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 糖类的任何 4- 位。

11. 如权利要求 1-4 中任一项所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述修饰的荚膜糖是寡糖。

12. 如权利要求 1-4 中任一项所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述修饰的糖包含末端异头羟基或衍生自末端异头羟基的氨基。

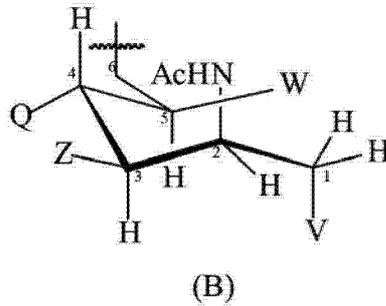
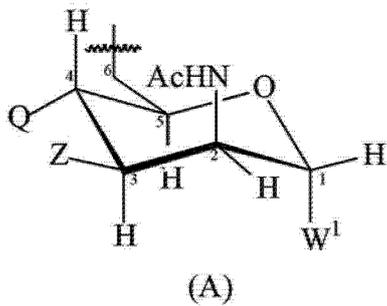
13. 如权利要求 1-4 中任一项所述的修饰的荚膜糖,其特征在于,所述修饰的荚膜糖的至少一个单糖单元中相应天然荚膜糖的两个邻位羟基不包含封端基团。

14. 一种具有下式的糖:



其中

T 具有式 (A) 或 (B) :



n 是 1-100 的整数 ;

各 Z 基团独立选自 OH、OAc 或下式 (Ia) 所示的封端基团 :



各 Q 基团独立选自 OH、OAc 或下式 (Ia) 所示的封端基团 :



V 选自 -NH<sub>2</sub>、-NHE、-NE<sup>1</sup>E<sub>2</sub>、W<sup>2</sup> 或 -O-D, 其中 :E、E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 是氮保护基, 所述保护基可以是相同或不同的, 且 D 是氧保护基 ;

W 选自 -OH 或如下式 (Ia) 所示的封端基团 :



W<sup>1</sup> 选自 -OH 或如下式 (Ia) 所示的封端基团 :



W<sup>2</sup> 选自 -OH 或如下式 (Ia) 所示的封端基团 :



且其中在相应的天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置上的至少一个 Z 基团和 / 或至少一个 Q 基团是下式 (Ia) 所示的封端基团 :

$-O-X-Y$  (Ia);

式 (Ia) 中, X 是  $-C(O)$ , Y 是  $R^3$ ,  $R^3$  是  $C_{1-6}$  烷基,

并且所述糖的至少 80% 单糖在 Z 基团和 / 或 Q 基团位置包含式 (Ia) 的封端基团 :

$-O-X-Y$  (Ia)。

15. 如权利要求 14 所述的糖, 其特征在于, 至少 10% 的 Z 基团是封端基团。

16. 如权利要求 14 或 15 所述的糖, 其特征在于, n 是 15-25 的整数。

17. 如权利要求 14-15 中任一项所述的糖, 其特征在于, 至少 1% 的 Q 基团是封端基团。

18. 一种修饰荚膜糖的方法, 该方法包括以下步骤 :

(a) 提供在单糖单元上具有至少一个羟基的荚膜糖 ; 和

(b) 将所述糖的至少 80% 单糖单元上的所述至少一个羟基转化成下式 (Ia) 所示封端基团 :

$-O-X-Y$  (Ia);

式 (Ia) 中, X 是  $-C(O)$ , Y 是  $R^3$ ,  $R^3$  是  $C_{1-6}$  烷基 ;

使得所述荚膜糖中至少四个单糖单元具有封端基团。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 且步骤 (b) 包括以下步骤 :

(b1) 在存在咪唑催化剂时使荚膜糖与  $[(R^3C(O))_2O]$  反应。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 中的所述荚膜糖是荚膜寡糖。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述荚膜寡糖可通过将相应天然荚膜多糖解聚和分级获得。

22. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 的所述荚膜糖是天然荚膜多糖, 且该方法还包括步骤 (c), 其中将步骤 (b) 的产物分级从而得到修饰的荚膜寡糖。

23. 一种修饰脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖的方法, 该方法包括以下步骤 :

(a) 提供天然脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖 ;

(b) 将所述多糖解聚和分级以提供寡糖 ; 和

(c) 将所述寡糖的至少一个羟基转化成如权利要求 18-19 中任一项所述的封端基团。

24. 一种修饰脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖的方法, 该方法包括以下步骤 :

(a) 提供天然脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖 ;

(b) 将所述多糖的至少一个羟基转化成如权利要求 18-19 中任一项所述的封端基团 ; 和

(c) 将所得多糖解聚和分级。

25. 一种制备如权利要求 1 所述的修饰的荚膜糖的方法, 所述方法是一种包括在两个或更多单糖单元之间形成糖苷键的全合成方法。

26. 一种通过权利要求 18-19 中任一项所述方法可获得的或者获得的修饰的荚膜糖。

27. 一种如权利要求 1-4 中任一项所述修饰的糖的糖 - 蛋白质偶联物。

28. 如权利要求 27 所述的偶联物, 其特征在于, 所述蛋白质是细菌毒素或类毒素。

29. 如权利要求 28 所述的偶联物, 其特征在于, 所述细菌毒素或类毒素是白喉毒素或

类毒素。

30. 如权利要求 29 所述的偶联物,其特征在于,所述细菌毒素或类毒素是 CRM<sub>197</sub>。

31. 一种制造糖 - 蛋白质偶联物的方法,该方法包括以下步骤:

(c) 提供如权利要求 12 所述的修饰的荚膜糖 ;和

(d) 通过末端异头羟基或衍生自末端异头羟基的氨基将所述修饰的荚膜糖偶联于蛋白质。

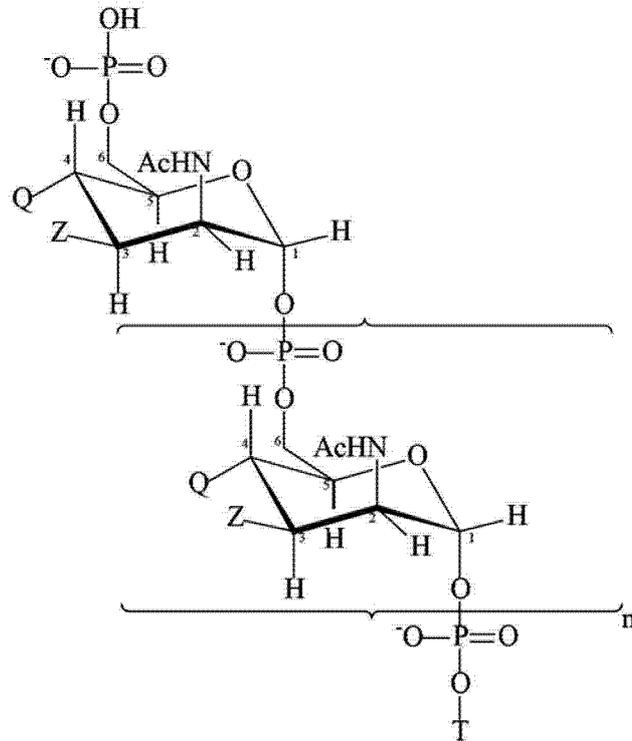
32. 一种制造糖 - 蛋白质偶联物的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 提供如权利要求 13 所述的修饰的荚膜糖 ;

(b) 通过氧化裂解将至少一对邻位羟基转化成醛基 ;和

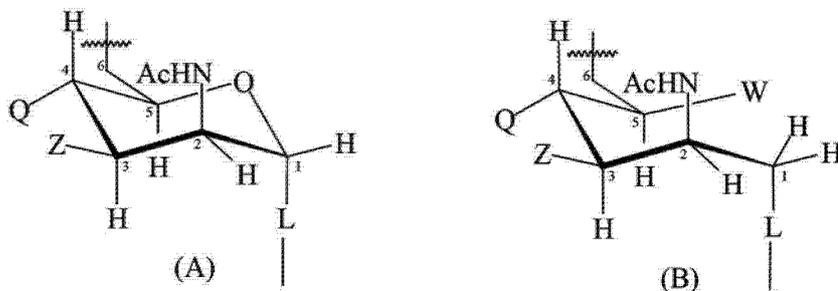
(c) 通过还原胺化将所述修饰的荚膜糖连接于蛋白质。

33. 一种包含下式所示糖部分的分子 :



其中

T 具有式 (A) 或 (B) :



n 是 1-100 的整数 ;

各 Z 基团独立选自 OH 或下式 (Ia) 所示的封端基团 :

-O-X-Y (Ia) ;

各 Q 基团独立选自 OH 或下式 (Ia) 所示的封端基团 :

-O-X-Y (Ia);

W 选自 -OH 或下式 (Ia) 所示的封端基团:

-O-X-Y (Ia);

L 是 O、NH、NE、S 或 Se, 其中, L 的游离共价键结合于蛋白质载体,

且其中所述蛋白质载体是细菌毒素或类毒素;

且其中在相应的天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置上的至少一个 Z 基团和 / 或至少一个 Q 基团是下式 (Ia) 所示的封端基团:

-O-X-Y (Ia)

式 (Ia) 中, X 是 -C(O), Y 是 R<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> 是 C<sub>1-6</sub> 烷基,

并且所述糖的至少 80% 单糖在 Z 基团和 / 或 Q 基团位置包含封端基团。

34. 一种药物组合物, 其包含 (a) 如权利要求 1-4 任一项所述的修饰的糖, 和 (b) 药学上可接受的载体。

35. 如权利要求 34 所述的组合物, 还包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 C、W135 和 Y 中一种或多种的糖类抗原。

36. 如权利要求 34 或 35 所述的组合物, 还包含疫苗佐剂。

37. 如权利要求 36 所述的组合物, 其特征在于, 所述佐剂是磷酸铝。

38. 如权利要求 34-35 中任一项所述的组合物, 其为抗脑膜炎奈瑟球菌所致疾病的疫苗。

39. 如权利要求 36 所述的组合物, 其特征在于, 它是一种抗脑膜炎奈瑟球菌所致的疾病的疫苗。

40. 如权利要求 35 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖是寡糖。

41. 如权利要求 40 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖偶联于载体蛋白质。

42. 一种药物组合物, 含有 (a) 权利要求 27-30 中任一项所述的糖 - 蛋白质偶联物, 和 (b) 药学上可接受的载体。

43. 如权利要求 44 所述的药物组合物, 还含有来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 C、W135 和 Y 中一种或多种的糖类抗原。

44. 如权利要求 45 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖是寡糖。

45. 如权利要求 46 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖偶联于载体蛋白质。

46. 如权利要求 44 所述的组合物, 其特征在于, 还含有疫苗佐剂。

47. 一种药物组合物, 含有 (a) 权利要求 33 所述的分子, 和 (b) 药学上可接受的载体。

48. 如权利要求 47 所述的组合物, 还含有来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 C、W135 和 Y 中一种或多种的糖类抗原。

49. 如权利要求 48 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖是寡糖。

50. 如权利要求 49 所述的组合物, 其特征在于, 所述糖偶联于载体蛋白质。

51. 如权利要求 47 所述的组合物, 还含有疫苗佐剂。

52. 如权利要求 48 所述的组合物, 还含有疫苗佐剂。

53. 权利要求 1-17 和 26 中任一项所述的修饰的糖、权利要求 27-30 中任一项所述的糖 - 蛋白质偶联物、或权利要求 33 所述的分子在制造用于预防或治疗一种或多种荚膜菌所致疾病的药物中的应用。

54. 如权利要求 53 所述的应用,其特征在于,所述疾病是细菌性脑膜炎。

## 修饰的糖类

[0001] 本文引用的所有文献通过引用全文纳入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明属于多糖化学领域,并涉及修饰的糖、其制备方法以及偶联的衍生物。具体地说,本发明涉及具有改善的水中稳定性的修饰的糖。

### 背景技术

[0003] 多糖是重要的生物分子,它们已经广泛应用在制药工业中,用于疾病的预防和治疗。例如,多年来荚膜多糖已经应用在对抗荚膜细菌,如脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和 Hib (B 型流感嗜血杆菌) (*Haemophilus influenzae* type B) 的疫苗中。

[0004] 为了提高这些多糖的免疫原性,尤其是提高这些多糖在儿童中的免疫原性,已开发了偶联疫苗。它们包含偶联在载体蛋白质上的荚膜多糖 [如,参考文献 1、2、3]。偶联作用能使得 T- 非依赖性的抗原转变为 T- 依赖性的抗原。

[0005] 许多类型的多糖的问题是其在水中的稳定性差。多糖在水中的稳定性取决于连接糖单元的 O- 糖苷键的性质。水中的稳定性差是由于 O- 糖苷键在酸或糖苷酶存在下容易发生水解。血清组 A 脑膜炎球菌的荚膜多糖是水中稳定性差的多糖的一个例子。

[0006] 多糖的稳定性是生产偶联疫苗中的一个具体问题。为了制备多糖 - 蛋白质偶联物,需要对多糖的官能团进行化学操作,使得多糖能被连接到蛋白质上。将多糖暴露于化学试剂,特别是酸,可能导致不希望的糖苷键断裂,接着发生多糖的片段化。这样的片段化是极不希望发生的,它降低了多糖 - 蛋白质偶联物合成的产率。

[0007] 在这种情况下不稳定的多糖一般需要小心选择试剂和反应条件以克服上述的问题。然而,这限制了可用于操作多糖的试剂,因而限制了多糖和载体蛋白质之间的可能形成的键联的范围。此外,这些多糖的不稳定性意味着难以开发出有效的可用于工业规模制备疫苗的操作程序。

[0008] 参考文献 4 披露了一种修饰的荚膜糖,其在相应的天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置包含封端基团。据说修饰的荚膜糖具有改善的水解稳定性。本发明的一个目的是提供另一种或改进的具有改善的水解稳定性的修饰的荚膜糖。

### 发明内容

[0009] 本发明基于以下的发现:荚膜糖的单糖单元上的羟基的修饰可提高其稳定性。用本发明方法得到的修饰的糖较其相应的未修饰的糖对水解更稳定。

[0010] 因此,本发明提供了一种修饰的荚膜糖,其在相应的天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置包含封端基团 (blocking group)。封端基团的定义如下。本发明的修饰的荚膜糖较其天然的糖对应物对水解更稳定。优选地,本发明的修饰的荚膜糖保留与其天然糖对应物的免疫交叉反应性。

[0011] 本发明还提供了用封端基团修饰荚膜糖的方法；包含所述修饰的荚膜糖的糖-蛋白质偶联物；制造所述糖-蛋白质偶联物的方法，包含所述修饰的荚膜糖和/或糖-蛋白质偶联物的药物组合物；以及其方法和用途。

[0012] 本发明的修饰的糖

[0013] 本发明提供了一种修饰的荚膜糖，其在相应的天然荚膜糖至少一个单糖单元的羟基位置包含封端基团。封端基团具有式 (Ia) 或 (Ib)：

[0014]  $-O-X-Y$  (Ia)  $-O-R^1$  (Ib)

[0015] 其中

[0016] X 是 C(O)、S(O) 或 SO<sub>2</sub>；

[0017] Y 是 NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> 或 R<sup>3</sup>；

[0018] R<sup>1</sup> 是被 1、2 或 3 个独立选自羟基、巯基或胺的基团取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基；

[0019] R<sup>2</sup> 是 H 或 C<sub>1-6</sub> 烷基；和

[0020] R<sup>3</sup> 是 C<sub>1-6</sub> 烷基。

[0021] 优选地，封端基团具有式 (Ia)。在该实施方式中，优选 X 是 C(O)。这种氨基甲酸酯和酯封端基团对糖苷键具有稳定效果并可在温和条件下制备。提供氨基甲酸酯和酯封端基团的糖的操作方法的例子在下文中描述。然而，本发明不限于通过本文列举方法制备的修饰的糖，本发明的修饰的糖的其他制备方法对技术人员而言是显而易见的。

[0022] 优选地，R<sup>2</sup> 是 H。

[0023] R<sup>1</sup> 的 C<sub>1-6</sub> 烷基被 1、2 或 3 个独立选自羟基、巯基或胺的基团取代。当 C<sub>1-6</sub> 烷基被 2 或 3 个基团取代时，取代基可以是相同基团或不同基团，但通常是相同的基团。优选地，R<sup>1</sup> 的 C<sub>1-6</sub> 烷基被 1、2 或 3 个羟基取代。

[0024] R<sup>1</sup> 可在 C<sub>1-6</sub> 烷基链的任何位置被取代。优选地，至少一个取代基存在于 C<sub>1-6</sub> 烷基链的远端。当 C<sub>1-6</sub> 烷基链是直链烷基时，这意味着 C<sub>1-6</sub> 烷基在 C<sub>x</sub> 上被取代，其中 x 是 C<sub>1-6</sub> 烷基链中碳原子的总数。类似地，当 C<sub>1-6</sub> 烷基链是支链烷基时，这意味着 C<sub>1-6</sub> 烷基在一个支链，通常是最长支链的远端被取代。

[0025] 在优选实施方式中，R<sup>1</sup> 被单个基团取代，该取代位于 C<sub>1-6</sub> 烷基链的远端，如上所述。这种基团对于提供改善的水解稳定性特别有效。优选地，所述单个基团是羟基。因此优选的基团包括羟甲基、2-羟基乙基、3-羟基丙基、4-羟基丁基、5-羟基戊基和 6-羟基己基。特别优选的基团是 2-羟基乙基。

[0026] 在其他优选实施方式中，R<sup>1</sup> 被两个邻位基团 (vicinal group)，即位于 C<sub>1-6</sub> 烷基链相邻位置上的两个基团取代。这种基团对于提供改善的水解稳定性特别有效。优选地，两个邻位基团位于 C<sub>1-6</sub> 烷基链的远端。当 C<sub>1-6</sub> 烷基链是直链烷基时，这意味着两个邻位基团位于 C<sub>x</sub> 和 C<sub>x-1</sub> 上，其中 x 是 C<sub>1-6</sub> 烷基链中碳原子的总数。类似地，当 C<sub>1-6</sub> 烷基链是支链烷基时，这意味着两个邻位基团位于一个支链，通常是最长支链的远端。优选地，所述两个邻位基团是羟基。这种基团为与载体分子偶联提供柄 (handle)，如下所述。因此，优选的基团包括 1,2-二羟基乙基；1,2-二羟基丙基和 2,3-二羟基丙基；1,2-二羟基丁基、2,3-二羟基丁基和 3,4-二羟基丁基；1,2-二羟基戊基、2,3-二羟基戊基、3,4-二羟基戊基和 4,5-二羟基戊基；以及 1,2-二羟基己基、2,3-二羟基己基、3,4-二羟基己基、4,5-二羟基己基和 5,6-二羟基己基。如上所述，优选所述两个邻位基团位于 C<sub>1-6</sub> 烷基链的远端。因此，特别优

选的基团包括 1,2-二羟基乙基、2,3-二羟基丙基、3,4-二羟基丁基、4,5-二羟基戊基和 5,6-二羟基己基。特别优选的基团 4,5-二羟基戊基。

[0027] 在一些实施方式中,修饰的荚膜糖包含至少两种封端基团(如上所述)。例如,优选所述糖包含:a)至少一个封端基团,其中 $R^1$ 被单个基团取代,该取代发生在 $C_{1-6}$ 烷基链的远端(如上所述);和b)至少一个封端基团,其中 $R^1$ 被两个邻位基团取代(如上所述)。这种混合的封端基团对于提供改善的水解稳定性特别有效。此外,通过包含至少一个其中 $R^1$ 被两个邻位羟基取代的封端基团为与载体分子偶联提供柄,如下所述。

[0028] 优选地, $R^3$ 是 $C_1-C_3$ 烷基。最优选地, $R^3$ 是 $C_1$ 烷基( $CH_3$ ),尽管 $C_2$ 烷基和 $C_3$ 烷基也是优选的。

[0029] 式 $-O-X-Y$ 或 $-O-R^1$ 的封端基团可通过标准衍生操作由羟基(如天然分子中发现的那样)制备,如将羟基与酰卤、烷基卤、磺酰卤等反应。因此, $-O-X-Y$ 中的氧原子优选是羟基的氧原子,而 $-O-X-Y$ 中的 $-X-Y$ 基团优选代替羟基的氢原子。或者,可通过取代反应如 Mitsunobu 型取代获得封端基团。这些以及其他从羟基制备封端基团的方法是熟知的。

[0030] 通常,本发明的修饰的糖是寡糖。寡糖可通过本文所述的任何解聚和分级(sizing)方法从多糖获得。

[0031] 本发明的修饰的荚膜糖可从天然荚膜糖获得。然而,本发明不限于从天然荚膜糖获得的修饰的糖。本发明的修饰的荚膜糖可通过其他方法获得,如全合成或部分合成(参见,例如,参考文献 5)。

[0032] 在本发明的修饰的荚膜糖中,具有封端基团的单糖单元的数目是可变的。优选地,修饰的荚膜糖中所有的或几乎所有的单糖单元可具有封端基团。或者,修饰的荚膜糖中至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 的单糖单元可具有封端基团。修饰的荚膜糖中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个单糖单元可具有封端基团。

[0033] 当修饰的荚膜糖包含至少两种类型的封端基团时,具有每种类型的封端基团的单糖单元的数目也是可变的。例如,相对其他类型封端基团由一种类型的封端基团构成的封端基团总数的比例是可变的。具体地说,当存在两种类型的封端基团时,一种类型封端基团与另一类型封端基团的比例可选自 1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2 和 1 : 1。具体地说,在上述实施方式中,当所述糖包含以下封端基团时:a)至少一个其中 $R^1$ 被单个基团取代且该取代位于 $C_{1-6}$ 烷基链远端的封端基团;和b)至少一个其中 $R^1$ 被两个邻位基团取代的封端基团,优选前一种类型的封端基团与后一种类型的封端基团的比例选自 99 : 1、98 : 2、97 : 3、96 : 4、95 : 5、94 : 6、93 : 7、92 : 8、91 : 9、90 : 10、89 : 11、88 : 12、87 : 13、86 : 14、85 : 15、84 : 16、83 : 17、82 : 18、81 : 19 和 80 : 20。在这些比例中,95 : 5、94 : 6、93 : 7、92 : 8、91 : 9、90 : 10、89 : 11、88 : 12、87 : 13、86 : 14 和 85 : 15 是特别优选的。在这些比例中优选 90 : 10。

[0034] 同样,单糖单元上封端基团的数目是可变的。例如,单糖单元上封端基团的数目可以是 1、2、3、4、5 或 6,优选 1-4,更优选 1 或 2,最优选 1。

[0035] 在一个实施方式中,所述至少一个具有封端基团的单糖单元包括非末端单糖单

元。术语“非末端单糖单元”是指不是寡糖 / 多糖链中末端单糖单元之一的单糖单元。

[0036] 本发明包括修饰的荚膜糖,其中末端和非末端单糖单元的全部羟基位置都有封端基团。然而,在一些优选实施方式中,本发明的修饰的荚膜糖中至少有一个游离的羟基或氨基。有一个游离的羟基或氨基是有利的,因为它为修饰的荚膜糖提供了进一步反应(如偶联到载体分子上)的柄。当修饰的糖含有游离羟基时,它可以是异头羟基,具体是末端异头羟基。当修饰的糖含有氨基时,它可以是由异头羟基衍生的。通过还原性胺化反应(例如用  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 容易从异头羟基得到氨基。类似地,在其他优选实施方式中,所述修饰的荚膜糖的至少一个单糖单元中相应天然荚膜糖的两个邻位羟基不包含封端基团。优选地,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%的单糖单元具有两个这种方式的邻位羟基。例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个单糖单元具有两个这种方式的邻位羟基。优选地,5-15%,最优选10%的单糖单元具有两个这种方式的邻位羟基。单糖单元中的两个邻位羟基是有利的,因为它们为与载体分子偶联提供柄,如下所述。

[0037] 或者,在一些优选实施方式中,修饰的荚膜糖中至少一个或至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%单糖单元可具有封端基团,其中  $\text{R}^1$  被两个邻位羟基取代,如上所述。例如,修饰的荚膜糖中1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个单糖单元可具有这种封端基团。优选地,修饰的荚膜糖中5-15%,最优选10%单糖单元具有其中  $\text{R}^1$  被两个邻位羟基取代的封端基团。再者,单糖单元中的两个邻位羟基是有利的,因为它们为与载体分子偶联提供柄,如下所述。

[0038] 参考文献4中建议有效的封端基团是吸电子基团。不希望被理论束缚,但相信糖苷键对水解不稳定是由于受到糖羟基对糖苷键的分子内亲核进攻(即形成环状中间体)引起的。羟基的亲核性越大,分子内亲核进攻的倾向就越大。吸电子的封端基团具有使氧孤对电子离域化的作用,因此降低氧的亲核性,并降低分子内亲核进攻的倾向。我们吃惊地发现,包含被1、2或3个独立选自羟基、巯基或胺的基团取代的  $\text{C}_{1-6}$  烷基的基团可以是有效的封端基团,尽管封端基团中存在亲核的羟基、巯基或胺。此外,这些羟基-、巯基-或胺-取代的基团是有利的,因为它们能够将修饰的荚膜糖与载体分子更加有效地偶联。不希望被理论束缚,但相信这种效果源自包含被1、2或3个独立选自羟基、巯基或胺的基团取代的  $\text{C}_{1-6}$  烷基的基团的相对亲水性。此外,当封端基团包含被两个邻位羟基取代的  $\text{C}_{1-6}$  烷基时,该封端基团本身为与载体分子偶联提供柄。

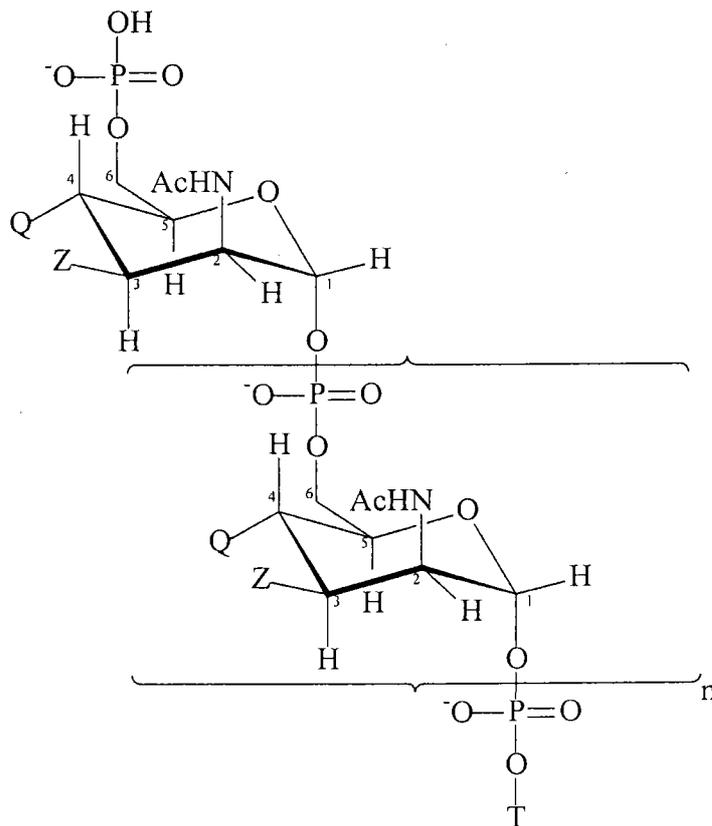
[0039] 在上述所有实施方式中,修饰的荚膜糖优选为具有磷酸二酯键的修饰的荚膜糖。更优选地,所述修饰的荚膜糖是修饰的脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseriameningitidis*)血清组A糖类。脑膜炎奈瑟球菌血清组A糖类对水解特别不稳定。

[0040] 当所述修饰的荚膜糖是修饰的脑膜炎奈瑟球菌血清组A糖类时,所述封端基团优选位于相应的脑膜炎奈瑟球菌血清组A糖类的4-和/或3-位,更优选位于4-位。位于脑膜炎奈瑟球菌血清组A糖类4-和/或3-位的封端基团已显示出对于提高水解稳定性特别有效。

[0041] 在具有酯封端基团的实施方式中（即当封端基团具有式 (Ia), X 是 C(O) 且 Y 是 R<sup>3</sup> 时), 发明人发现, 修饰的脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 糖类的稳定性受到具有封端基团的 4- 和 / 或 3- 位的比例影响。例如, 具有封端基团的 4- 位的比例可以是约 0%, 至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或约 100%, 优选为至少 30% 和约 100%。类似地, 具有封端基团的 3- 位的比例可以是约 0%, 至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或约 100%, 优选为至少 95% 和约 100%。通常, 具有封端基团的 4- 和 3- 位的比例是在各位置上大致相同。换句话说, 具有封端基团的 4- 位与具有封端基团的 3- 位的比例约为 1 : 1。然而, 在一些实施方式中, 具有封端基团的 4- 位与具有封端基团的 3- 位的比例是可变的。例如, 具有封端基团的 4- 位与具有封端基团的 3- 位的比例可以是 1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3 或 1 : 2。类似地, 具有封端基团的 3- 位与具有封端基团的 4- 位的比例可以是 1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3 或 1 : 2。

[0042] 本发明还提供一种下式所示糖 :

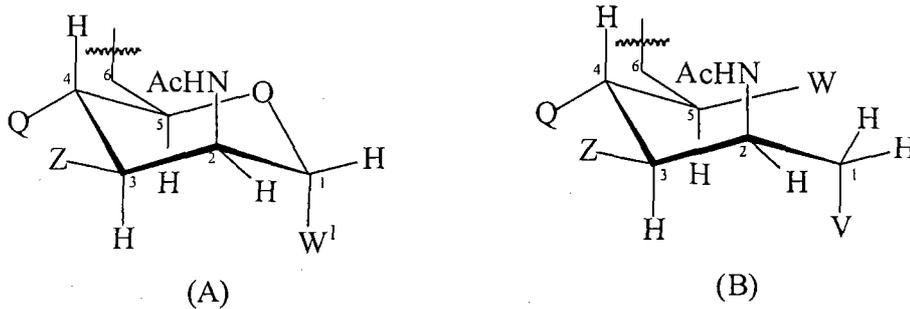
[0043]



[0044] 其中

[0045] T 具有式 (A) 或 (B) :

[0046]



[0047]  $n$  是 1-100 的整数；

[0048] 各  $Z$  基团独立选自  $\text{OH}$ 、 $\text{OAc}$  或如上文所定义的封端基团；和

[0049] 各  $Q$  基团独立选自  $\text{OH}$ 、 $\text{OAc}$  或如上文所定义的封端基团；

[0050]  $V$  选自  $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHE}$ 、 $-\text{NE}^1\text{E}^2$ 、 $\text{W}^2$  或  $-\text{O}-\text{D}$ ，其中： $E$ 、 $E^1$  和  $E^2$  是氮保护基，所述保护基可以是相同或不同的，且  $D$  是氧保护基；

[0051]  $W$  选自  $\text{OH}$  或如上文所定义的封端基团；

[0052]  $\text{W}^1$  选自  $-\text{OH}$  或如上文所定义的封端基团；

[0053]  $\text{W}^2$  选自  $-\text{OH}$  或如上文所定义的封端基团；

[0054] 其中至少 1（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40）个  $Z$  基团和至少 1（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40）个  $Q$  基团是如上文定义的封端基团。

[0055] 优选地， $n$  是 15-20 的整数。

[0056]  $n+2$  个  $Z$  基团各自可以是相同或不同的。同样， $n+2$  个  $Q$  基团各自可以是相同或不同的。

[0057]  $V$  优选是  $-\text{NH}_2$  或  $-\text{NHE}$ 。

[0058] 合适的氮保护基是甲硅烷基（如 TMS、TES、TBS、TIPS）、酰基衍生物（如三氟乙酰胺、甲氧基羰基、乙氧基羰基、叔丁氧基羰基（Boc）、苄氧基羰基（Z 或 Cbz）、9-苄基甲氧基羰基（Fmoc）、2-（三甲基甲硅烷基）乙氧基羰基、烯丙氧基羰基（Alloc）、2,2,2-三氯乙氧基羰基（Troc）、磺酰衍生物（如  $\beta$ -三甲基甲硅烷基乙磺酰（SES）、亚磺酰衍生物、 $\text{C}_{1-12}$  烷基、苄基、二苯甲基、三苯甲基、烯丙基、9-苄基苄基，等等。优选的氮保护基是 Fmoc。

[0059] 二价的氮保护基可表示为  $\text{E}^1\text{E}^2$ ，包括环酰亚胺衍生物（如  $N$ -邻苯二甲酰亚胺、 $N$ -二硫杂琥珀酰亚胺、 $N$ -2,3-二苯基马来酰亚胺）、亚胺衍生物（如  $N$ -1,1-二甲基硫代亚甲基胺、 $N$ -亚苄基胺、 $N$ -对甲氧基亚苄基胺、 $N$ -二苯基亚甲基胺）、烯胺衍生物（如  $N$ -(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺)等。优选的二价氮保护基是  $N$ -邻苯二甲酰亚胺基。

[0060] 合适的氧保护基包括酯、醚（如甲硅烷基醚或烷基醚）和缩醛。具体例子包括烯丙基、乙酰基、Alloc、苄基、苄氧基甲基（BOM）、叔丁基、三苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基（TBS）、叔丁基二苯基硅烷基（TBDPS）、三乙基硅烷基（TES）、三甲基硅烷基（TMD）、三异丙基硅烷基（TIPS）、对甲氧基苄基（PMB）、MEM、甲氧基甲基（MOM）、MTM 和四氢吡喃基（THP）。

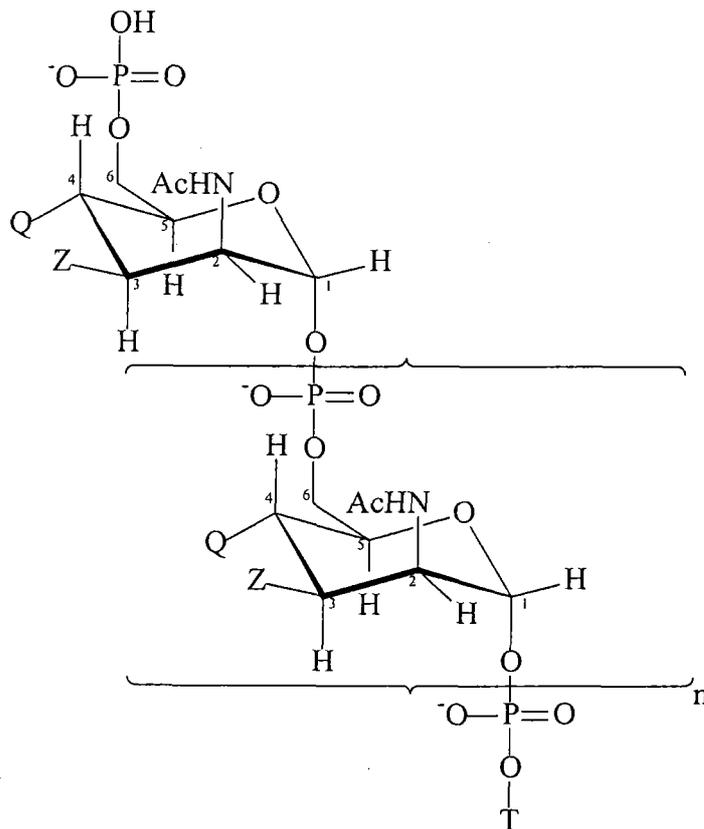
[0061] 所有的  $Z$  基团可以是  $\text{OH}$ （前提是至少一个  $Z$  基团和 / 或至少一个  $Q$  基团是封端基团）。或者，所有  $Z$  基团中至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 可以

是 OAc。优选约 60-90% 的 Z 是 OAc, 其它的 Z 基团是 OH 或上面定义的封端基团。优选地, 至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35% 或 40% 的 Z 基团是封端基团, 60-90% 是 OAc, 其余为 OH。优选地, 约 10-40% 的 Z 基团是封端基团, 60-90% 是 OAc, 而其余为 OH。或者, 约 0%、至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或约 100% 的 Z 基团是封端基团, 优选至少 95% 和约 100%。

[0062] 所有的 Q 基团可以是 OH (前提是至少一个 Z 基团和 / 或 Q 基团是封端基团)。或者, 至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15% 或 20% 的 Q 基团可以是 OAc。优选约 1-20% 的 Q 基团是 OAc, 其余的 Q 基团是 OH 或上面定义的封端基团。优选地, 至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的 Q 基团是封端基团, 1-20% 是 OAc, 其余为 OH。优选地, 约 80-99% 的 Q 基团是封端基团, 1-20% 是 OAc, 而其余为 OH。或者, 约 0%、至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或约 100% 的 Q 基团是封端基团, 优选至少 30% 和约 100%。

[0063] 本发明还提供了一种包含下式所示糖部分的分子:

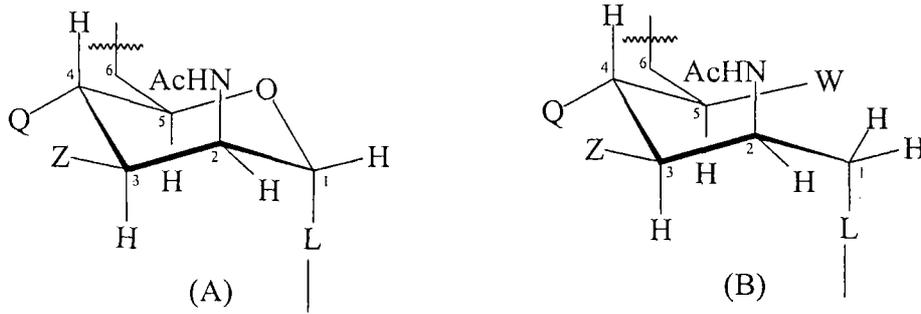
[0064]



[0065] 其中

[0066] T 具有式 (A) 或 (B):

[0067]



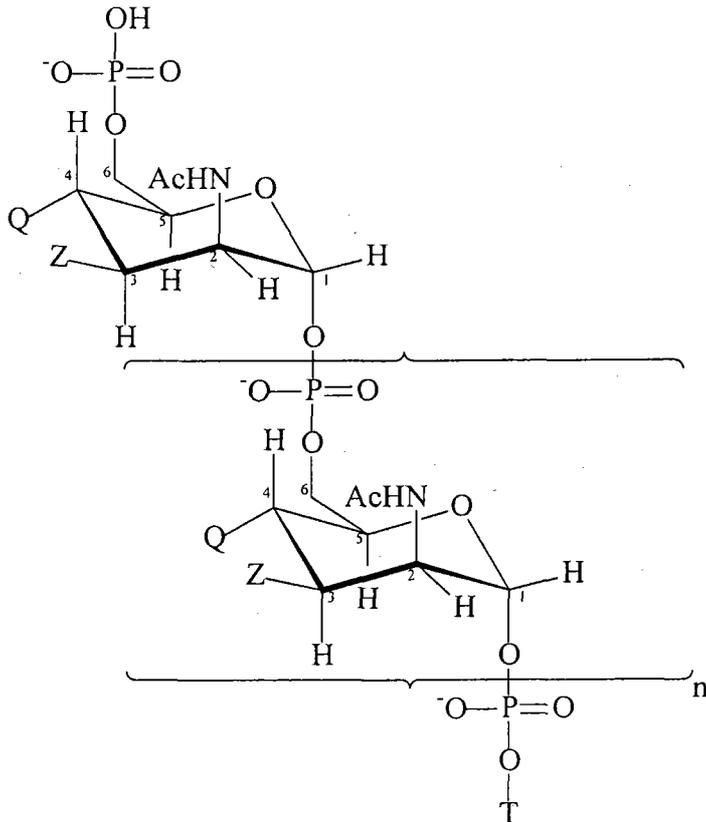
[0068] n、Z、Q 和 W 如上文所定义；至少 1 (如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40) 个 Z 基团和 / 或至少 1 (如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40) 个 Q 基团是封端基团；并且 L 是 O、NH、NE、S 或 Se。

[0069] L 的游离共价键可与任何合适的部分，如与 -H、-E、接头、蛋白质载体等连接。L 也可能是 N，连接到二价接头、二价保护基或二价蛋白质载体上。

[0070] 优选的 n、Z、Q 和 W 基团在上文中描述。

[0071] 本发明还提供了一种包含下式所示糖的分子：

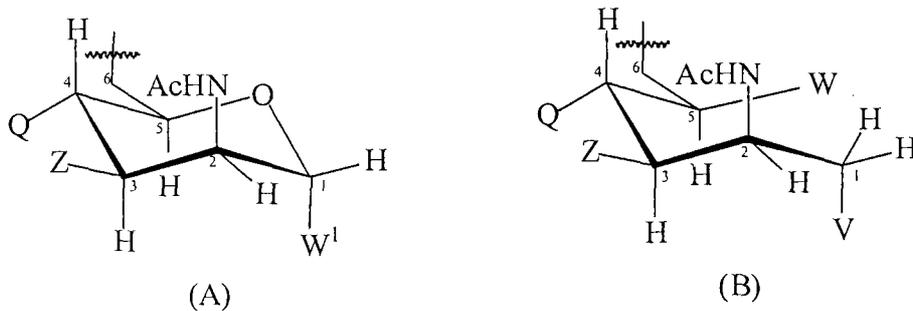
[0072]



[0073] 其中

[0074] T 具有式 (A) 或 (B)：

[0075]



[0076] n、Z、Q、W、W<sup>1</sup> 和 V 如上文所定义，和至少 1（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40）个 Z 基团和 / 或至少 1（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40）个 Q 基团具有式 (IIa) 或 (IIb)：

[0077]  $-O-X-Y'$  (IIa)  $-O-R^4$  (IIb)

[0078] 其中

[0079] X 如上文所定义；

[0080] Y' 是  $NR^2R^4$ ；

[0081] R<sup>2</sup> 如上文所定义；和

[0082] R<sup>4</sup> 是  $-C_{1-4}$  亚烷基  $-CH(O)$  或  $-C_{1-5}$  亚烷基  $-NH-$ ，其中  $-NH-$  基团是蛋白质载体的一部分。

[0083] 优选地，Z 和 / 或 Q 基团中至少有一个具有式 (IIa)。在该实施方式中，优选 X 是  $C(O)$ 。

[0084] 优选的 R<sup>2</sup> 基团在上文的式 (Ia) 中描述。

[0085] 优选的 R<sup>4</sup> 基团包括  $-C_1$  亚烷基  $-CH(O)$ 、 $-C_2$  亚烷基  $-CH(O)$ 、 $-C_3$  亚烷基  $-CH(O)$  和  $-C_4$  亚烷基  $-CH(O)$ 。特别优选的 R<sup>4</sup> 基团是  $-C_3$  亚烷基  $-CH(O)$ 。

[0086] 其他优选的 R<sup>4</sup> 基团包括  $-C_1$  亚烷基  $-NH-$ 、 $-C_2$  亚烷基  $-NH-$ ； $-C_3$  亚烷基  $-NH-$ 、 $-C_4$  亚烷基  $-NH-$  和  $-C_5$  亚烷基  $-NH-$ 。特别优选的 R<sup>4</sup> 基团是  $-C_4$  亚烷基  $-NH-$ 。

[0087] 优选的 n、Z、Q、W、W<sup>1</sup> 和 V 基团在上文中描述。

[0088] 制造修饰的糖的方法

[0089] 本发明提供了一种修饰荚膜糖的方法，该方法包括以下步骤：

[0090] (a) 提供在单糖单元上具有至少一个羟基的荚膜糖；和

[0091] (b) 将所述至少一个羟基转化成封端基团。

[0092] 所述封端基团是上文中定义的任何一种封端基团。

[0093] 荚膜糖可以是天然的荚膜糖（寡糖或多糖）。或者，荚膜糖可以是例如脱-0-乙酰基的荚膜糖和 / 或具有末端氨基的荚膜糖（如通过还原性胺化得到的）。

[0094] 在修饰封端基团是  $-OC(O)NR^1R^2$  的糖的优选方法中，步骤 (b) 包括以下步骤：

[0095] (b1) 在有机溶剂中使荚膜糖与双功能试剂反应；和

[0096] (b2) 将步骤 (b1) 的产物与式 (III) 的氨基化合物反应：

[0097]  $HNR^1R^2$  (III)

[0098] 其中 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 如上文定义。

[0099] 术语“双功能试剂”指能够发挥以下双重功能的任何试剂：(i) 在步骤 (b1) 提供第一亲电子碳原子，用于与糖的羟基偶联；(ii) 提供第二亲电子碳原子，用于与步骤 (b2) 所用的氨基偶联。一般，第二亲电子碳原子在步骤 (b) 中从第一亲电子碳原子再生。双功能试剂在多糖和氨基化合物之间提供  $-C(O)-$  连接。

[0100] 本发明使用的双功能试剂包括但不限于 1,1'-羰基二咪唑 (CDI)、羰基二-1,2,4-三唑 (CDT)、羰基二-1,2,3-苯并三唑 (CDB)、碳酸二苯酯、溴化氰、光气或三光气。熟练人员应知道能够起相同作用的其它双功能试剂。

[0101] 优选的双功能试剂是 CDI。CDI 的优点是比例如光气或溴化氰温和。特别是，使用 CDI 的偶联反应不会产生氢卤酸气体如 HCl 或 HBr。HCl 或 HBr 气体的产生是不利的，因为这些气体要求在反应室出口洗气以避免它们逃逸入大气中。而且，HCl 或 HBr 的产生可能影响糖的敏感官能团，发生糖的分解或片段化，引起产率下降。

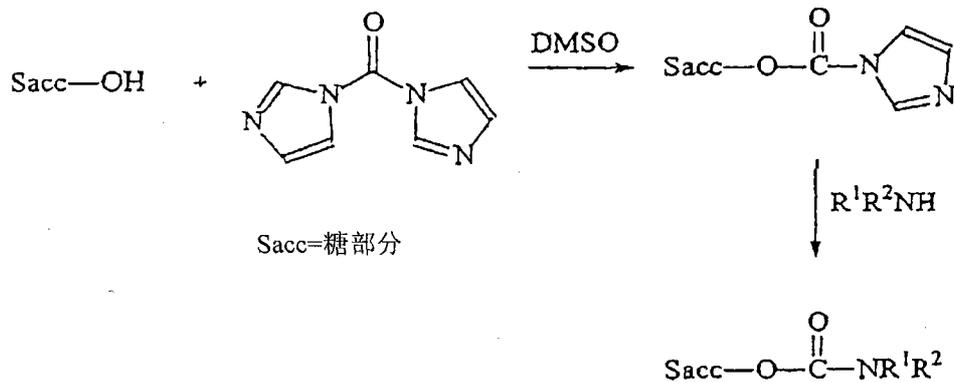
[0102] 用于步骤 (b1) 的有机溶剂优选是非质子溶剂。非质子溶剂是本领域技术人员熟知的，不包含任何可离解的氢原子。这些溶剂是有利的，因为它们通过增强羟基的亲核性而促进糖羟基与双功能试剂的反应。合适的非质子溶剂包括但不限于：二甲亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)、甲酰胺、六甲基磷三酰胺 (HMPT)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮 (DMPU)、二甲基乙酰胺 (DMAC) 或六甲基磷酰胺 (HMPA)。DMSO 是优选的。

[0103] 在本发明方法的步骤 (b2) 中，步骤 (b1) 的产物与氨基化合物反应，形成修饰的多糖。用于本发明方法的氨基化合物是式 (III) 化合物，如上定义。

[0104] 可用于本发明的合适的氨基化合物取决于  $R^1$  和  $R^2$ 。如上所述，在优选实施方式中， $R^1$  被单个羟基取代，该取代位于  $C_{1-6}$  烷基链的远端，且  $R^2$  是 H。因此，可用于本发明的优选的氨基化合物包括氨基甲醇、2-氨基乙醇、3-氨基丙-1-醇、4-氨基丁-1-醇、5-氨基戊-1-醇和 6-氨基己-1-醇。特别优选的氨基化合物是 2-氨基乙醇。在其他优选实施方式中， $R^1$  被两个邻位羟基取代，且  $R^2$  是 H。因此，优选的可用于本发明的氨基化合物包括 1-氨基乙-1,2-二醇；1-氨基丙-1,2-二醇和 3-氨基丙-1,2-二醇；1-氨基丁-1,2-二醇、1-氨基丁-2,3-二醇和 4-氨基丁-1,2-二醇；1-氨基戊-1,2-二醇、1-氨基戊-2,3-二醇、5-氨基戊-2,3-二醇和 5-氨基戊-1,2-二醇；和 1-氨基己-1,2-二醇、1-氨基己-2,3-二醇、5-氨基己-3,4-二醇、6-氨基己-2,3-二醇和 6-氨基己-1,2-二醇。在特别优选的实施方式中， $R^1$  被两个邻位羟基在  $C_{1-6}$  烷基链远端取代。因此，可用于本发明的优选的氨基化合物包括 3-氨基丙-1,2-二醇、4-氨基丁-1,2-二醇、5-氨基戊-1,2-二醇和 6-氨基己-1,2-二醇。特别优选的氨基化合物是 5-氨基戊-1,2-二醇。它们可以盐形式（如盐酸盐）用于本发明。

[0105] 优选的本发明方法列举在下面的方案 1 中：

[0106]



[0107] 方案 1

[0108] 在该方案中,首先用 CDI 在 DMSO 溶剂中通过单糖单元上的至少一个羟基使糖(如 MenA 多糖或寡糖)活化。生成的咪唑氨基甲酸酯中间体用胺 R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>NH(如 2-氨基乙醇)捕获,产生修饰的糖。

[0109] 或者,可以通过使荚膜糖的一个或多个羟基与式 XC(O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>的试剂反应用一步方法制备修饰的糖,其中 X 是离去基团,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>如上定义。合适的离去基团包括但不限于 -Cl、-Br、-CF<sub>3</sub>、-OC<sub>6</sub>F<sub>5</sub>或 -CCl<sub>3</sub>。

[0110] 在修饰封端基团是 -OC(O)NR<sup>3</sup>的糖的优选方法中,步骤(b)包括以下步骤:

[0111] (b1) 在存在咪唑催化剂时使荚膜糖与 [(R<sup>3</sup>C(O))<sub>2</sub>O]反应。

[0112] 该方法特别适合修饰其中的封端基团是 -OC(O)CH<sub>3</sub>的糖。在该实施方式中,步骤(b)包括以下步骤:

[0113] (b1) 在存在咪唑催化剂时使荚膜糖与 [(CH<sub>3</sub>C(O))<sub>2</sub>O](乙酸酐)反应。

[0114] 或者,本发明的修饰的荚膜糖可以通过合成方法,例如,从合适的单糖单元制备。通常,修饰的荚膜糖的全合成包括在合适的单糖单元之间形成糖苷键连接(如磷酸二酯键连接),然后用上述的任何方法修饰得到的糖。或者,可在形成糖苷键连接之前修饰单糖单元,得到相同的修饰的荚膜糖。

[0115] 本发明的修饰的荚膜糖优选是寡糖。从天然的荚膜多糖开始,可通过以下两种方法之一得到修饰的荚膜寡糖:(1) 修饰荚膜多糖,接着对修饰的多糖进行解聚和分级,形成修饰的寡糖;(2) 对荚膜多糖进行解聚和分级,接着修饰得到的寡糖,形成修饰的寡糖。两种方法都包括在本发明范围内。但是,在某些实施方式中第一种方法是优选的,因为该方法确保得到末端羟基,以便用于随后修饰寡糖与载体分子如蛋白质的偶联。

[0116] 本发明还提供了一种修饰脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖的方法,该方法包括以下步骤:

[0117] (a) 提供脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖;

[0118] (b) 将所述多糖解聚和分级以提供寡糖;和

[0119] (c) 将所述寡糖的至少一个羟基转化成封端基团,如上所述。

[0120] 该方法的步骤(b)之后可任选进行已知的衍生化步骤,然后进行步骤(c)。已知的衍生化步骤包括,例如,还原性胺化,接着保护生成的 -NH<sub>2</sub>和/或脱-O-乙酰化。

[0121] 本发明还提供了一种修饰脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖的方法,该方法包括以下步骤:

[0122] (a) 提供脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 多糖;

[0123] (b) 将所述多糖的至少一个羟基转化成封端基团,如上所述;和

[0124] (c) 将所得多糖解聚和分级以提供寡糖。

[0125] 该方法的步骤(c)之后可任选进行已知的衍生化步骤。已知的衍生化步骤包括,例如,还原性胺化,接着保护生成的 $-NH_2$ 和/或脱-O-乙酰化。

[0126] 任何上述方法可后接除去污染物(如低分子量污染物)的步骤。

[0127] 荚膜糖原料

[0128] 本发明的修饰的荚膜糖可从天然荚膜糖获得。术语“天然的荚膜糖”指含糖的聚合物(如糖、糖酸、氨基糖、多元醇、糖醇和磷酸糖等的聚合物),它们可从细菌的荚膜中发现。细菌包括革兰阳性菌和革兰阴性菌,如脑膜炎奈瑟球菌(*N. meningitidis*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)和流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)。而且,“天然的荚膜糖”既包括多糖也包括寡糖。天然的荚膜寡糖可通过将天然多糖解聚和分级得到。

[0129] 天然荚膜糖的“羟基位置”是天然荚膜糖上具有羟基的位置。然而,它不包括糖苷键或其残基中具有羟基的位置(如作为磷酸酯键一部分的羟基不占据羟基位置)。天然荚膜糖上存在乙酰氧基(AcO)的位置也不是羟基位置。

[0130] 天然荚膜糖可包含通过磷酸二酯键连接的糖单元。包含磷酸二酯键的糖对水解是不稳定的。

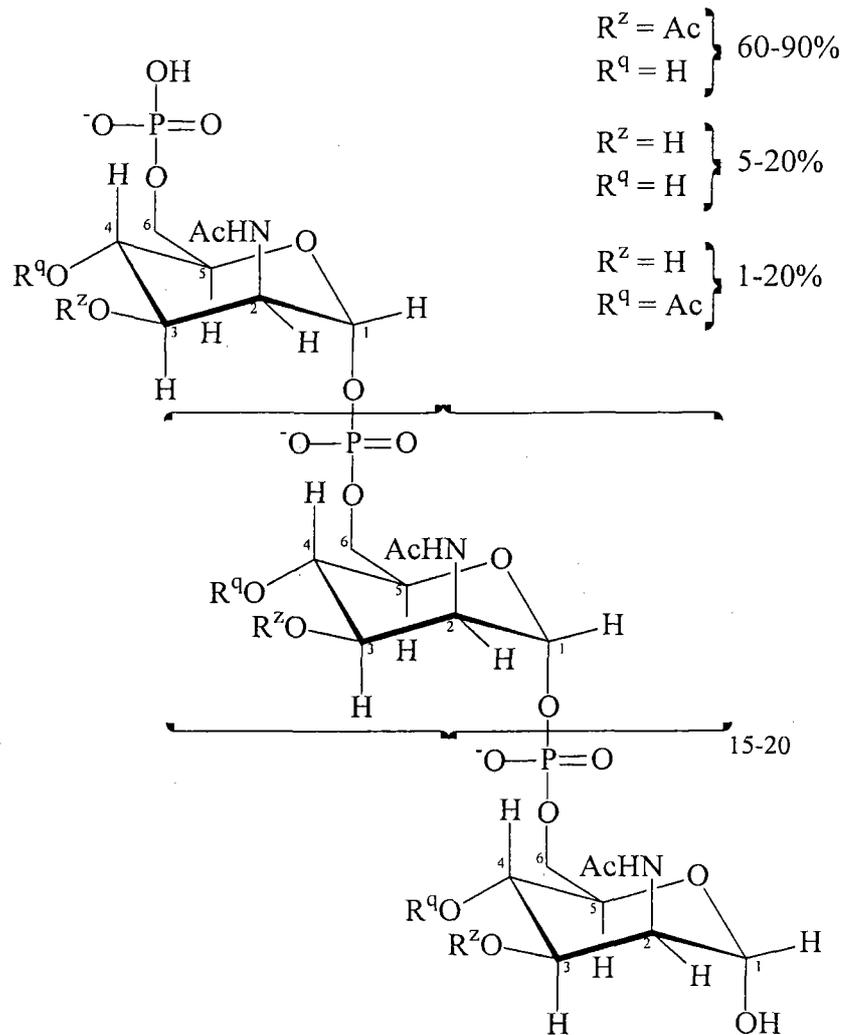
[0131] 天然荚膜糖和本发明修饰的荚膜糖优选在哺乳动物(如人)中具有免疫原性。哺乳动物可以是成年人或儿童。

[0132] 天然荚膜糖优选是从以下细菌得到的多糖(或其寡糖片段):脑膜炎奈瑟球菌(包括血清组A、B、C、W135和Y)、肺炎链球菌(包括血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19F和23F)、B型流感嗜血杆菌、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、粘膜炎莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和/或绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

[0133] 虽然本发明可应用于任何血清组的脑膜炎奈瑟球菌,但优选使用从血清组A(“MenA”)得到的荚膜糖。MenA荚膜糖在水溶液中特别不稳定,这意味着对这个分子进行化学操作(如偶联到载体蛋白质上)需要用特殊的操作程序。但是,按照本发明修饰的MenA糖在水溶液中是很稳定的。

[0134] MenA荚膜多糖 $\{ \rightarrow 6) -D-ManpNAc(3/4OAc) - \alpha - (1 \rightarrow OPO_3 \rightarrow \}$ 是由N-乙酰基甘露糖胺残基通过 $\alpha$ 1-6磷酸二酯键连接在一起而构成的,具有如下所示的重复单元。

[0135]



[0136] 按照上面的定义,约 80-99%的 4-位是羟基位置,10-40%的 3-位是羟基位置。末端 1-羟基也占据一个羟基位置。该末端 1-羟基是末端异头羟基。作为  $-\text{OP}(O)(\text{OH})\text{O}-$  基团一部分的羟基不是羟基位置。

[0137] 糖-蛋白质偶联物

[0138] 本发明修饰的糖可以进行任何对于糖类常见的下游加工(如衍生化、偶联、片段化等)。为了提高免疫原性,本发明修饰的糖优选与载体蛋白质偶联。与载体蛋白质的偶联对于儿科疫苗特别有用[6]并且是公知的技术[如参考文献 7-15 等所综述的]。多糖可直接连接到蛋白质[2,16]或者它可通过接头基团连接。已经提出许多不同类型的接头基团用来将多糖与蛋白质相连[如 3,17]。

[0139] 因此,本发明提供了一种蛋白质和本发明的修饰的糖的偶联物。蛋白质可直接与糖偶联,或者可使用接头。可以使用任何合适的接头化学。修饰多糖的稳定性提高有利于使用各种各样的连接。

[0140] 如上所述,在一些实施方式中,优选修饰的荚膜糖具有至少一个游离的羟基或氨基,可用作随后与载体蛋白质连接的柄。

[0141] 具有游离羟基的修饰的荚膜糖可通过选择性地封闭荚膜糖上的羟基得到,或通过使所有的羟基都被封闭的修饰的荚膜糖选择性地脱封闭而得到。或者,可通过将修饰的荚膜糖解聚和分级展示游离羟基。优选的是,至少一个游离羟基是末端异头羟基。末端异头

羟基优选作为游离羟基,是因为末端异头羟基可通过将修饰的荚膜糖解聚和分级而展示。

[0142] 具有游离氨基的修饰的荚膜糖可通过末端异头羟基的还原性胺化而得到,任选接着保护生成的  $-NH_2$ 。还原性胺化反应可在本发明的修饰步骤之前或之后进行。还原性胺化反应优选在本发明的修饰步骤之前进行,因为可在羟基 / 封端基团的存在下选择性地保护 / 去保护生成的  $-NH_2$ 。

[0143] 例如,本发明提供了一种制造糖 - 蛋白偶联物的方法,该方法包括以下步骤:

[0144] (a) 提供本发明的修饰的荚膜糖,其中所述修饰的糖包含末端异头羟基或衍生自末端异头羟基的氨基;和

[0145] (b) 通过末端异头羟基或衍生自末端异头羟基的氨基将所述修饰的荚膜糖连接于蛋白质。

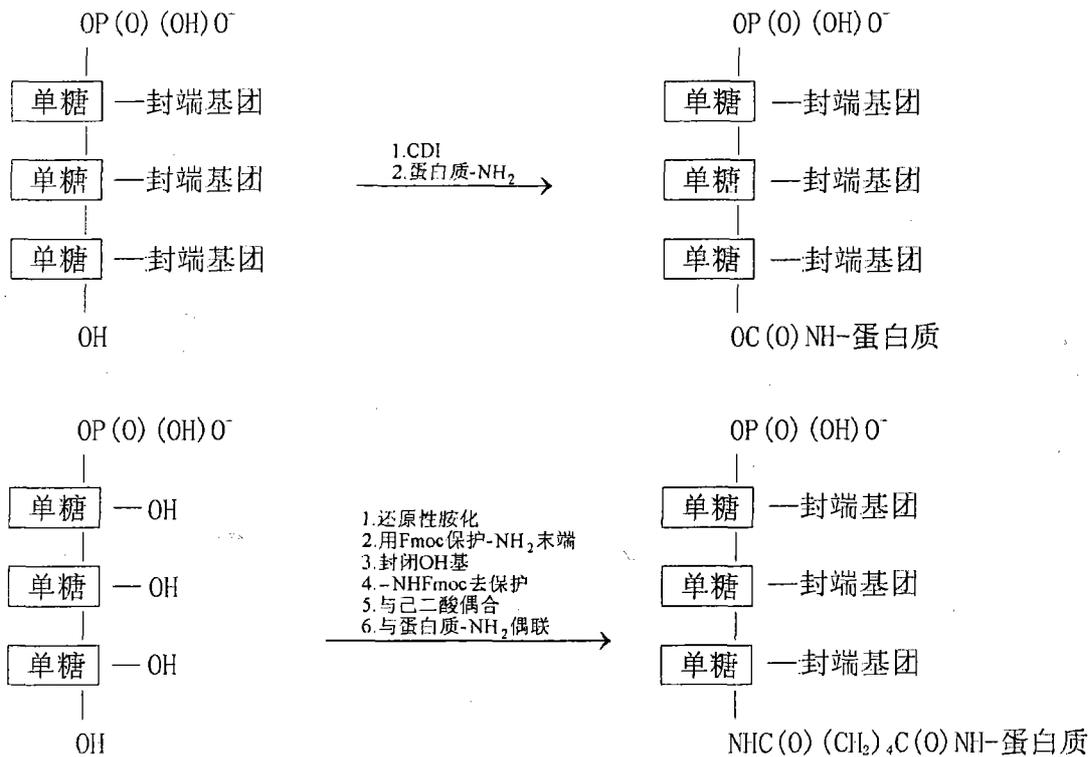
[0146] 所述蛋白质优选为细菌毒素或类毒素,尤其是白喉毒素或类毒素。例如,所述蛋白质优选是 CRM<sub>197</sub>。

[0147] 可用任何已知方法,如参考文献 3 和 17 所述的方法通过接头基团进行连接。优选的连接类型是羰基接头,它可通过修饰的糖的游离羟基与 CDI 反应 [18,19],接着与蛋白质反应,形成氨基甲酸酯连接而形成。另一个优选的连接类型是己二酸接头,它可通过使修饰的糖上的游离  $-NH_2$  与己二酸偶联(例如,用二酰亚胺活化),然后使蛋白质与生成的糖 - 己二酸中间体偶联而形成 [11,20,21]。其它接头包括 B-丙酰胺基 [22]、硝基苯基 - 乙胺 [23]、卤代酰基卤化物 [24]、糖苷键 [25]、6-氨基己酸 [26]、ADH [27]、C4-C12 部分 [28] 等。

[0148] 偶联反应可包括:异头碳端基还原为伯羟基,伯羟基的任选保护 / 去保护;伯羟基与 CDI 反应,形成 CDI 氨基甲酸酯中间体;CDI 氨基甲酸酯中间体与蛋白质的氨基偶联。

[0149] 方案 2 表示两个不同的例子,说明按照本发明荚膜糖如何与载体蛋白质偶联。在第一个例子中,蛋白质通过末端羟基偶联。在第二个例子中,蛋白质通过末端氨基连接。

[0150]



## [0151] 方案 2

[0152] 直接连接蛋白质可包括氧化多糖,然后与蛋白质进行还原性胺化,如参考文献 2 和 16 所述。例如,在所述修饰的荚膜糖的至少一个单糖单元中相应天然荚膜糖的两个邻位羟基不包含封端基团的实施方式中,可通过氧化裂解(oxidative cleavage)(如 NaIO<sub>4</sub>、Pb(OAc)<sub>4</sub> 等)将一对或多对邻位羟基转化成醛基。然后可通过还原胺化将修饰荚膜糖连接到蛋白质。

[0153] 例如,本发明提供一种制造糖-蛋白偶联物的方法,该方法包括以下步骤:

[0154] (a) 提供本发明的修饰的荚膜糖,其中,所述修饰的荚膜糖的至少一个单糖单元中相应天然荚膜糖的两个邻位羟基不包含封端基团;

[0155] (b) 通过氧化裂解将至少一对邻位羟基转化成醛基;和

[0156] (c) 通过还原胺化将修饰荚膜糖连接于蛋白质。

[0157] 所述蛋白质优选为细菌毒素或类毒素,尤其是白喉毒素或类毒素。例如,所述蛋白质优选是 CRM<sub>197</sub>。

[0158] 如上所述,在一些实施方式中,优选所述修饰的荚膜糖的至少一个单糖单元包含其中 R<sup>1</sup> 被两个邻位羟基取代的封端基团。两个邻位羟基可用作随后与载体蛋白连接的柄。例如,通过氧化裂解(如 NaIO<sub>4</sub>、Pb(OAc)<sub>4</sub> 等)可将一对或多对邻位羟基转化成醛基。然后可通过还原胺化将修饰荚膜糖连接到蛋白质。

[0159] 例如,本发明提供一种制造糖-蛋白偶联物的方法,该方法包括以下步骤:

[0160] (a) 提供本发明的修饰的荚膜糖,其中至少一个单糖单元包含其中 R<sup>1</sup> 被两个邻位羟基取代的封端基团;

[0161] (b) 通过氧化裂解将至少一对邻位羟基转化成醛基;和

[0162] (c) 通过还原胺化将修饰荚膜糖连接于蛋白质。

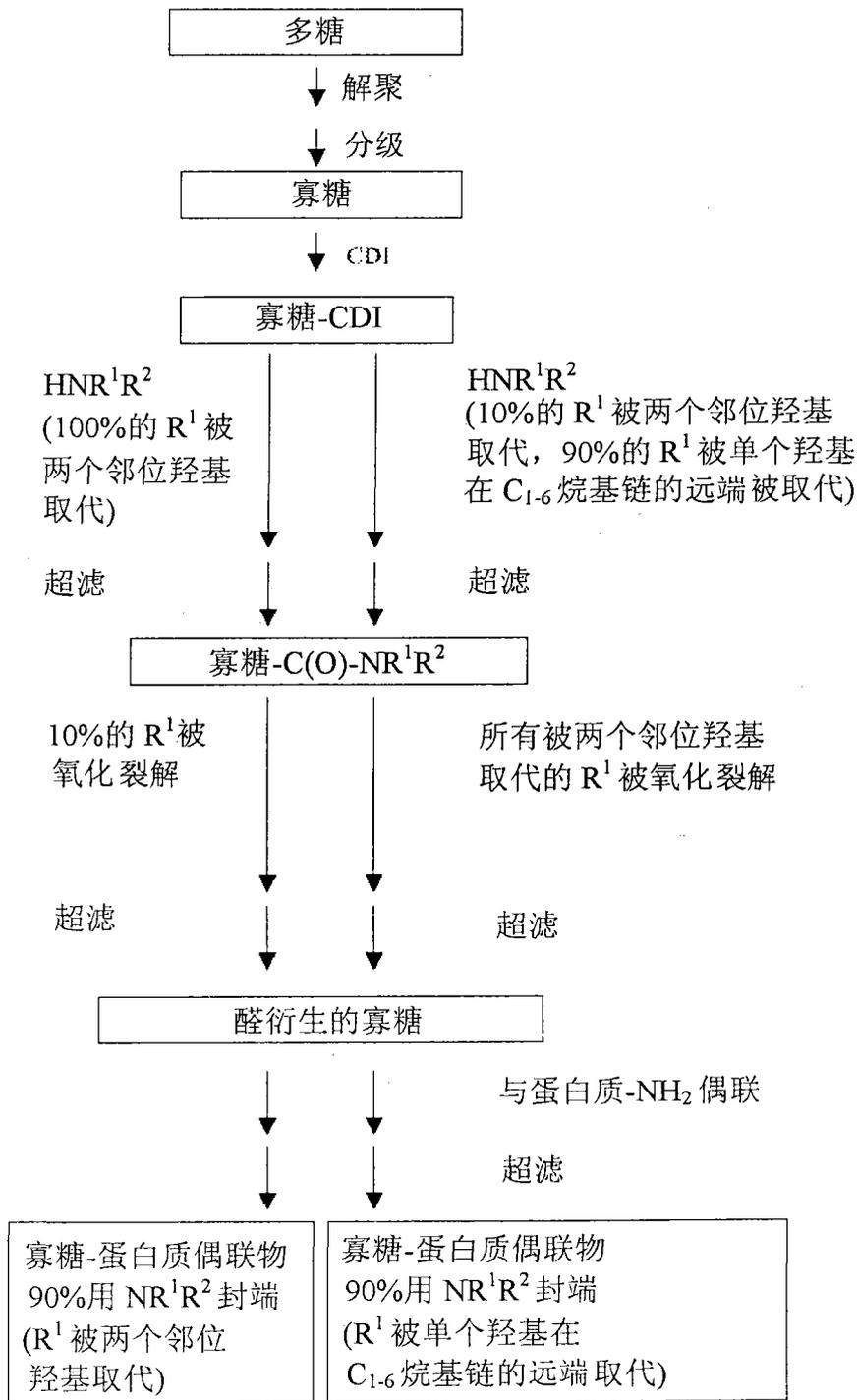
[0163] 所述蛋白质优选为细菌毒素或类毒素,尤其是白喉毒素或类毒素。例如,所述蛋白

质优选是 CRM<sub>197</sub>。

[0164] 在该方法的一些实施方式中,所述封端基团中存在的所有邻位羟基在步骤(b)中被转化成醛基。在这些实施方式中,产生的醛基的数目取决于修饰的荚膜糖内存在的其中 R<sup>1</sup> 被两个邻位羟基取代的封端基团的总数。在其他实施方式中,选择的氧化裂解条件仅使一部分存在于所述封端基团中的邻位羟基转化成醛基。在这些实施方式中,产生的醛基的数目取决于修饰的荚膜糖内存在的其中 R<sup>1</sup> 被两个邻位羟基取代的封端基团的总数以及选择的条件。在这种实施方式中,修饰的荚膜糖中优选 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 或 20% 的单糖单元具有封端基团。例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个单糖单元具有被转化成醛基的封端基团。优选地,5-15%,最优选 10% 的单糖单元具有被转化成醛基的封端基团。

[0165] 方案 3 表示两个进一步的例子,说明按照本发明荚膜糖如何与载体蛋白质偶联。在第一个例子(左侧)中,所有封端基团具有被两个邻位羟基取代的 R<sup>1</sup> 基团。这些邻位羟基中的一部分(如 10%)被转化成与蛋白质偶联的醛基。在第二个例子(右侧)中,存在两种类型的封端基团。其中一部分(如 10%)具有被两个邻位羟基取代的 R<sup>1</sup>。所有这些邻位羟基被转化成与蛋白质偶联的醛基。

[0166]



[0167] 方案 3

[0168] 优选的载体蛋白是细菌毒素或类毒素,如白喉或破伤风类毒素。这些是在偶联疫苗中常用的。CRM<sub>197</sub> 白喉类毒素是特别优选的 [29]。其它合适的载体蛋白质包括脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [30]、合成肽 [31, 32]、热激蛋白 [33, 34]、百日咳蛋白 [35, 36]、流感嗜血杆菌的蛋白 D [37]、细胞因子 [38]、淋巴因子 [38]、激素 [38]、生长因子 [38]、艰难梭菌 (C. difficile) 的毒素 A 或 B [39]、摄铁蛋白 [40] 等。可使用载体蛋白的混合物。

[0169] 偶联后,可分离游离和偶联的糖。有许多合适的分离方法,包括疏水色谱、切向超滤、渗滤等。[也参见参考文献 41、42 等]。

[0170] 一种载体蛋白可携带多种不同的糖 [43]。

**[0171] 药物组合物和方法**

[0172] 用本发明方法制备的组合物是药学上可接受的。除修饰的糖和 / 或偶联物外,它们可包含其它组分,例如它们一般包含一种或多种药物载体。对这类组分的充分讨论参见参考文献 44。因此本发明提供了一种药物组合物,其包含 (a) 本发明的修饰的糖和 / 或本发明的偶联物,和 (b) 药学上可接受的载体。所述组合物优选为免疫原性组合物(如疫苗)。基于糖类或糖-蛋白质偶联物的疫苗是本领域熟知的。

[0173] 组合物可含有一种或多种缓冲剂。缓冲剂一般包括:磷酸盐缓冲液;Tris 缓冲液;硼酸盐缓冲液;琥珀酸盐缓冲液;组氨酸缓冲液;或柠檬酸缓冲液。包含的缓冲剂的浓度一般是 5-20mM。

[0174] 为了控制张力,优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠(NaCl),它的浓度可以是 1-20mg/ml。可以存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、二水合磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

[0175] 组合物的渗透压通常为 200mOsm/kg-400mOsm/kg,优选为 240-360mOsm/kg,更优选为 290-310mOsm/kg。虽然以前报道过渗透压对疫苗接种引起的疼痛无影响[45],但优选将渗透压保持在此范围内。

[0176] 组合物的 pH 通常为 5.0-8.0,更常见为 5.5-6.5,例如 6.5-7.5。因此,本发明方法可包括在包装前调整散装疫苗 pH 的步骤。

[0177] 该组合物优选无菌。该组合物优选无热原,如每剂量含有 < 1EU(内毒素单位,标准量度),优选每剂量 < 0.1EU。该组合物优选不含谷蛋白。

[0178] 该组合物可含有防腐剂,如硫柳汞或 2-苯氧乙醇。然而,疫苗优选应基本不含(即小于 5 μg/ml)含汞物质,如不含硫柳汞。更优选无汞的疫苗。

[0179] 该组合物可含有一次免疫的物质,或者可含有多次免疫的物质(即‘多剂量’药盒)。多剂量配置优选含有防腐剂。

[0180] 疫苗的典型给药体积约为 0.5ml。

[0181] 组合物优选储存于 2-8°C。不应冷冻。理想地,应避光保存。

[0182] 当组合物包括偶联物时,它还可包含未偶联的载体蛋白,但优选未偶联载体的量相对于载体总量小于 5%。

[0183] 本发明组合物适合给予人类患者,本发明提供在患者中产生免疫应答的方法,包括将该组合物给予患者的步骤。本发明也提供了用作药物的本发明的组合物。本发明还提供了本发明的修饰的糖和 / 或偶联物在制备在患者中产生免疫应答的药物中的应用。这些方法和应用引发的免疫应答通常包括抗体应答,优选抵抗脑膜炎球菌感染的保护性抗体应答。由奈瑟菌属造成的疾病包括脑膜炎、败血病和淋病。优选预防和 / 或治疗细菌性脑膜炎。

[0184] 可以各种方式给予该组合物。最优选的免疫途径是肌肉内注射(如注射到上肢或下肢),但其它可用的途径包括皮下注射、鼻内[46-48]、口服[49]、皮内[50,51]、经皮、透皮[52]等。

[0185] 按照本发明制备的组合物可用于治疗儿童和成人。患者可以小于 1 岁、1-5 岁、5-15 岁、15-55 岁或至少 55 岁。患者可以是老年人(如 ≥ 50 岁,优选 ≥ 65 岁)、青年(如 ≤ 5 岁)、住院患者、健康护理人员、军队服务人员和军人、怀孕妇女、慢性疾病患者、免疫缺

陷患者和去国外旅行的人。然而该组合物不只适用于这些人群,可以在更广泛的人群中使用。

[0186] 可以通过单剂量方案或多剂量方案进行治疗。多剂量可用于初免方案和 / 或加强免疫方案。在多剂量方案中,可通过相同或不同途径给予各种剂量,例如初免采用胃肠道外途径而加强免疫采用粘膜途径,或者初免采用粘膜途径而加强免疫采用胃肠道外途径等。对于免疫原初 (immunological naive) 患者,特别适合给予一个以上的剂量 (一般是两个剂量)。一般以至少 1 周 (例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 12 周、约 16 周等) 的间隔给予多个剂量。

[0187] 可在与其它组合物基本相同的时间 (例如在向健康护理专业人员的同一次医疗咨询或就诊期间),特别是与其他疫苗相同的时间,将本发明的组合物给予患者。

[0188] 免疫原性组合物包含免疫有效量的糖类抗原,以及需要的任何其它规定组分。‘免疫有效量’指以一次剂量或一系列剂量的一部分,将该剂量给予个体能有效治疗或预防。此量取决于所治疗个体的健康和身体状况、年龄、所治疗个体的分类学地位 (如非人灵长动物、灵长动物等)、个体的免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗配方、治疗医生对医学情况的评估和其它相关因素。预计该量将落入可通过常规试验测定的相对较宽的范围内。给药治疗可以是单剂量方案或多剂量方案 (如包括加强剂量)。

[0189] 本发明疫苗可以是预防性 (即预防感染) 或治疗性 (即在感染后治疗疾病) 疫苗,但一般是预防性疫苗。

#### [0190] 佐剂

[0191] 本发明组合物宜包含佐剂,佐剂可用于在接受该组合物的患者中提高所引发的免疫应答反应。可用于本发明的佐剂包括但不限于:

[0192] • 包含钙盐和铝盐 (或其混合物) 的含矿物质组合物。钙盐包括磷酸钙 (如参考文献 53 公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等,所述盐取任何合适的形式 (如凝胶、晶体、无定形态等)。优选吸附于这些盐。也可将含有矿物质的组合物制成金属盐的颗粒 [54]。下面开始更详细地描述铝盐佐剂。

[0193] • 水包油乳剂,如下文所详述。

[0194] • 免疫刺激性寡核苷酸,例如含有 CpG 基序的寡核苷酸 (含有通过磷酸键连接于鸟嘌呤的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)、TpG 基序 [55]、或双链 RNA、或含有回文序列的寡核苷酸、或含有聚 (dG) 序列的寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸可包含核苷酸修饰 / 类似物,如硫代磷酸酯修饰,可以是双链或 (除 RNA 外) 单链。参考文献 56-58 公开了可能的类似取代,例如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献 59-64 中进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂作用。CpG 序列可能导向 TLR9,例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT [65]。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫应答,例如 CpG-A ODN (寡脱氧核糖核苷酸),或更特异地诱导 B 细胞应答,例如 CpG-B ODN。参考文献 66-68 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。CpG 优选是 CpG-A ODN。优选构建 CpG 寡核苷酸时使其 5' 端可为受体所识别。任选将两个 CpG 寡核苷酸序列的 3' 端相连接形成“免疫聚体”。参见例如,参考文献 65 和 69-71。有用的 CpG 佐剂是 CpG7909,也称为 ProMune™ (科雷制药集团公司 (Coley Pharmaceutical Group, Inc.))。免疫刺激性寡核苷酸一般含有至少 20 个核苷酸。它们可含有少于 100 个核苷酸。

[0195] • 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A ('3dMPL', 也称为 'MPL™') [72-75]。3dMPL 可由

明尼苏达沙门菌 (*Salmonella minnesota*) 的无庚糖突变体制备, 在化学上类似于脂质 A, 但缺少酸 - 不稳定性磷酰基和碱 - 不稳定性酰基。参考文献 76 最先描述了 3dMPL 的制备。3dMPL 可以取酰基化不同的相关分子 (如具有 3、4、5 或 6 个长度可以不同的酰基链) 的混合物的形式。两个葡糖胺 (也称为 2-脱氧-2-氨基-葡萄糖) 单糖在其 2-位 (即 2 和 2' 位) 碳上 N-酰基化, 3' 位上也有 O-酰基化。

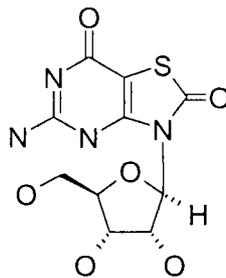
[0196] • 咪唑并噻啉化合物, 如咪唑莫特 ("R-837") [77, 78]、瑞唑莫德 ("R-848") [79] 和其类似物; 及其盐 (如盐酸盐)。有关免疫刺激性咪唑并噻啉的其它细节可参见参考文献 80-84。

[0197] • 缩氨基硫脲化合物, 如参考文献 85 所述的化合物。参考文献 85 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- $\alpha$  方面特别有效。

[0198] • 色胺酮化合物, 如参考文献 86 所述的化合物。参考文献 86 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- $\alpha$  方面特别有效。

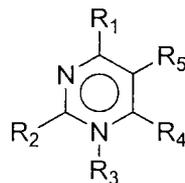
[0199] • 核苷类似物, 如 (a) 艾沙托立宾 (Isatorabine) (ANA-245 ; 7-硫杂-8-氧代鸟苷) 和其前药:

[0200]



[0201] (b) ANA975 ; (c) ANA-025-1 ; (d) ANA380 ; (e) 参考文献 87-89 所述的化合物 ; (f) 具有下式的化合物 :

[0202]



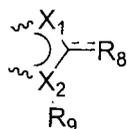
[0203] 式中 :

[0204]  $R_1$  和  $R_2$  各自独立地是氢、卤素、 $-NR_aR_b$ 、 $-OH$ 、 $C_{1-6}$  烷氧基、取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、杂环基、取代的杂环基、 $C_{6-10}$  芳基、取代的  $C_{6-10}$  芳基、 $C_{1-6}$  烷基或取代的  $C_{1-6}$  烷基 ;

[0205]  $R_3$  不存在, 或者是 H、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{6-10}$  芳基、取代的  $C_{6-10}$  芳基、杂环基或取代的杂环基 ;

[0206]  $R_4$  和  $R_5$  各自独立地是氢、卤素、杂环基、取代的杂环基、 $-C(O)-R_d$ 、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基, 或结合在一起形成 5 元环, 如  $R_{4-5}$  :

[0207]



R4-5

[0208] 在 $\sim$ 所示的化学键处实现结合,

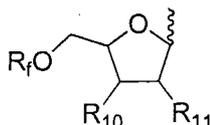
[0209]  $X_1$  和  $X_2$  各自独立地是 N、C、O 或 S;

[0210]  $R_8$  是氢、卤素、-OH、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  烯基、 $C_{2-6}$  炔基、-OH、 $-NR_aR_b$ 、

[0211]  $-(CH_2)_n-O-R_c$ 、 $-O-(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-S(O)_pR_e$  或  $-C(O)-R_d$ ;

[0212]  $R_9$  是氢、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、杂环基、取代的杂环基或  $R_{9a}$ , 其中  $R_{9a}$  是:

[0213]

 $R_{9a}$ 

[0214] 在 $\sim$ 所示的化学键处实现结合,

[0215]  $R_{10}$  和  $R_{11}$  各自独立地是氢、卤素、 $C_{1-6}$  烷氧基、取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、 $-NR_aR_b$  或 -OH;

[0216]  $R_a$  和  $R_b$  各自独立地是氢、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $-C(O)R_d$ 、 $C_{6-10}$  芳基;

[0217]  $R_c$  各自独立地是氢、磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、 $C_{1-6}$  烷基或取代的  $C_{1-6}$  烷基;

[0218]  $R_d$  各自独立地是氢、卤素、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{1-6}$  烷氧基、取代的  $C_{1-6}$  烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-NH(\text{取代的 } C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $-N(\text{取代的 } C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $C_{6-10}$  芳基或杂环基;

[0219]  $R_e$  各自独立地是氢、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $C_{6-10}$  芳基、取代的  $C_{6-10}$  芳基、杂环基或取代的杂环基;

[0220]  $R_f$  各自独立地是氢、 $C_{1-6}$  烷基、取代的  $C_{1-6}$  烷基、 $-C(O)R_d$ 、磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯;

[0221]  $n$  各自独立地是 0、1、2 或 3;

[0222]  $p$  各自独立地是 0、1 或 2; 或者

[0223] (g) (a)-(f) 中任一项的药学上可接受的盐, (a)-(f) 中任一项的互变异构体, 或互变异构体的药学上可接受的盐。

[0224] • 洛索立宾 (Loxoribine) (7-烯丙基-8-氧代鸟苷) [90]。

[0225] • 参考文献 91 所述化合物, 包括: 酰基哌嗪化合物、吡啶二酮化合物、四氢异喹啉 (THIQ) 化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮杂乙烯基化合物、氨基苯并咪唑啉酮 (ABIQ) 化合物 [92. 93]、水合酞酰胺 (hydraphtalamide) 化合物、苯并苯基酮化合物、异喹啉化合物、固醇化合物、喹唑啉酮 (quinazolinone) 化合物、吡咯化合物 [94]、葱醌化合物、喹啉啉化合物、三嗪化合物、吡啶嘧啶化合物和吡啶化合物 [95]。

[0226] • 参考文献 96 所述的化合物, 包括 3,4-二(1H-吡啶-3-基)-1H-吡啶-2,5-二酮, 星孢素类似物、衍生的哒嗪、色原-4-酮、吡啶满酮、喹唑啉和核苷类似物。

[0227] • 氮烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物, 如 RC529 [97, 98]。

[0228] • 磷腈, 如参考文献 99 和 100 中所述的聚[二(羧基苯氧基)磷腈] (poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene], “PCPP”。

[0229] • 小分子免疫增强剂 (SMIP), 例如:

- [0230] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0231] N2,N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0232] N2- 乙基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0233] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0234] 1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0235] N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0236] N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0237] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 戊基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0238] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙 -2- 烯基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0239] 1-(2- 甲基丙基)-2-[( 苯基甲基) 硫代]-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺
- [0240] 1-(2- 甲基丙基)-2-( 丙硫基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺
- [0241] 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2- 基]( 甲基) 氨基] 乙醇
- [0242] 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑 [4-c] 喹啉 -2- 基]( 甲基) 氨基] 乙酸乙酯;
- [0243] 4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1,3- 二氢 -2H- 咪唑 [4,5-c] 喹啉 -2- 酮;
- [0244] N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基)-N4, N4- 双 ( 苯基甲基)-1H- 咪唑 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺;
- [0245] N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4, N4- 双 ( 苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0246] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4, N4- 双 ( 苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0247] N2, N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4, N4- 双 ( 苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺
- [0248] 1-{4- 氨基 -2-[ 甲基 ( 丙基) 氨基]-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 基}-2- 甲基丙 -2- 醇
- [0249] 1-[4- 氨基 -2-( 丙基氨基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 基]-2- 甲基丙 -2- 醇
- [0250] N4, N4- 二苄基 -1-(2- 甲氧基 -2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺。

[0251] • 皂苷 [ 参考文献 131 的第 22 章 ] 是在许多种类植物的树皮、叶、茎干、根甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。已广泛研究了作为佐剂的来自皂树 (*Quillaja saponaria*) Molina 树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) ( 墨西哥菝葜)、满天星 (*Gypsophilla paniculata*) ( 婚纱花) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) ( 皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21 以及脂质制剂如 ISCOM。QS21 以商标 Stimulon™ 出售。已采用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定组分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。皂苷优选 QS21。制备 QS21 的方法参见参考文献 101。皂苷制剂也可包含甾醇, 如胆固醇 [102]。皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒 [ 参考文献 131 的第 23 章 ]。ISCOM 通常也含有磷脂

如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。ISCOM 中可采用任何已知的皂苷。ISCOM 优选包含 QuilA、QHA 和 QHC 中的一种或多种。参考文献 102-104 中进一步描述了 ISCOM。任选地, ISCOM 可不含其它去污剂 [105]。开发基于皂苷的佐剂的综述可参见参考文献 106 和 107。

[0252] • 细菌 ADP-核糖基化毒素(如大肠杆菌 (*E. coli*) 不耐热肠毒素"LT"、霍乱毒素"CT"或百日咳毒素"PT")及其脱毒衍生物,如称为 LT-K63 和 LT-R72 的突变毒素 [108]。参考文献 109 中描述了将脱毒的 ADP-核糖基化毒素用作粘膜佐剂,参考文献 110 中描述了将其用作胃肠道外佐剂。

[0253] • 生物粘附剂和粘膜粘附剂,如酯化透明质酸微球 [111] 或壳聚糖及其衍生物 [112]。

[0254] • 由可生物降解和无毒材料(例如聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚正酯、聚酐、聚己酸内酯等),优选聚(丙交酯-共-乙交酯)形成的微粒(即直径约 100nm-150  $\mu$ m,更优选约 200nm-30  $\mu$ m,最优选约 500nm-10  $\mu$ m 的微粒),这些微粒任选经处理而具有带负电荷表面(例如用 SDS 处理)或带正电荷表面(例如用阳离子去污剂如 CTAB 处理)。

[0255] • 脂质体(参考文献 131 第 13 和 14 章)。适合用作佐剂的脂质体制剂的例子描述于参考文献 113-115。

[0256] • 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂 [116]。这种制剂还包括聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂和辛苯糖醇 [117] 以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯糖醇 [118] 的混合物。优选的聚氧乙烯醚选自:优选的聚氧乙烯醚选自下组:聚氧乙烯-9-月桂醚(月桂醇聚醚 9)、聚氧乙烯-9-硬脂酰基(stearyl)醚、聚氧乙烯-8-硬脂酰基醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

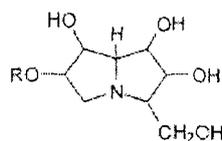
[0257] • 胞壁酰肽,例如 N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺("thr-MDP")、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺("去甲 MDP")、N-乙酰葡萄糖胺酰-N-乙酰胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰丙酰胺("DTP-DPP"或"Theramide™")和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺("MTP-PE")。

[0258] • 由第一种革兰阴性菌制备的外膜蛋白蛋白质体制剂与衍生自第二种革兰阴性菌脂多糖(LPS)制剂的组合,其中外膜蛋白蛋白质体和 LPS 制剂形成稳定的非共价连接佐剂复合物。这类复合物包括"IVX-908",它是由脑膜炎奈瑟球菌外膜和 LPS 组成的复合物。

[0259] • 甲基肌苷 5'-单磷酸酯("MIMP") [119]。

[0260] • 多聚羟化吡咯双烷类化合物 [120],如下式化合物:

[0261]

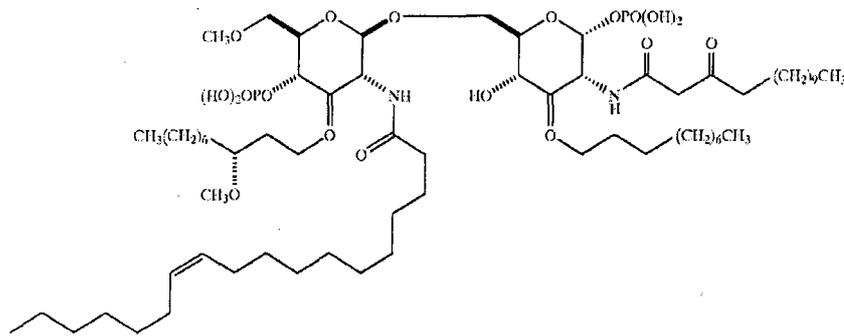


[0262] 式中, R 选自:氢,直链或支链、未取代或取代、饱和或不饱和的酰基、烷基(如环烷基)、烯基、炔基和芳基,或其药学上可接受的盐或衍生物。例子包括但不限于:木麻黄(casuarine)、木麻黄-6- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、3-表-木麻黄、7-表-木麻黄、3,7-二表-木麻黄等。

[0263] •  $\gamma$  菊粉 [121] 或其衍生物,如阿尔加穆林(algammulin)。



[0270] • 含有连接于含磷酸无环主链的脂质的化合物,如 TLR4 拮抗剂 E5564 [126, 127] :  
[0271]



[0272] 参考文献 131 和 132 中更详细地讨论了这些和其它佐剂活性物质。

[0273] 组合物可包含两种或多种所述佐剂。

[0274] 组合物中的抗原和佐剂一般形成混合物。

[0275] 水包油乳液佐剂

[0276] 水包油乳液佐剂作为佐剂是特别有效的。多种这类乳液是已知的,它们一般包含至少一种油和至少一种表面活性剂,油与表面活性剂是可生物降解(可代谢)和生物相容性的。乳液中油滴的直径通常小于  $5\mu\text{m}$ ,甚至可以是亚微米级,用微流化床实现这种小尺寸可以提供稳定的乳液。优选小于  $220\text{nm}$  的液滴,因为它们可进行过滤除菌。

[0277] 本发明可使用的油诸如动物油(如鱼油)或植物油。植物油的来源包括坚果、种籽和谷物。坚果油中最常见的是花生油、大豆油、可可油和橄榄油。也可使用获自(例如)霍霍巴豆的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻油等。在谷物油中,最常见的是玉米油,但也可采用其它谷类如小麦、燕麦、裸麦、稻、画眉草(teff)、黑小麦(triticale)等的油。可从坚果和种籽油开始,通过水解、分离和酯化合适物质制备甘油和 1,2-丙二醇的 6-10 碳脂肪酸酯(不是种籽油中天然产生的)。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油是可代谢的,因此可用于实施本发明。由动物来源获得纯油的过程中必需的分选、纯化、皂化和其它步骤是本领域众所周知的。大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如,鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和鲸油如鲸蜡代表了可用于本发明的几种鱼油的例子。通过生化途径用 5-碳异戊二烯单位合成许多支链油,它们总称为萜类。鲨鱼肝油含有支链不饱和类萜,称为鲨烯 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,本文特别优选此类萜。鲨烯的饱和类似物鲨烷也是优选的油。鱼油,包括鲨烯和鲨烷易于从商业来源购得,或可通过本领域已知方法获得。其它优选油是生育酚(见下)。可采用油的混合物。

[0278] 可通过'HLB'(亲水/亲脂平衡)对表面活性剂分类。本发明优选的表面活性剂的 HLB 为至少 10,优选至少 15,更优选至少 16。可用于本发明的表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温),特别是聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80;以商品名 DOWFAX 出售的环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物,如直链 EP/PO 嵌段共聚物;重复的乙氧基(氧-1,2-乙二基)数量不同的辛苯聚醇,特别感兴趣的是辛苯聚醇 9(曲通(Triton)X-100,或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇);(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂如磷脂酰胆碱(卵磷脂);衍生自十二烷醇、十六烷醇、十八烷醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为苜泽表面活性剂),如三乙二醇单月桂基醚(苜泽 30);聚氧乙烯-9-月桂醚以及去水山梨糖醇酯(通常称为司盘),如去

水山梨糖醇三油酸酯（司盘 85）和去水山梨糖醇单月桂酸酯。包含在乳液中的优选表面活性剂是吐温 80（聚氧乙烯失水山梨糖醇酯）、司盘 85（失水山梨糖醇三油酸酯）、卵磷脂和曲通 X-100。可使用表面活性剂的混合物，如吐温 80/ 司盘 85 混合物。

[0279] 本发明所用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于：

[0280] • 鲨烯、吐温 80 和司盘 85 的亚微米乳液。该乳液的体积组成可以是约 5% 鲨烯、约 0.5% 聚山梨酯 80 和约 0.5% 司盘 85。以重量计，这些比例变为 4.3% 鲨烯、0.5% 聚山梨酯 80 和 0.48% 司盘 85。此佐剂称为 'MF59' [128-130]，如参考文献 131 的第 10 章和参考文献 132 的第 12 章所详述。MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子，如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0281] • 鲨烯、生育酚和吐温 80 的乳液。该乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。它也可含有司盘 85（如 1%）和 / 或卵磷脂。这些乳液可含有 2-10% 鲨烯、2-10% 生育酚和 0.3-3% 吐温 80，鲨烯：生育酚的重量比优选  $\leq 1$ ，因为这能提供更稳定的乳液。可通过下述方法制备一种这样的乳液：将吐温 80 溶解于 PBS 得到 2% 溶液，然后将 90ml 该溶液与 5g DL- $\alpha$  生育酚和 5ml 鲨烯的混合物混合，然后使该混合物微流体化。得到的乳液可含有（如）平均直径为 100-250nm，优选约 180nm 的亚微米油滴。

[0282] • 鲨烯、生育酚和曲通去污剂（如曲通 X-100）的乳液。

[0283] • 鲨烯、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401（"普罗流尼<sup>TM</sup> L121"）的乳液。可以用磷酸盐缓冲盐水，pH 7.4 配制该乳液。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体，已知与用 "SAF-I" 佐剂（0.05-1% Thr-MDP、5% 鲨烯、2.5% 普罗流尼 L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）配的苏氨酸基-MDP 一起使用 [133]。也可不与 Thr-MDP 一起使用，例如用 "AF" 佐剂（5% 鲨烯、1.25% 普罗流尼 L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）[134]。优选微流体化。

[0284] • 含有 0.5-50% 油、0.1-10% 磷脂和 0.05-5% 非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 135 所述，优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴尺寸。

[0285] • 不可代谢油（如轻质矿物油）和至少一种表面活性剂（如卵磷脂、吐温 80 或司盘 80）的亚微米水包油乳液。可包含添加剂，例如 QuilA 皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂体偶联物（如通过葡糖醛酸的羧基将脂族胺加到酰基皂苷上而产生的 GPI-0100，参见参考文献 136）、二甲基二-十八烷基溴化铵和 / 或 N, N'-二-十八烷基-N, N'-双(2-羟乙基)丙二胺。

[0286] • 皂苷（如 QuilA 或 QS21）和固醇（如胆固醇）结合成螺旋胶束的乳液 [137]。

[0287] 可以在递送时，将该乳液与抗原临时混合。因此，在包装或出售的疫苗中该佐剂和抗原可分开保存，使用时配制成最终制剂。抗原通常是水性形式，以便最终通过混合两种液体制备疫苗。混合的两种液体的体积比可变（例如 5 : 1-1 : 5），但通常约为 1 : 1。

#### [0288] 铝盐佐剂

[0289] 可使用称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规名称，但仅为方便使用，因为它们都不是所代表的实际化合物的准确描述 [例如参见参考文献 131 的第 9 章]。本发明可采用通常用作佐剂的任何 "氢氧化物" 或 "磷酸盐" 佐剂。

[0290] 称为 "氢氧化铝" 的佐剂一般是羟基氧化铝盐（通常至少部分为晶体）。可采用红外 (IR) 光谱将式  $AlO(OH)$  代表的羟基氧化铝与其它铝化合物，如氢氧化铝  $Al(OH)_3$  区别开，具体区别是  $1070\text{cm}^{-1}$  处存在吸收条带和  $3090-3100\text{cm}^{-1}$  处存在强肩峰 [参考文献 131 的

第9章]。半高时衍射条带的宽度(WHH)反映出氢氧化铝佐剂的结晶度,由于结晶尺寸较小结晶很少的颗粒谱线增宽较大。表面积随WHH的增加而增加,WHH值较大的佐剂显示吸附抗原的能力较强。氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态(例如,电子透射显微照片所见的)。氢氧化铝佐剂的pI通常约11,即在生理pH下佐剂本身具有表面正电荷。据报道,pH 7.4时,氢氧化铝佐剂的吸附能力在每mg  $Al^{+++}$ 1.8-2.6mg蛋白质之间。

[0291] 称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝,也常常含有少量硫酸盐(即羟基磷酸硫酸铝)。可通过沉淀获得这些佐剂,沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代该盐中羟基的程度。羟基磷酸盐的 $PO_4/Al$ 摩尔比通常为0.3-1.2。羟基磷酸盐因存在羟基而有别于严格的 $AlPO_4$ 。例如,3164 $cm^{-1}$ 处的IR谱带(例如加热到200°C)表明存在结构羟基[参考文献131的第9章]。

[0292] 磷酸铝佐剂的 $PO_4/Al^{3+}$ 摩尔比通常为0.3-1.2,优选为0.8-1.2,更优选为 $0.95 \pm 0.1$ 。磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 $PO_4/Al$ 摩尔比为0.84-0.92的无定形的羟基磷酸铝,每毫升包含0.6mg  $Al^{3+}$ 。磷酸铝通常是颗粒(如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态)。抗原吸附后颗粒直径一般是0.5-20 $\mu m$ (如约5-10 $\mu m$ )。据报道,pH 7.4时磷酸铝佐剂的吸附容量为0.7-1.5毫克蛋白质/毫克 $Al^{+++}$ 。

[0293] 磷酸铝的零电荷点(PZC)与磷酸对羟基的取代程度逆相关,这种取代程度可能取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根与酸性更高的PZC有关)或加入缓冲液如组氨酸缓冲液(使PZC碱性更强)改变PZC。本发明所用的磷酸铝的PZC通常为4.0-7.0,更优选为5.0-6.5,例如约为5.7。

[0294] 用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以,但不一定含有缓冲剂(如磷酸盐或组氨酸或Tris缓冲剂)。该悬浮液优选无菌且无热原。该悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子,如浓度为1.0-20mM,优选5-15mM,更优选约10mM的磷酸根离子。该悬浮液也可含有氯化钠。

[0295] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。在这种情况下,磷酸铝比氢氧化铝多,例如重量比为至少2:1,例如 $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ 等。

[0296] 给予患者的组合物中 $Al^{+++}$ 的浓度优选小于10mg/ml,例如 $\leq 5mg/ml$ 、 $\leq 4mg/ml$ 、 $\leq 3mg/ml$ 、 $\leq 2mg/ml$ 、 $\leq 1mg/ml$ 等。优选范围是0.3-1mg/ml。

#### [0297] 其它抗原

[0298] 除了修饰的糖和/或偶联物以外,本组合物还可包含其它抗原性组分。例如,组合物可包含一种或多种其它糖类(无论是否按照本发明进行修饰)。例如,组合物可包含脑膜炎奈瑟球菌的血清组C、W135和Y的糖类(如除了修饰的MenA糖以外)。这些通常偶联到载体蛋白质上,并且从脑膜炎奈瑟球菌的不同血清型得到的糖类可以偶联到相同的或不同的载体蛋白质上。当混合物包含从血清组A和C得到的荚膜糖时,优选MenA糖:MenC糖的比(w/w)大于1(如2:1、3:1、4:1、5:1、10:1或更高)。当MenA组分对MenC组分以过量(质量/剂)存在时,观察到了MenA组分的免疫原性提高[138]。

[0299] 组合物还可包含蛋白质抗原。

[0300] 可包括在本发明组合物中的抗原包括:

[0301] - 来自脑膜炎奈瑟球菌血清组B的蛋白质抗原(见下文)。

- [0302] - 脑膜炎奈瑟球菌的外膜囊泡 (OMV) 制品, 如参考文献 139、140、141、142 等中披露的那些。
- [0303] - 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 抗原如 CagA[143-146]、VacA[147、148]、NAP[149、150、151]、HopX[ 如 152]、HopY[ 如 152] 和 / 或脲酶。
- [0304] - 肺炎链球菌的糖抗原 [ 如 153, 154, 155]。
- [0305] - 甲型肝炎病毒, 如灭活病毒的抗原 [ 如 156, 157]。
- [0306] - 乙型肝炎病毒的抗原, 如表面和 / 或核心抗原 [ 如 157, 158]。
- [0307] - 丙型肝炎病毒的抗原 [ 如 159]。
- [0308] - 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) 的无细胞抗原, 如百日咳博德特菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA), 也可任选与百日咳杆菌黏附素 (pertactin) 和 / 或凝集原 2 和 3 组合使用 [ 例如, 参考文献 160 和 161]。
- [0309] - 百日咳博德特菌的细胞抗原。
- [0310] - 白喉抗原, 如白喉类毒素 [ 如参考文献 162 的第 3 章 ], 如 CRM197 突变体 [ 如 163]。
- [0311] - 脊髓灰质炎病毒抗原 [ 如 164, 165] 如灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV)。
- [0312] - 破伤风抗原, 如破伤风类毒素 [ 如参考文献 162 的第 4 章 ]。
- [0313] - 流感嗜血杆菌 B 的糖抗原 [ 如参考文献 166-174]。
- [0314] - 麻疹、腮腺炎和 / 或风疹抗原 [ 如参考文献 162 的第 9、10 和 11 章 ]。
- [0315] - 淋病奈瑟球菌抗原。
- [0316] - 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 抗原 [ 例如, 175、176、177、178、179、180、181]。
- [0317] - 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 抗原 [ 例如, 182]。
- [0318] - 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 抗原 [ 例如, 183]。
- [0319] - 狂犬病抗原 [ 如 184] 如冻干的灭活病毒 [ 如 185, RabAvert™]。
- [0320] - 流感抗原 [ 如参考文献 162 的第 19 章 ], 如血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶表面蛋白。
- [0321] - 粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 抗原 [ 如 186]。
- [0322] - 无乳链球菌 (B 型链球菌) 的抗原 [ 如 187、188]。
- [0323] - 无乳链球菌 (B 型链球菌) 的糖抗原。
- [0324] - 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 型链球菌) 的抗原 [ 如 188、189、190]。
- [0325] - 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 抗原 [ 如 191]。
- [0326] - 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 抗原 [ 如 192、193、194]。
- [0327] - 单纯疱疹病毒 (HSV) 抗原。用于本发明的优选 HSV 抗原是膜糖蛋白 gD。优选使用 HSV-2 毒株的 gD (' gD2' 抗原)。该组合物可使用 C- 末端膜锚定区缺失的 gD 形式 [195], 如包含天然蛋白的氨基酸 1-306 且 C- 末端加入天冬酰胺和谷氨酰胺的截短的 gD。这种蛋白质形式包含信号肽, 信号肽被切割后产生成熟的 283 个氨基酸的蛋白质。缺失锚定物, 以便将该蛋白制备成可溶形式。
- [0328] - 人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原。用于本发明的优选 HPV 抗原是 L1 衣壳蛋白,

该蛋白可组装形成称为病毒-样颗粒 (VLP) 的结构。可通过在酵母细胞 (例如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 或昆虫细胞 (例如夜蛾 (*Spodoptera*) 细胞, 如草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*), 或果蝇 (*Drosophila*) 细胞) 中重组表达 L1 产生 VLP。在酵母细胞中, 质粒载体可携带 L1 基因; 在昆虫细胞中, 杆状病毒载体可携带 L1 基因。更优选地, 该组合物包含来自 HPV-16 和 HPV-18 毒株的 L1 VLP。已证明这种二价组合非常有效 [196]。除了 HPV-16 和 HPV-18 毒株外, 也可能包含来自 HPV-6 和 HPV-11 毒株的 L1 VLP。也可能采用致癌性 HPV 毒株。疫苗可包含 20-60  $\mu\text{g/ml}$  (如约 40  $\mu\text{g/ml}$ ) L1/HPV 毒株。

[0329] - 黄病毒属病毒, 如黄热病病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒的四种血清型、蜱媒脑炎病毒、西尼罗河病毒的抗原。

[0330] - 瘟病毒抗原, 如经典的猪热病毒、牛病毒性腹泻病毒和 / 或边界病病毒的抗原。

[0331] - 细小病毒, 如细小病毒 B19 的抗原。

[0332] - 朊病毒蛋白 (如 CJD 朊病毒蛋白)。

[0333] - 淀粉样蛋白, 如  $\beta$  肽 [197]。

[0334] - 癌抗原, 如参考文献 198 的表 1 或参考文献 199 的表 3 和 4 中列出的那些。

[0335] 该组合物可包含一种或多种这些额外抗原。

[0336] 必要时, 可使有毒的蛋白质抗原脱毒 (如通过化学和 / 或遗传方式使百日咳毒素脱毒 [161])。

[0337] 当组合物中包含白喉抗原时, 也优选包含破伤风抗原和百日咳抗原。相似地, 当包含破伤风抗原时, 也优选包含白喉和百日咳抗原。相似地, 当包含百日咳抗原时, 也优选包含白喉和破伤风抗原。

[0338] 抗原可吸附于铝盐。

[0339] 组合物中各抗原的浓度一般是至少 1  $\mu\text{g/ml}$ 。通常, 任何给定抗原的浓度将足以引发针对该抗原的免疫应答。

[0340] 作为本发明组合物中使用蛋白质抗原的另一种替代方式, 可使用编码该抗原的核酸 [如参考文献 200-208]。因此, 本发明组合物的蛋白质组分可被编码该蛋白的核酸 (优选 DNA, 如质粒形式的 DNA) 取代。

[0341] 非糖类脑膜炎球菌抗原

[0342] 尽管脑膜炎球菌血清组 A、C、W135 和 Y 的荚膜糖可用来产生保护性免疫, 但相同的方法对于血清组 B 无效。因此本发明的修饰的糖和偶联物可与非基于荚膜糖的脑膜炎球菌抗原如蛋白质抗原、脂多糖或膜囊泡一起使用 (例如单独使用或混合使用)。

[0343] 已经报道了脑膜炎球菌血清组 A [209] 和 B [210, 211] 的基因组序列, 并可从编码多肽中选择合适的蛋白质抗原 [如参考文献 212-217]。对候选抗原进行操作以改善异源表达 [参考文献 218-220]。

[0344] 一种优选的组合物包含 Tbp 蛋白和 Hsf 蛋白 [221]。Hsf 是一种自转运蛋白 [222-224], 也称为 nhhA [224]、GNA0992 [212] 或 NMB0992 [210]。Tbp 是运铁蛋白结合蛋白 [225-228], 包括 TbpA 和 TbpB 以及 TbpA 和 TbpB 的高分子量和低分子量形式。Tbp 包括上述各种蛋白质以及蛋白质的复合物以及能够结合运铁蛋白的任何其他蛋白质或其复合物。尽管 Tbp 可表示 TbpA 或 TbpB 的高或低分子量形式, 但优选 TbpA 和 / 或 TbpB 的高分子量和低分子量形式同时存在。最优选地, 存在 TbpA 的高分子量和低分子量形式。

[0345] 另一种优选组合物包含至少一种选自对奈瑟菌属具有不同功能的至少两种不同类型蛋白质中每一种的抗原。这种蛋白质类型的例子有：粘附素、自转运蛋白、毒素、整合外膜蛋白和铁获取蛋白。可如下选择这些抗原，采用参考文献 229 的命名法：至少一种选自 FhaB、NspA PilC、Hsf、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119 或 NadA 的奈瑟菌属粘附素；至少一种选自 Hsf、Hap、IgA 蛋白酶、AspA 或 NadA 的奈瑟菌属自转运蛋白；至少一种选自 FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT (NMB1343) 以及 LPS 免疫型 (immunotype) L2 和 LPS 免疫型 L3 之一或两者的奈瑟菌属毒素；至少一种选自 TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、HpuA、HpuB、Lipo28 (GNA2132)、Sibp、NMB0964、NMB0293、FbpA、Bcp、BfrA、BfrB 或 P2086 (XthA) 的奈瑟菌属铁获取蛋白；至少一种选自 PilQ、OMP85、FhaC、NspA、TbpA、LbpA、TspA、TspB、TdfH、PorB、MIItA、HpuB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA (GNA1946)、NMB1124、NMB1162、NMB1220、NMB1313、NMB1953、HtrA 或 PLDA (OMPLA) 的奈瑟菌属膜相关蛋白，优选外膜蛋白，优选整合外膜蛋白。据说奈瑟菌属抗原的这些组合能导致疫苗抗奈瑟菌属感染的效力异常增强 [229]。

[0346] 特别优选的组合物包含以下五种抗原中的一种或多种 [230]：(1) ‘NadA’ 蛋白，优选采取低聚形式（如采取三聚形式）；(2) ‘741’ 蛋白；(3) ‘936’ 蛋白；(4) ‘953’ 蛋白；和 (5) ‘287’ 蛋白。

[0347] 来自 MenB 的“NadA”（奈瑟菌粘附素 A）在参考文献 215 中被称为蛋白“961”（SEQ ID 2943 和 2944），在参考文献 210 中被称为“NMB1994”（参见 GenBank 登录号：11352904 和 7227256）。有关该蛋白的详细描述见于参考文献 231。按照本发明的描述被使用时，NadA 可有不同的形式。NadA 的优选形式是野生型序列的截短或缺失变体，如参考文献 218-220 所描述的那些形式。尤其优选无 C-端膜锚定序列的 NadA（如，对于 2996 株来说，缺失残基 351-405）。

[0348] 来自 MenB 的“741”蛋白描述于参考文献 215 中（SEQ ID 2535 和 2536），在参考文献 210 中标记为“NMB1870”（参见 GenBank 登录号 GI：7227128）。血清组 A 的相应蛋白 [209] 在 GenBank 中的登录号为 7379322。天然的 741 是脂蛋白。按照本发明的描述被使用时，741 可有不同的形式。741 的优选形式是野生型序列的截短或缺失变体，如参考文献 218-220 所描述的那些形式。尤其，741 的 N-端可以缺失到并包含其聚甘氨酸序列（即，对于 MC58 株来说是缺失残基 1 到 72），在本文中有时用“ $\Delta$ G”前缀加以区分。这种缺失可增强其表达。缺失还可以去除 741 的脂化位点。各种 741 序列可在参考文献 220 的 SEQ ID 1-22、在参考文献 232 的 SEQ ID 1-23、以及在参考文献 233 的 SEQ ID 1-299 中找到。

[0349] 来自于血清组 B 的“936”蛋白描述于参考文献 215 中（SEQ ID 2883 和 2884），在参考文献 210 中标记为“NMB2091”（参见 GenBank 登录号 GI：7227353）。血清组 A 的相应基因 [209] 在 GenBank 中的登录号为 7379093。按照本发明的描述被使用时，936 可有不同的形式。936 的优选形式是野生型序列的截短或缺失变体，如参考文献 218-220 所描述的那些形式。尤其，936 的 N 端前导肽可以是缺失的（例如，对于 MC58 株来说缺失残基 1 到 23），被称为 936<sup>(NL)</sup>。

[0350] 来自于血清组 B 的“953”蛋白描述于参考文献 215 中（SEQ ID 2917 和 2918），在参考文献 210 中标记为“NMB1030”（参见 GenBank 登录号 GI：7226269）。血清组 A 的相应蛋白 [209] 在 GenBank 中的登录号为 7380108。按照本发明的描述被使用时，953 可有不同

的形式。953 的优选形式是野生型序列的截短或缺失变体,如参考文献 218-220 所描述的那些形式。尤其,953 的 N 端前导肽可以是缺失的(例如,对于 MC58 株来说缺失残基 1 到 19)。

[0351] 来自于血清组 B 的“287”蛋白描述于参考文献 215 中 (SEQ ID 3103 和 3104),在参考文献 210 中标记为“NMB2132”,在参考文献 212 中称为‘GNA2132’(参见 GenBank 登录号 GI:7227388)。血清组 A 的相应蛋白 [209] 在 GenBank 中的登录号为 7379057。按照本发明的描述被使用时,287 可有不同的形式。287 的优选形式是野生型序列的截短或缺失变体,如参考文献 218-220 所描述的那些形式。更特殊的是,287 的 N 端可以缺失到并包含其聚甘氨酸序列(即,对于 MC58 株来说是缺失残基 1 到 24,得到  $\Delta$ G287)。

[0352] 蛋白 287 优选来自菌株 2996,或者更优选来自菌株 394/98。蛋白 741 优选来自血清组 B 菌株 MC58、2996、394/98 或 95N477,或来自血清组 C 菌株 90/18311。更加优选菌株 MC58。蛋白 936、953 和 NadA 优选来自菌株 2996。当组合物中包含特定蛋白质抗原(如 741 或 287)时,该组合物可包含一种以上变体形式的抗原,例如是相同的蛋白质但来自一种以上的菌株。这些蛋白质可以串联或单独的蛋白质形式存在。

[0353] 可包含在本发明组合物中的其他 MenB 多肽抗原包括包含以下氨基酸序列的那些:参考文献 213 的 SEQ ID NO:650;参考文献 213 的 SEQ ID NO:878;参考文献 213 的 SEQ ID NO:884;参考文献 213 的 SEQ ID NO:4;参考文献 214 的 SEQ ID NO:598;参考文献 215 的 SEQ ID NO:818;参考文献 215 的 SEQ ID NO:864;参考文献 215 的 SEQ ID NO:866;参考文献 215 的 SEQ ID NO:1196;参考文献 215 的 SEQ ID NO:1272;参考文献 215 的 SEQ ID NO:1274;参考文献 215 的 SEQ ID NO:1640;参考文献 215 的 SEQ ID NO:1788;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2288;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2466;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2554;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2576;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2606;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2608;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2616;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2668;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2780;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2932;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2958;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2970;参考文献 215 的 SEQ ID NO:2988,或包含某氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列:(a) 与所述序列具有 50%或更高相同性(如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高);和/或(b) 包含所述序列中至少 n 个连续氨基酸的片段,其中 n 是 7 或更大(如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更大)。(b) 的优选片段包含相关序列的表位。可包含这些多肽中的一个以上(如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或更多)。

[0354] 然而,在一些实施方式中,本发明的组合物包含相同的但来自一种以上菌株的蛋白质。已经发现该方法对于 741 蛋白有效。该蛋白是引发抗-脑膜炎球菌抗体应答的极其有效的抗原,并在所有脑膜炎球菌血清组中表达。系统进化分析显示,该蛋白质分为两组,其中一组又可一分为二,从而总共得到三种变体 [234],而抗特定变体的抗血清在相同变体组内具有杀菌作用,但对于表达其他两种变体之一的菌株无活性,即存在变体内交叉保护,但不存在变体间交叉保护 [232, 234]。因此,为使交叉株效力最大,优选的是组合物中应包含一种以上的蛋白 741 的变体。

[0355] 本发明的组合物包含小量(如小于 t 种抗原,其中 t 是 10、9、8、7、6、5、4 或 3)纯化的血清组 B 蛋白质。所述蛋白质优选在异源宿主内重组表达,然后纯化。对于包含 t 种

MenB 抗原的组合物,可能存在 t 种独立的多肽,但为进一步降低复杂程度,优选至少两种抗原作为一条多肽链表达(‘杂交’蛋白[参考文献 218-220]),即 t 种抗原形成少于 t 种的多肽。杂交蛋白主要提供两个优点:首先,本身不稳定或弱表达的蛋白质可通过加入能克服该问题的合适的杂交伴侣来辅助;其次,商业制造被简化,这是由于为制造两种单独使用的蛋白质只需要采取一次表达和纯化。本发明组合物中所包括的杂合体可包含上面列出的五种蛋白质中的两种或多种(即 2、3、4 或 5 种)。优选由 5 种蛋白质中的 2 种构成的杂合体。

[0356] 另一种优选的组合物包含血清组 B 脂寡糖 (LOS) [235]。LOS 可与血清组 B 多肽一起使用或者可代替它/它们使用。

[0357] 膜囊泡也可用于该组合物。这些囊泡可以通过破坏脑膜炎球菌外膜以形成包括外膜中蛋白质组分的外膜囊泡而获得的任何蛋白脂质体 (proteoliposomic) 囊泡。‘OMV’ 是从细菌人工制备的(如通过去污剂处理),因此不同于微囊泡 (MV [236]) 和 ‘天然 OMV’ (‘NOMV’ [237]),这两者都是在细菌生长过程中自发形成并被释放到培养基中的天然行速成的膜囊泡。可通过在肉汤培养基中培养奈瑟菌属、由肉汤培养基中的较小泡 (bled) 分离完整细胞、然后从耗尽细胞的培养基中收集 MV,从而获得 MV。通常根据培养物内产生的 MV 的量来选择用于制造 MV 的菌株,如参考文献 238 和 239 描述了具有高 MV 产量的奈瑟菌属。也可从 mlta 敲除株获得囊泡 [240]。

[0358] 为降低热原活性,优选的是细菌应具有低内毒素 (LPS) 水平。合适的突变株细菌是已知的,如奈瑟菌属突变株 [241] 和螺杆菌属突变株 [242]。从革兰阴性菌制备耗尽 LPS 的外膜的方法描述于参考文献 243。

[0359] 所述细菌可以是野生型菌,或者可以是重组菌。优选的重组菌过表达(相对于相应的野生型菌株)诸如 NspA、蛋白 287 [244]、蛋白 741 [244]、TbpA、TbpB、超氧化物歧化酶 [245] 等免疫原。细菌可表达一种以上的 PorA I 类外膜蛋白,如 2、3、4、5 或 6 种 PorA 亚型: P1. 7, 16 ; P1. 5, 2 ; P1. 19, 15 ; P1. 5c, 10 ; P1. 12, 13 ; 和 P1. 7h, 4 [如参考文献 246 和 247]。

[0360] 可用于本发明的其他重组菌具有一种或多种突变以降低(或者优选敲除)特定基因产物的表达(如见参考文献 248 和 249)。优选的被下调和/或敲除的基因包括:(a) Cps、CtrA、CtrB、CtrC、CtrD、FrpB、GalE、HtrB/MsbB、LbpA、LbpB、LpxK、Opa、Opc、PilC、PorA、PorB、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA 和/或 TbpB [248]; (b) CtrA、CtrB、CtrC、CtrD、FrpB、GalE、HtrB/MsbB、LbpA、LbpB、LpxK、Opa、Opc、PhoP、PilC、PmrE、PmrF、PorA、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA 和/或 TbpB [249]; (c) 裂解糖基转移酶 NMB0033 [250]; (d) ExbB、ExbD、rmpM、CtrA、CtrB、CtrD、GalE、LbpA、LbpB、Opa、Opc、PilC、PorA、PorB、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA 和/或 TbpB [251]; 和 (e) CtrA、CtrB、CtrD、FrpB、Opa、Opc、PilC、PorA、PorB、SiaD、SynA、SynB 和/或 SynC [252]。

[0361] 优选的作为这些非糖类抗原来源的血清组 B 菌株是 MC58、2996、H44/76、394/98 和新西兰菌株 98/254。然而,要使用的最佳血清型和菌株将取决于特定地理区域内流行的菌株。例如,脑膜炎球菌可以是任何血清型(如 1、2a、2b、4、14、15、16 等)、任何血清亚型 (P1. 2 ; P1. 4 ; P1. 5 ; P1. 5, 2 ; P1. 7, 16 ; P1. 7, 16b ; P1. 9 ; P1. 9, 15 ; P1. 12, 13 ; P1. 13 ; P1. 14 ; P1. 15 ; P1. 21, 16 ; P1. 22, 14 ; 等) 和任何免疫型(如 L1 ; L3, 3, 7 ; L10 ; 等), 优选菌株包括:(a) B:4:P1. 4 ; (b) B:4:P1. 15 ; (c) B:15:P1. 7, 16 ; 和 (d) B:4:P1. 7b, 4。脑膜炎球菌可来自任何合适谱系,包括超侵入性和超毒性的谱系,如以下七种超毒性谱系中的任何一种:亚群

I ;亚群 III ;亚群 IV-1 ;ET-5 复合体 ;ET-37 复合体 ;群落 A4 ;谱系 3。用多基因座酶电泳法 (MLEE) 确定这些谱系,但也可采用多基因座序列分型法 (MLST) 对脑膜炎球菌进行分类 [参考文献 253],例如,用 MLST 确定 ET-37 复合体是 ST-11 复合体,ET-5 复合体是 ST-32 (ET-5),谱系 3 是 ST-41/44,等等。

[0362] 非糖类抗原通常诱导有效抵抗 MenB 超毒性 (hypervirulent) 谱系 A4、ET-5 和谱系 3 中两种或三种的血清杀菌抗体反应。它们还可诱导对超毒性谱系亚群 I、亚群 III、亚群 IV-1 或 ET-37 复合体中一种或多种以及对其它谱系 (如超侵入性谱系) 的杀菌反应。这些抗体反应可在小鼠中方便地测量并且是疫苗功效的标准指标 [如参见参考文献 212 的尾注 14]。血清杀菌活性 (SBA) 测量补体介导的细菌杀灭,并可采用人或幼兔补体来测定。WHO 标准要求疫苗能在 90% 以上的接受者中诱导 SBA 升高至少 4 倍。

[0363] 该组合物不需要诱导针对这些超毒性谱系内每种 MenB 菌株的杀菌抗体,而是说 (例如),对于具体超毒性谱系内脑膜炎球菌血清组 B 的四个或多个菌株的任何给定组,该组合物诱导的抗体对该组中至少 50% (如 60%、70%、80%、90% 或更多) 有杀菌性。优选的菌株组包括在以下至少四个国家中分离的菌株:GB、AU、CA、NO、IT、US、NZ、NL、BR 和 CU。血清的杀菌效价优选为至少 1024 (如  $2^{10}$ 、 $2^{11}$ 、 $2^{12}$ 、 $2^{13}$ 、 $2^{14}$ 、 $2^{15}$ 、 $2^{16}$ 、 $2^{17}$ 、 $2^{18}$  或更高,优选至少  $2^{14}$ ),即以 1/1024 的比例稀释时血清能够杀伤至少 50% 的具体菌株的受试细菌,如参考文献 212 所述。

[0364] 优选组合物可诱导对以下血清组 B 脑膜炎球菌菌株的杀菌反应:(i) 来自 A4 群落的菌株 961-5945 (B:2b:P1. 21, 16) 和 / 或菌株 G2136 (B:-);(ii) 来自 ET-5 复合体的菌株 MC58 (B:15:P1. 7, 16b) 和 / 或菌株 44/76 (B:15:P1. 7, 16);(iii) 来自谱系 3 的菌株 394/98 (B:4:P1. 4) 和 / 或菌株 BZ198 (B:NT:-)。更优选的组合物可诱导对菌株 961-5945、44/76 和 394/98 的杀菌反应。菌株 961-5945 和 G2136 都是奈瑟球菌 MLST 参比菌株 [参考文献 254 中编号 638 和 1002]。菌株 MC58 可从广泛来源获得 (如 ATCC BAA-335),它是参考文献 210 中测序的菌株。菌株 44/76 被广泛使用和表征 (如参考文献 255),它是奈瑟球菌 MLST 参比菌株之一 [参考文献 254 中编号 237;参考文献 256 中表 2 的第 32 行]。菌株 394/98 最初在 1998 年来源于新西兰,已经有数篇采用此菌株的发表研究 (如参考文献 257 和 258)。菌株 BZ198 是另一种 MLST 参比菌株 [参考文献 254 中编号 409;参考文献 256 中表 2 的第 41 行]。该组合物还可诱导针对来自 ET-37 复合物的 W135 血清组菌株 LNP17592 (W135:2a:P1. 5, 2) 的杀菌反应。

[0365] 概述

[0366] 术语“含有”包括“包含”以及“由... 组成”,例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它物质,例如 X+Y。

[0367] 术语“基本上”不排除“完全”,如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。必要时,可从本发明定义中删去术语“基本上”。

[0368] 与数值 x 相关的术语“约”表示,例如  $x \pm 10\%$ 。

[0369] 术语“烷基”在文中表示直链和支链形式的烷基基团。然而,术语“烷基”通常表示直链形式的烷基基团。所述烷基可被 1、2 或 3 个选自 -O-、-NH- 或 -S- 的杂原子打断。所述烷基也可被 1、2 或 3 个双键或三键打断。然而,术语“烷基”通常表示不具有杂原子中断或者双键或三键中断的烷基基团。当提及  $C_{1-6}$  烷基时表示含有 1 和 6 之间任何碳原子数目

的烷基基团（如  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 、 $C_6$ ）。

[0370] 术语“烯基”在文中表示如上文所定义的二价烷基基团。当提及  $C_{1-5}$  烯基时表示含有 1 和 5 之间任何碳原子数目的烯基基团（如  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ ）。类似地，当提及  $C_{1-4}$  烯基时表示含有 1 和 4 之间任何碳原子数目的烯基基团（如  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ ）。

[0371] 术语“氨基”包括式  $-NH_2$  或  $-NH-E$  的基团，其中 E 是氮保护基。典型的氮保护基的例子如上所述。

[0372] 术语“胺”表示式  $-NH_2$  的基团，文中另有说明除外。

[0373] 术语“修饰的荚膜糖”表示可通过适当修饰从天然荚膜糖获得的糖。因此，天然荚膜糖中重复单糖单元的基础序列在本发明的修饰的荚膜糖内得以保留。

[0374] 术语“糖”包括寡糖（如含有 2-39 个单糖单元）和多糖（如含有 40 个或更多单糖单元）。如原本在细菌中所发现的，天然荚膜糖通常采取多糖形式。多糖可被处理以得到较短的寡糖。寡糖可通过将天然多糖纯化和 / 或解聚随后定径（如通过温和酸水解、通过加热、通过排阻层析等等）获得。

[0375] 将动物（特别是牛）材料用于培养细胞时，它们应获自未患传染性海绵状脑病（TSE），特别是未患牛海绵状脑病（BSE）的来源。总之，优选在完全不含动物来源物质的情况下培养细胞。

[0376] 应理解，可离子化的基团可以本文式中所示的中性形式存在，或者可以带电形式存在，这取决于 pH。因此，磷酸基团可以是  $-P-O-(OH)_2$ ，此式仅代表中性磷酸基团，本发明也包括其它带电形式。类似地，文中提及阳离子和阴离子基团时应表示生理条件下基团上存在的电荷，如胺  $-NH_2$  被质子化得到阳离子性  $-NH^{3+}$  基团，这种质子化是生理 pH 下发生的。此外，羧基  $-COOH$  去质子化得到阴离子性  $-COO^-$  基团，这种质子化可在生理 pH 下发生。此外，本发明包括带电形式的本发明分子的盐。糖环可以是开环或闭环形式，虽然本文结构式中显示的是闭环形式，但本发明也包括开环形式。类似地，本发明包括本发明分子的异构形式，包括互变异构体（如亚胺 / 烯胺互变异构体）、构象异构体、对映体、非对映体等。

[0377] 在确定血清组后，脑膜炎球菌分类包括血清型、血清亚型和免疫型，标准术语表为血清组、血清型、血清亚型和免疫型，其中由冒号分开，如 B:4:P1. 15:L3,7,9。在血清组 B 内，某些谱系常常可引起疾病（超侵袭性的），某些谱系所导致的疾病比其他谱系更严重（超毒性的），而另外一些谱系却根本不致病。现在已知有 7 种具有超毒性的谱系，分别是亚群 I、III 和 IV-1、ET-5 复合物、ET-37 复合物、A4 簇和谱系 3。这些谱系已通过多基因座酶电泳（MLEE）方法确定，但是也可以用多基因座序列分型（MLST）方法对脑膜炎球菌进行分类 [参考文献 256]。

[0378] 附图简要说明

[0379] 图 1 提供了化学合成 CRM<sub>197</sub>-MenA 偶联物的流程。展示了“MenA10/90”（MenA 寡糖，在约 10% 的单糖单元上包含 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团，在约 90% 的单糖单元上包含 2-羟基乙基氨基甲酸酯封端基团）和“MenA10/0”（MenA 寡糖，在约 10% 的单糖单元上包含 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团）的通用结构。

[0380] 图 2 提供了分级之前（图 A）和之后（图 B）MenA 寡糖的 214nm 阴离子交换分析概况。

[0381] 图 3 提供了 25°C 时未经化学修饰的 MenA 寡糖（图 A）、MenA10/90 寡糖（图 B）和

MenA10/0 寡糖 (图 C) 的 600MHz  $^1\text{H}$  NMR 谱。

[0382] 图 4 比较了 37°C 储存期间未经化学修饰的 MenA 寡糖、MenA10/90 寡糖和 MenA10/0 寡糖产生的磷酸单酯的百分比。

[0383] 图 5 提供了 MenA 寡糖的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱。

[0384] 图 6 比较了通过  $^{31}\text{P}$  NMR 测得的 37 °C 储存期间未经化学修饰的 MenA 寡糖、MenA10/90 寡糖和 MenA10/0 寡糖的聚合度 (DP)。

[0385] 图 7 提供了以下 CRM-MenA 寡糖偶联物的 SDS-PAGE 概况:泳道 M- 分子量标记;泳道 1-CRM;泳道 2-CRM-MenA10/90;和泳道 3-CRM-MenA10/0。

[0386] 图 8 比较了 37°C 储存期间 CRM-MenA10/90 寡糖偶联物和 CRM-MenA10/0 寡糖偶联物释放的游离糖 (FS)。

[0387] 图 9 比较了 37°C 储存期间 CRM-MenA10/90 寡糖偶联物和 CRM-MenA10/0 寡糖偶联物产生的磷酸单酯百分比。

[0388] 本发明实施方式

[0389] 实施例 1

[0390] Men A 寡糖的修饰

[0391] MenA 多糖的受控水解

[0392] 通过化学水解 MenA 多糖溶液产生 MenA 寡糖。简言之,将 MenA 多糖溶于 50mM 乙酸缓冲液 pH 4.75 使最终浓度达到 10mg/ml。在 73°C 加热溶液直到聚合度 (DP) 达到约 10。通过监测溶液光学活性 ( $\alpha_{\text{Hg}} 365\text{nm}$ ) 随时间的变化来控制水解,采用以下等式计算 DP:  $\text{DP} = 1 / \{0.5817 [1 - (\alpha_t / \alpha_m)]\}$ , 其中  $\alpha_m$  是当溶液温度为 50°C 时 6 种样品的平均旋光强度,  $\alpha_t$  是 t 时刻的旋光强度。当与 DP 相对应的  $\alpha$  值达到 10 时停止水解。水解反应结束时将溶液室温冷却并将 pH 校准到约 6.5。

[0393] MenA 寡糖的大小分级

[0394] MenA 多糖的受控酸性水解产生具有目标平均 DP 的多分散性。为制备偶联物,可采用两步大小分级进一步限制寡糖多分散性。这些分级步骤通常使 MenA 寡糖的 DP 从大约 10 的值变化到 15 和 20 之间的值,所述值由总磷 (Pt) 和最终磷酸单酯 (Pm) 值之间的摩尔比来测量。Pt 浓度按照参考文献 259 中描述的方法测定,Pm 通过测量马铃薯酸性磷酸酶参与的酶反应释放的无机磷酸盐来测定 [260]。

[0395] 简言之, MenA 水解产物首先通过 30KDa 切向流过滤膜超滤以除去高分子量物质。该过程当中,产物被浓缩约 10 倍,然后用 13 体积的 5mM 乙酸缓冲液 (pH 6.5) 渗滤。收集含有所需寡糖的渗出物并弃去残余物。

[0396] 在第二个步骤中,通过阴离子交换柱层析将渗出物分级。该步骤被设计成能除去 DP 小于 6 的免疫原性可能较弱的低 Mw 物质 [261]。将 30KDa 超滤获得的寡糖混合物加载到之前用 5mM 乙酸钠, pH 6.5 平衡的 Q-Sepharose FastFlow 填充的柱上。寡糖 / 填充体积的比值为 17mg/ml 填充树脂。然后柱子用 5 柱体积 (cv) 平衡缓冲液洗涤。然后在柱上施加 10cv 5mM 乙酸钠缓冲液 / 125mM NaCl, pH 6.5 洗液以洗脱  $\text{DP} \leq 6$  的寡糖。然后用 5mM 乙酸钠缓冲液 / 500mM NaCl, pH 6.5 洗液以回收所需寡糖组分。用 5cv 2M NaCl 剥离并用 1M NaOH 清洗完成该过程。

[0397] 用分析型阴离子交换层析来测量分级之前和之后的寡糖多分散性。简言之, MenA

寡糖的多分散性采用 Mono-Q HR 5/5 柱通过 HPLC 分析。用水平衡之后将 1ml 含有约 1mg 糖的样品加载到柱上,然后用 0 到 60% 的 NaCl 1M 线性梯度以 0.5ml 的流速展开。在 214nm 监测色谱图。用指定 DP 分别为 5 和 6(通过质谱和  $^1\text{H}$  NMR 证实)的单分散性 MenA 寡糖的标准制品来鉴定检测的多分散性样品中 DP 低于 6 的寡糖的存在或去除。图 2 显示了水解产物(图 A)与分级的 MenA 寡糖(图 B)的分析概况的比较。

#### [0398] 抗衡离子交换

[0399] 两步大小分级过程得到的 Q-Sepharose 洗脱液在 3KDa 膜上超滤以交换钠抗衡离子与四丁基铵,后者为寡糖提供非水性溶剂溶解度。简言之, MenA 寡糖溶液用 4 体积 10mM 四丁基溴化铵渗滤,随后 10 体积水渗滤。收集含有所需产物的渗余物并弃去渗出物。通过旋转蒸发除去渗余物中的水。

#### [0400] MenA 寡糖的化学修饰

[0401] MenA 寡糖用 1,1'-羰二咪唑(CDI)活化随后仅与 1-氨基-4,5-戊二醇(APD)或与 APD 和 2-氨基乙醇(ETA)反应以获得两种不同的目标结构(图 1):

[0402] i) 在 10% 单糖单元上含有 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团并在约 90% 的单糖单元上含有 2-羟基乙基氨基甲酸酯封端基团的 MenA 寡糖(MenA10/90);

[0403] ii) 在约 10% 单糖单元上含有 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团的 MenA 寡糖(MenA10/0)。

[0404] 简言之,将上述 3KDa 膜超滤衍生的 MenA 寡糖溶于 DMSO 使终浓度约为 10mg/ml。在该溶液中加入 20 倍摩尔过量的 CDI(相对于 MenA 单糖单元的摩尔数)并将溶液室温搅拌 2 小时。然后在活化的寡糖溶液中加入 9 体积冷的( $-20^\circ\text{C}$ )乙酸乙酯,然后加入 2M  $\text{CaCl}_2$  溶液至最终摩尔浓度与 MenA 单糖单元相等。将该混合物搅拌 30 分钟,在寡糖沉降后通过抽吸除去大部分上清液并通过离心回收沉淀,用乙酸乙酯洗涤 3 次并真空干燥。

[0405] 为加入封端基团,将活化的寡糖溶于 DMSO 至终浓度为 10mg/ml。为获得“MenA10/0”寡糖,加入 0.1 倍摩尔过量(相对于 MenA 单糖单元的摩尔数)的 APD,并将反应物室温搅拌 2 小时。之后边搅拌边加入 19 体积的 0.25M 磷酸钠缓冲液, pH 6.5。该操作期间形成的任何絮状物通过 0.2  $\mu\text{m}$  膜过滤除去。为获得“MenA10/90”寡糖,加入 0.6 倍摩尔过量的三乙胺和 0.1 倍摩尔过量的 APD 并将反应物室温搅拌 2 小时。随后,在该溶液中加入 50 倍摩尔过量的 ETA(相对于 MenA 单糖单元的摩尔数),将溶液室温下继续搅拌 2 小时。之后再次边搅拌边加入 19 体积 0.25M 磷酸钠缓冲液, pH 6.5 并通过 0.2  $\mu\text{m}$  膜过滤除去任何絮状物。

[0406] 通过 3KDa 膜超滤从过量低分子量试剂中纯化衍生寡糖的粗溶液。将溶液首先浓缩约 20 倍,然后用 10 体积 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 和随后的 10 体积蒸馏水渗滤。从渗余物中回收纯化产物并弃去渗出物。

#### [0407] 通过 $^1\text{H}$ NMR 证实化学修饰

[0408] 化学修饰的 MenA 寡糖通过 NMR 鉴定以证实已经发生了所需的化学修饰。

[0409] 天然 MenA 寡糖的  $^1\text{H}$  NMR 谱示于图 3A。该图谱与公开文献一致 [262, 263]。对纯 APD 和 ETA 进行的  $^1\text{H}$  NMR 得到以下信号: APD 信号:  $\text{HOCH}_2^{\text{A}}\text{CH}^{\text{B}}(\text{OH})\text{CH}_2^{\text{C}}\text{CH}_2^{\text{D}}\text{CH}_2^{\text{E}}\text{NH}_2$  ( $\text{H}^{\text{A}}$ , 3.6ppm,  $\text{H}^{\text{B}}$ , 3.7ppm,  $\text{H}^{\text{C}}$ , 1.5ppm,  $\text{H}^{\text{D}}$ , 1.6ppm,  $\text{H}^{\text{E}}$ , 2.7ppm); ETA 信号:  $\text{HOCH}_2^{\text{F}}\text{CH}_2^{\text{G}}\text{NH}_2$  ( $\text{H}^{\text{F}}$ , 4.4ppm,  $\text{H}^{\text{G}}$ , 3.6ppm)。这些赋值被用作鉴别衍生寡糖图谱中 APD 和 ETA 信号的指导。MenA10/90 寡

糖的  $^1\text{H}$  NMR 谱示于图 3B。MenA10/0 寡糖的  $^1\text{H}$  NMR 谱示于图 3C。被引入 N-乙酰-甘露糖胺 4 和 / 或 3 位的 ETA 或 APD 基团与羰基之间的共价键被 HSQC 谱中检测到的 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) 异核相关性证实。检测到羰基与 ETA 的  $\text{H}^{\text{G}}$  或 APD 的  $\text{H}^{\text{F}}$  之间的大范围相关峰。类似地,羰基与 N-乙酰-甘露糖胺的 3/4 位中的成对 (germinal) 质子大范围相关。将来自 APD 和 MenA 的所选信号整合以便估算通过化学处理引入的 APD 基团的百分比。将 1.5ppm (APD 基团) 的  $\text{H}^{\text{D}}+\text{H}^{\text{C}}$  重叠信号与 4.6ppm (MenA 寡糖) 的  $\text{H}_2$  峰整合。在不同实验中,6% 到 14% 的 MenA 单糖单元被 APD 基团取代。按照相同方法,用 3.6ppm (ETA 基团) 的  $\text{H}^{\text{F}}$  重叠信号与 4.6ppm (MenA 寡糖) 的  $\text{H}_2$  峰的比值估算 ETA 基团。由于与 APD 信号 ( $\text{H}^{\text{A}}$ , 3.6ppm, 以及  $\text{H}^{\text{B}}$ , 3.7ppm) 部分重叠,将  $\text{H}^{\text{D}}+\text{H}^{\text{C}}$  值的 3/4 减去  $\text{H}^{\text{F}}$  的积分。在不同实验中,66% 到 85% 的 MenA 单糖单元被 ETA 基团取代。如所预计的,在图 3C 中,与 ETA 基团相关的信号不存在,这证实了预计的结构和 NMR 作为结构阐明和相同性评估工具的适用性。图 3A 表明 O-乙酰化在血清组 A 脑膜炎球菌多糖酸性水解后被保留,且尽管氨基甲酸酯基团改变了局部磁场并使赋值更加复杂,但 O-乙酰化状态在化学修饰后似乎被维持 (图 3B 和 3C)。

[0410] MenA 寡糖的稳定性

[0411] 作为磷酸二酯键水解的结果, MenA 寡糖的降解导致新形成磷酸单酯基团。将 MenA10/90 和 MenA10/0 寡糖的稳定性与天然寡糖的稳定性进行比较。

[0412] 简言之,将浓度为 1.4-3mg/ml 的 MenA 寡糖溶液在 10mM 组氨酸缓冲液, pH 7.2 中 37°C 培育。在为期 42 天的不同时间点上分析寡糖在储存期间产生的磷酸单酯的量。

[0413] 图 4 显示上述三种寡糖在 37°C 储存期间磷酸单酯基团增加。磷酸单酯的百分比用  $[\text{Pm}(t)-\text{Pm}(0)] \times 100 / [\text{Pt}(0)-\text{Pm}(0)]$  计算,其中  $\text{Pm}(t)$  和  $\text{Pt}(t)$  是  $t$  时刻磷酸单酯基团和总磷的浓度;  $\text{Pm}(0)$  和  $\text{Pt}(0)$  是 0 时刻磷酸单酯基团和总磷的浓度。总磷 ( $\text{Pt}$ ) 浓度按照参考文献 259 中描述的方法测定,最终磷酸单酯 ( $\text{Pm}$ ) 通过测量马铃薯酸性磷酸酶参与的酶反应释放的无机磷酸盐来测定 [260]。

[0414] MenA10/90 和 MenA10/0 寡糖显示出与天然寡糖相比稳定性改善,随时间释放磷酸单酯基团的趋势降低可证实此点。这些结果显示,通过用本发明的封端基团封闭 N-乙酰甘露糖胺 4 和 3 位的羟基可增强 MenA 寡糖的稳定性。

[0415] 类似地,用  $^{31}\text{P}$  NMR 分析 [264] 来评价与天然寡糖相比在 10mM 组氨酸缓冲液 pH 7.2 中 37°C 储存 42 天时修饰的 MenA 寡糖的稳定性。简言之,通过链内磷酸二酯基团 ( $\text{P}_{\text{链内}}$ ) 和磷酸单酯非还原性末端基团 ( $\text{P}_{\text{非还原性末端}}$ ) 之间的摩尔比来确定平均解聚度 (avDP) (图 5)。

[0416] 
$$\text{avDP} = [\text{P}_{\text{链内}} + 1] / \text{P}_{\text{非还原性末端}}$$

[0417] 同样, MenA10/90 和 MenA10/0 寡糖显示出与天然寡糖相比稳定性改善,所有时间点上聚合度较高可证实此点 (图 6)。

样品	avDP						
	0d	7d	14d	21d	28d	35d	42d
[0418] 寡MenA天然	19.2	17.5	17.1	14.7	13.8	12.8	11.5
寡MenA10/0	24.9	23.8	22.6	20.5	19.1	18.2	16.8
寡MenA10/90	24.3	24.3	24.1	23.5	23.5	23.6	23.1

[0419] 表 I

[0420] CRM<sub>197</sub>-MenA 偶联物

[0421] 通过受控的高碘酸盐氧化产生反应性醛基

[0422] MenA10/90 和 MenA10/0 寡糖中衍生自 APD 的 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团的邻位羟基用有限的高碘酸钠氧化以产生反应性醛基。简言之,使 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 配制的 MenA10/90 和 MenA10/0 寡糖的溶液与每摩尔 MenA 单糖单元 0.1 摩尔 NaIO<sub>4</sub> 反应。反应在黑暗中搅拌进行,并在 225nm 进行分光光度计监测。约 2 小时后 225nm 吸光度达到平台期。反应产生的醛基的量通过分析氧化反应期间释放的甲醛的等摩尔量来确定 [265]。加入终浓度与 NaIO<sub>4</sub> 等摩尔的乙二醇终止反应。

[0423] 与 4,5-二羟基戊基氨基甲酸酯封端基团的最初数量相比,醛基的产生是几乎定量的。

[0424] 氧化寡糖的纯化

[0425] 氧化的寡糖通过 3KDa 膜超滤纯化。将溶液浓缩 2 倍然后用 10 体积 0.5M NaCl 渗滤,接着用 10 体积蒸馏水渗滤。收集含有所需产物的渗余物并弃去渗出物。通过旋转蒸发除去渗余物中的水。

[0426] 与 CRM<sub>197</sub> 偶联

[0427] 通过还原胺化将氧化的 MenA 寡糖与 CRM<sub>197</sub> (白喉毒素的非毒性变体) 偶联 [266], 从而分别获得 CRM-MenA10/90 和 CRM-MenA10/0 (图 1)。

[0428] 简言之,以每摩尔蛋白质 13 摩尔醛基的比例将氧化的 MenA 寡糖溶于 50mg/ml CRM<sub>197</sub> 溶液。加入 100mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 以使得最终的蛋白质浓度为 30mg/ml。然后加入 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 配制的 2M NaBH<sub>3</sub>CN 溶液以使得 NaBH<sub>3</sub>CN 相对于醛基 70 倍摩尔过量。反应在 37°C 进行 3 天。然后加入 14 体积 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 之后加入 25 倍摩尔过量的 NaBH<sub>4</sub> (相对于醛基的摩尔数)。将 pH 控制在 8.5 并将混合物室温搅拌 2 小时以猝灭任何残留的醛基。在猝灭步骤结束时再将 pH 校正到 7.2, 并将溶液通过孔径 0.2 μm 的膜过滤。

[0429] 偶联物的纯化

[0430] 然后通过 30KDa 膜超滤从过量的试剂和残余物、未反应的寡糖中纯化偶联物。反应混合物用 100 体积 0.01M 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 渗滤,接着用 50 体积 10mM 组氨酸, pH 7.2 渗滤。然后,含有纯化偶联物的溶液通过孔径为 0.2 μm 的膜过滤并于 2-8°C 储存。

[0431] 验证与 CRM<sub>197</sub> 的偶联

[0432] MenA 寡糖与 CRM<sub>197</sub> 的偶联通过 SDS-Page 证实 (图 7)。SDS-Page 按照参考文献 267 进行,使用 7.5% 丙烯酰胺为堆积胶,7.5% 丙烯酰胺为分离胶。电泳之前用样品缓冲液

1 : 4 处理样品并煮沸 10 分钟。电泳在 200V 恒压下进行约 40 分钟。凝胶用考马斯染色液显色约 20 分钟并用乙酸 /EtOH 溶液 (7/40%) 脱色约 4 小时。

[0433] 图 7 中, 偶联物的曲线相比 CRM<sub>197</sub> 向较高分子量迁移且明显不同于 CRM<sub>197</sub>。SDS-Page 分析还证实存在高分子量物质。该物质可能是在偶联反应期间形成的, 能使每个寡糖分子有多个 CRM<sub>197</sub> 附着点。

[0434] 还分析了偶联物的糖和蛋白质含量。观察到糖 / 蛋白质比例从 0.20 到 0.32 (wt/wt)。

[0435] CRM<sub>197</sub>-MenA 偶联物的稳定性

[0436] CRM<sub>197</sub>-MenA 偶联物的稳定性通过测量磷酸二酯键水解导致的未偶联糖类随时间的释放来确定。

[0437] Centricon 30 装置 (容量 2ml) 用 1ml 蒸馏水冲洗并离心两次。在 940  $\mu$ l 含有约 0.3mg/ml 糖的样品 (CRM-MenA10/90 或 CRM-MenA10/0) 中加入 60  $\mu$ l 盐水。将混合物加入装置之前按照上文所述测量总磷含量。装置在 1942g 离心, 直到渗余物室中留下 100-200  $\mu$ l 溶液, 然后用 2x1ml 盐水洗涤并再次离心。回收渗出物室中的溶液并用盐水将样品体积调至 3ml。按上文所述分析各样品衍生的渗出物的总磷含量。

[0438] 数值  $(P2/P1) \times 100$  代表游离糖的百分比, 其中 P1 是 Centricon 处理前的总磷, P2 是 Centricon 处理后的总磷。通过掺杂实验来证实通过膜回收的游离寡糖, 方法是在 940  $\mu$ l 样品或盐水中加入 60  $\mu$ l 约 2mg/ml 寡糖, 然后进行上述分离过程。回收率始终超过 80%。

[0439] 图 8 显示, 相比 CRM-MenA10/0, CRM-MenA10/90 偶联物显示出释放游离糖的趋势降低。FS (游离糖) 按照  $FS\% (t) - FS\% (0)$  计算, 其中  $FS\% (t)$  和  $FS\% (0)$  分别是 t 和 0 时刻的游离糖百分比。

[0440] 还通过测量储存期间磷酸单酯的产生确定了 CRM<sub>197</sub>-MenA 偶联物的稳定性。简言之, 将浓度范围从 157 到 253  $\mu$ g/ml 的偶联物溶液在 10mM 组氨酸缓冲液, pH 7.2 中 37 $^{\circ}$ C 培育。在为期 42 天的不同时间点上分析偶联物在储存期间产生的磷酸单酯的量。

[0441] 图 9 显示上述两种偶联物在 37 $^{\circ}$ C 储存期间磷酸单酯基团的增量。如上所述计算磷酸单酯的百分比。相比 CRM-MenA10/0, CRM-MenA10/90 偶联物显示出产生磷酸单酯的趋势降低。

[0442] CRM-MenA 偶联物的免疫原性

[0443] 为评价 MenA 偶联物引发识别天然 MenA 荚膜多糖的抗体的能力, 在小鼠中进行了免疫原性实验。

[0444] 疫苗制剂

[0445] 将 CRM-MenA10/90 和 CRM MenA10/0 偶联物与磷酸钠缓冲液和  $AlPO_4$  悬浮液混合, 使得在 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 中的终浓度为 20  $\mu$ g/ml 糖和 0.6mg/ml  $Al^{3+}$ 。对于无佐剂制剂,  $AlPO_4$  悬浮液用磷酸钠缓冲液代替。免疫接种之前所得疫苗用盐水 1 : 5 稀释。

[0446] 小鼠的免疫

[0447] 每组 8 只 6-8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠用 0.5ml 含 2  $\mu$ g 糖的偶联疫苗皮下免疫 2 或 3 次。在两次注射方案中, 第一次和第二次剂量之间的间隔为 4 周。在免疫之前和第二次剂量 2 周后进行采血。在三剂量方案中, 在第 0、14 和 28 天给予疫苗并在 0 时刻、第三次

免疫 1 天前 (2 个血清剂量之后) 和 14 天后 (3 个血清剂量之后) 进行采血。

[0448] 免疫原性

[0449] 分析免疫小鼠血清中的特异性抗 -MenA 荚膜多糖总 IgG 抗体的总量以及针对脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 的补体介导的血清杀菌活性 (SBA)。

[0450] 基本按照参考文献 268 所述方法, 但根据动物血清分析进行适度改进, 以测定特异性抗 -MenA 荚膜多糖总 IgG 抗体。各个体小鼠血清通过滴定曲线一式两份分析。抗 -MenA 多糖效价采用基于参考线测定法 (Reference Line Assay Method) 的软件, 以小鼠 Elisa 单位 (MEU) 计算。计算各免疫组的几何平均效价 (GMT)。

[0451] 对各免疫组的 II 次免疫后和 III 次免疫后 (当适用时) 血清库进行 SBA 测量。标准 SBA 方法基于添加 0.25% 葡萄糖的 MH (Mueller Hinton) 肉汤中检测菌株 (MenA F8238) 的接种物。细菌培养物在 5% CO<sub>2</sub> 下 37°C 培育, 当细菌达到早期指数生长期 (约 0.220-0.240 OD<sub>600</sub>) 时终止生长。然后用 1% BSA 的 GBBS 缓冲液将细菌稀释到 10<sup>-4</sup> 并在存在热灭活血清库 (56°C 灭活 30 分钟) 和 25% 幼兔血清作为补体来源时在 5% CO<sub>2</sub> 下 37°C 培育 1 小时。然后将反应混合物铺到 MH 琼脂上并于 37°C 培育过夜。杀菌效价表示为杀死 50% 细菌时血清稀释度的倒数。

[0452] 表 II 显示了抗 -MenA 荚膜多糖总 IgG 效价, 表示为通过 ELISA 测得的 GMT (+/-95 置信限) 以及 CRM-MenA10/90 和 CRM-MenA10/0 诱导的 SBA 效价。两种偶联物都能够小鼠中诱导具有杀菌功能活性的特异性抗 -MenA 多糖抗体。

[0453]

疫苗	2 次免疫后 ELISA 效价	2 次免疫后 SBA 效价
	GMT (+/-95% CI)	
CRM-MenA 10/0 批号 5/A1P04	346 (230 ;520)	> 4096 < 8192
CRM-MenA 10/90 批号 5/A1P04	270 (217 ;336)	4096

[0454]

[0455] 表 II

[0456] 在第二个实验中, 在有和没有 AlPO<sub>4</sub> 时检测 CRM-MenA10/90 在小鼠中的免疫原性。CRM-MenA10/90 的免疫原性在表 III 中证实, 该表显示了第二次和第三次免疫后诱导的特异性抗 -MenA IgG 抗体效价和这些抗体的补体介导的杀菌活性。发现免疫前效价为阴性 (SBA < 4)。这些数据表明存在佐剂增强抗体应答情况。在偶联物中观察到的免疫原性显然是寡糖与蛋白质载体化学偶联的结果, 因为 MenA 寡糖、CRM<sub>197</sub> 和 AlPO<sub>4</sub> 的物理混合物没有免疫原性。

[0457]

疫苗	2 次免疫后 ELISA 效价 GMT (+/-95% CI)	3 次免疫后 ELISA 效价 GMT (+/-95% CI)	2 次免疫后 SBA 效价	3 次免疫后 SBA 效价

CRM-MenA 10/90 批号 11 AlPO <sub>4</sub>	867(585 ;1285)	1299(1008 ;1675)	2048	4096
CRM-MenA 10/90 批号 11	388(249 ;604)	426(241 ;751)	1024	2048
寡 MenA10/90 批 号 11+CRM <sub>197+</sub> AlPO <sub>4</sub> (未偶联抗原的物 理混合物)	2	2	< 4	< 4

[0458] 表 III

[0459] 实施例 2

[0460] MenA 多糖的修饰

[0461] MenA 多糖的化学修饰

[0462] 在 170mg(2.5mmol) 咪唑和 1mL CH<sub>3</sub>CN 中加入 20mg 天然 MenA 荚膜多糖 (0.072mmol)。用磁力棒搅拌,加入 163 μL(1.59mmol) 乙酸酐并将反应物于 55℃ 培育 21 小时。咪唑:乙酸酐的摩尔比为 2:4。用 Centricon 纤维素膜(截止分子量为 1kDa)对 Milli-Q 水(1:7 体积/体积)进行渗滤步骤以纯化反应产物。最后将物质真空干燥(SpeedVac)。

[0463] 通过 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 证实化学修饰

[0464] 为建立乙酰化程度,通过 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 光谱法表征修饰的 MenA 荚膜多糖的完整结构。

[0465] 用定量 NMR 分析来量化糖链的 O-乙酰化水平。O-乙酰化百分比用与 H<sub>1</sub>(N-乙酰-甘露糖胺残基 C-1 位上的质子)相比 H<sub>2</sub><sup>30Ac</sup> 峰(C-3 上被 O-乙酰化的 N-乙酰-甘露糖胺残基 C-2 位上的质子)、H<sub>2</sub><sup>40Ac</sup> 峰(C-4 上被 O-乙酰化的 N-乙酰-甘露糖胺残基 C-2 位上的质子)和 H<sub>2</sub><sup>de0Ac</sup> 峰(未被 O-乙酰化的 N-乙酰-甘露糖胺残基 C-2 位上的质子)的积分来估算。通过 H<sub>2</sub><sup>30Ac</sup> 和 H<sub>2</sub><sup>40Ac</sup> 峰积分之和获得总的 O-乙酰化水平。

[0466] % O-乙酰化 =  $[H_2^{30Ac} + H_2^{40Ac}] / [H_1^{0Ac} + H_1^{de0Ac}]$

[0467] 此外, O-乙酰化百分比用与 H<sub>1</sub>(N-乙酰-甘露糖胺残基 C-1 位上的质子)相比 H<sub>2</sub><sup>30Ac</sup>/H<sub>2</sub><sup>40Ac</sup> 峰(C-3 上被 O-乙酰化的 N-乙酰-甘露糖胺残基 C-3 位上的质子以及 C-4 上被 O-乙酰化的 N-乙酰-甘露糖胺残基 C-4 位上的质子)的积分来估算。

[0468] % O-乙酰化 =  $[H_2^{30Ac} / H_2^{40Ac}] / [H_1^{0Ac} + H_1^{de0Ac}]$

[0469] MenA 多糖的稳定性

[0470] 如上所述,用 <sup>31</sup>P NMR 分析来评价与天然多糖和相应的寡糖相比,在 10mM 组氨酸缓冲液 pH 7.2 中 37℃ 储存 42 天的过程中,完全乙酰化的修饰的 MenA 荚膜多糖的稳定性。

[0471] 完全 O-乙酰化的修饰的 MenA 多糖比天然荚膜多糖和相应寡糖稳定得多。

样品	avDP						
	0d	7d	14d	21d	28d	35d	42d
[0472] 多MenA 天然	>50	>50	44.6	29.6	26.9	20.8	18.3
寡MenA 天然	17.3	15.5	13.0	12.0	11.0	10.4	9.6
多MenA 完全乙酰化	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

[0473] 表 IV

[0474] 这些结果证实,通过用本发明的封端基团封闭 N-乙酰甘露糖胺 4 和 3 位的羟基可增强 MenA 寡糖的稳定性。

[0475] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,可在本发明的范围和构思内进行修改。

[0476] 参考文献(将其内容纳入本文作参考)

[0477] 美国专利 4,711,779

[0478] 美国专利 4,761,283

[0479] 美国专利 4,882,317

[0480] WO 03/080678

[0481] Berkin 等 (2002) Chemistry 8:4424-33

[0482] Ramsay 等 (2001) Lancet 357(9251):195-6

[0483] Lindberg(1999) Vaccine 17 增刊 2:S28-36

[0484] Buttery 和 Moxon(2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-8

[0485] Ahmad 和 Chapnick(1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii

[0486] Goldblatt(1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567

[0487] EP-B-0 477 508

[0488] 美国专利 5,306,492

[0489] W098/42721

[0490] Dick 等, 刊于《偶联疫苗》(Conjugate Vaccines) (Cruse 等编) Karger, Basel, 1989, 卷 10, 48-114

[0491] Hermanson 《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques), 学术出版社 (Academic Press), 圣地亚哥加州 (1996)

[0492] 美国专利 4,356,170

[0493] 美国专利 4,695,624

[0494] Bethell G. S. 等, J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4

[0495] Hearn M. T. W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18

[0496] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919

[0497] EP-A-0208375

[0498] W000/10599

[0499] Gever 等, Med. Microbiol. Immunol, 165:171-288 (1979).

[0500] 美国专利 4,057,685.

[0501] 美国专利 4,673,574 ;4,761,283 ;4,808,700.

- [0502] 美国专利 4, 459, 286.
- [0503] 美国专利 4, 965, 338
- [0504] 美国专利 4, 663, 160.
- [0505] Research Disclosure, 453077 (2002/01)
- [0506] EP-A-0372501
- [0507] EP-A-0378881
- [0508] EP-A-0427347
- [0509] W093/17712
- [0510] W094/03208
- [0511] W098/58668
- [0512] EP-A-0471177
- [0513] W000/56360
- [0514] W091/01146
- [0515] W000/61761
- [0516] W001/72337
- [0517] Lei 等 (2000) Dev Biol (Basel) 103 :259-264
- [0518] W000/38711
- [0519] W099/42130
- [0520] Gennaro (2000)《雷明顿药物科学与实践》(Remington :The Science and Practice of Pharmacy). 第 20 版, ISBN :0683306472.
- [0521] Nony 等 (2001) Vaccine 27 :3645-51.
- [0522] Greenbaum 等 (2004) Vaccine 22 :2566-77.
- [0523] Zurbriggen 等 (2003) Expert Rev Vaccines 2 :295-304.
- [0524] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43 :728-30.
- [0525] Mann 等 (2004) Vaccine 22 :2425-9.
- [0526] Halperin 等 (1979) Am J Public Health 69 :1247-50.
- [0527] Herbert 等 (1979) J Infect Dis 140 :234-8.
- [0528] Chen 等 (2003) Vaccine 21 :2830-6.
- [0529] 美国专利 6355271.
- [0530] W000/23105.
- [0531] W001/22972.
- [0532] Kandimalla 等 (2003) Nucleic Acids Research 31 :2393-2400.
- [0533] W002/26757.
- [0534] W099/62923.
- [0535] Krieg (2003) Nature Medicine 9 :831-835.
- [0536] McCluskie 等 (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32 :179-185.
- [0537] W098/40100.
- [0538] 美国专利 6, 207, 646.
- [0539] 美国专利 6, 239, 116.

- [0540] 美国专利 6,429,199.
- [0541] Kandimalla 等 (2003) *Biochemical Society Transactions* 31(第3部分): 654-658.
- [0542] Blackwell 等 (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [0543] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [0544] W001/95935.
- [0545] Kandimalla 等 (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [0546] Bhagat 等 (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [0547] W003/035836.
- [0548] Myers 等 (1990) 《内毒素反应的细胞和分子方面》(Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions) 第 145-156 页.
- [0549] Ulrich (2000) 参考文献 132 的第 16 章 (第 273-282 页).
- [0550] Johnson 等 (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
- [0551] Baldrick 等 (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
- [0552] 英国专利申请 GB-A-2220211.
- [0553] US 4,680,338.
- [0554] US 4,988,815.
- [0555] W092/15582.
- [0556] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [0557] Wu 等 (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [0558] Vasilakos 等 (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- [0559] 美国专利 4689338、4929624、5238944、5266575、5268376、5346905、5352784、5389640、5395937、5482936、5494916、5525612、6083505、6440992、6627640、6656938、6660735、6660747、6664260、6664264、6664265、6667312、6670372、6677347、6677348、6677349、6683088、6703402、6743920、6800624、6809203、6888000 和 6924293.
- [0560] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [0561] W02004/060308.
- [0562] W02004/064759.
- [0563] US 6,924,271.
- [0564] US2005/0070556.
- [0565] US 5,658,731.
- [0566] 美国专利 5,011,828.
- [0567] W02004/87153.
- [0568] US 6,605,617.
- [0569] W002/18383.
- [0570] W02004/018455.
- [0571] W003/082272.
- [0572] W02006/002422.
- [0573] Johnson 等 (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

- [0574] Evans 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2 :219-229.
- [0575] Andrianov 等 (1998)Biomaterials 19 :109-115.
- [0576] Payne 等 (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196.
- [0577] US 5, 057, 540.
- [0578] W096/33739.
- [0579] EP-A-0109942.
- [0580] W096/11711.
- [0581] W000/07621.
- [0582] Barr 等 (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :247-271.
- [0583] sjolanderet 等 (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :321-338.
- [0584] Pizza 等 (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461.
- [0585] W095/17211.
- [0586] W098/42375.
- [0587] Singh 等 (2001)J Cont Release 70 :267-276.
- [0588] W099/27960.
- [0589] US 6, 090, 406
- [0590] US 5, 916, 588
- [0591] EP-A-0626169.
- [0592] W099/52549.
- [0593] W001/21207.
- [0594] W001/21152.
- [0595] Signorelli 和 Hadden (2003)int Immunopharmacol 3(8) :1177-86.
- [0596] W02004/064715.
- [0597] Cooper (1995)Pharm Biotechnol 6 :559-80.
- [0598] W003/011223.
- [0599] Meraldi 等 (2003)Vaccine 21 :2485-2491.
- [0600] Pajak 等 (2003)Vaccine 21 :836-842.
- [0601] US-6586409.
- [0602] Wong 等 (2003)J Clin Pharmacol 43(7) :735-42.
- [0603] US2005/0215517.
- [0604] W090/14837.
- [0605] Podda 和 Del Giudice (2003)Expert Rev Vaccines 2 :197-203.
- [0606] Podda (2001)Vaccine 19 :2673-2680.
- [0607] 《疫苗设计：亚单位和佐剂方法》(Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach) (Powell 和 Newman 编) 普利马出版社 (Plenum Press) 1995 (ISBN0-306-44867-X).
- [0608] 《疫苗佐剂：制备方法和研究策略》(Vaccine Adjuvants:Preparation Methods and Research Protocols) (《分子医学方法系列丛书》(Methods in Molecular Medicine series) 第 42 卷). ISBN:1-59259-083-7. 0' Hagan 编.

- [0609] Allison 和 Byars(1992)Res Immunol 143 :519-25.
- [0610] Hariharan 等 (1995)Cancer Res 55 :3486-9.
- [0611] W095/11700.
- [0612] 美国专利 6, 080, 725.
- [0613] W02005/097181.
- [0614] 国际专利申请 WO 03/007985.
- [0615] W001/52885.
- [0616] Bjune 等 (1991)Lancet 338(8775) :1093-1096.
- [0617] Fukasawa 等 (1999)Vaccine 17 :2951-2958.
- [0618] Rosenqvist 等 (1998)Dev. Biol. Stand. 92 :323-333.
- [0619] Covacci 和 Rappuoli (2000)J. Exp. Med. 19 :587-592.
- [0620] W093/18150.
- [0621] Covacci 等 (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5791-5795.
- [0622] Tummuru 等 (1994)Infect. Immun. 61 :1799-1809.
- [0623] Marchetti 等 (1998)Vaccine 16 :33-37.
- [0624] Telford 等 (1994)J. Exp. Med. 179 :1653-1658.
- [0625] Evans 等 (1995)Gene 153 :123-127.
- [0626] W096/01272 和 W096/01273, 尤其是 SEQ ID NO :6.
- [0627] W097/25429.
- [0628] W098/04702.
- [0629] Watson(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :331-332.
- [0630] Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v.
- [0631] Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207.
- [0632] Bell(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :1187-1188.
- [0633] Iwarson(1995)APMIS 103 :321-326.
- [0634] Gerlich 等 (1990)Vaccine 8 Suppl :S63-68 和 79-80.
- [0635] Hsu 等 (1999)Clin Liver Dis 3 :901-915.
- [0636] Gustafsson 等 (1996)N. Engl. J. Med. 334 :349-355.
- [0637] Rappuoli 等 (1991)TIBTECH 9 :232-238.
- [0638] 《疫苗》(Vaccines) (1988)Plotkin 和 Mortimer 编 . ISBN 0-7216-1946-0.
- [0639] Del Giudice 等 (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70.
- [0640] Sutter 等 (2000)Pediatr Clin North Am 47 :287-308.
- [0641] Zimmerman 和 Spann(1999)Am Fam Physician 59 :113-118, 125-126.
- [0642] Lindberg(1999)Vaccine 17 增刊 2 :S28-36.
- [0643] Buttery 和 Moxon(2000)J R Coll Physicians Lond 34 :163-168.
- [0644] Ahmad 和 Chapnick(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :113-133, vii
- [0645] Goldblatt(1998)J. Med. Microbiol. 47 :563-567.
- [0646] 欧洲专利 0477508.
- [0647] 美国专利 5, 306, 492.

- [0648] W098/42721.
- [0649] 《偶联疫苗》(Conjugate Vaccines) (Cruse 等编) ISBN 3805549326, 尤其是卷 10 : 48-114.
- [0650] Hermanson(1996)《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques) ISBN :0123423368 或 012342335X.
- [0651] W002/02606.
- [0652] Kalman 等 (1999) Nature Genetics 21 :385-389.
- [0653] Read 等 (2000) Nucleic Acids Res 28 :1397-406.
- [0654] Shirai 等 (2000) J. Infect. Dis. 181(增刊 3) :S524-S527.
- [0655] W099/27105.
- [0656] W000/27994.
- [0657] W000/37494.
- [0658] W099/28475.
- [0659] Ross 等 (2001) Vaccine 19 :4135-4142.
- [0660] Dreesen(1997) Vaccine 15 Suppl :S2-6.
- [0661] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998/01 16 ;47(1) :12, 19.
- [0662] McMichael(2000) Vaccine 19 增刊 1 :S101-107.
- [0663] Schuchat(1999) Lancet 353(9146) :51-6.
- [0664] W002/34771.
- [0665] Dale(1999) Infect Dis Clin North Am 13 :227-43, viii.
- [0666] Ferretti 等 (2001) PNAS USA 98 :4658-4663.
- [0667] Kuroda 等 (2001) Lancet 357(9264) :1225-1240 ;也可见第 1218-1219 页 .
- [0668] J Toxicol Clin Toxicol(2001) 39 :85-100.
- [0669] Demicheli 等 (1998) Vaccine 16 :880-884.
- [0670] Stepanov 等 (1996) J Biotechnol 44 :155-160.
- [0671] EP-A-0139417.
- [0672] Harper 等 (2004) Lancet 364(9447) :1757-65.
- [0673] Ingram(2001) Trends Neurosci 24 :305-307.
- [0674] Rosenberg(2001) Nature 411 :380-384.
- [0675] Moingeon(2001) Vaccine 19 :1305-1326.
- [0676] Robinson 和 Torres(1997) Seminars in Immunology 9 :271-283.
- [0677] Donnelly 等 (1997) Annu Rev Immunol 15 :617-648.
- [0678] Scott-Taylor 和 Dalgleish(2000) Expert Opin Investig Drugs 9 :471-480.
- [0679] Apostolopoulos 和 Plebanski(2000) Curr Opin Mol Ther 2 :441-447.
- [0680] Ilan(1999) Curr Opin Mol Ther 1 :116-120.
- [0681] Dubensky 等 (2000) Mol Med 6 :723-732.
- [0682] Robinson 和 Pertmer(2000) Adv Virus Res 55 :1-74.
- [0683] Donnelly 等 (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2) :S190-193.
- [0684] Davis(1999) Mt. Sinai J. Med. 66 :84-90.

- [0685] Parkhill 等 (2000) *Nature* 404 :502-506.
- [0686] Tettelin 等 (2000) *Science* 287 :1809-1815.
- [0687] W000/66791.
- [0688] Pizza 等 (2000) *Science* 287 :1816-1820.
- [0689] W099/24578.
- [0690] W099/36544.
- [0691] W099/57280.
- [0692] W000/22430.
- [0693] W000/66741.
- [0694] W001/64920.
- [0695] W001/64922.
- [0696] W003/020756.
- [0697] W02004/014419.
- [0698] W099/31132 ;美国专利 6, 495, 345.
- [0699] W099/58683.
- [0700] Peak 等 (2000) *FEMS Immunol Med Microbiol* 28 :329-334.
- [0701] W093/06861.
- [0702] EP-A-0586266.
- [0703] W092/03467.
- [0704] 美国专利 5912336.
- [0705] W02004/014418.
- [0706] 英国专利申请 0223741. 0、0305831. 0 和 0309115. 4 ;以及 W02004/032958.
- [0707] Comanducci 等 (2002) *J. Exp. Med.* 195 :1445-1454.
- [0708] W02004/048404
- [0709] W003/063766.
- [0710] Massignani 等 (2003) *J Exp Med* 197 :789-799.
- [0711] W02004/015099.
- [0712] W002/09643.
- [0713] Katial 等 (2002) *Infect. Immun.* 70 :702-707.
- [0714] 美国专利 6, 180, 111.
- [0715] W001/34642.
- [0716] PCT/IB2005/003494.
- [0717] W099/10497.
- [0718] W002/07763.
- [0719] 欧洲专利 0624376.
- [0720] W001/52885.
- [0721] W000/25811.
- [0722] Claassen 等 (1996) *Vaccine* 14 :1001-1008.
- [0723] Peeters 等 (1996) *Vaccine* 14 :1009-1015.

- [0724] W001/09350.
- [0725] W002/09746.
- [0726] Adu-Bobie 等 (2004) *Infect Immun* 72 :1914-1919.
- [0727] WO 02/062378.
- [0728] WO 2004/014417.
- [0729] Maiden 等 (1998) *PNAS USA* 95 :3140-3145.
- [0730] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [0731] Pettersson 等 (1994) *Microb Pathog* 17(6) :395-408.
- [0732] Maiden 等 (1998) *PNAS USA* 95 :3140-3145.
- [0733] Welsch 等 (2002) 第 13 届国际致病奈瑟菌会议 (Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference), 挪威国立公众健康研究所, 奥斯陆, 挪威; 2002 年 9 月 1-6 日。“基因组衍生抗原 (GNA) 2132 引发针对脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 和 C 菌株的保护性血清抗体” (Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C *Neisseria meningitidis* strains).
- [0734] Santos 等 (2002) 第 13 届国际致病奈瑟菌会议, 挪威国立公众健康研究所, 奥斯陆, 挪威; 2002 年 9 月 1-6 日。“用含有衍生自脑膜炎奈瑟球菌基因组的重组蛋白的新型疫苗免疫猕猴的血清杀菌反应” (Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*).
- [0735] Chen 等 (1956) *Anal. Chem.* 28 :1756-1758.
- [0736] Anderson 等 (1985) *J. Clin. Invest.* 76 :52-59.
- [0737] Costantino 等 (1999) *Vaccine* 17 :1251-1263.
- [0738] Lemercinier 和 Jones (1996) *Carbohydr. Res.* 296 :83-96.
- [0739] Gudlavalleti 等 (2004) *J. Biol. Chem.* 279(41) :42765-42773.
- [0740] Berti F., Bartoloni A., Norelli F., Averani G., Giannozzi A., Berti S. 和 Costantino P. 会议演讲 - 第 15 届国际致病奈瑟菌会议 (2006)
- [0741] Nash (1953) *J. Biochem.* 55 :416-421.
- [0742] Giannini 等 (1984) *Nucleic Acids Res.* 12 :4063-4069
- [0743] Laemmli (1970) *Nature, Lond.* 227 :680-685.
- [0744] Carlone 等 (1992) *J. Clin. Microbiol.* 30 :154-159.

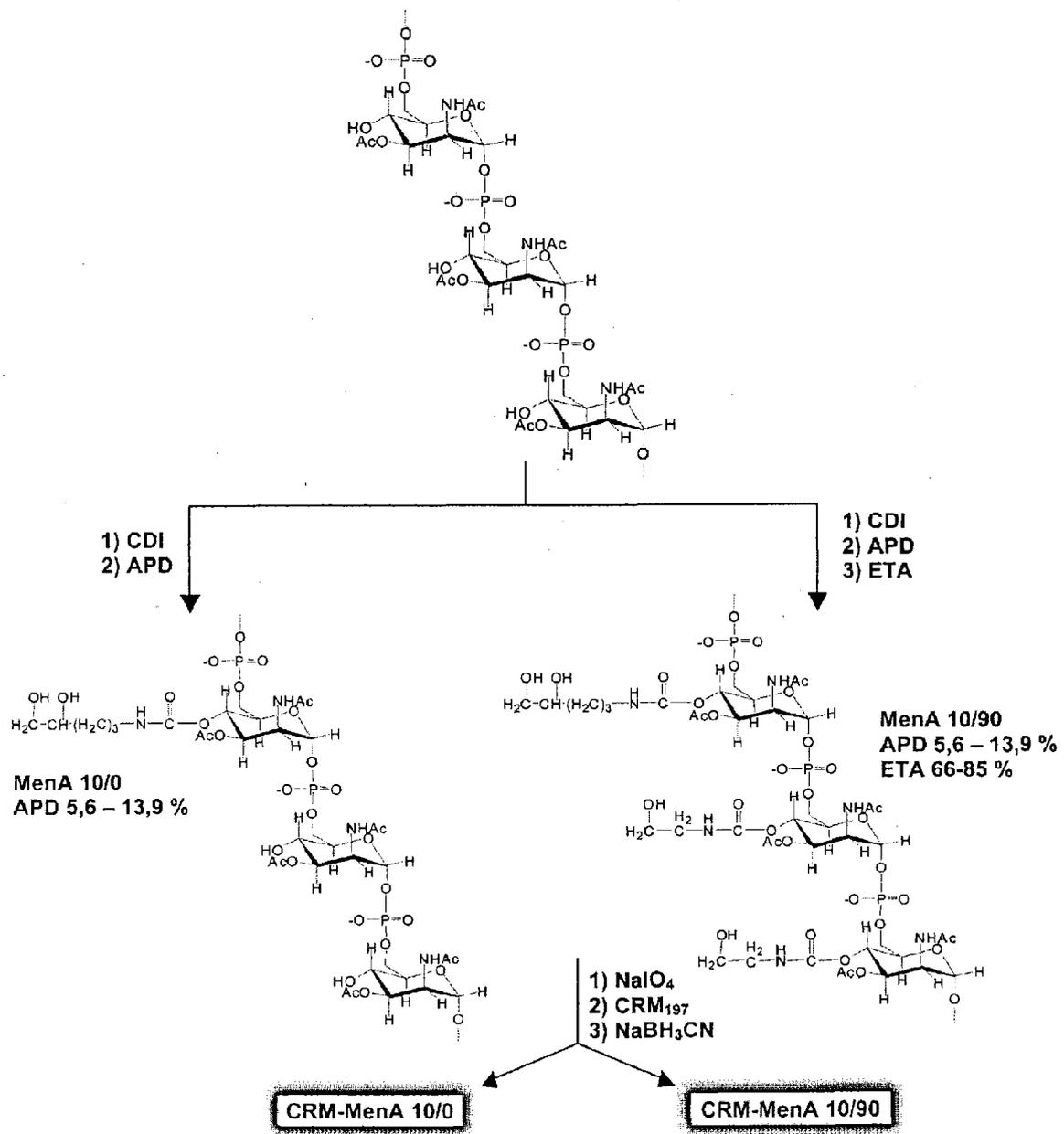


图 1

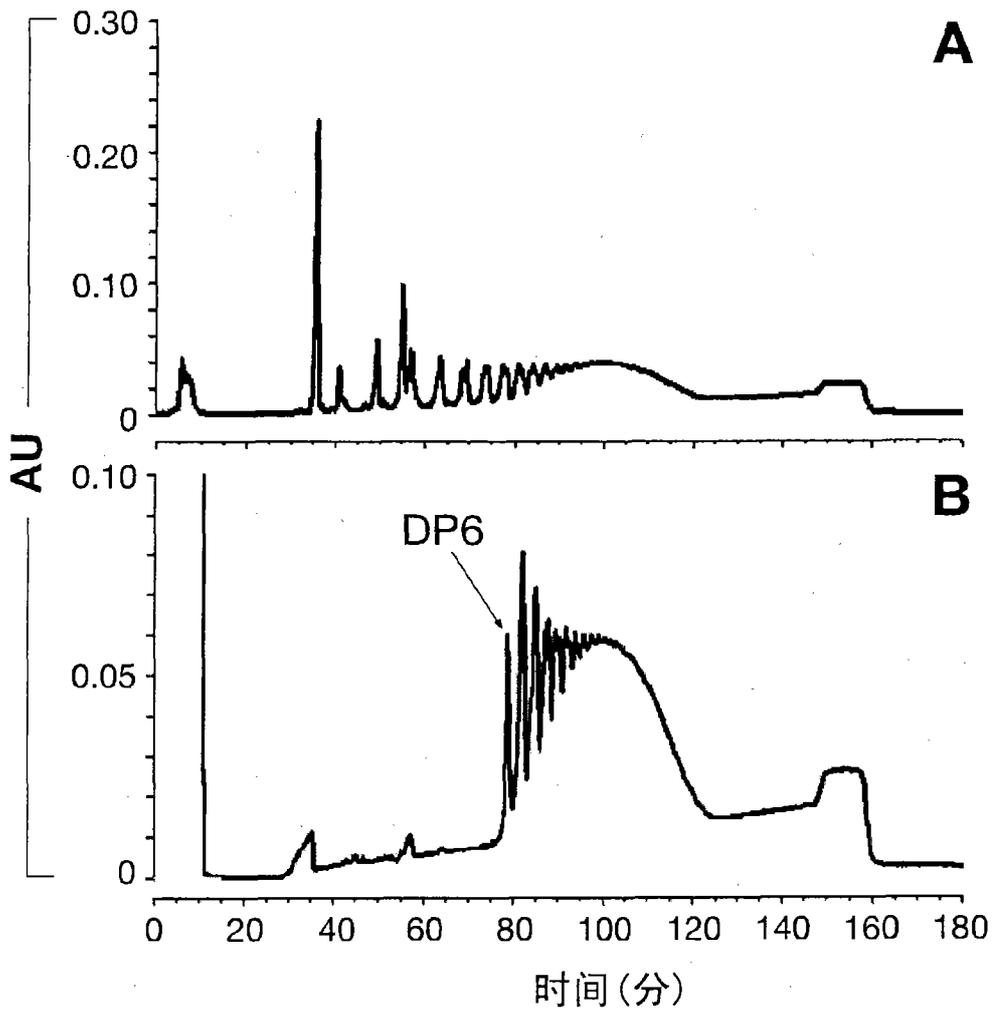


图 2

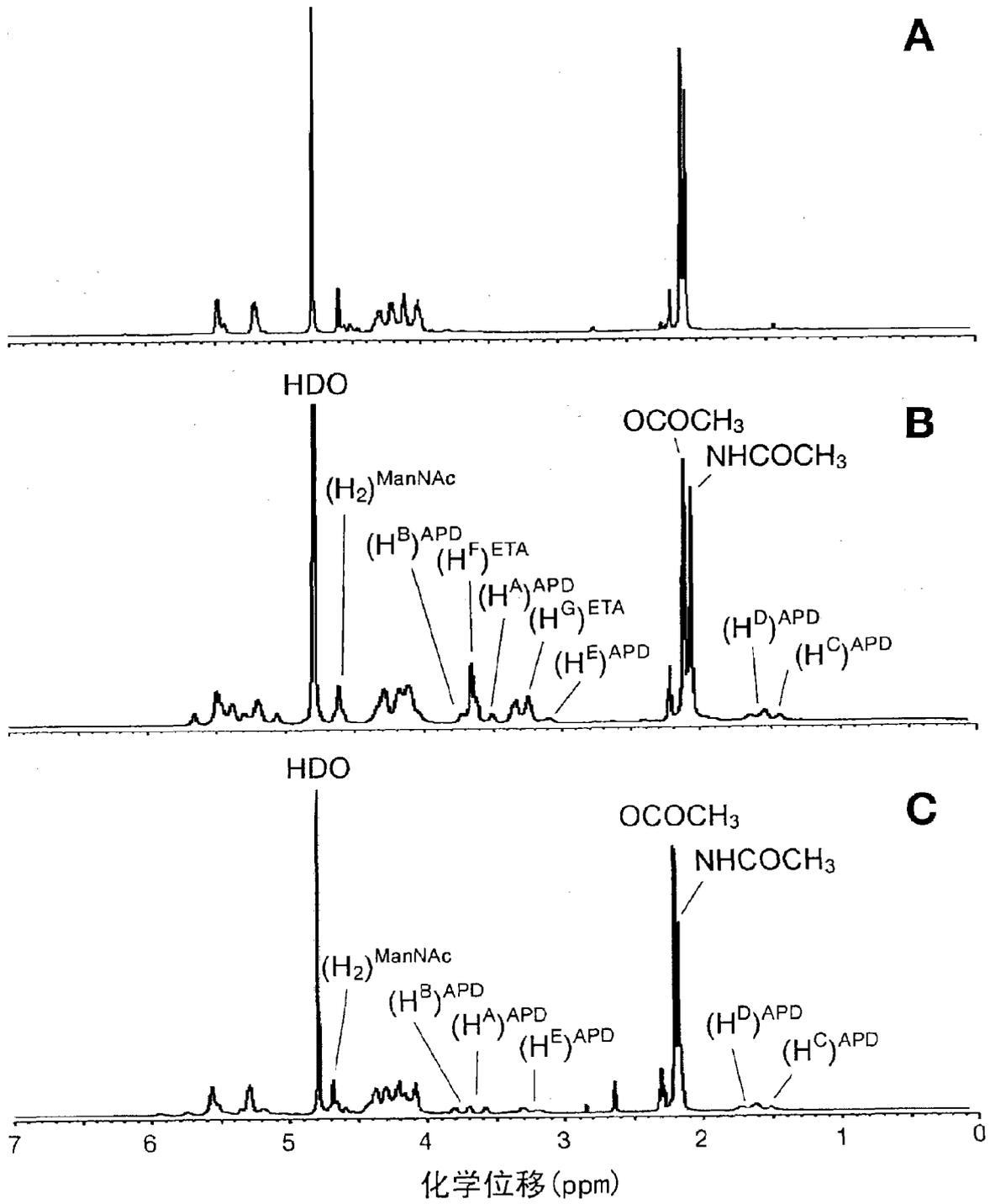


图 3

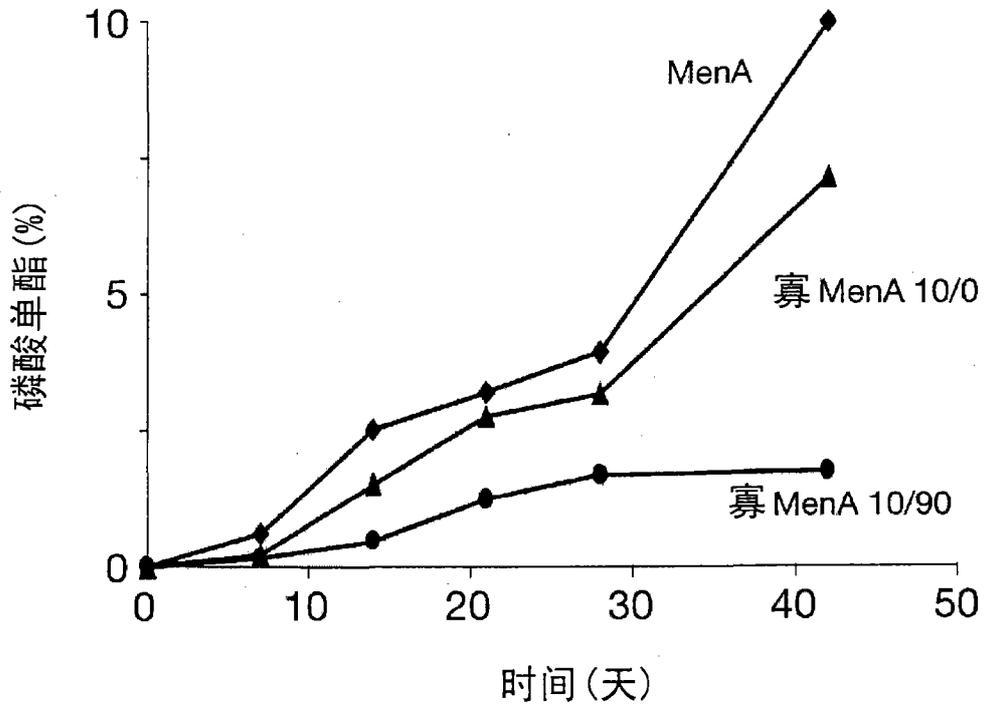


图 4

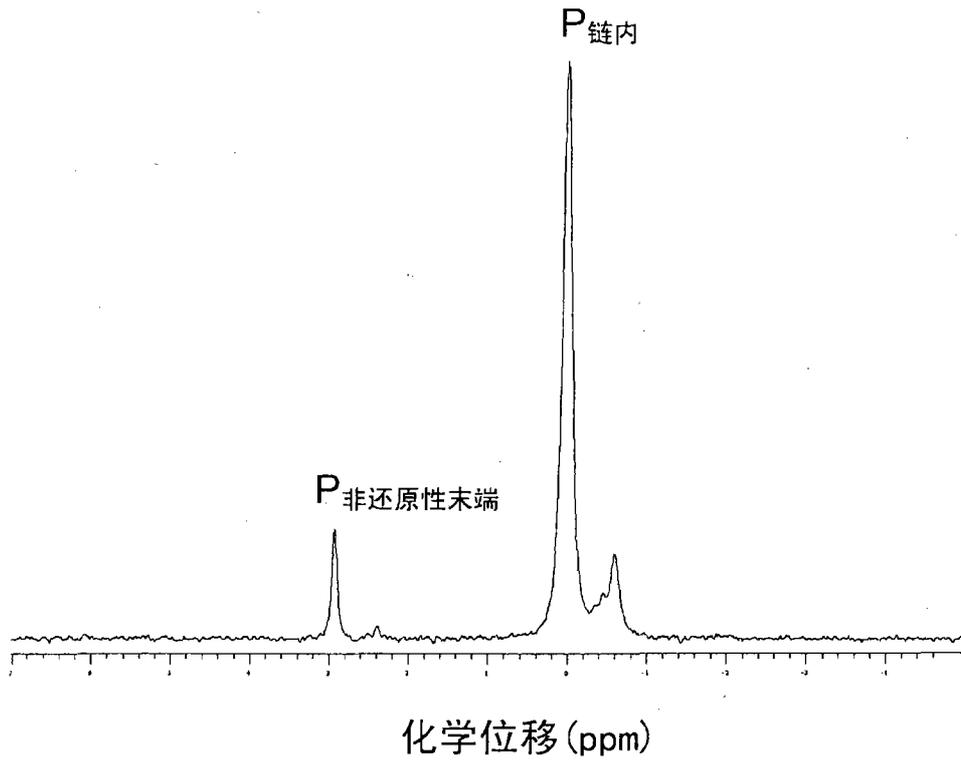


图 5

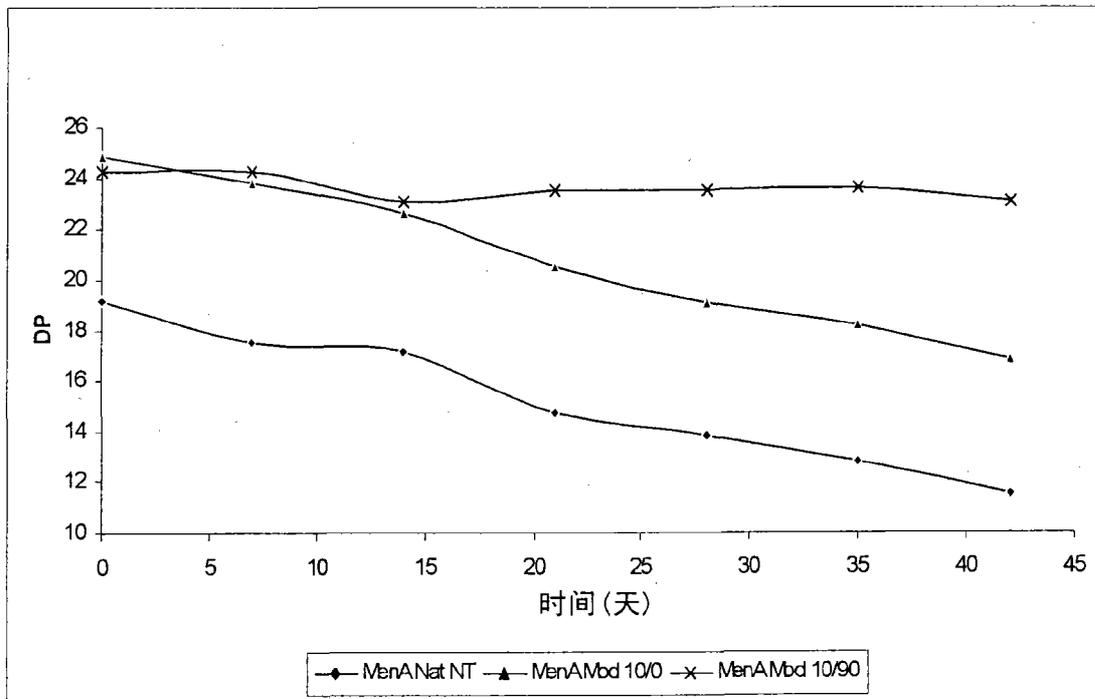


图 6

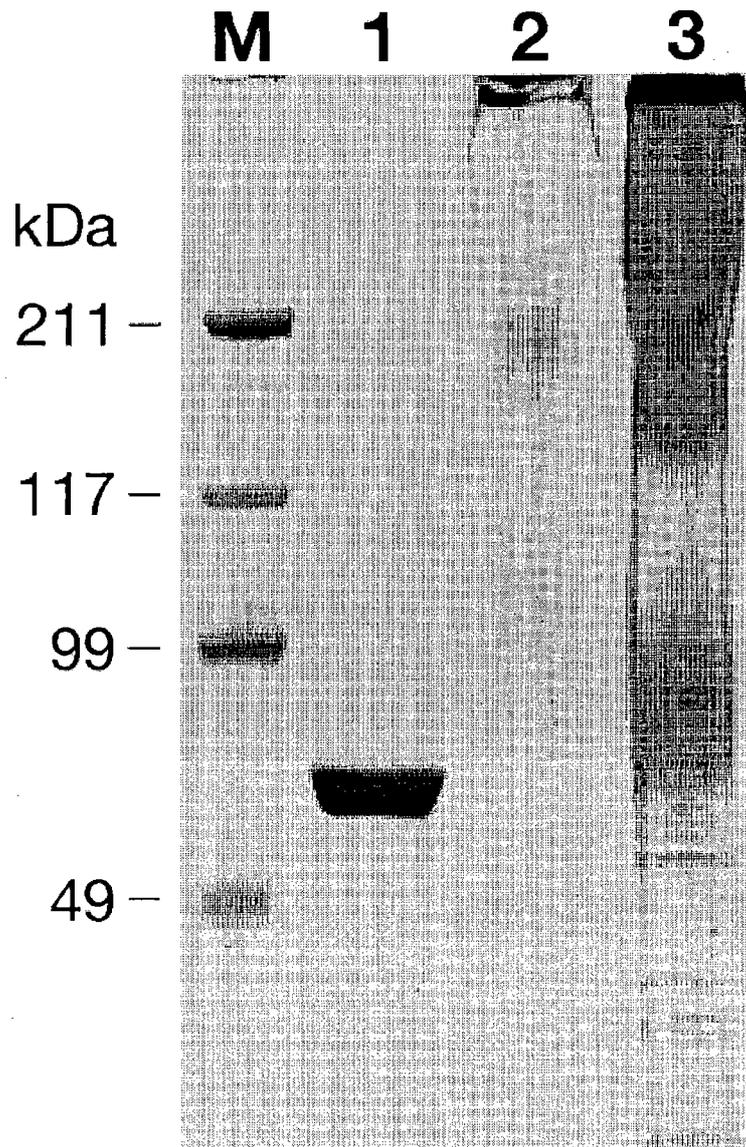


图 7

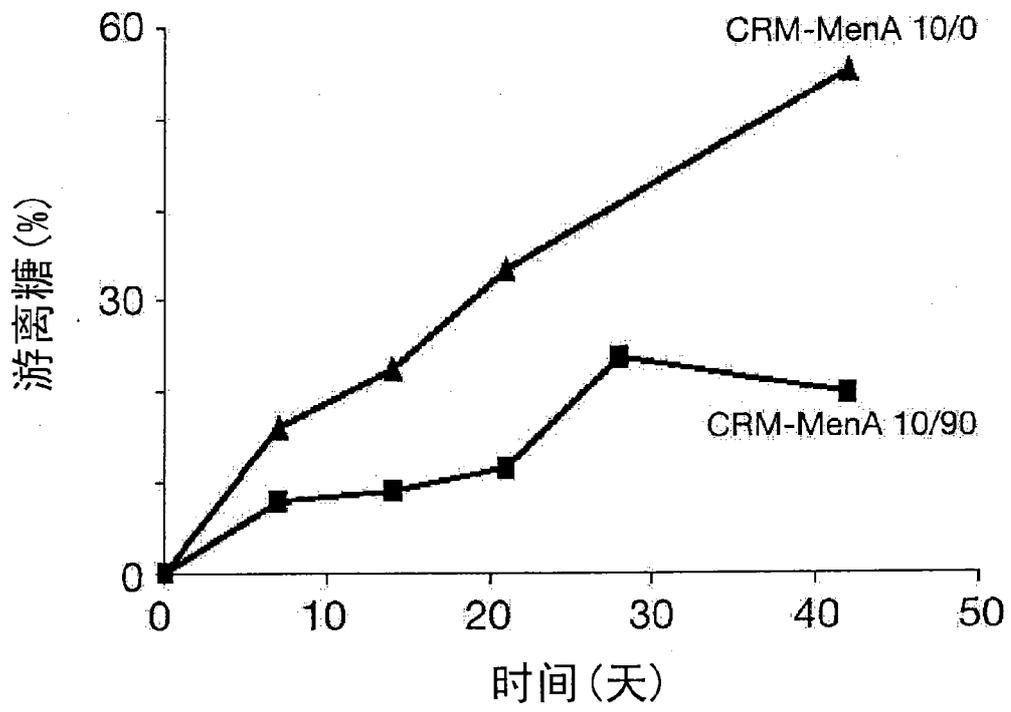


图 8

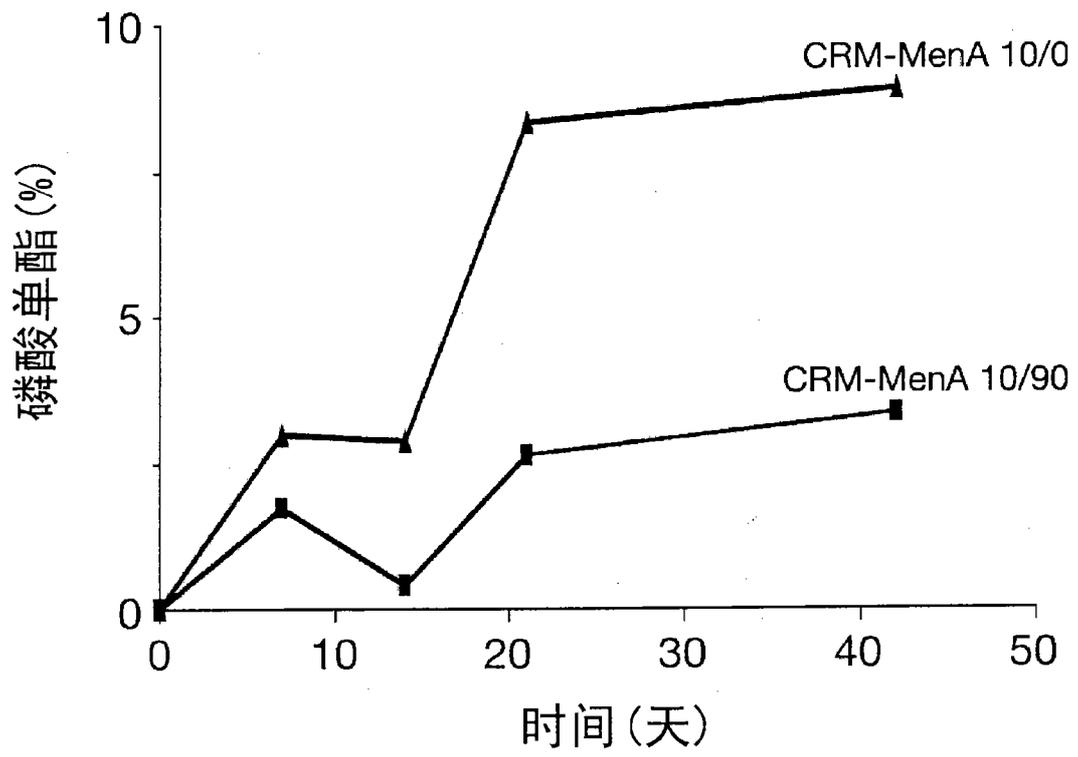


图 9