

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580044025.0

[51] Int. Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月16日

[11] 公开号 CN 101107010A

[22] 申请日 2005.11.1

[21] 申请号 200580044025.0

[30] 优先权

[32] 2004.11.1 [33] US [31] 60/623,907

[86] 国际申请 PCT/US2005/039424 2005.11.1

[87] 国际公布 WO2006/050341 英 2006.5.11

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.21

[71] 申请人 布里格海姆妇女医院公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 D·L·卡斯珀 H-K·格特姆森

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

权利要求书5页 说明书28页 附图30页

[54] 发明名称

经修饰的链球菌多糖及其用途

[57] 摘要

此处提供了经修饰的链球菌多糖和使用所述经修饰的多糖的方法。

1. 一种抗原组合物，其包含：
 - (a) 经修饰的 B 组链球菌 (GBS) V 型多糖；和
 - (b) 共价地和所述多糖结合的部分。
2. 权利要求 1 的组合物，其中通过在从多糖除去侧链-末端唾液酸残基的条件下进行处理来修饰所述多糖。
3. 权利要求 2 的组合物，其中通过在略微酸性的条件下进行处理来修饰所述多糖。
4. 权利要求 1 的组合物，其中所述多糖是去唾液酸 GBS V 型多糖。
5. 权利要求 1 的组合物，其中通过在从多糖主链上除去三糖侧链的条件下进行处理来修饰所述多糖。
6. 权利要求 5 的组合物，其中通过顺序地去唾液酸化、脱乙酰基化和脱氨基作用来修饰所述多糖。
7. 权利要求 1 的组合物，其中所述多糖是脱氨 GBS V 型多糖。
8. 权利要求 1 的组合物，其中所述部分是多肽。
9. 权利要求 8 的组合物，其中所述多肽是细菌多肽。
10. 权利要求 9 的组合物，其中所述多肽是细胞表面或分泌的细菌多肽。
11. 权利要求 9 的组合物，其中所述多肽是 GBS 多肽。
12. 权利要求 11 的组合物，其中所述多肽是由在 Tettelin 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19):12391-6, 2002 中鉴定的基因编码的 GBS V 多肽。
13. 权利要求 11 的组合物，其中所述 GBS 多肽选自：C 蛋白 α 多肽、GBS C 蛋白 β 多肽、 ϵ 多肽、R 蛋白、 α 样蛋白、b 组链球菌 1 的表面蛋白 (spb1)、spb2、层粘连蛋白结合蛋白 (Lmb)、C5a 肽酶、基质粘附 (Ema) 多肽及其抗原片段。
14. 权利要求 8 的组合物，其中所述组合物包含 2、3、4 或 5 种不同的多肽。

15. 权利要求 9 的组合物，其中所述多肽是细菌毒素或类毒素。
16. 权利要求 15 的组合物，其中所述多肽是破伤风类毒素。
17. 权利要求 15 的组合物，其中所述多肽是白喉类毒素。
18. 权利要求 15 的组合物，其中所述多肽是白喉突变蛋白交叉反应性物质 (CRM197)。
19. 权利要求 1 的组合物，其中所述多糖至少为 1 千道尔顿 (kD)。
20. 权利要求 19 的组合物，其中所述多糖至少为 25kD。
21. 权利要求 20 的组合物，其中所述多糖至少为 50kD。
22. 权利要求 1 的组合物，其中所述组合物包含 0.1 至 500 μ g 的多糖。
23. 权利要求 1 的组合物，其中所述组合物还包含可药用载体。
24. 权利要求 1 的组合物，其中所述组合物还包含佐剂。
25. 权利要求 24 的组合物，其中所述佐剂是明矾。
26. 权利要求 1 的组合物，其中所述组合物还包含至少一种其他的多糖。
27. 权利要求 26 的组合物，其中至少一种其他的多糖包含细菌多糖。
28. 权利要求 27 的组合物，其中所述细菌多糖包含 GBS 多糖。
29. 权利要求 28 的组合物，其中所述细菌多糖包含 GBS Ia、Ib、II、III、IV、VI、VII 或 VIII 型多糖中的一种或多种。
30. 用于在哺乳动物中引发免疫应答的方法，所述方法包括给所述哺乳动物施用组合物，所述组合物包含：
 - (a) 经修饰的 B 组链球菌 (GBS) V 型多糖；和
 - (b) 共价地和所述多糖结合的部分；从而在哺乳动物中引发免疫应答。
31. 权利要求 30 的方法，其中通过在从多糖除去侧链-末端唾液酸残基的条件下进行处理来修饰所述多糖。
32. 权利要求 30 的方法，其中所述经修饰的多糖是去唾液酸 GBS V 型多糖。

33. 权利要求 30 的方法, 其中通过在从多糖主链除去三糖侧链的条件下进行处理来修饰所述多糖。

34. 权利要求 30 的方法, 其中所述经修饰的多糖是脱氨 GBS V 型多糖。

35. 权利要求 30 的方法, 其中所述部分是多肽。

36. 权利要求 35 的方法, 其中所述多肽是细菌多肽。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述多肽是细胞表面或分泌的细菌多肽。

38. 权利要求 36 的方法, 其中所述多肽是 GBS 多肽。

39. 权利要求 38 的方法, 其中所述 GBS 多肽选自: C 蛋白 α 多肽、GBS C 蛋白 β 多肽、 ϵ 多肽、R 蛋白、 α 样蛋白、b 组链球菌 1 的表面蛋白 (spb1)、spb2、层粘连蛋白结合蛋白 (Lmb)、C5a 肽酶、基质粘附 (Ema) 多肽及其抗原片段。

40. 权利要求 35 的方法, 其中所述组合物包含 2、3、4 或 5 种不同的多肽。

41. 权利要求 36 的方法, 其中所述多肽是毒素或类毒素。

42. 权利要求 41 的方法, 其中所述多肽是破伤风类毒素。

43. 权利要求 41 的方法, 其中所述多肽是白喉类毒素。

44. 权利要求 41 的方法, 其中所述多肽是 CRM197。

45. 权利要求 30 的方法, 其中所述多糖至少为 1 千道尔顿 (kD)。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述多糖至少为 25 kD。

47. 权利要求 30 的方法, 其中给受试者施用所述组合物两次或更多次。

48. 权利要求 30 的方法, 其中给哺乳动物施用包含 0.1 至 500 μ g 的所述多糖的组合物的量。

49. 权利要求 48 的方法, 其中给哺乳动物施用包含 25 至 100 μ g 的所述多糖的组合物的量。

50. 权利要求 30 的方法, 其中所述组合物还包含佐剂。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述佐剂是明矾。

52. 权利要求 30 的方法，其中所述方法在哺乳动物中引发抗体反应。
53. 权利要求 52 的方法，其中所述方法在哺乳动物中引发 IgG 抗体反应。
54. 权利要求 30 的方法，其中所述方法在哺乳动物中引发保护性反应。
55. 权利要求 30 的方法，其中所述哺乳动物处在被 GBS 细菌感染
的风险中。
56. 权利要求 30 的方法，其中所述哺乳动物是灵长类动物。
57. 权利要求 56 的方法，其中所述灵长类动物是人。
58. 权利要求 57 的方法，其中给成人施用所述组合物。
59. 权利要求 58 的方法，其中给超过 10 岁的人施用所述组合物。
60. 权利要求 59 的方法，其中所述人是非妊娠妇女。
61. 权利要求 59 的方法，其中给超过 50 岁的人施用所述组合物。
62. 权利要求 61 的方法，其中给超过 70 岁的人施用所述组合物。
63. 权利要求 59 的方法，其中所述人是孕妇。
64. 权利要求 30 的方法，其中所述组合物还包含除了经修饰的
GBS V 型多糖外的至少一种其他的多糖。
65. 权利要求 64 的方法，其中至少一种其他的多糖包含 GBS Ia、
Ib、II、III、IV、VI、VII 或 VIII 型多糖。
66. 给新生儿提供抗体的方法，该方法包括：
给孕妇施用抗原组合物，该组合物包含：
(a) 经修饰的 B 组链球菌 (GBS) V 型多糖；和
(b) 与所述多糖物理结合的部分。
67. 用于制备免疫原性组合物的方法，该方法包括：
提供纯化的 GBS V 多糖；
在修饰所述多糖的结构的条件下处理所述多糖。
68. 权利要求 67 的方法，其中在除去多糖侧链的一个或多个残基
的条件下修饰该多糖。

69. 权利要求 68 的方法，其中在除去多糖的侧链-末端唾液酸残基的条件下修饰该多糖。

70. 权利要求 67 的方法，其中在除去多糖的三糖侧链的条件下修饰该多糖。

71. 包含通过权利要求 66 的方法获得的抗血清的组合物。

经修饰的链球菌多糖及其用途

交叉参照相关申请

本申请要求 2004 年 11 月 1 日提交的 U. S. S. N. 60/623, 907 的优先权的利益，其内容在此以其全文引用作为参考。

此处描述的工作部分由来自国立卫生研究院的资金(基金号 R37 AI23339 和 N01-AI-25495)资助。因此，美国政府可拥有本发明中的某些权利。

技术领域

本发明涉及包含细菌多糖和经修饰的多糖的组合物，和更特别地涉及使用所述多糖在哺乳动物中诱导免疫应答的用途。

背景

B 组链球菌是美国和世界其他地方新生儿败血症和脑膜炎的主要病因 (Anthony 和 Okada, *Annu Rev Med.*, 28: 355-69, 1977; Baker, *Adv Intern Med.*, 25: 475-501, 1980; Dillion 等人, *J Pediatr.*, 110(1): 31-6, 1987)。在 1990 年代以前，实质上所有的攻击性 B 组链球菌 (GBS) 感染都是由血清型 Ia、Ib、II 和 III 引起的。在 1990 年代的儿科学文献中出现新血清型 V 型感染新生婴儿的报导 (Greenberg 等, *J. Pediatr.* 123(3): 494-5, 1993; Hervas 和 Benedi, *J Pediatr.*, 123(5): 839, 1993; Rench and Baker, *J Pediatr.*, 122(4): 638-40, 1993)。由 V 型 GBS 引起的感染在 1990 年代中期前明显地变得更加普遍，且该血清型现在被认为是新生婴儿和孕妇中感染的共同病因 (Zaleznik 等人, *Clin Infect Dis.*, 30(2): 276-81, 2000)。V 型 GBS 的荚膜多糖及其他 GBS 的荚膜多糖 (CPS) 具有共同的结构特征但其抗原性不同 (Wessels 等人, *J Biol*

Chem., 266(11):6714-9, 1991)。

概述

本发明部分地基于这样的观察，即可通过改变多糖的结构例如显露多糖上的优势免疫表位来增强细菌多糖的免疫原性。我们已发现经化学修饰从而除去多糖的一个或多个侧链残基的 GBS V 型荚膜多糖 (GBS V CPS 或 GBS V PS) 在灵长类动物中引发有效的 IgG 反应。

在一个方面，本发明表征了包含经修饰的细菌多糖的抗原组合物。所述经修饰的细菌多糖可以是结构经修饰以显露免疫原表位例如优势免疫表位的多糖形式。多糖的修饰可增强多糖在宿主生物中的免疫原性和/或刺激免疫应答，该免疫应答在保护宿主生物方面比通过未修饰的（例如，天然的）多糖形式诱导的保护作用更有效。可增强免疫原性的修饰包括从多糖的主链残基除去一个或多个侧链糖残基的修饰。

在一个实施方案中，经修饰的多糖诱导抗体反应，例如，与该多糖的天然形式相比，增强的抗体反应，例如哺乳动物（例如，灵长类动物）中的保护性抗体反应。在一个实施方案中，多糖诱导 IgG 反应。多糖可与载体部分例如多肽（例如，细菌多肽）物理结合。经修饰的多糖可包含此处描述的特征（例如，修饰的多糖可以是例如经修饰的 B 组链球菌 (GBS) V 型多糖，例如，该多糖经修饰以除去一个或多个侧链糖，例如，经修饰的多糖是脱氨 GBS V 型多糖或去唾液酸化 GBS V 型多糖）。

在另一个方面，本发明表征了抗原组合物，其包括：(a) 经修饰的 GBS V 型多糖；和 (b) 与该多糖物理（例如，共价地）结合的部分。可通过从多糖除去一个或多个侧链糖残基的处理来修饰该多糖。例如，在例如通过在略微酸性的条件下处理或用神经氨酸酶从多糖除去侧链-末端唾液酸残基的条件下处理该多糖。在一个实施方案中，多糖是去唾液酸 GBS V 型多糖。在一个实施方案中，通过在从多糖的主链除去三糖侧链的条件下进行处理来修饰多糖。可通过顺序地去唾液酸化、去乙酰化和脱氨作用修饰多糖。在一个实施方案中，所述多糖是脱氨 GBS V 型多糖。

在一些实施方案中，在细菌（例如，GBS V 细菌）中产生经修饰的多糖，所述细菌经基因改造以合成以经修饰的形式存在的多糖（例如，细菌对于将侧链加至多糖的酶的表达是有缺陷的，或细菌表达或过量表达从多糖除去侧链的酶）。

与经修饰的 GBS 多糖结合的部分是，例如，增强经修饰的多糖对抗原呈递细胞的结合的化合物，例如多肽，例如细菌多肽，例如细胞表面多肽或分泌的细菌多肽。可直接或通过结合剂将多肽连接至多糖。在各种实施方案中，所述多肽是 GBS 多肽，例如细胞表面或分泌的 GBS 多肽。在各种实施方案中，多肽是 GBS 多肽，例如细胞表面或分泌的 GBS 多肽。在各种实施方案中，GBS 多肽选自 GBS C 蛋白 α 多肽、GBS C 蛋白 β 多肽、 ϵ 多肽、R 蛋白、 α 样蛋白、b 组链球菌 1 的表面蛋白 (spb1)、spb2、层粘连蛋白结合蛋白 (Lmb)、C5a 肽酶、基质粘附 (Ema) 多肽及其抗原片段和变体。GBS 多肽可以是 GBS Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII 或 VIII 型的多肽。在一个实施方案中，所述多肽是由 Tettelin 等人，*Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19):12391-6, 2002 中的 GBS V 基因组的序列中鉴定的基因产物编码的多肽，所述文献的内容在此以其全文引用作为参考。

在一个实施方案中，所述多肽是细菌毒素或类毒素，例如破伤风类毒素、白喉类毒素、白喉突变蛋白可交叉反应性物质 (CRM197) 或其抗原片段。

组合物可包含超过一种类型的载体部分。例如，经修饰的多糖可连接至 2、3、4 或 5 个不同的多肽，例如，2 种或更多种细菌多肽，例如细菌类毒素和 GBS C 蛋白 α 。

组合物的多糖组分可以是至少 1 千道尔顿 (kD)、5 kD、10 kD、15 kD、20 kD、25 kD 或 50 kD。组合物可具有 0.1 ~ 500 μ g，例如 0.5 ~ 100 μ g、1 ~ 50 μ g 或 5 ~ 25 μ g 的量的多糖。

在一个实施方案中，组合物还包含可药用载体。在一个实施方案中，组合物还包含佐剂，例如明矾。

组合物还可包含第二多糖，例如另一种 GBS 血清型或非 GBS 细菌

的多糖，例如，除了经修饰的 GBS V 型多糖外的 GBS Ia、Ib、II、III、IV、VI、VII 或 VIII 型多糖中的一种或多种多糖。

在另一个方案，本发明描述了在哺乳动物中引发免疫应答的方法。该方法包括，例如，给哺乳动物施用组合物，该组合物包含：(a) 经修饰的细菌多糖，例如，经修饰的 B 组链球菌 (GBS) V 型多糖；和，任选地，(b) 与该多糖物理结合的（例如，共价结合的）部分；从而在哺乳动物中引发免疫应答。

可通过在从多糖去除侧链-末端唾液酸残基的条件下进行处理来修饰多糖，例如去唾液酸化的 GBS V 型多糖。可通过在从多糖的主链除去三糖侧链的条件下进行处理来修饰多糖。可通过顺序地去唾液酸化、去乙酰化和脱氨作用来修饰多糖。在一个实施方案中，所述多糖是脱氨 GBS V 型多糖。

与经修饰的 GBS 多糖结合的部分可以是多肽，例如，细菌多肽，例如细胞表面或分泌的细菌多肽。在各种实施方案中，所述多肽是 GBS 多肽，例如，细胞表面或分泌的 GBS 多肽。在各种实施方案中，GBS 多肽选自 GBS C 蛋白 α 多肽、GBS C 蛋白 β 多肽、 ϵ 多肽、R 蛋白、 α 样蛋白、b 组链球菌 1 的表面蛋白 1 (spb1)、spb2、层粘连蛋白结合蛋白 (Lmb)、C5a 肽酶、基质粘附 (Ema) 多肽及其抗原片段和变体。GBS 多肽可以是 GBS Ia、Ib、II、III、IV、VI、VII 或 VIII 型的多肽。

在一个实施方案中，所述多肽是细菌毒素或类毒素，例如破伤风类毒素、白喉类毒素、白喉突变蛋白交叉反应性物质 (CRM197) 或其抗原片段。

所述组合物可包含超过一种类型的载体部分。例如，经修饰的多糖可连接至 2、3、4 或 5 种不同的多肽，例如，2 种或更多种细菌多肽，例如细菌类毒素和 GBS C 蛋白 α 。

所述组合物的多糖组分可以是至少 1 千道尔顿 (kD)、5 kD、10 kD、15 kD、20 kD、25 kD 或 50 kD。

在一个实施方案中，所述组合物还可包含可药用载体。在一个实施方案中，所述组合物还包含佐剂，例如明矾。

组合物还可包含第二多糖,例如另一种 GBS 血清型的多糖或非 GBS 细菌的多糖,例如,除了经修饰的 GBS V 型多糖外的 GBS Ia、Ib、II、III、IV、VI、VII 或 VIII 型多糖中的一种或多种多糖。

可给受试者施用组合物 1 次或 2 次或更多次。在一个实施方案中,给哺乳动物施用包含 0.1 至 500 μ g 例如 25 至 100 μ g 的多糖的量的组合物。

该方法可在哺乳动物中引发抗体反应,例如哺乳动物中的增强的抗体反应,例如 IgG 抗体反应,例如 IgM 抗体反应。在一个实施方案中,所述方法在哺乳动物中引发保护性反应。该方法还可包括在哺乳动物中评估对 GBS 细菌的免疫应答(例如,评估体液免疫应答和/或细胞介导的免疫应答)。

在一个实施方案中,哺乳动物处于 GBS 细菌感染风险中,例如,所述哺乳动物具有免疫妥协(immunocompromised)或处于变成免疫缺损的风险中,或为老年。

在一个实施方案,哺乳动物是灵长类动物,例如人或猴子。在一个实施方案中,给超过 10、20、30、40、50、60、65、70、75 或 80 岁的人施用组合物。

在一个实施方案中,所述哺乳动物是孕妇。

在另一个方面,本发明描述了给新生儿提供抗体的方法。该方法可包括,例如,给孕妇施用抗原组合物,所述组合物包含:(a) 经修饰的 B 组链球菌(GBS) V 型多糖;和,任选地,(b) 与该多糖物理结合的部分。所述组合物可以是此处描述的组合物。

在另一个方面,本发明描述了制备免疫原组合物的方法。该方法包括,例如,提供纯化的 GBS V 多糖;和在修饰多糖的结构条件下处理该多糖。在一个实施方案中,在除去多糖侧链的一个或多个残基的条件下修饰该多糖,例如,在除去多糖的侧链-末端唾液酸残基的条件下修饰该多糖,或在除去多糖的三糖侧链的条件下修饰该多糖。

本发明也表征了包含通过方法获得的抗血清的组合物,所述方法包括提供纯化的 GBS V 多糖;和在修饰多糖的结构条件下处理该多

糖。在一个实施方案中，在除去多糖的侧链的一个或多个残基的条件下修饰该多糖，例如在除去多糖的侧链-末端唾液酸残基的条件下修饰该多糖，或在除去多糖的三糖侧链的条件下修饰该多糖。

可制备通过此处描述的方法制备的抗体并将其给受试者例如处于GBS感染的风险中或暴露于GBS的受试者施用。在一个实施方案中，给一个或多个哺乳动物（例如，人）施用组合物，该组合物包含（a）经修饰的细菌多糖，例如经修饰的B组链球菌（GBS）V型多糖；和（b）与所述多糖物理结合的（例如，共价结合的）部分。从受试者分离包含抗体（例如，抗血清）的样品。可将多个样品混合。以例如足以在受试者中减轻由GBS导致的感染症状或感染程度的量给第二哺乳动物（例如，人）施用所述抗血清。

“经修饰的细菌多糖”是指经修饰从而具有与该多糖的天然形式（即，在细菌中发现的该多糖的天然形式）不同的结构的细菌多糖。

“纯化的”是指基本上和与该多糖天然地结合的各种蛋白和脂质组分分离的多糖物质。纯化的寡糖中的残留的外来组分不干扰所述纯化物质作为抗原的用途。术语“纯化的”不排除保留其合成的人为产物的合成的寡糖制剂；其也不排除包含一些杂质的制剂，只要所述制剂展示可重复的数据，例如，分子量、糖残基含量、糖键、层析术反应和免疫原行为。

如此处所用的，“可药用载体”包括任何和所有生理可相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，所述载体适合用于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮施用（例如，通过注射或输注）。可在保护其免受可使其失活的酸及其他天然化合物的作用的物质中提供所述组合物，即经修饰的GBS V CPS缀合物组合物。

本发明的一个或多个实施方案的详细内容示于下面的附图和描述中。根据描述和附图以及权利要求，本发明的其他特征、目的和有利方面将变得明显。所有引述的专利、专利申请和参考资料（包括参考公共序列数据库条目（entry））对于所有目的都以其全文引用作为参

考。U. S. S. N. 60/623, 907 对于所有目的以其全文引用作为参考。

附图描述

图 1 是 GBS V 型荚膜多糖的七糖重复单位的结构的图形描述。

图 2A 是 GBS V 型荚膜多糖的七糖重复单位的结构的图形描述。

图 2B 是 GBS V 型荚膜多糖的脱氨基形式的结构的图形描述。

图 2C 是 GBS V 型荚膜多糖的去唾液酸形式的结构的图形描述。

图 3 是描述在 (1) 由大约 200 个重复单位的聚合物组成的天然 V 型多糖 (实心三角形); (2) 代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的 V 型寡糖 (OS) 的化学修饰的 V 型多糖 (空心三角形); (3) 全长去唾液酸 V 型 PS (实心圆); (4) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氨 V 型 PS (实心正方形); (5) 无单糖侧链的 V 型 PS (其和 GBS VII 型 PS 的结构相同) (菱形); 和 (6) GBS IV 型 PS (空心圆) 存在的情况下, 用 GBS V 型多糖-破伤风类毒素 (GBS V-TT) 缀合物疫苗免疫的受试者的人血清的 IgG 级分对天然 GBS V 型的结合的抑制的图。

图 4 是描述在 GBS V 型 PS 的各种形式存在的情况下, 用 GBS V 型多糖-破伤风类毒素 (GBS V-TT) 缀合物疫苗免疫的受试者的人血清的 IgM 级分对天然 GBS V 型的结合的抑制的图。

图 5 是描述用人 GBS V 型特异性抗体杀死 GBS V 细菌的条形图。IgG 级分、IgM 级分和全血清的结果分别以黑色、具条纹的和白色的条块显示。对照血清的结果以灰色条块显示。

图 6 是描述在 PGA、V 型和去唾液酸 V 型多糖存在的情况下, GBS V 型细菌被 GBS V-TT-诱导的人抗血清 (IgM 级分, 白色条块; IgG 级分, 灰色条块) 调理吞噬杀伤及其生长的条形图。

图 7 是描述在 (1) 天然的 GBS V 多糖 (实心三角形); (2) 代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的 GBS V 型寡糖 (OS) 的经化学修饰的 V 型多糖 (空心三角形); (3) GBS IV PS (实心圆); (4) 无单糖侧链的 GBS V PS (其和 GBS VII 型 PS 的结构相同) (空心正方形); (5) 去唾液酸 V 型 PS (实心圆); 和 (6) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氨 V 型 PS (实心正方形) 存在的情况下, GBS V-TT 诱导的鼠类单克隆 IgG

对天然 GBS V 的结合的抑制的图。

图 8 是描述猕猴中针对 GBS III-TT 疫苗的 GBS III 特异性 IgM 反应的图表。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。

图 9 是描述猕猴中针对 GBS III-TT 疫苗的 GBS III 特异性 IgA 反应的图表。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。免疫由黑色箭头标示。

图 10 是描述猕猴中针对 GBS III-TT 疫苗的 GBS III 特异性 IgG 反应的图。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。

图 11 是描述猕猴中针对 GBS V-TT 疫苗的 GBS V 特异性 IgM 反应的图。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。

图 12 是描述猕猴中针对 GBS V-TT 疫苗的 GBS V 特异性 IgA 反应的图。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。

图 13 是描述猕猴中针对 GBS V-TT 疫苗的 GBS V 特异性 IgG 反应的图。各线对应于从来自个体猴子的血清获得的值。

图 14 是描述在用 GBS V-TT 糖缀合物疫苗进行第一和第二次免疫后，人(hu)和猕猴(灵长类动物)中同种型转换的 GBS V 特异性抗体的水平的图。

图 15 是描述在用 GBS-TT 糖缀合物疫苗进行第一和第二次免疫后，猕猴中诱导的同种型转换的 GBS III 和 GBS V 特异性抗体的水平的图。

图 16 是描述在(1)由大约 150 个重复单位的聚合物组成的天然 GBS III PS (实心圆); (2)代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的 III 型寡糖(OS)的经化学修饰的 GBS III 型 PS(空心三角形); (3)全长肺炎球菌 14 型 PS (即去唾液酸 III 型 PS, 实心正方形); (4)包含与 III 型的侧链相同的三糖侧链的 GBS Ia PS(空心圆); (5) GBS III-HSA (和包被抗原相同; 实心三角型); 和(6)人血清白蛋白(HSA; 十字形)存在的情况下, 用 GBS III-TT 疫苗免疫的猕猴# 369 92 的 IgG 抗体对天然 GBS III 的结合的抑制的图。

图 17 是描述在(1)由大约 150 个重复单位的聚合物组成的天然 GBS III PS (实心圆); (2)代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的

III 型寡糖 (OS) 的经化学修饰的 GBS III 型 PS (空心三角形); (3) 全长肺炎球菌 14 型 PS (即去唾液酸 III 型 PS, 实心正方形); (4) 包含和 III 型的侧链相同的三糖侧链的 GBS Ia PS (空心圆); (5) GBS III-HSA (和包被抗原相同; 实心三角型); 和 (6) 人血清白蛋白 (HSA; 十字形) 存在的情况下, 用 GBS III-TT 疫苗免疫的猕猴 # 543 91 的 IgG 抗体对天然 GBS III 的结合的抑制的图。

图 18 是描述在 (1) 由大约 200 个重复单位的聚合物组成的、缀合至 HSA 的天然 V 型多糖 (实心黑圆); (2) 未缀合的 GBS V (白色三角形); (3) 去唾液酸 V 型 PS (实心正方形); (4) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氨 V 型 PS (圆); 和 (5) PGA (十字形) 存在的情况下, 猕猴 # 120 92 的 IgG 抗体对 GBS V 的结合的抑制的图。

图 19 是描述在 (1) 天然 V 型多糖 (实心三角形); (2) 去唾液酸 V 型 PS (实心正方形); (3) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氨 V 型 PS (圆); 和 (4) PGA (十字形) 存在的情况下, 猕猴 # 256 89 的 IgG 抗体对 GBS V 的结合的抑制的图。

图 20 是描述 GBS V 细菌被各种浓度的来自猕猴, #245 89 的 IgM 级分和血清和对照血清杀伤的条形图。

图 21 是描述三只用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的猴子中的 GBS V 特异性 IgM 抗体的水平的图。

图 22 是描述三只用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的猴子中的 GBS V 特异性 IgA 抗体的水平的图。

图 23 是描述三只用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的猴子中的 GBS V 特异性 IgG 抗体的水平的图。

图 24 是描述在脱氨 (实心正方形)、去唾液酸 (空心正方形) 和天然 GBS V PS (三角形) 存在的情况下, 来自猕猴 # 259 87 的 GBS V 特异性 IgG 抗体的结合抑制的图。

图 25 是描述在脱氨 (实心正方形)、去唾液酸 (空心正方形) 和天然 GBS V PS (三角形) 存在的情况下, 来自猕猴 # 259 87 的 GBS V 特异性 IgM 抗体的结合抑制的图。

图 26 是 GBS V 细菌被各种浓度的来自猕猴# 393 93 的 IgM 级分、IgG 级分和血清杀死的条形图。

图 27A 是描述在 6 只不同的用每剂 0.625 μ g 的 GBS V-TT 缀合物疫苗免疫的小鼠中诱导的 V 特异性 IgG 的水平的图。显示在免疫前、第 20 天和第 31 天获得的血清的结果。

图 27B 是描述在 6 只不同的用每剂 0.625 μ g 的 GBS V-TT 缀合物疫苗和每剂 0.5mg 的明矾一起免疫的小鼠中诱导的 V 特异性 IgG 的水平的图。显示在免疫前、第 20 天和第 31 天获得的血清的结果。

图 27C 是描述在 6 只不同的用每剂 6.25 μ g 的 GBS V-TT 缀合物疫苗免疫的小鼠中诱导的 V 特异性 IgG 的水平的图。显示在免疫前、第 20 天和第 31 天获得的血清的结果。

图 27D 是描述在 6 只不同的用每剂 6.25 μ g 的 GBS V-TT 缀合物疫苗和每剂 0.5mg 的明矾一起免疫的小鼠中诱导的 V 特异性 IgG 的水平的图。显示在免疫前、第 20 天和第 31 天获得的血清的结果。

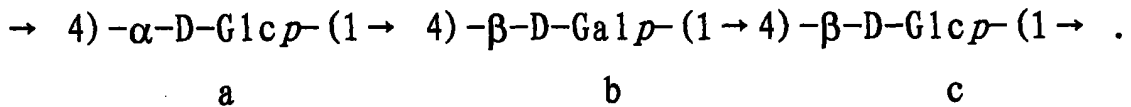
不同附图中的相同参考符表示相同的元素。

详述

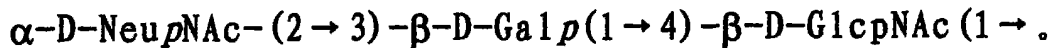
临床研究已显示多糖-蛋白缀合物疫苗在人中是安全的且有免疫原性 (Baker 等人, *J Infect Dis.*, 179:142-150, 1999; Baker 等人, *J Infect Dis.*, 182:1129-1138, 2000; Kasper 等人, *J Clin Invest.*, 98:2308-2314, 1996)。诱导 IgG 抗体的疫苗是优选的, 因为 IgG 抗体是长效的且穿过胎盘, 从而为新生婴儿提供保护。我们已显示细菌多糖的经修饰的形式, 和该多糖的天然形式相比, 引发更有效的 IgG 反应。更特别地, 我们已产生了缺少一个或多个侧链残基的 GBS V PS 的经修饰的形式, 而且我们发现包含这些修饰形式 (例如, 多糖-多肽缀合物) 的组合在灵长类动物中诱导出 GBS V 特异性 IgG 抗体。此处描述的经修饰的多糖组合物特别适用于在人中引发抗体反应。这些组合物可在处于最高感染风险的亚群中 (例如, 老年人中和通过母体传递 IgG 的新生儿中) 提供有益的反应。

GBS V 型多糖及其经修饰的形式。 GBS 荚膜多糖是包含半乳糖、

葡萄糖、N 乙酰葡萄糖胺和唾液酸残基的重复单位的高分子量聚合物。天然 GBS V 型 CPS 的重复单位是包含具有两个不同侧链的三糖主链的七糖，如图 1 和图 2A 中通过图解描述的（参见 Wessels 等人，*J Biol Chem.*, 266(11):6714-9, 1991）。GBS V CPS 的三糖主链具有下列结构：



(Glcp 是吡喃葡萄糖基，Galp 是吡喃半乳糖基。具有下列结构的三糖分枝通过后者的 O-6 连接至标有“a”的 D-Glcp：



D-Glcp 残基通过后者的 O-3 连接至标记有“b”的 D-Galp。

V 型多糖的分离。可使用已知的方法从 GBS V 型细菌培养物制备 GBS V 型 CPS。例如，为分离 CPS，将 GBS V 型菌株（例如，CJB111）以连续培养的方式生长在化学成分确定的培养基中。通过离心收获细胞并通过基质提取或用内-N-乙酰胞壁质酶变溶菌素处理取出 CPS。在 Deng 等人（*J. Biol. Chem.*, 275(11):7497-7504, 2000）中描述了使用变溶菌素的 CPS 的纯化。用 RNA 酶 A、DNA 酶 I、RNA 酶 T1 和链霉蛋白酶处理提取物。通过大小排阻层析和离子交换层析分离包含 CPS 的级分。可如描述的用于 GBS III CPS 的制备的方法（参见，例如，Wessels 等人，*J Clin Invest.*, 86:1428-1433, 1990）一样进行用于纯化的 GBS V CPS 的制备的方法。

经修饰的 V 型多糖的产生。可通过本领域已知的技术修饰 GBS 多糖。例如，可通过在略微酸性的条件下（例如，在 80° C 下在 0.1M 硫酸中进行 60 分钟）处理纯化的 V 型 CPS 或通过用神经氨酸酶处理来制备去唾液酸 GBS V 型 CPS。通过层析纯化所述混合物。可这样来制备脱氨 GBS V 型 CPS，即首先用碱处理去唾液酸 V 型 CPS 以使 CPS 脱乙酰基（例如，2M NaOH 和四氢化硼钠，加热至 100° C 进行 5 小时，然后用醋酸进行中和并冻干）。然后使脱乙酰基的 CPS 脱氨（例如，通过溶解在水中和醋酸水溶液中，然后用亚硝酸钠水溶液在室温下处理 1.5 小时，且通过离子

交换层析进行纯化；参见 Wessels 等人，*J Biol Chem.*, 266(11):6714-9, 1991)。

在各种实施方案中，通过在细菌中产生多糖来制备经修饰的多糖，在所述细菌中，已对编码修饰多糖的酶的核酸序列进行了基因操作(例如，已删除编码所述酶的基因、使其丧失功能，或插入或过表达所述基因)。GBS V的编码修饰多糖的酶的基因描述于，例如Tettelin等人，*Proc Natl Acad Sci USA*, 99(19):12391-6, 2002中。

可将GBS V缀合物与包含其他多糖(例如，GBS I、II、III或IV型)的一种或多种缀合物混合以提供用于免疫的多价组合物。可选择地，可通过在单一反应中缀合多种类型的多糖来产生用于免疫的多价多糖组合物。

经修饰的V型多糖的缀合。可使用本领域已知的方法将经修饰的GBS多糖缀合至载体部分。例如，可通过用高碘酸(或相关试剂，例如仲高碘酸或高碘酸钾)处理来氧化多糖，从而在具有邻位二羟基的位置上留下醛末端。可将经处理的多糖和载体部分在通过例如使用连接剂或通过直接偶联至所述部分来缀合组分的条件下进行反应。可通过例如还原胺化作用进行对多肽部分的缀合(参见，例如，Schwartz和Gray, *Arch. Biochem. Biophys.* 181: 542-549, 1977)。简而言之，在氰基硼氢化物离子或另一种还原剂存在的情况下使氧化的CPS和多肽部分反应，所述另一种还原剂既不还原目标物质的还原末端也不负面地影响多肽或荚膜多糖。用于缀合多糖的方法也描述于例如Wessels等人，*J Clin Invest.*, 86:1428-1433, 1990和Wang等人，*Vaccine*, 21(11-12):1112-7, 2003中。

合适的载体部分对于给哺乳动物(例如，年幼的哺乳动物)的施用是安全的且在免疫上是有效的(例如，其促进针对多糖的T细胞依赖性抗体反应)。示例性载体部分是白喉和破伤风类毒素。

一般地，任何化合物可用作载体部分。细菌毒素例如破伤风和白喉毒素结合至哺乳动物细胞表面，从而允许其缀合的多糖更有效地启动免疫应答。另一个示例性载体多肽CRM197是和天然白喉毒素相比包

含单个氨基酸改变的白喉毒素且其在免疫上与天然的白喉毒素无区别。产生 CRM197 的棒状杆菌白喉菌株 C7 (β 197) 的培养物可从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Rockville, Md., 在保藏号 ATCC 53281 下获得的。

其他细菌多肽可用作载体部分。在各种实施方案中, 使用分泌的或表面表达的细菌多肽 (例如, 链球菌例如 GBS 细菌的分泌的或表面表达的多肽)。例如, 可将经修饰的 GBS V 多糖缀合至 GBS C 蛋白 α 多肽或其抗原片段。GBS C 蛋白 α 是包含达到 9 个串联重复的 82 个氨基酸单位的表面结合多肽 (Michel 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10060-10064, 1992)。细菌 C 蛋白 α 多肽和使用其进行免疫接种的方法描述于美国专利 5,968,521、5,908,629、5,858,362、5,847,081、5,843,461、5,843,444、5,820,860 和 5,648,241 中。抗原片段可包含一个或多个串联重复的 82 个氨基酸的单位。GBS C 蛋白 β 或 ϵ 多肽 (或其抗原片段) 可缀合至经修饰的 GBS V 多糖。GBS C 蛋白 β 、C 蛋白 ϵ 、R 蛋白 (也称作 Rib 和 R4)、 α 样蛋白 (Alps)、B 组链球菌 1 的表面蛋白 (spb1)、spb2 和 Lmb (层粘连蛋白结合蛋白) 也可用作载体蛋白 (Heden 等人, *Eur J Immunol.*, 21(6):1481-90, 1991; Michel 等人, *Infect Immun.*, 1991 Jun; 59(6):2023-8; Larsson 等人, *Infect Immun.*, 64(9):3518-23, 1996; Wastfelt 等人, *J Biol Chem.*, 271(31):18892-7, 1996; Ferrieri, P., *Rev. Infect. Dis.*, 10(Suppl. 2):S363-S366, 1988; Kong 等人, *J. Clin. Microbiol.*, 40:620-626, 2002; Lachenauer 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:9630-9635, 2000; Spellerberg 等人, *Infect Immun.*, 67(2):871-8, 1999; Adderson 等人, *Infect Immun.*, 71(12):6857-63, 2003)。细菌 C5a 肽酶或其抗原片段 (例如, 链球菌 C5a 肽酶, 例如, 如美国专利 6,355,255 中所描述的) 也可用于与此处描述的经修饰的多糖缀合。链球菌基质粘附 (Ema) 多肽或其抗原片段 (美国专利公开号 20040071729 中描述的) 也可用于与多糖缀合。GBS 多糖可缀合至多个多肽。例如, 经修饰的 GBS 多糖可缀合至 2、3、4 或 5 个不同的

细菌多肽。

可用佐剂配制多糖组合物。佐剂可增强哺乳动物对多糖的免疫应答，例如增加抗体的产生和/或用更低剂量的多糖诱导免疫反应。佐剂包括：水乳液（例如，完全和不完全弗氏佐剂）、油、氧化铁、海藻酸钠、氢氧化铝、铝盐和钙盐（即，明矾）、未甲基化的 CpG 基序、葡聚糖、硫酸葡聚糖、细菌提取物（例如，分枝杆菌（mycobacterial）提取物）、QS-21（Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.）、MPL™（3-O-脱酰单磷酸脂质 A；Corixa, Hamilton, Mont.）；529（氨基烷基葡糖胺磷酸化合物，Corixa, Hamilton, Mont.）、N-乙酰基-胞壁酰基-L-tyrosine-基-D-异谷氨酰胺（thr-MDP）、N-乙酰基-正-胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺（CGP 11637，称作正-MDP）和 N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸基氧-乙胺）（CGP 19835A，称作 MTP-PE）。多肽佐剂例如 IL-12（Genetics Institute, Cambridge, Mass.）和 GM-CSF（Immunex Corp., Seattle, Wash.）也可用于增强对多糖组合物的免疫应答。

多糖组合物的施用。可将经修饰的多糖和多糖缀合物配制在合适的载体中以给受试者施用（例如，悬浮在 pH 6 的磷酸钠缓冲盐溶液中的 0.125M 磷酸铝凝胶的磷酸钠缓冲盐溶液（pH 7.4）或另一种常规介质）。合适的药物载体在本领域内是已知的。

用于给受试者施用的组合物可包含大约 0.1 至大约 500 μ g 例如大约 10 至 50 μ g 的多糖组合物，且其可在哺乳动物中诱导出有效的抗荚膜多糖抗体的水平。可通过常规的剂量/反应实验确定确切的剂量。

可以一次免疫的方式或以系列，例如在 1 个月、2 个月、3 个月或更长的间隔中以 2、3 或 4 次剂量的方式施用多糖缀合物组合物。可在初次免疫或初期系列免疫后 1 年、2 年或更多年提供加强免疫。孕妇的示例性免疫接种程序表是在中期妊娠或早晚期妊娠提供的一次剂量。对于非妊娠的成人的免疫接种，可使用一次剂量。成人中随后的加强剂量的需要可基于多糖组合物的免疫原性和疫苗在引发免疫应答

中的功效的持续监测。

实施例

实施例 1. 人血清中的 GBS V 特异性抗体的表征

针对 Ia 型、Ib 型和 III 型 B 组链球菌 (GBS) 的未缀合的多糖疫苗或糖缀合物疫苗在人中主要诱导 IgG 抗体。相反地, V 型 GBS 主要诱导 IgM 和 IgA 抗体。IgM 和 IgA 同种型都不能穿过胎盘来保护新生儿抵抗侵入性疾病。

诱导强 IgG 反应的 Ia、Ib 和 III 型 GBS 多糖是重复单位的聚合物, 所述重复单位在主链上具有二糖或三糖, 且三糖侧链在侧链的末端具有唾液酸残基。诱导低水平 IgG 抗体的 V 型多糖是包含具有 2 个侧链的三糖主链的重复单位的聚合物, 所述侧链其中之一是直接连接至主链的葡萄糖残基, 另一个是三糖侧链, 该侧链的末端残基是唾液酸。

制备经化学修饰的 V 型多糖以检查表位呈递和确定在人中诱导 IgG 反应的最佳表位。使用竞争性酶联免疫吸附测定法 (竞争 ELISA) 确定来自 5 个人志愿者 (在 GBS V PS 的各种修饰形式存在的情况下用 GBS V-破伤风类毒素缀合物 (GBS V-TT) 免疫的人) 的混合血清的 IgG 级分中的抗体对 GBS V PS 的反应性。在这些测定中, 经修饰的 GBS V PS 被称为“抑制剂”, 即, 对天然 GBS V PS 的结合的抑制剂。

为检测 GBS PS 特异性抗体, 使抗血清的 IgG 级分在不同量的溶液中的游离多糖存在的情况下结合包被在塑料 96 孔板 (ELISA 板) 上的天然 GBS V PS-HSA。在这些和下列实施例中报导的所有 ELISA 实验中, 用作包被抗原的天然多糖是缀合至 HSA 的形式。可使用除了 ELISA 外的方法检测 PS 特异性抗体, 例如, 用于评估抗体-抗原相互作用 (在溶液中或在固相上) 的其他本领域承认的方法。

IgG 级分对天然 GBS V PS-HSA 的结合结果显示于图 3。按对数标度上沿着 X 轴描述以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 表示的抑制剂的浓度, 按线性标度沿着 Y 轴描述抗体对结合至 ELISA 板的 PS 的结合的百分比抑制率。针对抑制作用进行检测的多糖是: (1) 由大约 200 个重复单位的聚合物组成的天

然 V 型多糖 (实心三角形)、(2) 代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的 V 型寡糖 (OS) 的经化学修饰的 V 型多糖 (空心三角形)、(3) 全长去唾液酸 GBS V PS (实心圆)、(4) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氨 GBS V PS (实心正方形)、(5) 无单糖侧链的 GBS V PS (其与 GBS VII PS 的结构相同) (菱形); 和 (6) GBS IV PS (空心圆)。

如由这些经化学修饰的多糖的交叠抑制曲线所显示的, 所有疫苗诱导的抗体都识别脱氨 (实心正方形) 和去唾液酸 V 型 PS (实心圆)。如所预期的, 抗体对天然 V 型 PS 的结合被天然 V 型 PS 抑制 (实心三角形)。缺少单糖侧链的经修饰的 V 型 PS (菱形) 不抑制结合。因此, 该侧链对于抗体的优势表位是至关重要的。这些数据也显示优势表位依赖于 V 型聚合物的大小, 因为更长的天然 V 型 PS (204 kDa, 实心三角形) 是比天然 V 型 PS 的较短形式 (7.8 kDa, 空心三角形) 好得多的抑制剂。

各多糖的 IC_{50} 示于表 1 中。

表 1. 多糖对于人 V-TT 诱导的 V 特异性 IgG 级分抗血清的 IC_{50}

抑制剂	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
V 型 PS	0.3
VII 型 PS	无抑制
IV 型 PS	>270
去唾液酸 V 型 V PS	0.14
脱氨 V 型 V PS	0.09

在针对 GBS V 的人混合血清中对于疫苗诱导的 GBS V 特异性抗体的 IgM 级分观察到相似由 GBS 多糖产生的抑制模式, 其中去唾液酸、脱氨和更长的天然 V 型 PS (204 kDa) 比较短的 V 型 PS (7.8 kDa) 和 IV 型 PS 更有效地抑制结合 (图 4)。因此, 单糖侧链也是被 IgM 抗体识别的优势表位。各多糖的 IC_{50} 示于表 2。对于来自目前为止总共 10 个受试志愿者的疫苗诱导的人血清的 IgG 和 IgM 级分, 获得相似的结果。

表 2. 多糖对于人 V-TT 诱导的 V 特异性 IgM 级分抗血清的 IC₅₀

抑制剂	IC ₅₀ (μg/ml)
V 型 PS	0.13
VII 型 PS	未确定
IV 型 PS	190
去唾液酸 V 型 V PS	0.013
脱氨基 V 型 PS	0.005

实施例 2. V 型特异性抗体的功能

接下来，检查由 GBS V-TT 糖缀合物诱导的抗体的功能。在人中，使用称为抗体依赖性补体介导的调理吞噬杀伤的方法清除 GBS。在基于 PS 的疫苗的情况下，PS 特异性疫苗诱导的抗体识别 GBS 细菌的荚膜多糖上的表位或结合位点。抗体结合导致补体激活和导致激活的补体组分沉积在细菌上。接受调理素作用的细菌上的抗体和补体组分被专职吞噬细菌通过例如 Fc 受体和补体受体识别，且在称为调理吞噬的过程中被吸收。被吞噬细胞例如多形核白细胞 (PMNL) 吞噬的 GBS 通过各种机制例如氧化爆发 (oxidative burst) 被杀死。图 5 显示来自体外测定的数据，该测定测量抗体在补体存在的条件下促进由 PMNL 进行的调理吞噬杀伤的能力。在该测定中，将抗体、补体、细菌和 PMNL 在体温下温育。温育 60 分钟后将对细菌的杀伤记录为反应混合物中活细菌的损失。GBS V 特异性抗体能够介导 GBS 细菌的杀伤。如图 5 中所示，标准人混合血清对照的 IgG 抗体级分 (黑色条块) 和 IgM 抗体级分 (具有条纹的条块) 促进 GBS 的杀伤。在该反应混合物中杀死超过 90% 的细菌需要 3 μg/ml 浓度的 GBS V 型特异性 IgG，而 0.1 μg/ml 的 V 型特异性 IgM 促进杀伤超过 90% 的细菌。因此 IgM 级分在促进细菌的杀伤中更有效。在各测定中将被免疫的人的全血清 (白色条块) 和未免疫的人血清 (灰色条块) 用作对照。

然后，就在 V 型 PS、去唾液酸 V 型 PS 和不相关的多糖，聚半乳糖醛酸 (PGA) 存在的情况下的杀伤作用检测人 GBS V-TT 诱导的抗体的 IgG 级分和 IgM 级分。在产生大约 90% 的活细菌减少 (1 对数灭杀) 的

浓度上检测抗体。将 GBS V 的菌株 CJB 111 用于该实验。如图 6 中所示,反应混合物中的去唾液酸 V 型和天然 V 型 PS 在 V 特异性 IgM 抗体 (白色条块) 和 V 特异性 IgG 抗体 (灰色条块) 存在的情况下完全消除了 PMNL 对 GBS 的杀伤, 这通过细菌的生长 (延伸至 X 轴上的 0.00 的左边的条块) 和杀伤的缺乏 (延伸至 X 轴上的 0.00 的右边的条块) 得到证明。PGA 对疫苗诱导的 V 特异性 IgM 和 V 特异性 IgG 抗体的调理吞噬的刺激没有任何作用。

实施例 3. 鼠类 GBS V 特异性抗体的表征

表征来自用 GBS III-TT 和 GBS V-TT 糖缀合物疫苗免疫的小鼠的血清。发现一次剂量的 GBS III-TT 和 GBS V-TT 糖缀合物疫苗都诱导 IgM 抗体和低水平 PS 特异性 IgG 抗体 (数据未显示)。使用任一种糖缀合物疫苗进行的重复免疫导致向 PS 特异性抗体的 IgG 的同种型转换的相当的增加。在第 2 和第 3 次免疫后 GBS V 特异性反应更加快速和更加强烈, 表明诱导了对抗原的免疫记忆 (数据未显示)。

在实施例 1 中描述的竞争 ELISA 测定法中检测 GBS V 特异性鼠类单克隆抗体。与人 IgG 相反, 鼠类 IgG 识别天然荚膜多糖但不识别去唾液酸多糖 (图 7)。图 7 中的图表显示, 与天然的多糖相比, 去唾液酸 GBS V PS 对鼠类 GBS V 诱导的 IgG 的结合要弱得多。在人中是优势表位的脱氨 GBS V PS 根本不被鼠类抗体识别。计算各多糖的 IC_{50} 并示于表 3 中。对于受试的所有鼠类的单克隆和多克隆血清已获得相似的结果。

表 3. 多糖对于鼠类 V-TT 诱导的 V 特异性 IgG 级分抗血清的 IC_{50}

抑制剂	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
V 型 PS	0.04
VII 型 PS	>810
IV 型 PS	不抑制
去唾液酸 V 型 V PS	0.7
脱氨 V 型 V PS	>10

这些数据显示，小鼠对 GBS III 型和 V 型的免疫应答与人对同种型转换、优势 B 细胞表位和功能性表位的免疫应答不同。

实施例 4. 猕猴中 GBS III 型多糖特异性反应

用 GBS III 型-TT (50 μ g PS, 肌肉注射) 免疫接种一组三只年轻非妊娠雌性猕猴 (猕猴 *Macaca mulatta*) 两次, 免疫接种之间间隔 8 周。在免疫接种前和免疫接种后每周获取血清以评估疫苗诱导的 PS 特异性抗体和载体特异性 (即, 破伤风类毒素特异性) 抗体的水平、同种型和功能。猕猴对所述疫苗的耐受良好。

检查对 III 型 PS 的 IgM、IgA 和 IgG 抗体反应。图 8 描述了在三只猕猴中在用 GBS III-TT 糖缀合物疫苗免疫前和两次免疫后的 GBS III 特异性 IgM 反应, 各线表示来自个体猴子的抗体的水平。在 X 轴上显示第一次免疫接种后以周表示的时间, 在 Y 轴上显示以 μ g/ml 表示的 III 型特异性 IgM 抗体的水平。用黑色箭头标示免疫。

在第一次免疫前用 GBS III-TT 免疫的三只猴子中有两只不具有预先存在的针对 GBS III 的抗体。在这两只猴子中, 在第一次免疫接种后两周检测出 GBS III 特异性 IgM 抗体。两周后 GBS III 特异性 IgM 的水平达到最高, 第二剂 GBS III-TT 疫苗没有免疫加强效应。

三只猴子中的一只 (猴子 # 369 92, 最上面的线) 在免疫接种前具有预先存在的针对所述多糖疫苗抗原的 IgM 抗体。然而, 这些抗体对于 GBS III PS 抗原不是特异性的, 因为向反应混合物中加入大量过量的纯化的 GBS III PS 不影响所述抗体对 ELISA 板的结合。由于高水平的预先存在的与 GBS III PS 交叉反应的天然抗体的原因, 我们在进一步分析中不考略接种后获得的值。

针对 GBS III PS 的 IgA 反应显示于图 9 中。三只猴子中的两只显示了低水平的针对 III 型 PS 的 IgA 同种型转换的抗体。第三只猴 (猴子 # 369 92, 其具有非特异性 GBS III 反应性 IgM 抗体) 没有表现任何对 GBS III 特异性 IgA 抗体的同种型转换。

各猴子的 IgG 抗体反应显示于图 10 中。三只动物中的两只在第一

剂 GBS III-TT 缀合物疫苗接种后作出反应，产生明显的对 GBS III PS 特异性 IgG 的同种型转换。此外，通过用 GBS III-TT 糖缀合物疫苗进行的第二次或“加强”免疫唤起的疫苗致敏的 GBS III 特异性免疫记忆导致 (1) 加速的抗体反应和 (2) GBS III 特异性 IgG 抗体水平的显著增加。

总之，这些数据显示猕猴中对 GBS III-TT 缀合物疫苗的抗体反应包括对 IgG 的显著的同种型转换，其类似于在人中观察到的同种型转换。

实施例 5. 猕猴中 GBS V 多糖特异性反应

用 GBS V-TT (50 μ g PS, 肌内注射) 免疫三只年轻的非妊娠雌性猕猴二次，免疫之间间隔 8 周。在免疫前和免疫后每周获取血清以评估疫苗诱导的 PS 特异性抗体和载体特异性 (即，破伤风类毒素特异性) 抗体的水平、同种型和功能。猕猴对 GBS V-TT 疫苗耐受良好。

将三只猕猴中用 GBS V-TT 糖缀合物疫苗免疫前和两次免疫后的 V 型特异性 IgM 抗体反应绘制于图 11 中。各线表示个体猴子中的反应。用 GBS V-TT 糖缀合物疫苗免疫的三只猴子中没有一只在免疫接种前具有预先存在的针对 GBS V PS 的 IgM 抗体。所有三只动物在第一剂 GBS V-TT 疫苗后具有明显的 GBS V IgM 反应，在免疫接种后第 2 至 3 周展现最高水平。在用 GBS V-TT 第二次免疫后，在三只猴子中的一只中引发 V 型特异性 IgM 水平的进一步增加，V 型特异性 IgM 的最高水平达到 95 μ g/ml。

三只猴中的一只在初次免疫后在其血清中具有低水平的针对 GBS V 的 IgA 同种型转换的抗体 (图 12)。在第二次免疫后在所有猴子中观察到低水平的 GBS V 转换的 IgA 抗体。

用 GBS V-TT 免疫的三只猴子中没有一只在免疫前具有针对 V 型 PS 的预先存在的 IgG 抗体。在第一次免疫后，IgG 转换的 PS 特异性抗体水平非常低，但在用 GBS V-TT 第二次接种后观察到显著的 IgG 反应 (图 13)。这些数据显示猕猴中对 GBS V-TT 糖缀合物疫苗的同种

型反应模式（具有（1）显著的 IgM 反应和（2）响应一剂 GBS V-TT 的最低限度的 IgG 转换）和人中观察到的反应相似。

比较在用 GBS V-TT 糖缀合物疫苗初次免疫和二次免疫后人（hu）和猕猴（灵长类动物）中同种型转换的 GBS V 特异性抗体的水平（图 14）。在人和非人灵长类动物中一剂 GBS V-TT 糖缀合物疫苗诱导非常低水平的对 IgG 的同种型转换。人和灵长类动物中 V 型特异性 IgG 转换的抗体的中位百分比分别为 5% 和 12%。第二剂 GBS V-TT 在人和非人灵长类动物中刺激更高水平的对 IgG 的同种型转换。然而，即使在加强接种后，在两种物种中主要的 V 特异性抗体仍然是 IgM 同种型。

比较猕猴中由 III 型-TT 和 V 型-TT 疫苗诱导的同种型转换的抗体的水平（图 15），结果显示对于两种不同的 GBS 糖缀合物疫苗在 PS 特异性抗体的同种型转换中存在显著的差异。GBS V-TT 疫苗在猕猴中诱导低水平的对 IgG 的同种型转换，而 GBS III 型-TT 疫苗诱导显著的对 IgG 的同种型转换。

实施例 6. 猕猴中 GBS III 型诱导的 IgG 抗体的特异性

通过竞争 ELISA 检查猕猴中被 GBS III-TT 疫苗诱导的抗体识别的 B 细胞表位。使来自一只用 GBS III-TT 免疫的猴子的疫苗诱导的抗体的 IgG 级分在不同量的溶液中的游离多糖或蛋白存在的情况下与包被在塑料 96 孔板上的天然 GBS III CPS 结合。将结合的结果绘制于图 16 中。以对数标度沿 X 轴显示抑制剂的量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)。以线性标度沿 Y 轴显示抗体对结合至 ELISA 板的多糖的结合的百分比抑制率。用于抑制试验的受试多糖是：(1) 由大约 150 个重复单位的聚合物组成的天然 GBS III PS (实心圆)；(2) 代表通过 PS 的臭氧处理获得的尺寸减小的 III 型寡糖 (OS) 的经化学修饰的 GBS III PS (空心三角形)；(3) 全长肺炎球菌 14 型 PS (即去唾液酸 III 型 PS, 实心正方形)；(4) 包含和 III 型的侧链相同的三糖侧链的 GBS Ia PS (空心圆)；(5) GBS III-HSA (与包被抗原相同；实心三角形)；和 (6) 人血清白蛋白 (HSA；十字形)。

将来自猴子# 369 92 的血清的抑制结果绘制于图 16 中, 且所述结果代表所有三只猴子。图 16 显示所有疫苗诱导的抗体识别天然的 III PS (实心圆和实心三角形), 然而只有抗体的亚群识别去唾液酸 III 型 PS (Pn14, 实心正方形)。此外, 优势表位依赖于 III 型聚合物的大小, 因为天然 GBS III PS (实心圆) 是远好于较短的形式 (III 型 OS, 空心三角形) 的抑制剂。

如其在人血清中那样, 识别去唾液酸 III 型 (即 Pn 14, 实心正方形) 的 III 型诱导的抗体群体在猴子血清中是变化的。在人中, 大约 50% 的疫苗具有只识别天然 III 型 PS 的疫苗诱导的抗体, 而 50% 具有也识别 III 型 PS 的去唾液酸形式的抗体 (由未缀合至或缀合至破伤风类毒素的 GBS III PS 诱导的)。在人中, 抗体的亚群识别 Pn14, 或总抗体群体是交叉反应性的。这对于猴子也是如此。猴子中的一只不具有可检测的 Pn14-交叉反应性抗体 (数据未显示), 一只具有识别 Pn14 的亚群 (猴子# 369 92, 图 16), 在猴子# 543 91 中, 所有疫苗诱导的抗体也和 Pn14 交叉反应 (图 17)。

在所有三只猴子中, III 型诱导的抗体的 IgM 级分具有和 IgG 级分相同的特异性 (数据未显示)。

总之, 猕猴中观察到的对于 III 型疫苗诱导的抗体的 B 细胞表位模式与人疫苗中观察到的表位模式相同。

实施例 7. 猕猴中 GBS V 型诱导的 IgG 抗体的特异性。

通过竞争 ELISA 检查非人灵长类动物中被 GBS V 型-TT 糖缀合物疫苗诱导的抗体识别的 B 细胞表位。使来自一只用 GBS V-TT 免疫的猕猴的疫苗诱导的抗体的 IgG 级分在不同量的溶液中的游离多糖存在的情况下与包被在塑料 96 孔板上的天然 GBS V 型多糖结合。将结果绘制于图 18 中, 以对数标度沿 X 轴显示以 $\mu\text{g}/\text{m}$ 表示的抑制剂的量, 以线性标度沿 Y 轴显示抗体对结合至 ELISA 板的 PS 的结合的百分比抑制率。

用于抑制检测的受试多糖是; (1) 由大约 200 个重复单位的聚合

物组成的缀合至 HSA 的天然 V 型多糖(实心黑色三角形); (2) 未缀合的 GBS V (白色三角形); (3) 去唾液酸 V 型 PS (实心正方形); 和 (4) 包含具有单糖侧链的 V 型主链的脱氧 V 型 PS (圆); 和 (5) PGA (十字形)。

如由这些经化学修饰的多糖和天然 V 型 PS (三角形) 的交叠抑制曲线(图 18) 所显示的, 所有疫苗诱导的抗体都识别脱氧(圆) 和去唾液酸 V 型 PS (正方形)。

因此, GBS V 型 PS 的主链在猕猴和人是优势表位。

猕猴中对于 GBS V-TT 疫苗诱导的抗体的优势 B 细胞表位是多糖的主链。包含三糖唾液酸的侧链不是该表位的部分 来自猕猴# 256 89 的竞争抑制 ELISA 的结果显示于图 19 中。对于该个体猴子, 抗体对脱氧 V 型 PS 的结合显著地优于对天然 PS 的结合。

对于所有三只猴子 GBS V 型诱导的抗体的 IgM 级分具有与 IgG 级分相同的特异性 (数据未显示)。

实施例 8. 猕猴中 V 型特异性抗体的功能

如实施例 2 中所描述的就调理吞噬杀伤能力检测通过用 GBS V-TT 疫苗接种猕猴诱导的抗体。GBS V 特异性抗体能够介导 GBS 细菌的杀伤(图 20)。来自猕猴# 256 89 的血清的 IgG 抗体级分(灰色条块) 和 IgM 抗体级分(具有条纹的条块) 都促进 GBS V 细菌的杀伤。我们发现 1 μ g/ml 的 GBS V 特异性 IgG 和 0.1 μ g/ml 的 GBS V 特异性 IgM 促进超过 90% 的存在于反应混合物中的细菌的杀伤。因此 IgM 级分在促进细菌的杀伤中更有效。白色和有斑点的条块是各测定中用作实验的质量控制的部分的对照。在来自猕猴# 256 89 的血清存在的情况下 B 组链球菌的调理吞噬杀伤的数据代表所有三只猴子中诱导的抗体。

总之, 在人和猕猴中获得的结果显示 V 型多糖的三糖侧链不被免疫系统识别。具有唾液酸的侧链可能“掩盖”人和非人灵长类动物中的 V 型多糖的可识别的优势免疫表位。我们假设提供优势免疫表位可能改善免疫系统的刺激, 且允许更好的同种型转换至保护性 PS 特异性

IgG 抗体。我们设计新的实验 GBS V 疫苗，其中将化学修饰的去唾液酸 GBS V PS 缀合至蛋白载体，然后我们检查这是否允许保护性表位（例如，包含直接结合至主链的葡萄糖残基的 V 型重复单位的主链）的更好的识别，从而允许向保护性 V 特异性 IgG 的同种型转换。

实施例 9. 使用修饰的 V 型多糖-蛋白缀合物进行的猕猴的接种。

使纯化的 GBS V PS 去唾液酸化和氧化以产生用于通过还原胺化作用缀合至单体 TT 的反应性醛基。去唾液酸 V-TT 疫苗在小鼠中是无毒的且具有免疫原性。然后，在非人灵长类动物中检测所述疫苗的免疫原性。用去唾液酸 V-TT 疫苗注射三只猕猴两次，其间相隔 8 周。从所述动物分离血清以表征在动物中诱导的抗体的表位识别和功能活性。

三只用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的猴子的 GBS V 特异性 IgM 抗体的反应描述于图 21 中。各线代表用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫前和两次免疫后个体动物中的 GBS V 特异性 IgM 抗体的水平。沿 X 轴显示初次免疫后以周表示的时间，沿 Y 轴显示以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 表示的 V 型特异性 IgM 抗体的水平。用黑色箭头标示免疫。

在免疫前，用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的三只猴子中没有一只具有针对天然 V 型 PS 的 IgM 抗体。在第一剂疫苗后在所有三只动物中观察到 GBS V 特异性 IgM 反应，免疫后 3-5 周观察到反应的最高水平。在第二次免疫后 GBS V 特异性 IgM 的水平没有增加。由去唾液酸 GBS V-TT 疫苗诱导的 GBS V 特异性 IgM 的水平比由天然的 GBS V-TT 疫苗诱导的 IgM 水平低，由去唾液酸疫苗诱导的 GBS V 特异性 IgM 和由天然疫苗诱导的 GBS V 特异性 IgM 的中位水平分别为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 对 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫前和免疫两次后的 GBS V 特异性 IgA 反应描绘于图 22 中。在两种免疫后，在三只猴子中的两只中观察到低水平的 IgA 抗体。

GBS V 特异性 IgG 抗体反应描绘于图 23 中。在免疫前用去唾液酸 V-TT 疫苗免疫的三只猴子中没有一只具有预先存在的对 V 型多糖的 IgG 抗体。在第一次免疫后，IgG V 特异性抗体的水平显著，免疫后

3-8 周获得最高水平。此外，对于三只猴子都看到在用去唾液酸 GBS V-TT 二次接种后的显著加强的应答。因此，去唾液酸 V-TT 疫苗刺激 (1) 适度的 IgM 反应，(2) 显著的 IgG 转换，(3) 在第二剂后加速的和增加的 V 特异 IgG 反应强度，和 (4) 长效 GBS V 特异性抗体反应，在第二次接种后 10 周具有大约 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 V 特异性 IgG 中位水平。

实施例 10. 由经修饰的 V 型多糖-蛋白缀合物诱导的 IgG 抗体的特异性。

通过在去唾液酸、脱氨或天然 GBS V 多糖存在的情况下测量对 GBS V 多糖的结合的抑制来检测获自猕猴# 259 87 的疫苗诱导的血清抗体的 IgG 级分的特异性。将结果绘制于图 24 中，抑制剂的浓度绘制于 X 轴上，百分比抑制率绘制于 Y 轴上。如通过这些经化学修饰的多糖和天然 V 型 PS (三角形) 的相似的抑制曲线所显示的，用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗诱导的 IgG 抗体免疫的猕猴中产生的所有 GBS V 特异性抗体都识别脱氨 (实心正方形) 和去唾液酸 (空心正方形) 多糖。因此，猕猴中对于去唾液酸 GBS V-TT 疫苗诱导的抗体的优势 B 细胞表位是具有侧链葡萄糖的多糖的主链。包含三糖唾液酸的侧链不是该表位的部分。使用来自其他两只猴子的血清也获得相同的结果。

就来自猕猴的 IgM 抗体重复实验。来自猕猴# 259 87 的血清的 IgM 抗体的结果描述于图 25 中。如通过这些化学修饰的多糖和天然 V 型 PS (三角形) 的相似的抑制曲线所显示的，疫苗诱导的 IgM 抗体识别脱氨基 (圆) 和去唾液酸 V 型 PS (正方形)，因此猕猴中对于去唾液酸 V-TT 糖缀合物疫苗诱导的抗体的优势 B 细胞表位是具有侧链葡萄糖的多糖的主链。包含三糖唾液酸的侧链不是免疫优势 B 细胞表位的部分。使用来自其他两只猴子的血清也获得相同的结果。

实施例 11. 猕猴中 V 型特异性抗体的功能。

就体外调理吞噬杀伤能力检测来自用去唾液酸 GBS V-TT 疫苗免疫的猕猴的抗体的 IgG 和 IgM 级分。我们发现在补体和 PMNL 存在的情况

下 IgG 和 IgM 级分的抗体都杀死活 GBS V 链球菌 (图 26)。

已描述了本发明的许多实施方案。然而,要理解的是可进行各种改变而不背离本发明的精神和范围。因此,其他实施方案在下面的权利要求的范围之内。

实施例 12. 用经修饰的 V 型多糖-蛋白缀合物和佐剂诱导的 IgG 抗体。

以每次免疫 0.625 μ g PS 的剂量和每次免疫 6.25 μ g PS 的剂量给小鼠腹膜内施用天然 GBS V-TT 疫苗。在 0.5mg 明矾存在或不存在的条件下用 GBS V-TT 缀合物免疫小鼠。在第 0 天和第 21 天给每组 6 只 129/J 小鼠给药。在免疫前,第一剂和第二剂之间(在第 20 天)和第二剂之后(在第 31 天)从动物获取血清。通过 ELISA 确定在各组动物中诱导的 V 特异性 IgG 的水平并将该水平绘制于图 27A-27D 中。如图 27A 中所示,在免疫后 31 天用低剂量的 GBS V-TT 组合物诱导的 V 特异性 IgG 的浓度在 0.01 至 1 μ g/ml 之间。相反地,明矾的加入导致 V 特异性 IgG 的水平在 10 至 100 μ g/ml 之间(图 27B)。类似地,在明矾不存在的条件下高剂量的 GBS V-TT 诱导 0.01-0.05 μ g/ml 的 V 特异性 IgG (图 27C),而高剂量在明矾存在的条件下诱导 10-100 μ g/ml 的水平。这些数据表明明矾可在哺乳动物中增强对 GBS 缀合物组合物的免疫应答。

实施例 13. 通过被动母体免疫使新生动物免疫受攻击的保护

使用母体接种和新生儿攻击的小鼠模型检查使用血清进行被动免疫产生的体内保护性功效,所述血清获自用去唾液酸 GBS V 型糖缀合物疫苗免疫的猕猴。该模型描述于 Rodewald 等人, *J Infect Dis.*, 166(3):635-9, 1992。简而言之,给妊娠 CD-1 小鼠(每组 3 只动物)腹膜内单次注射 0.5ml 下列血浆样品中的一种样品:获自 3 只用 GBS V-TT 免疫的猕猴的混合血清、获自 3 只用去唾液酸 GBS V-TT 免疫之后的猕猴的混合血清、标准的人参照混合血清物(SHRSIII; 阳性对照)或混合的免疫前猕猴血浆(阴性对照)。各混合血清/血浆中的 GBS V

特异性 IgG 的浓度列于表 4 中。

表 4. GBS 被动保护模型中受试混合血清/血浆中的 GBS V 特异性 IgG 的浓度

混合血清/血浆	V-IgG ($\mu\text{g/ml}$)
去唾液酸 V-TT 诱导的 (混合的猕猴血浆)	12.3
V-TT 诱导的 (混合的猕猴血浆)	10.5
标准的人参照血清 V (V-TT 诱导的; 阳性对照)	11.6
混合的免疫前猕猴血浆	不可检测的

出生前 2-3 天给小鼠施用血清。在出生的第一天, 用高于在该模型中杀死 50% 的小鼠的剂量 40 倍的剂量 ($40 \times \text{LD}_{50}$) 的 GBS (菌株 CJB111) 攻击小鼠生出的幼崽。出生后在 GBS 攻击 48 小时后存活的幼崽的数目列于表 5 中。如表 5 中所示, 用血清对妊娠动物进行的被动接种有效地保护其幼崽免受致死剂量的 GBS 伤害, 所述血清来自用去唾液酸 GBS V-TT 免疫的猕猴。由来自去唾液酸 V-TT 诱导的动物的血清获得的保护与由来自 V-TT 诱导的动物的血清获得的保护相当。

表 5. GBS 被动保护模型中的幼崽的存活率

给母体施用的混合血清/血浆	百分比存活率 (存活数目/总数)
去唾液酸 V-TT 诱导的 (混合的猕猴血浆)	66% (20/30)
V-TT 诱导的 (混合猕猴血浆)	78% (25/32)
标准的人参照血清 V (V-TT 诱导的; 阳性对照)	73% (27/37)
混合的免疫前猕猴血浆	16% (3/18)

实施例 14. 通过主动母体免疫使新生动物免受攻击的保护

也使用描述于上面实施例 13 中的母体接种和新生儿攻击的小鼠

模型确定主动免疫的体内功效。在第 0 和第 21 天给雌性 CD-1 小鼠施用 V-TT 或去唾液酸 V-TT 两次。各剂量包含 0.8 μ g 的以吸附至氢氧化铝的糖缀合物的形式提供的 PS。给另一组雌性小鼠施用盐水和氢氧化铝，作为对照。在出生的第一天用 40 倍于在该模型中使 50% 的小鼠致死的剂量的剂量 (40 x LD₅₀) 的 GBS (菌株 CBJ111) 攻击接受免疫的小鼠出生的幼崽。在出生后在 GBS 攻击 48 小时后存活的幼崽数目列于表 6 中。这些数据显示用去唾液酸 GBS V-TT 进行雌鼠的主动免疫保护其新生幼崽免受致死剂量的 GBS 的伤害。通过用去唾液酸 V-TT 主动免疫获得的保护和通过用 V-TT 主动免疫获得的保护相当。

表 6. GBS 主动保护模型中幼崽的存活率

给母体施用的疫苗	百分比存活率 (存活数目/总数)
去唾液酸 V-TT + 明矾	98% (49/50)
V-TT + 明矾	100% (71/71)
盐+明矾	41% (10/24)

其他实施方案

已描述了本发明的许多实施方案。然而，要理解，可进行许多改变而不背离本发明的精神和范围。因此，其他实施方案在下列权利要求的范围之内。

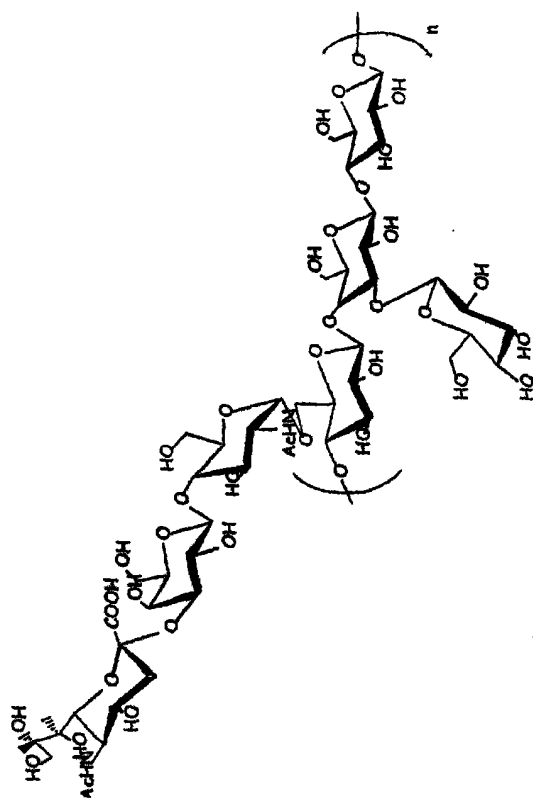


图1

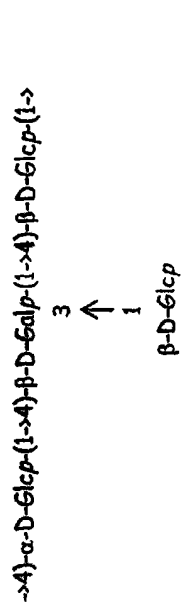


图 2B

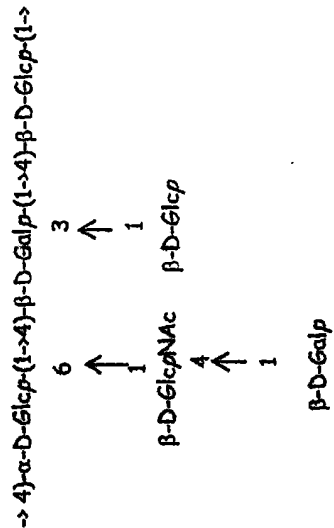


图 2C

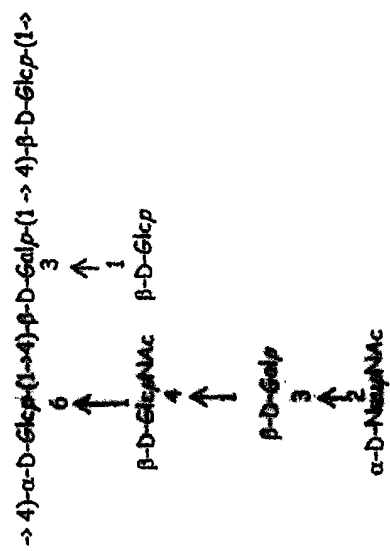


图 2A

GBS V型及其经修饰的形式免疫的人血清V-TT
诱导的V-特异性抗体的IgG级分对结合的抑制

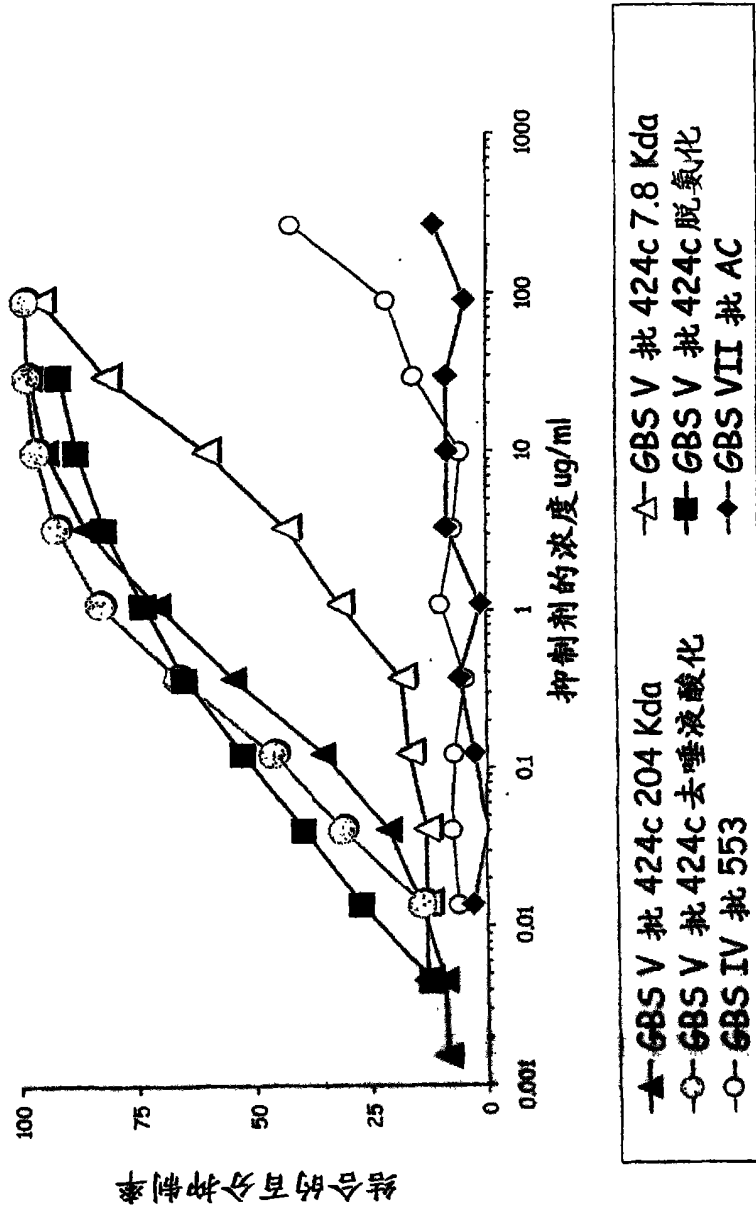


图 3

GBS V型及其经修饰的形式免疫的人血清V-TT
诱导的V-特异性抗体的IgM级分对结合的抑制

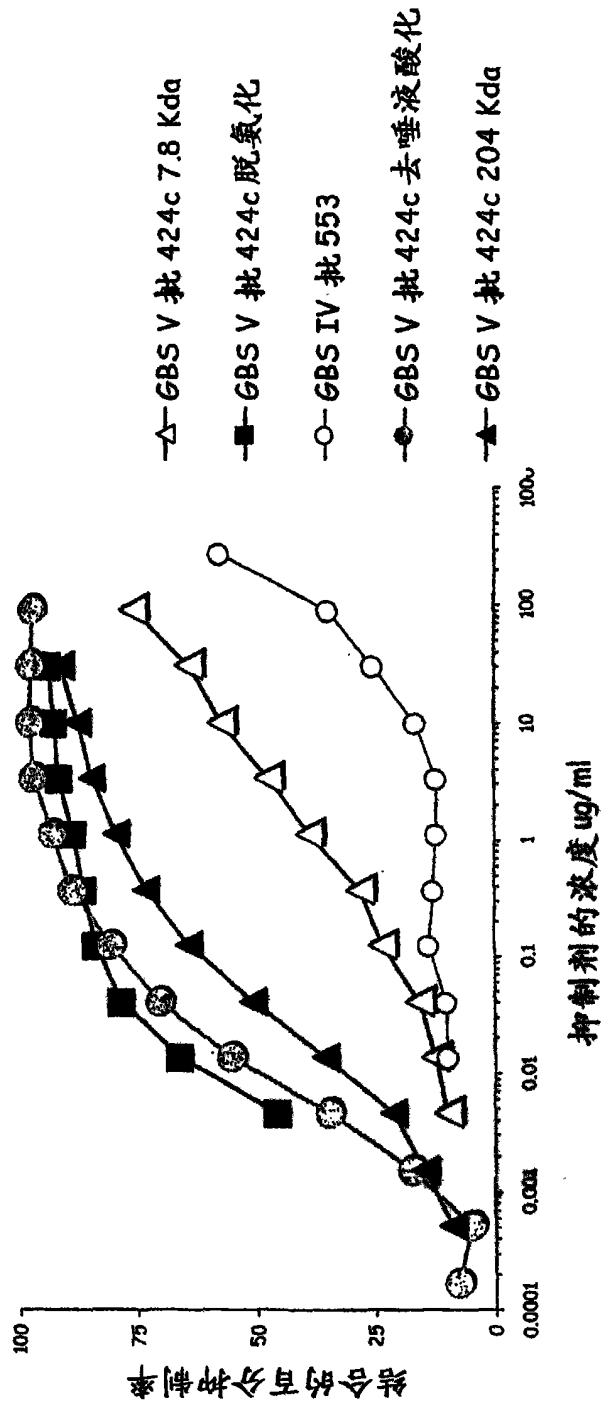


图 4

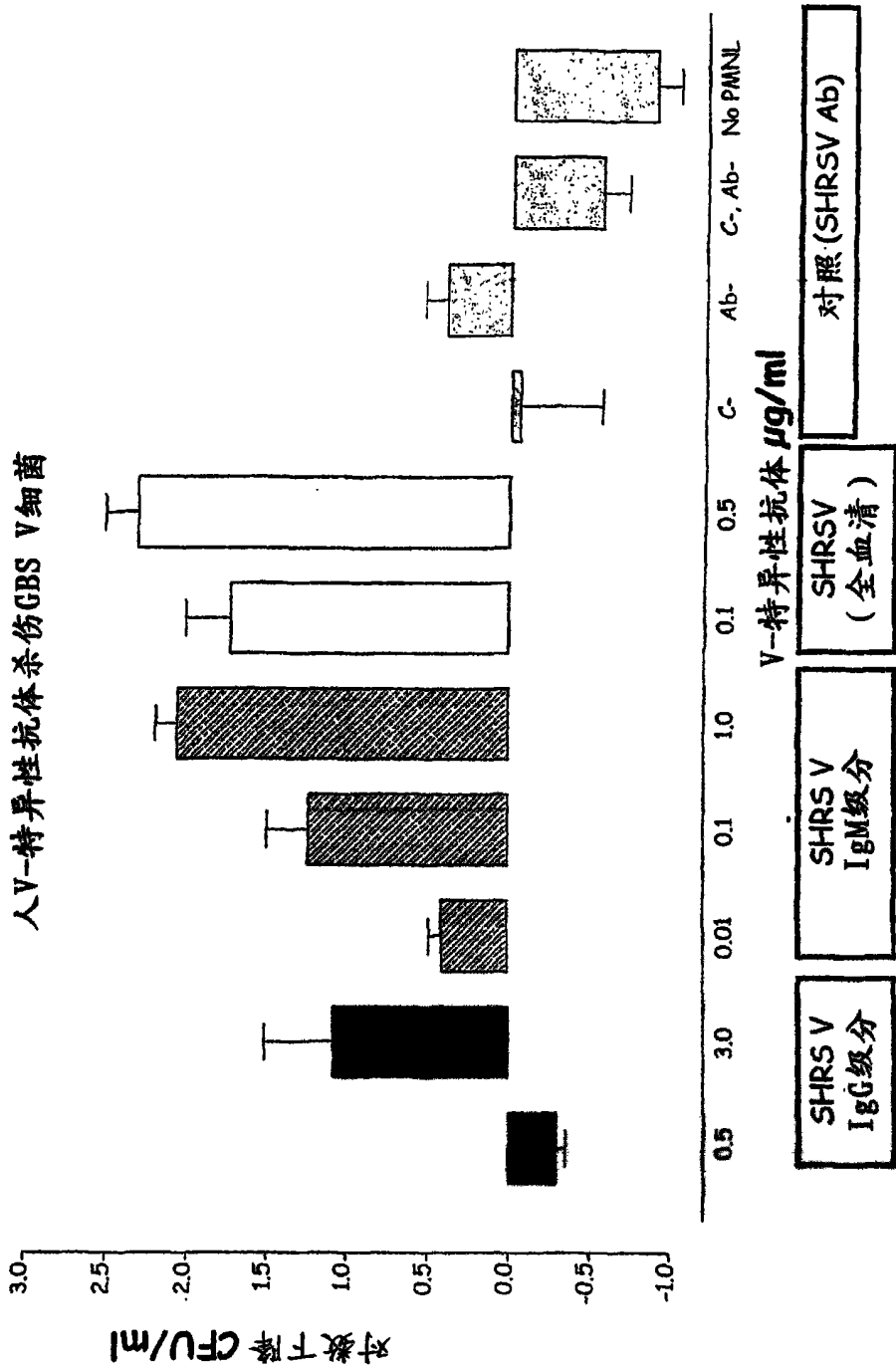


图5

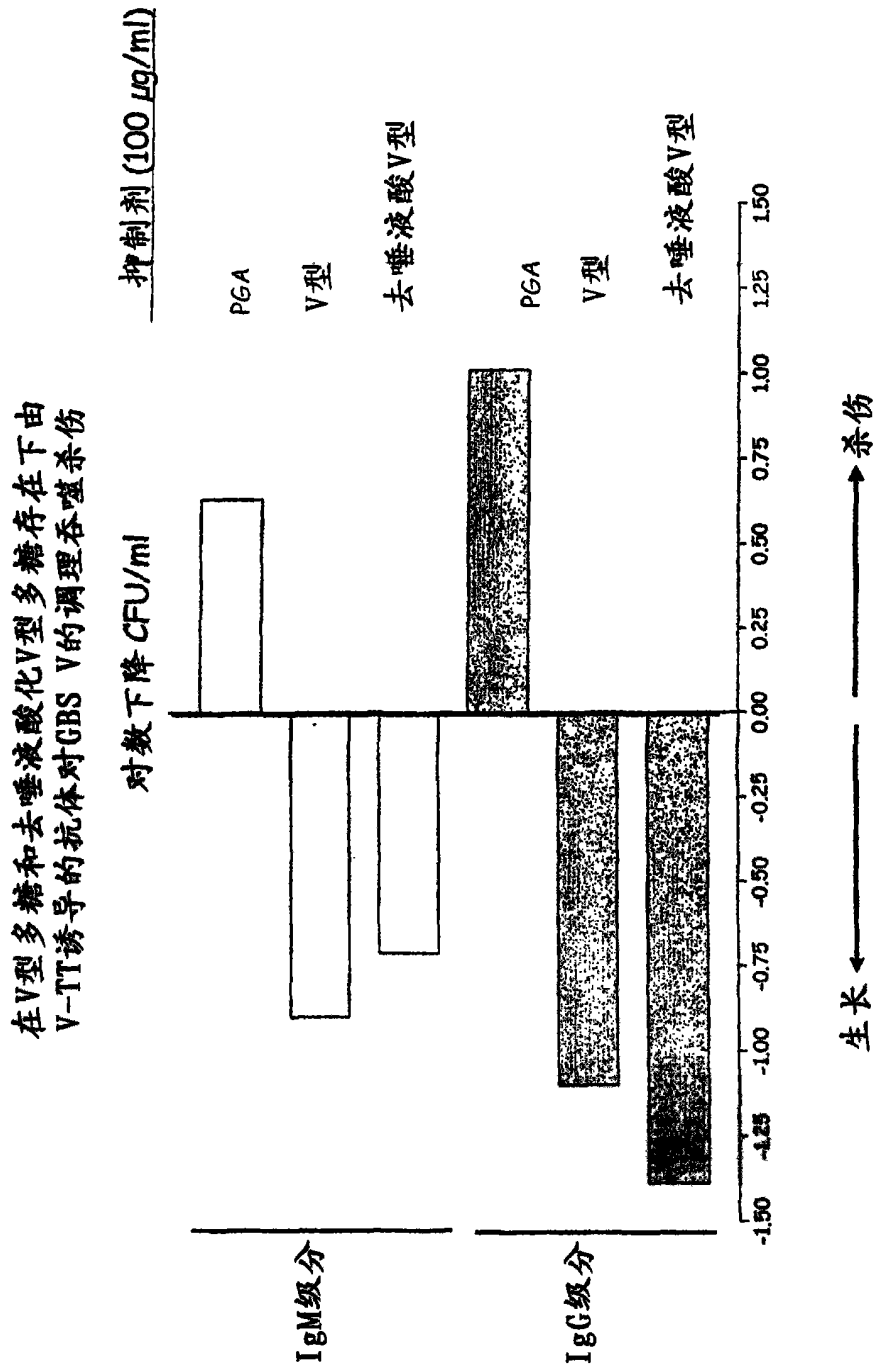


图6

GBS V及其修饰的形式免疫的鼠单克隆V-IT诱导的V-特异性抗体的IgG级分对结合的抑制

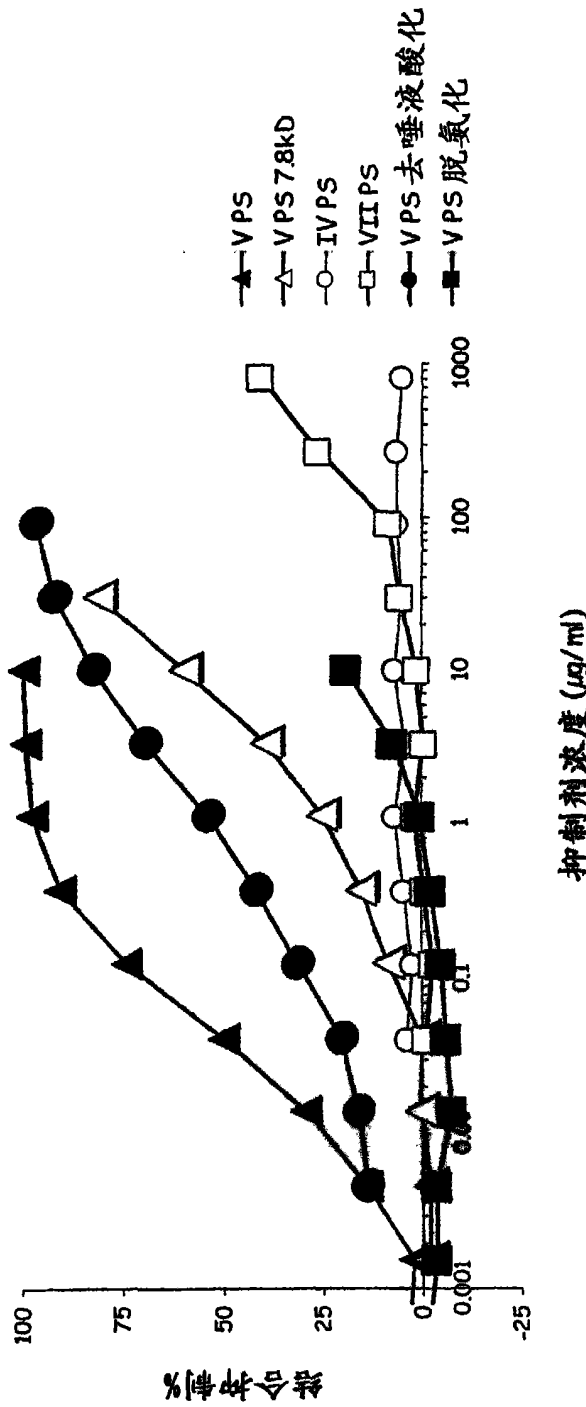
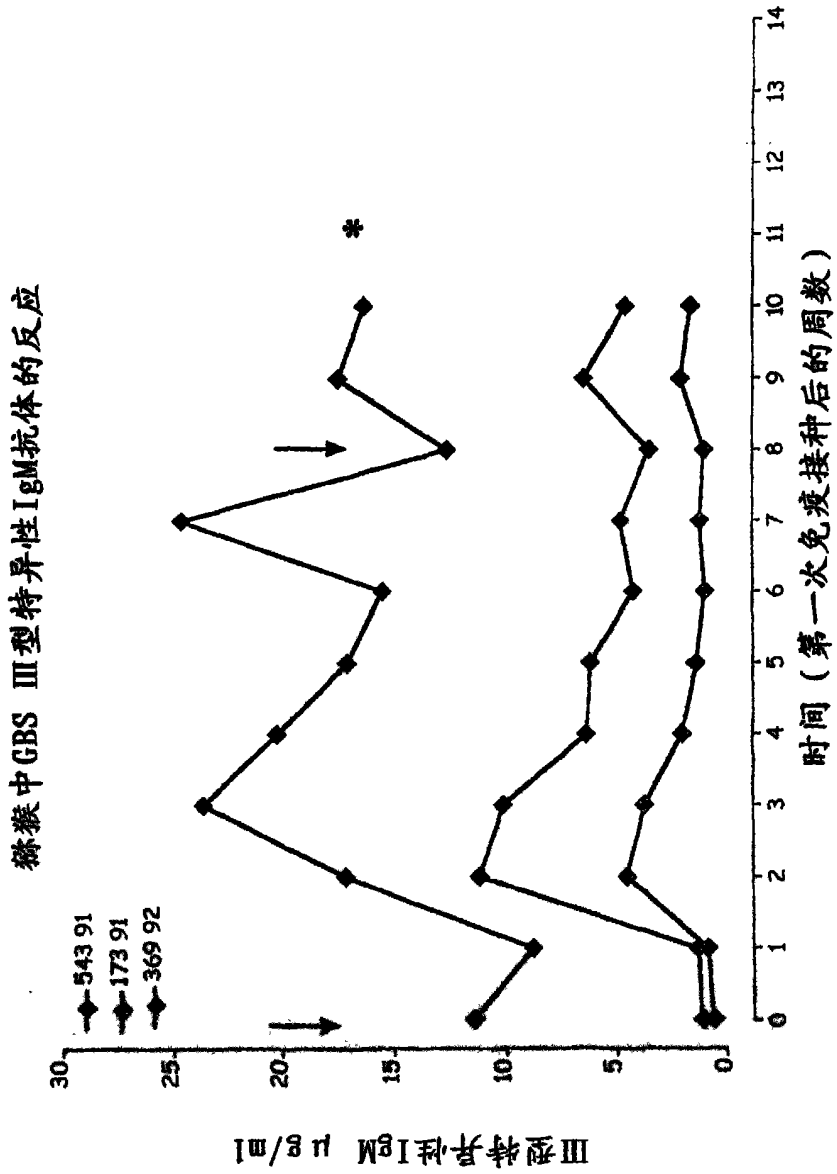


图7



*结合至GBS III-HSA的非特异性IgM抗体

图8

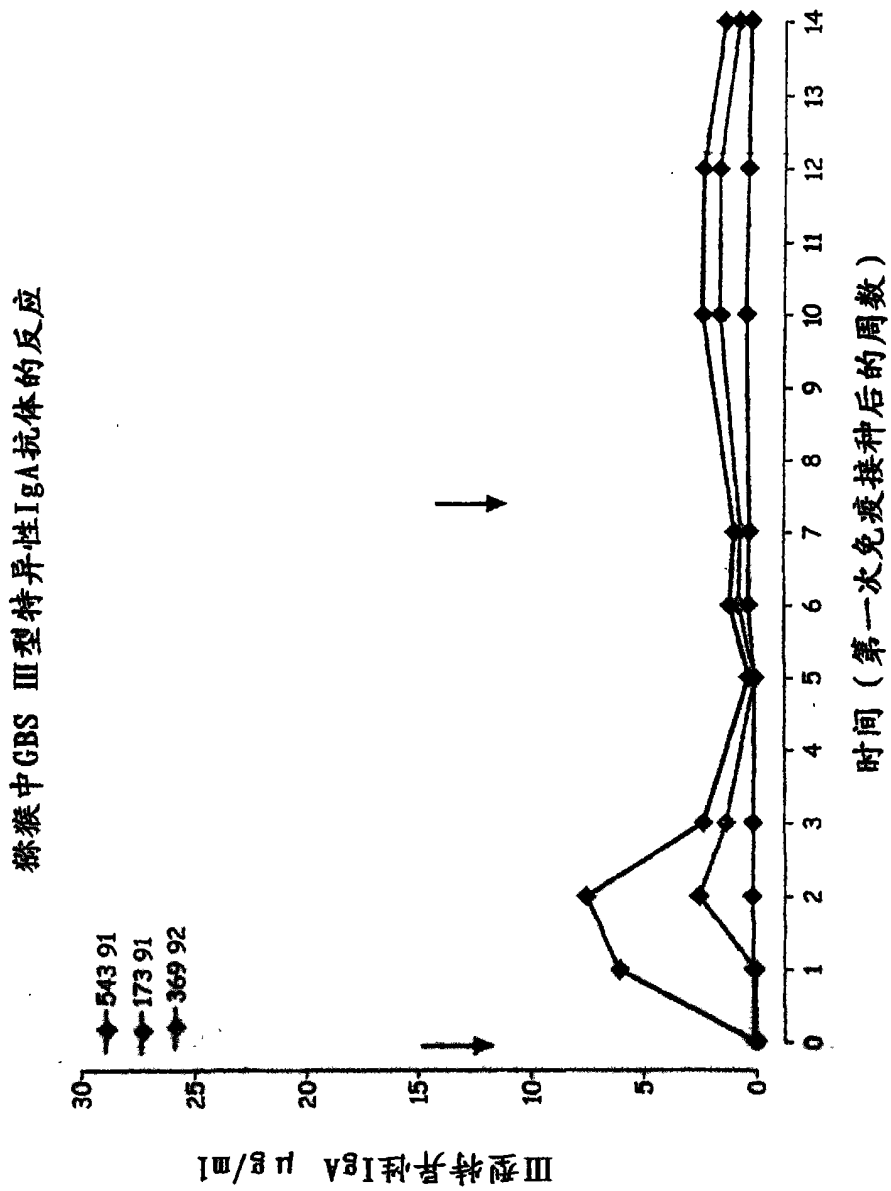


图9

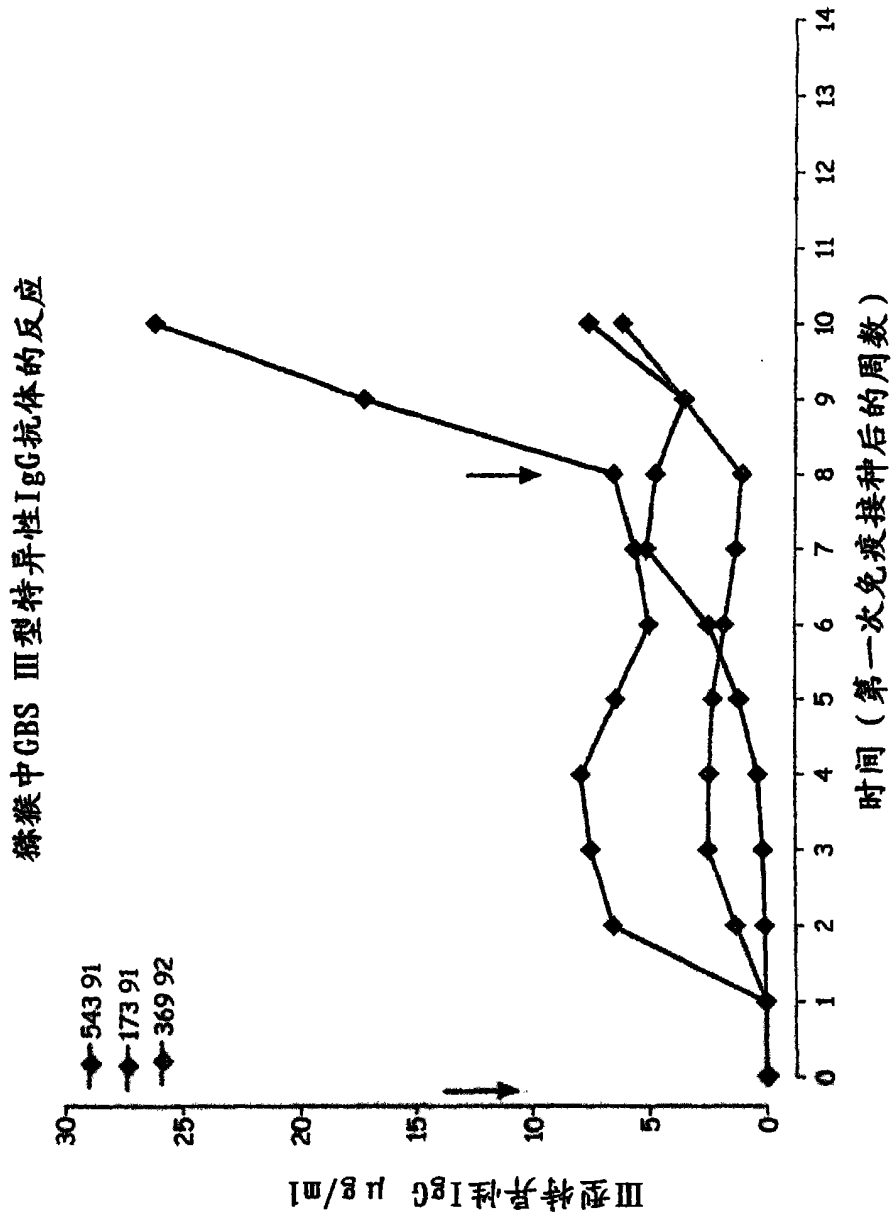


图10

猕猴中GBS V型特异性IgM抗体的反应

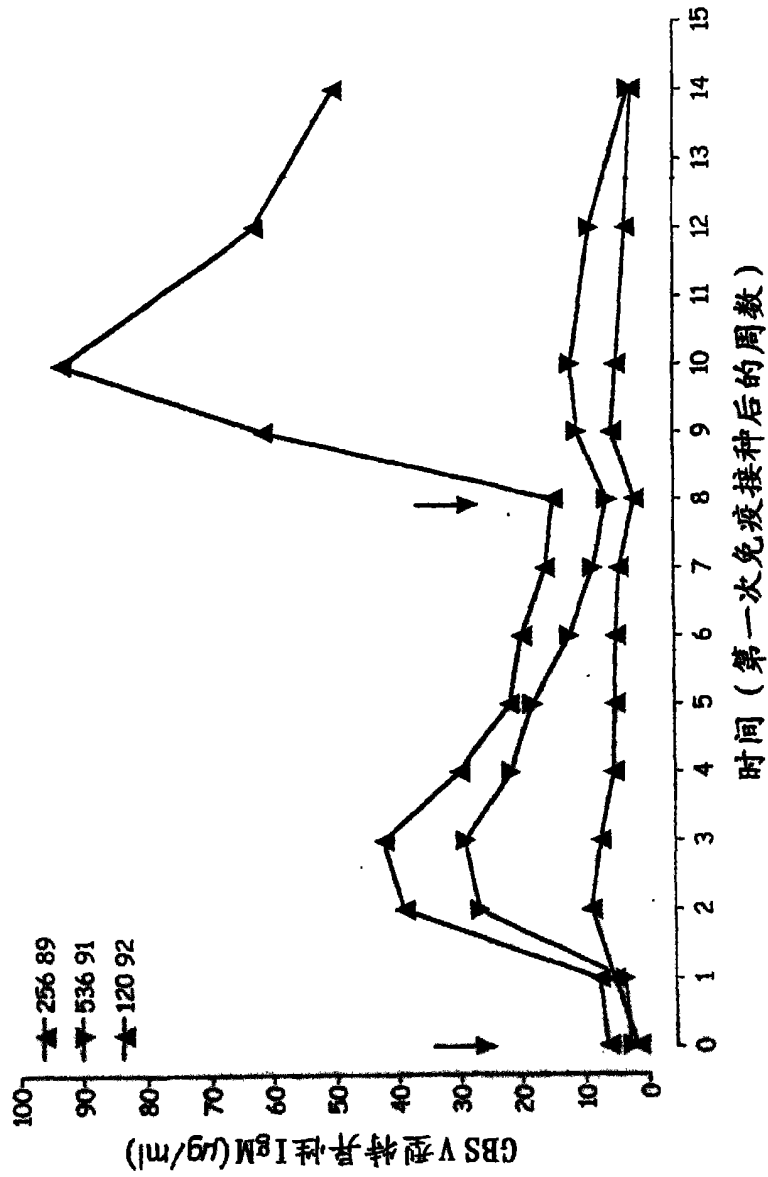


图11

猕猴中GBS V型特异性IgA抗体的反应

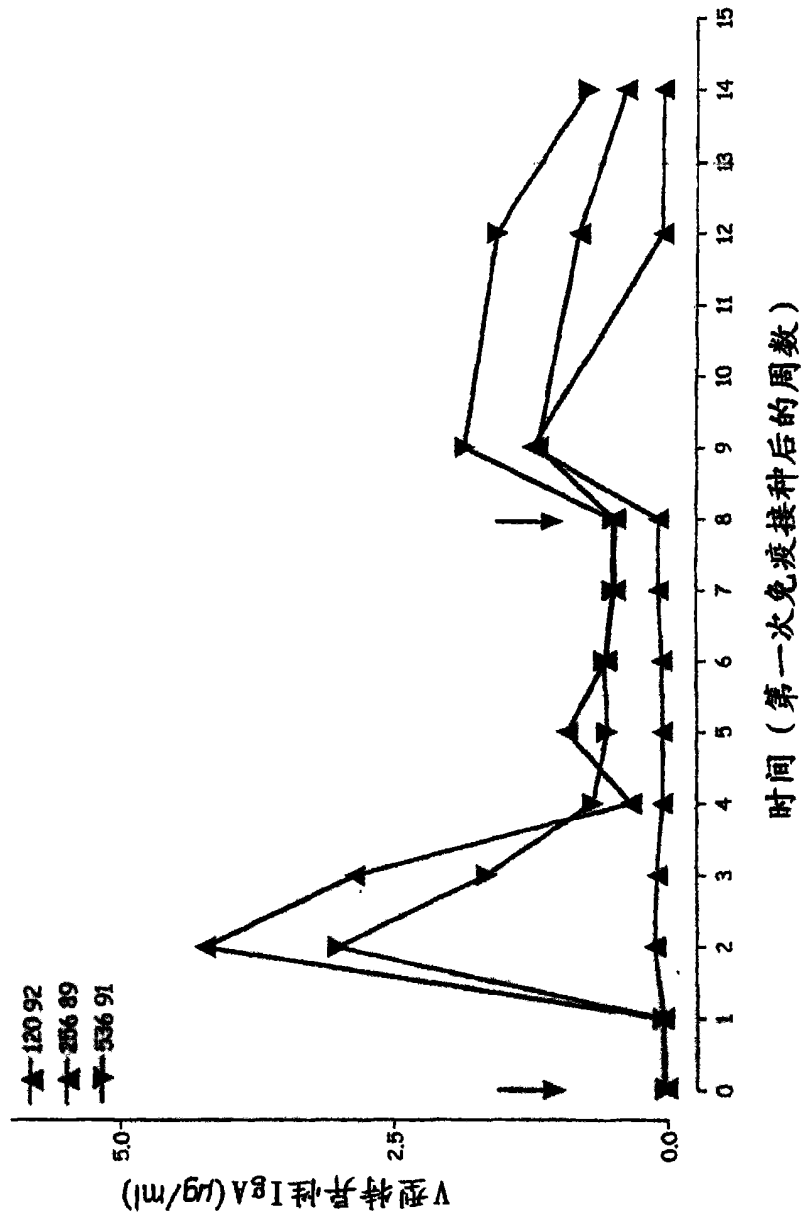


图12

猕猴中GBS V型特异性IgG抗体的反应

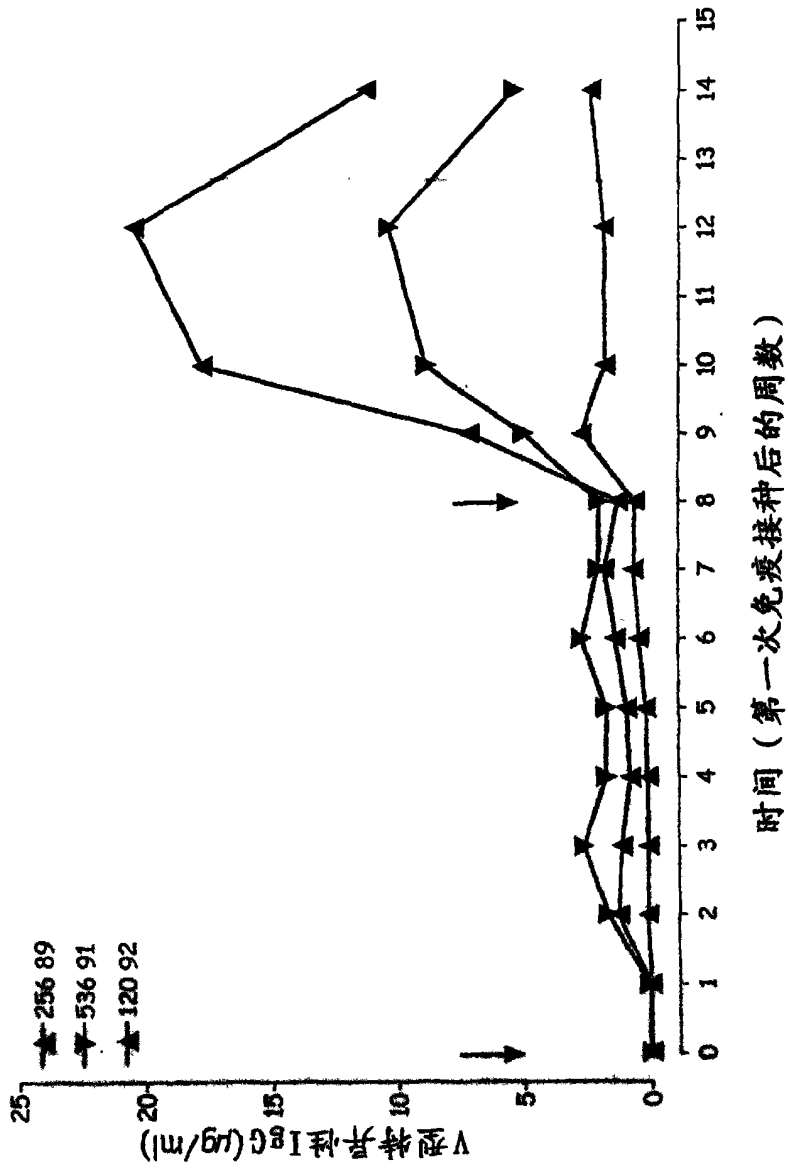


图13

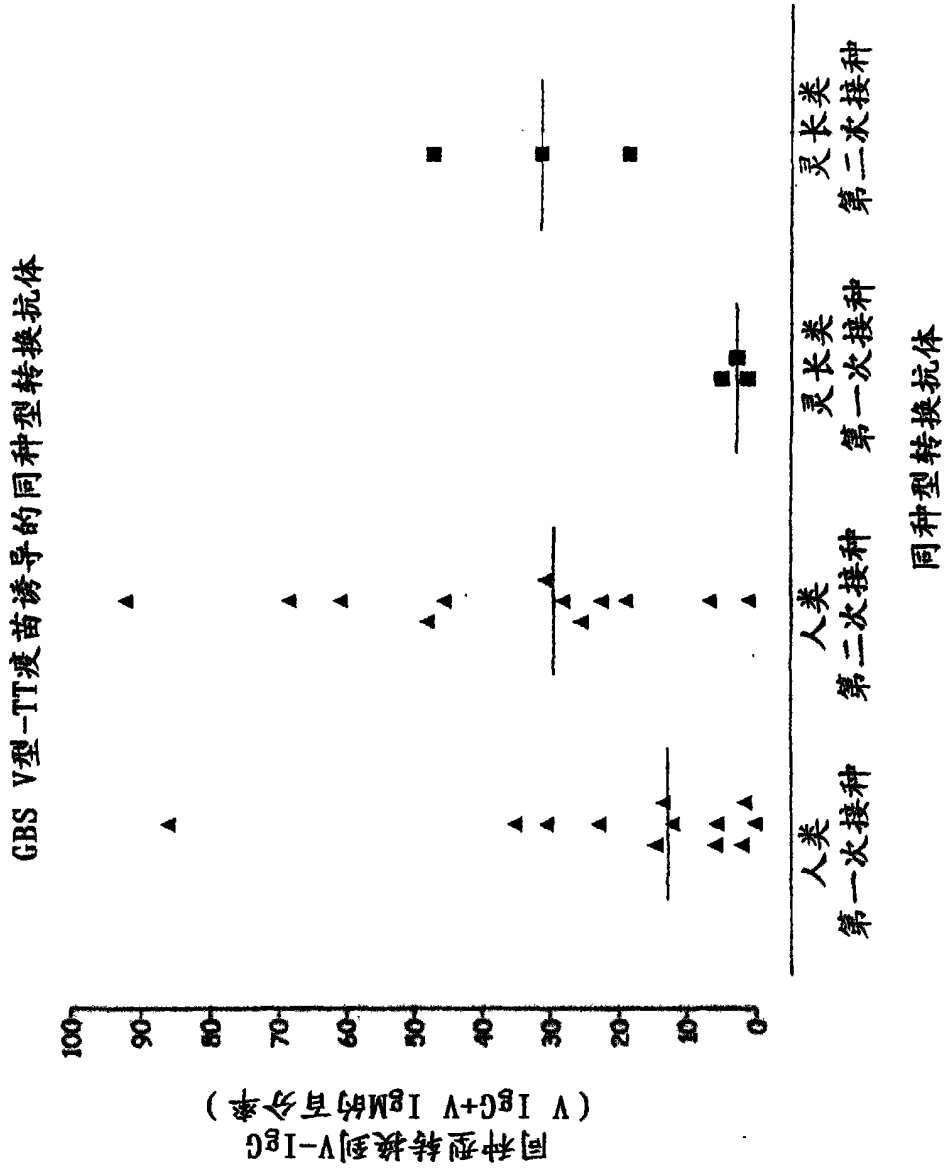


图14

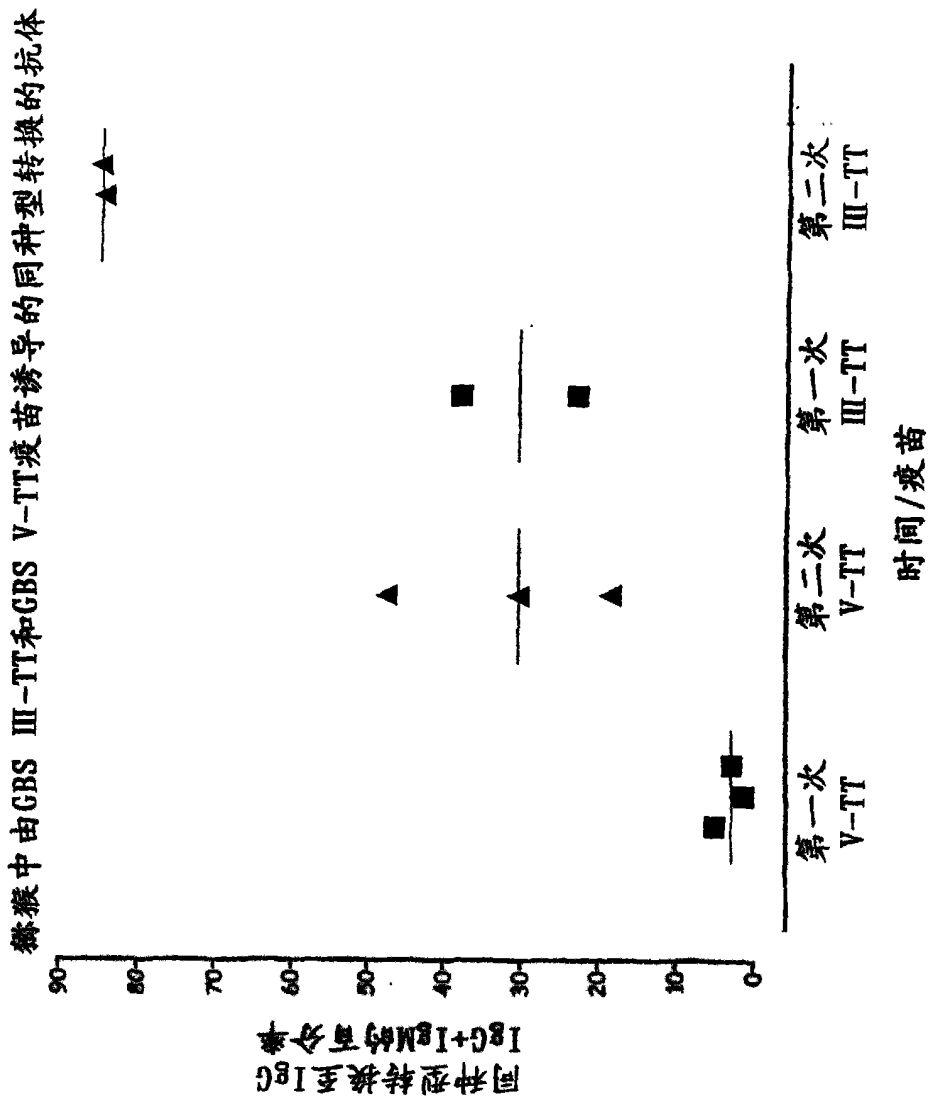


图15

猕猴#369 92中GBS III型诱导的IgG抗体的特异性

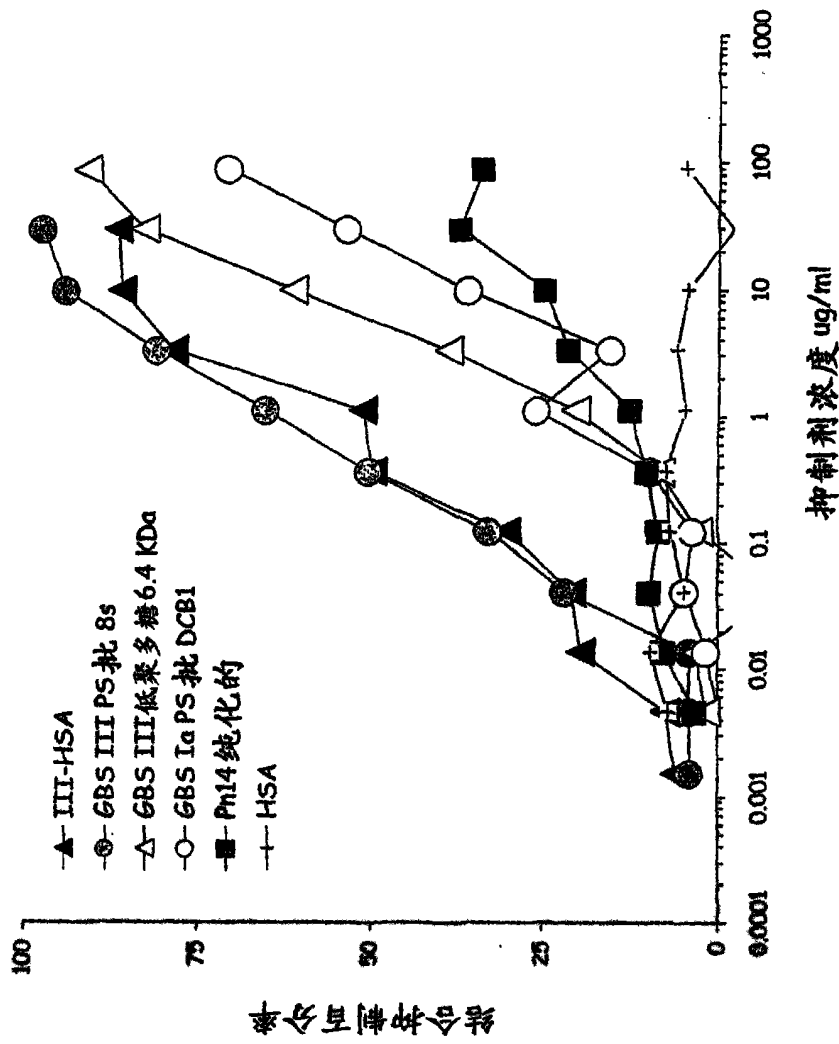


图16

猕猴#543 91中GBS III型诱导的IgG抗体的特异性

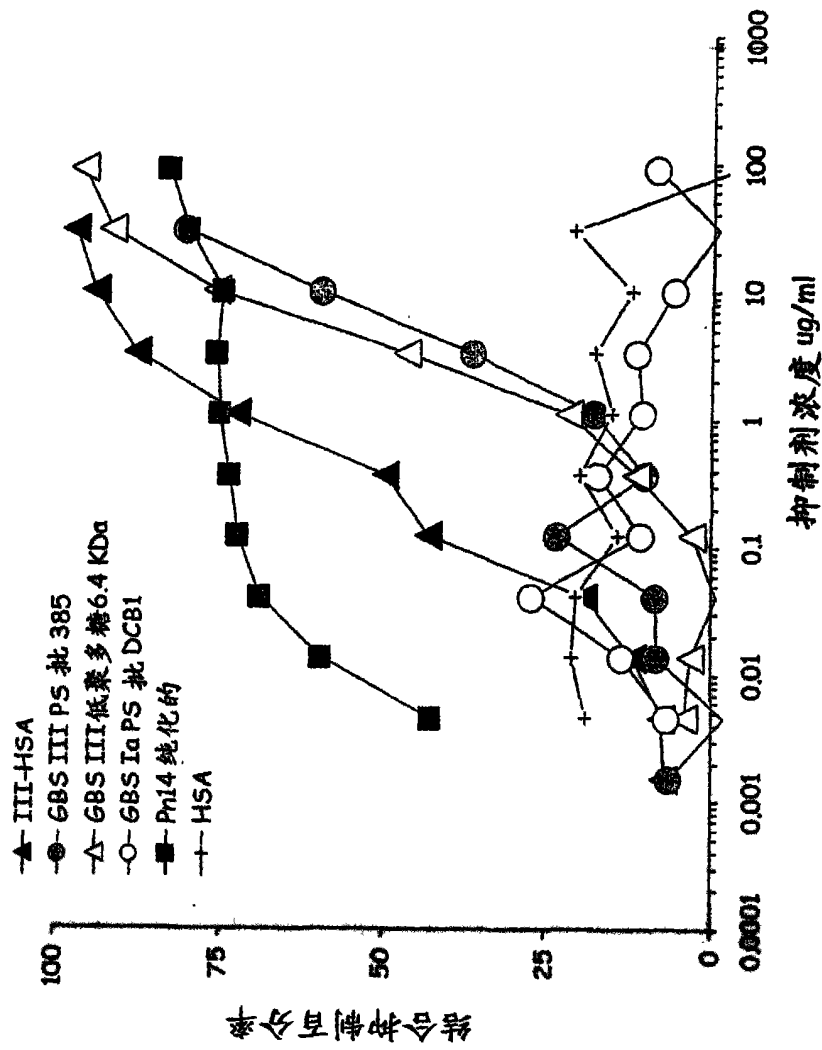


图17

猴猴#120 92中GBS V型诱导的IgG抗体的特异性

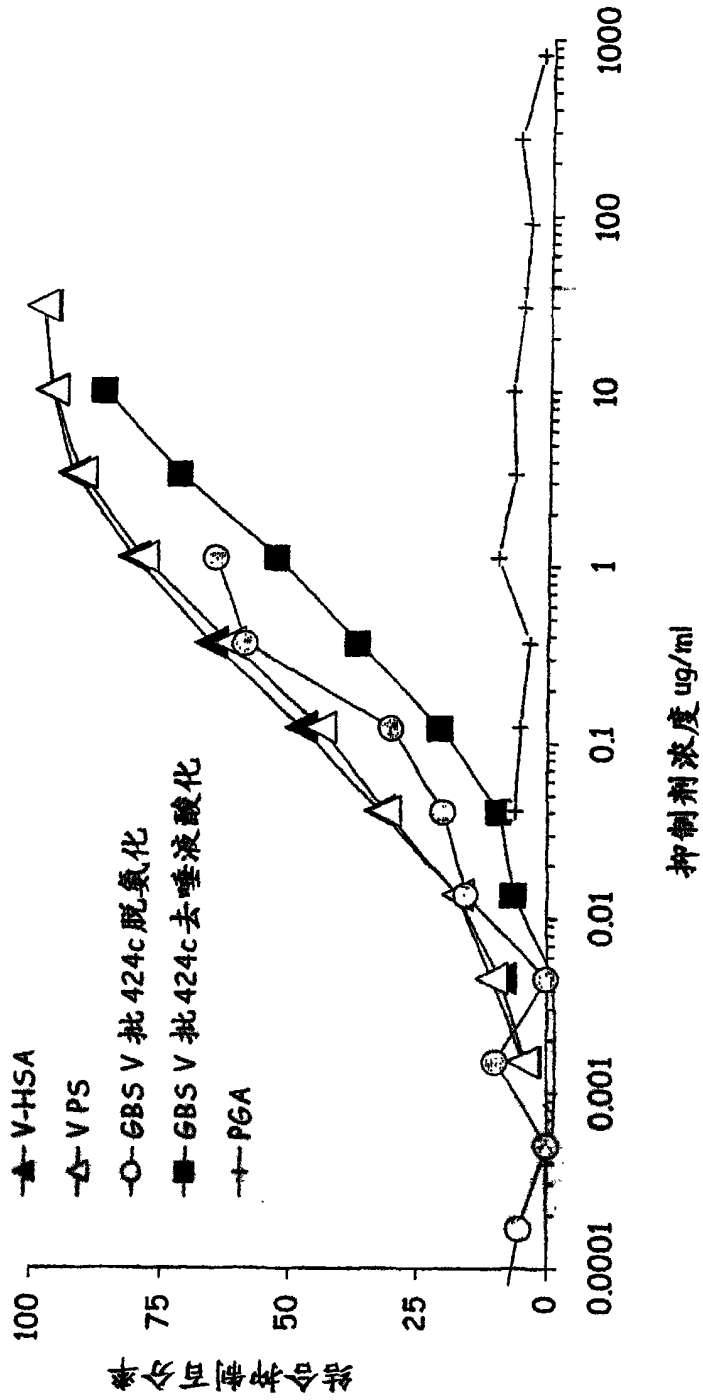


图18

猕猴#256 89中GBS V型诱导的IgG抗体的特异性

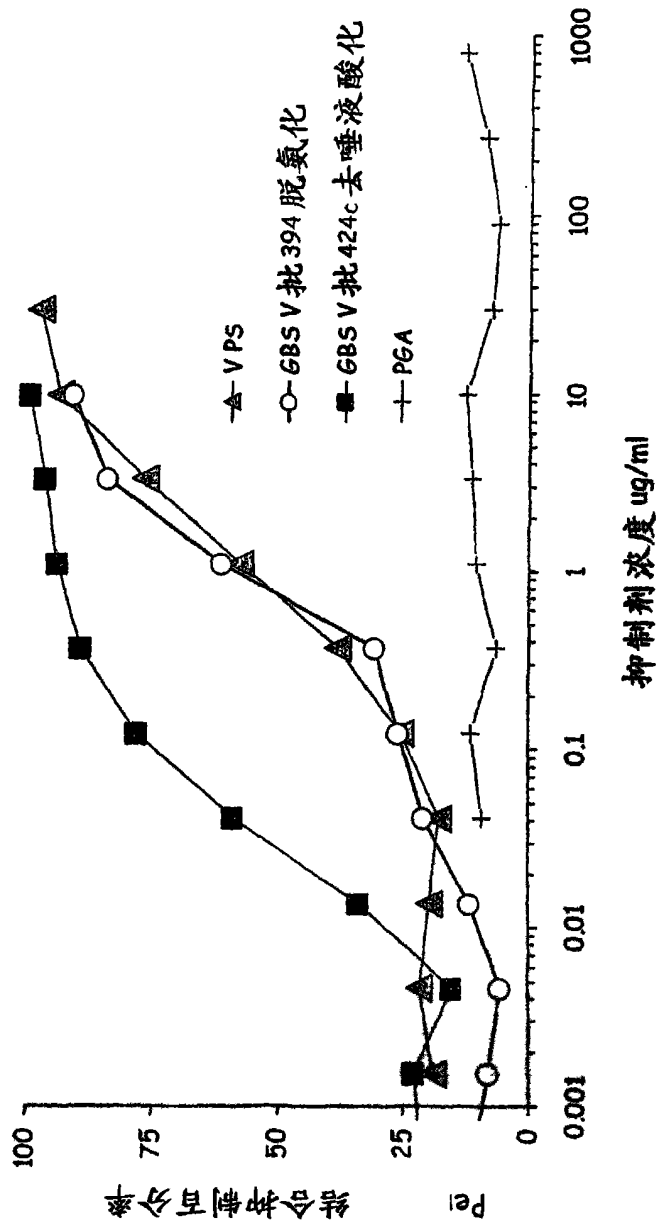


图19

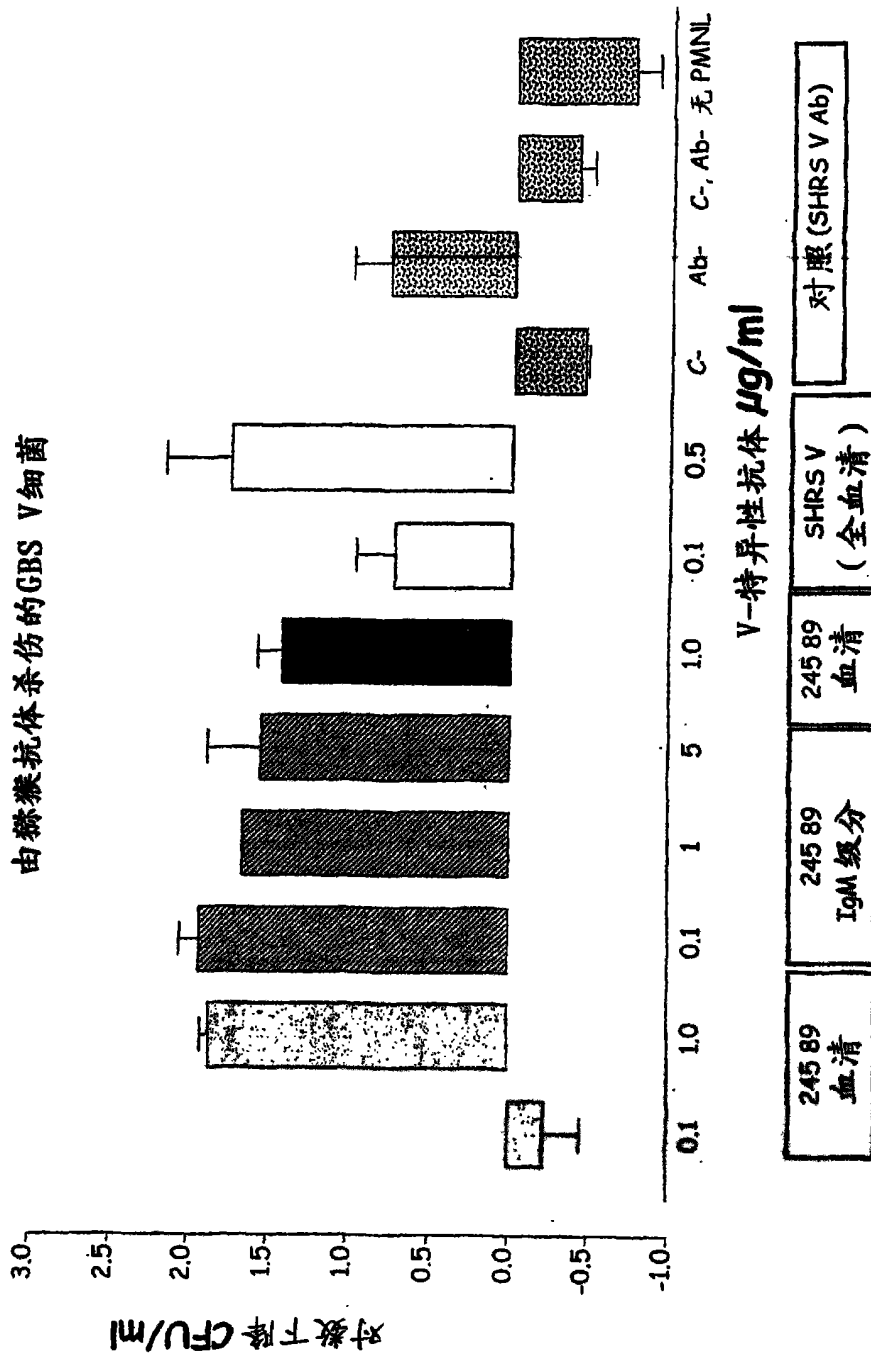


图 20

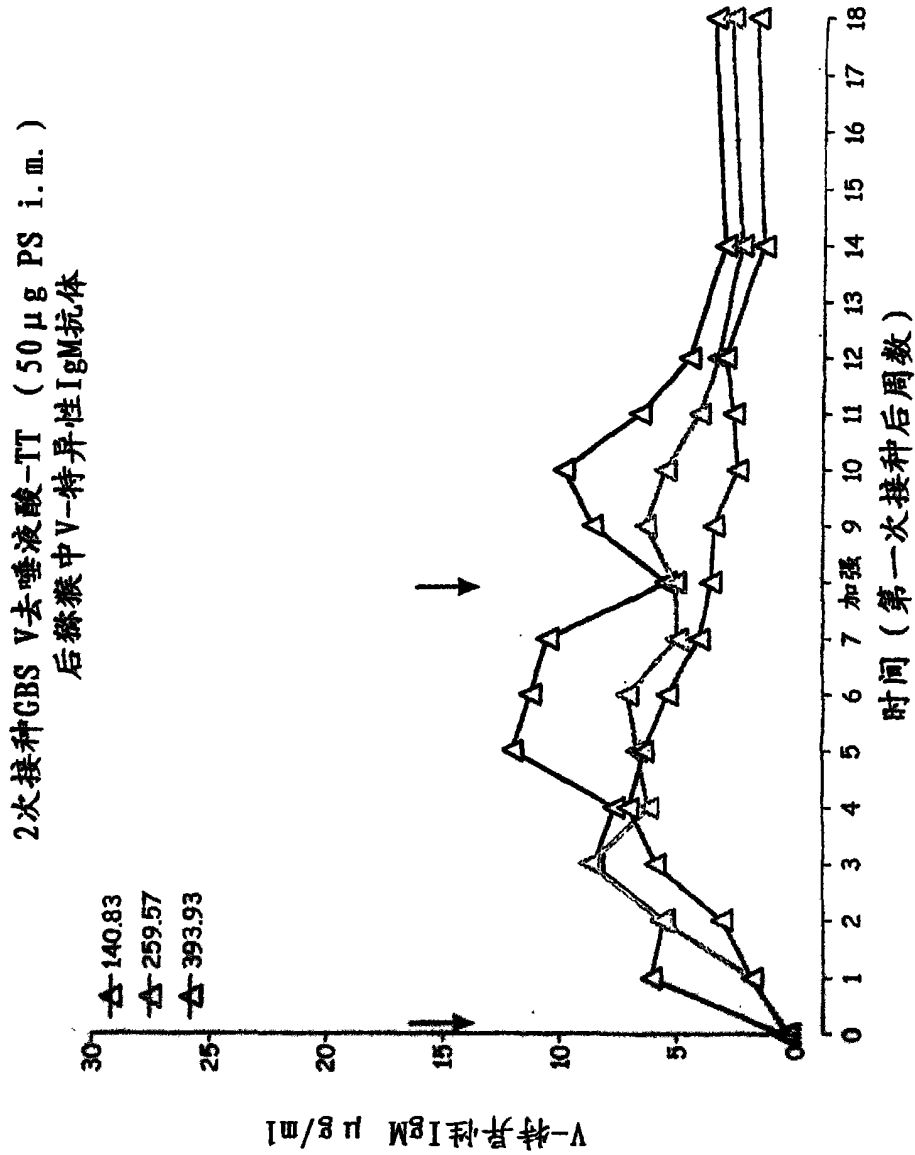


图21

2次接种GBS V去唾液酸-TT (50 μ g PS i. m.)
后猕猴中V-特异性IgA抗体

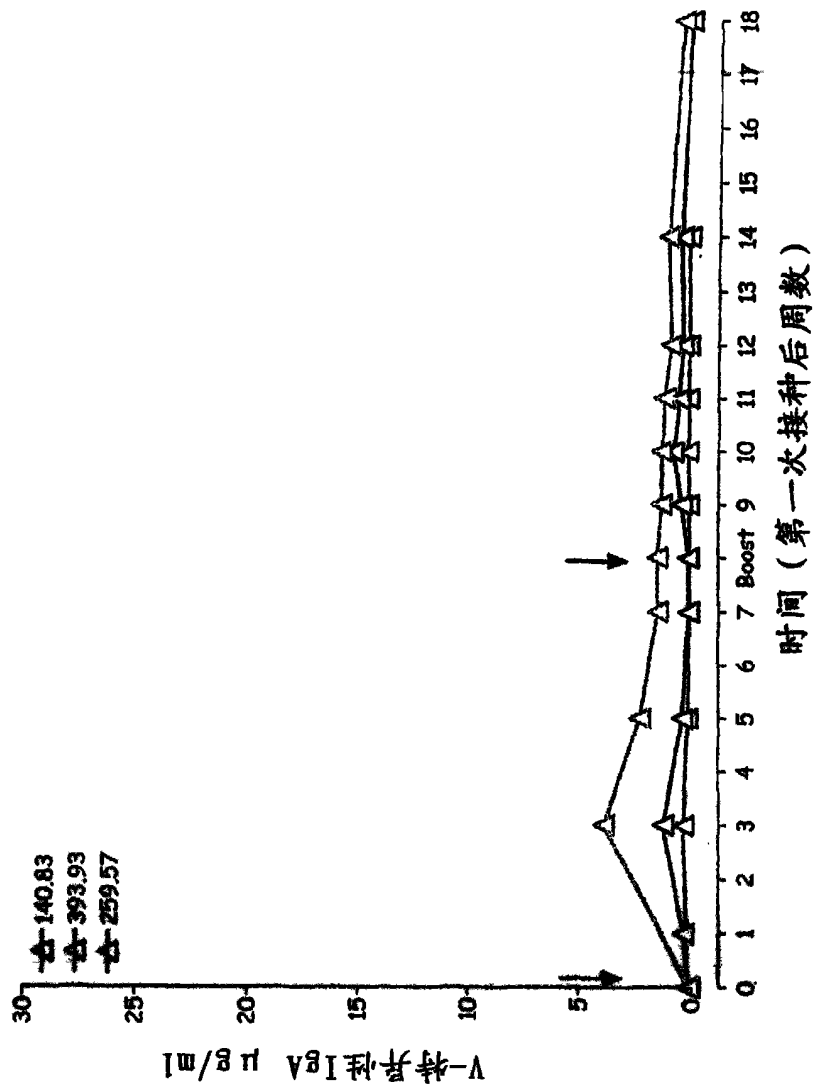


图22

2次接种GBS V去唾液酸-TT (50 μg PS i.m.)
后猕猴中V-特异性IgG抗体

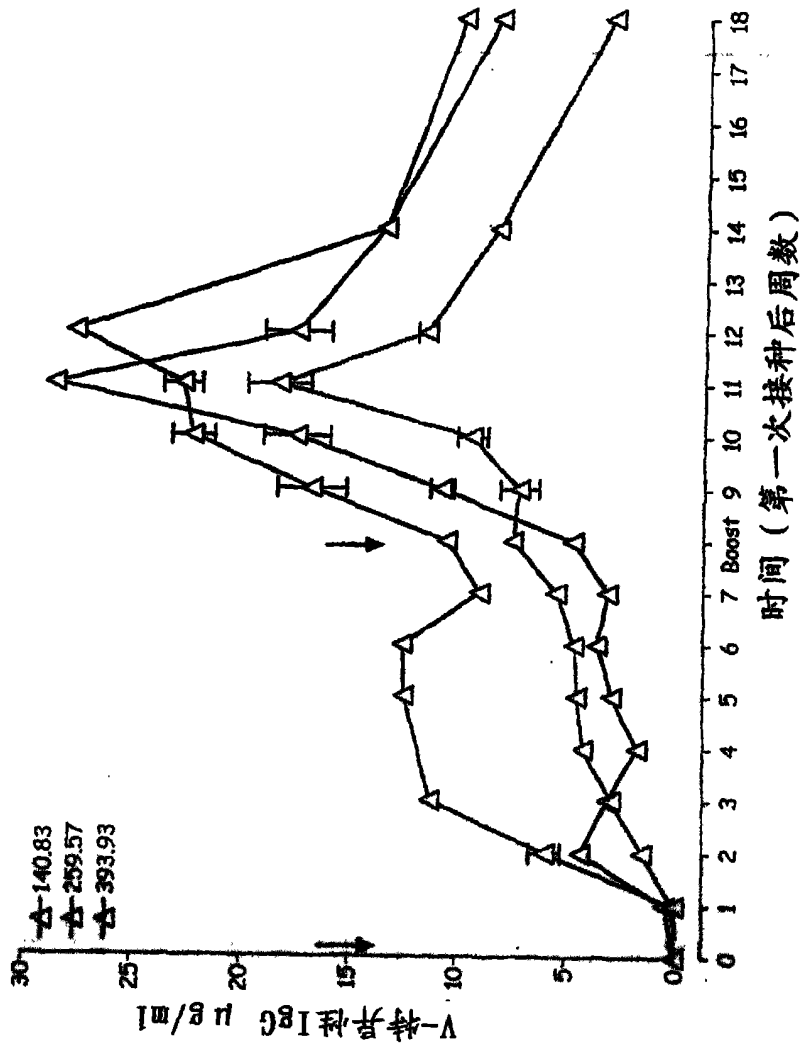


图 23

菌株#259 87中GBS去唾液酸GBS V-诱导的IgG抗体的特异性

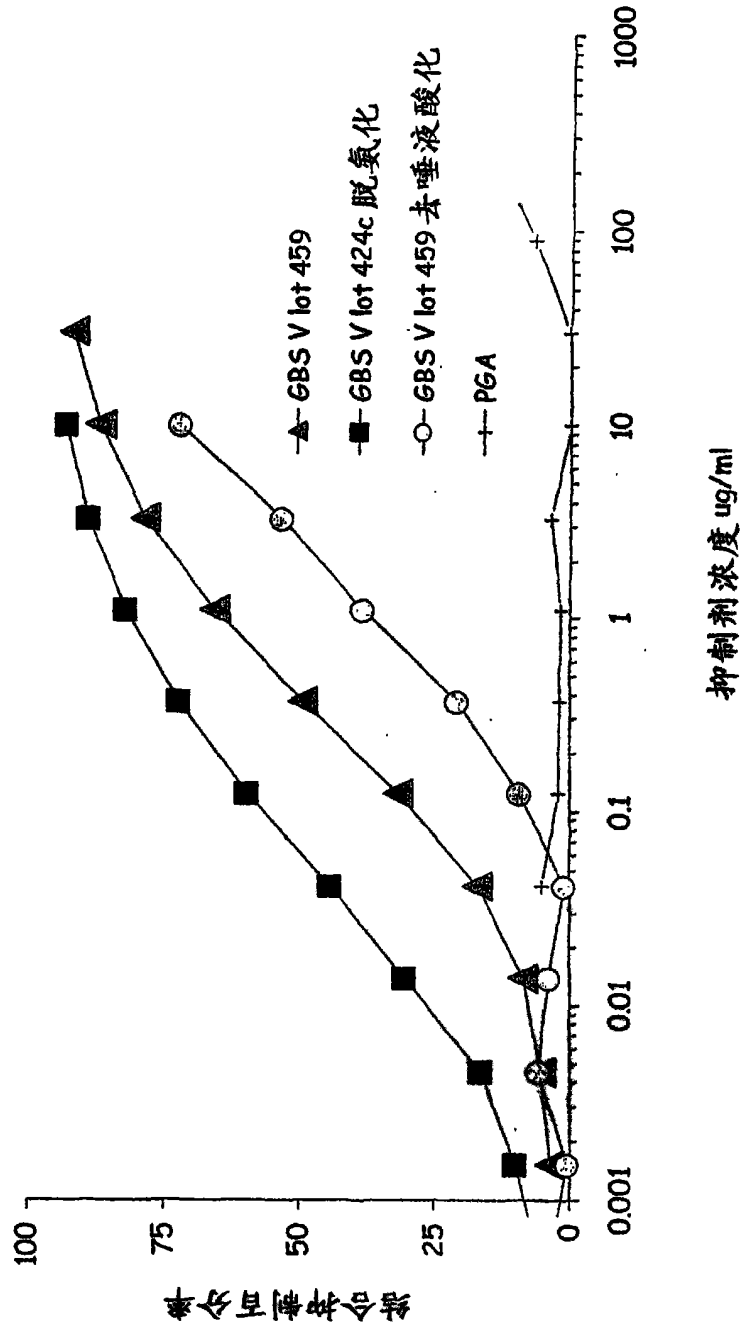


图 24

猕猴#259 87中GBS中唾液酸GBS V-诱导的IgM抗体的特异性

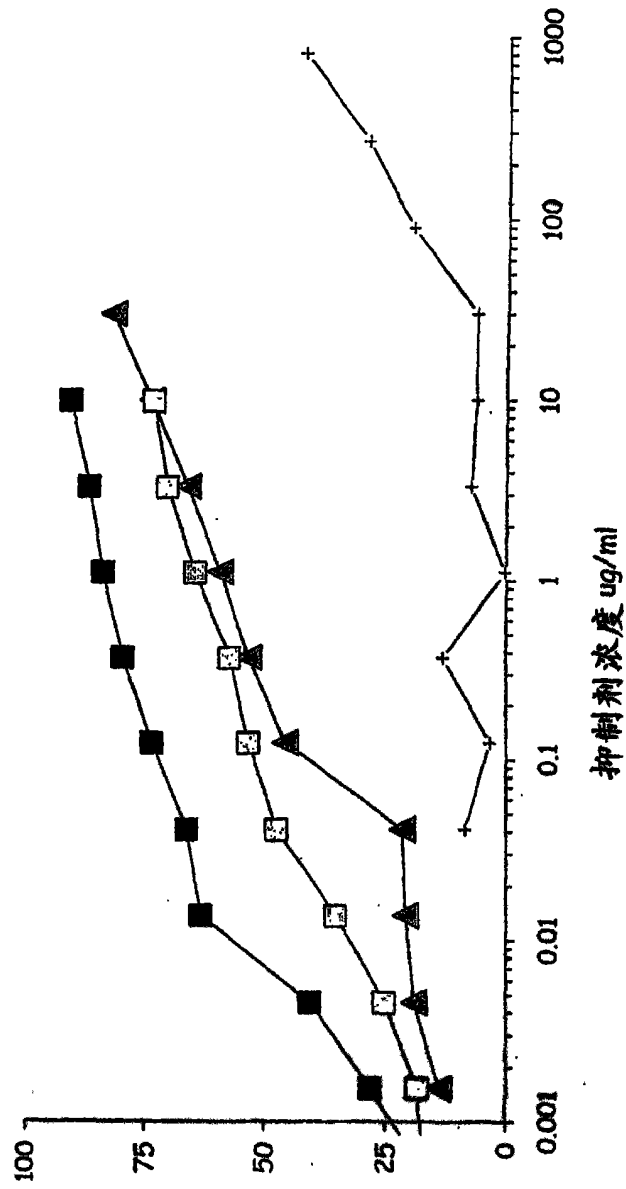


图 25

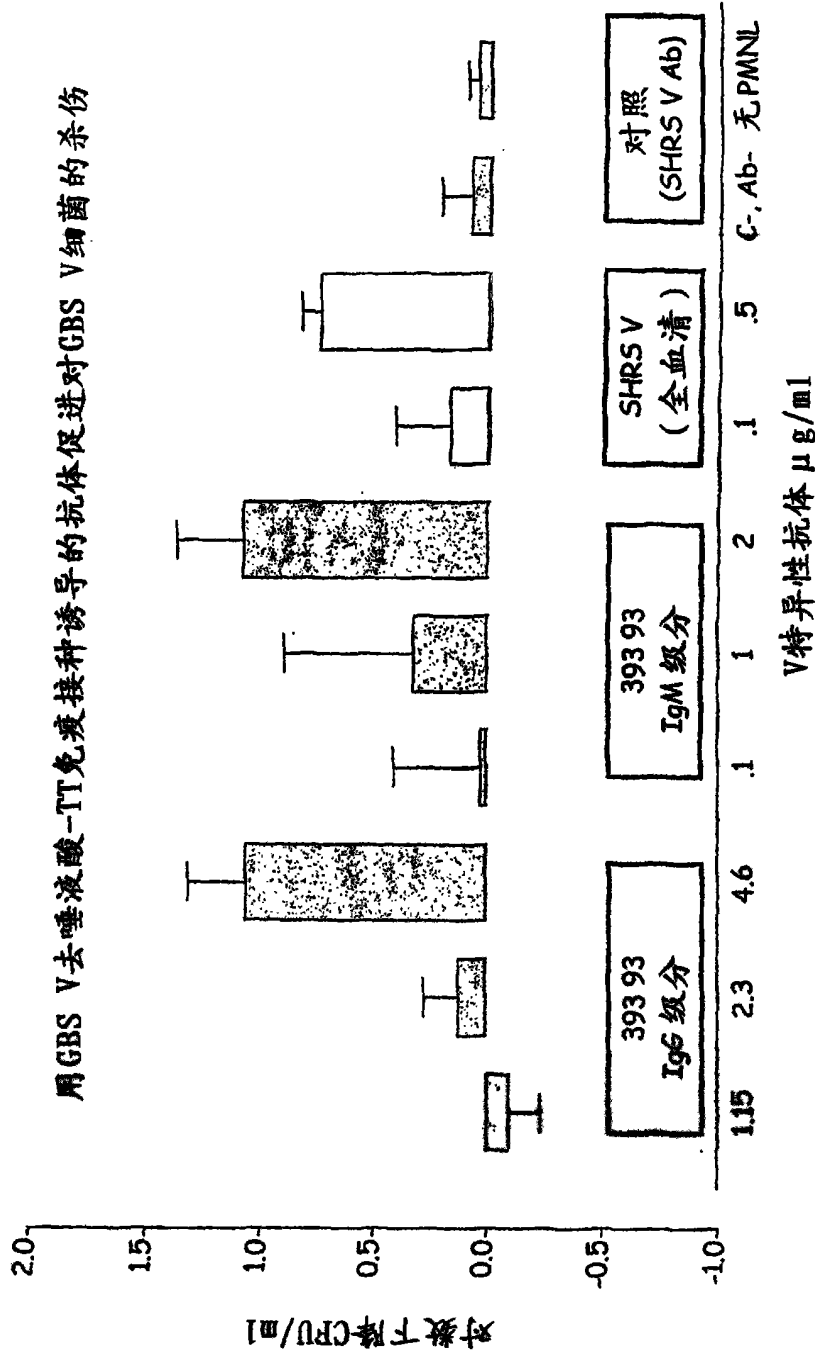


图26

V-TT 0.625 μ g PS无佐剂; V IgG反应

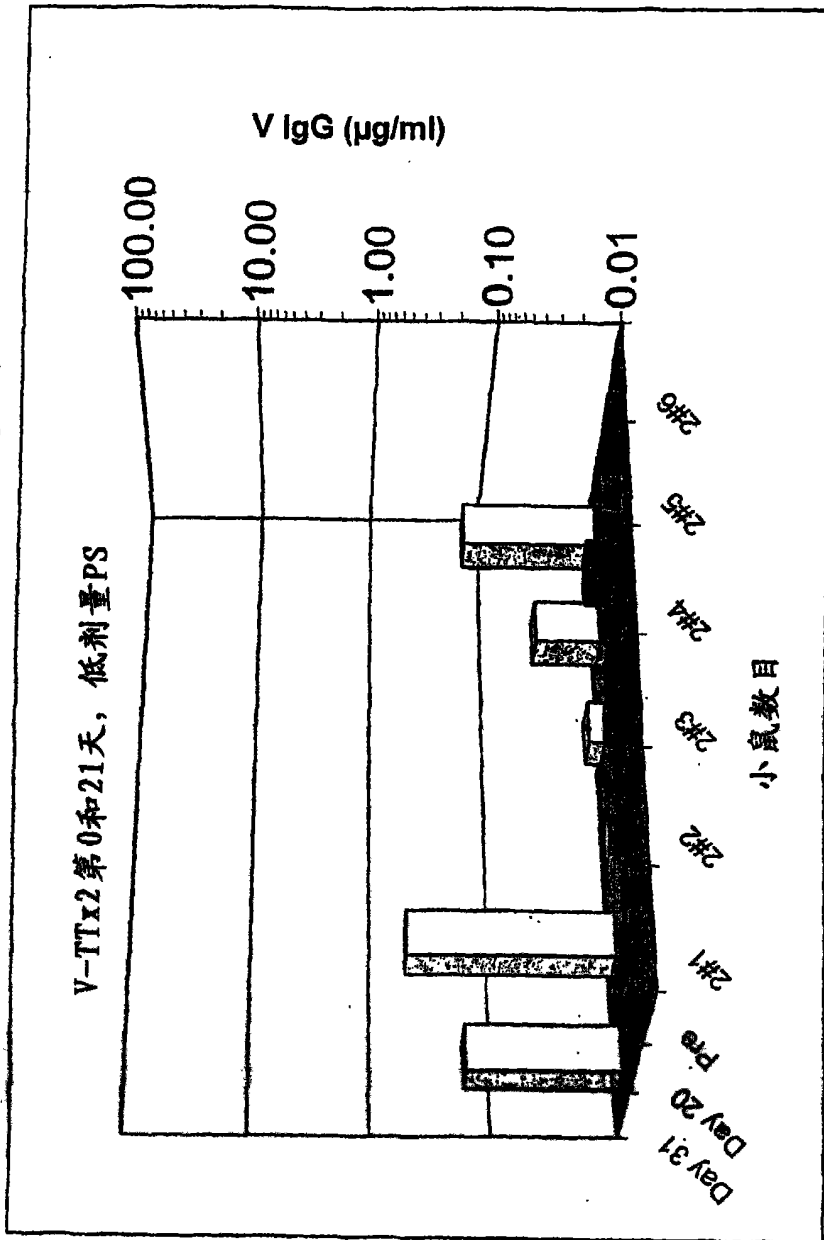


图 27A

V-TT 0.625 μ g PS明矾作为佐剂: V IgG反应

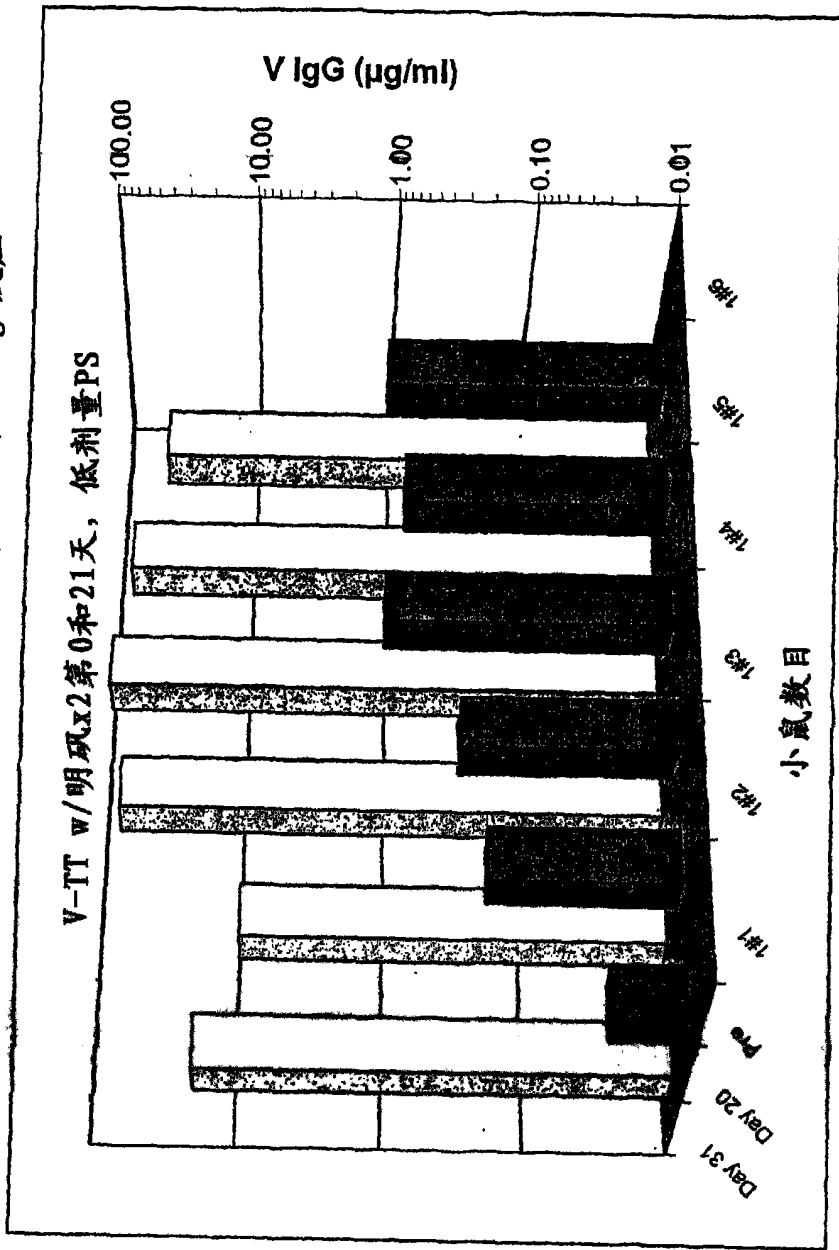


图 27B

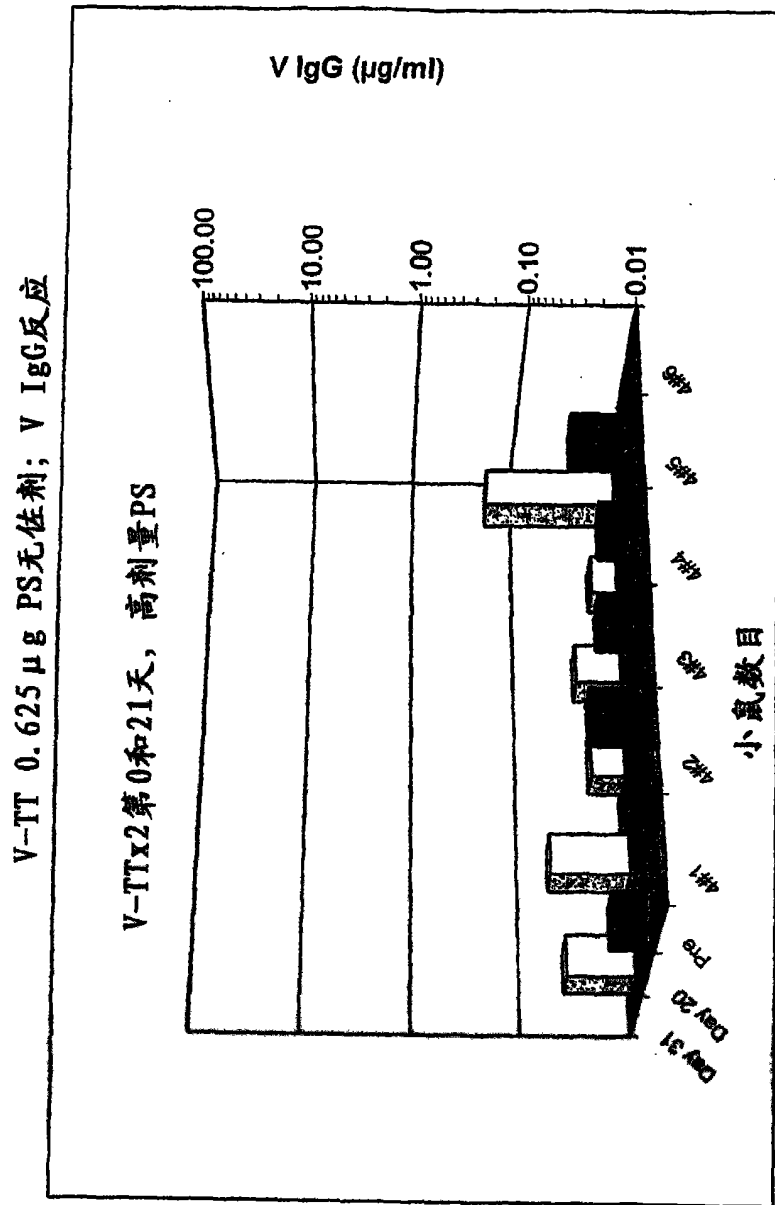


图27C

V-TT 6.25 μ B PS明矾作为佐剂: V IgG反应

V-TT w/明矾x2第0和21天, 高剂量PS

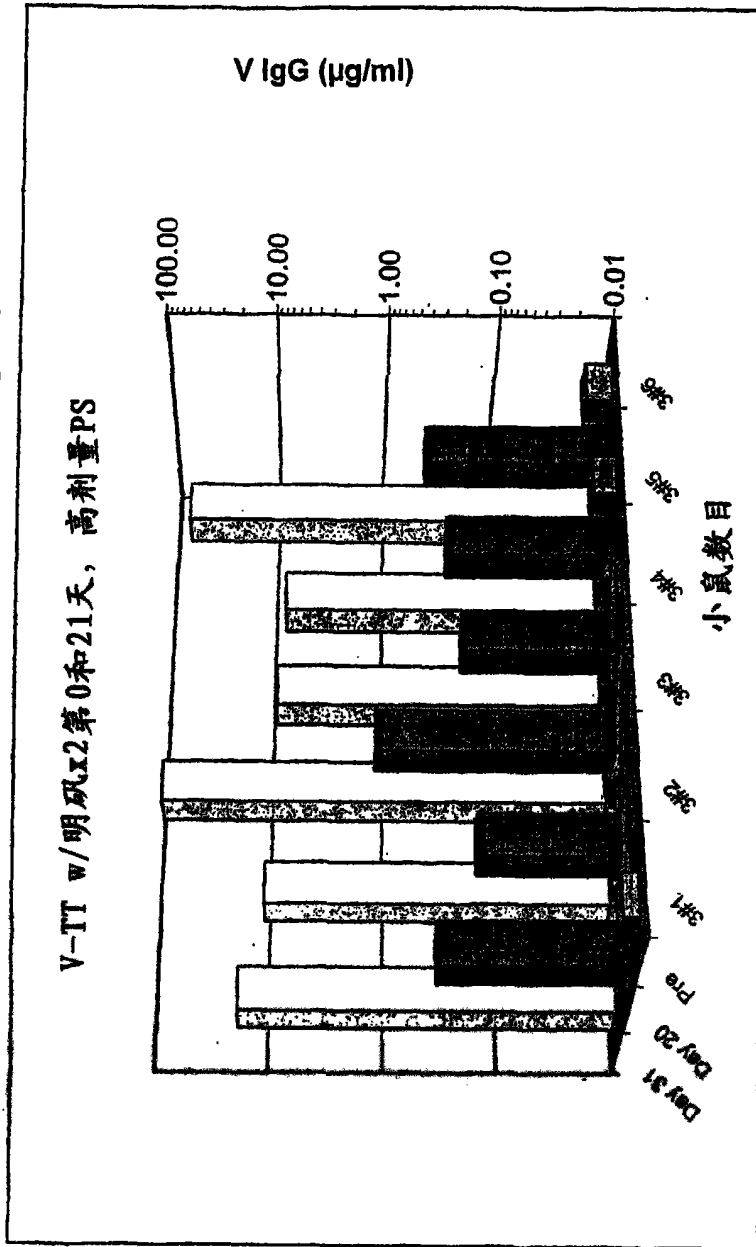


图27D