



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110179974 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 09

(21) 申请号 201910504933.7

(22) 申请日 2006.12.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110179974 A

(43) 申请公布日 2019.08.30

(30) 优先权数据

0526232.4 2005.12.22 GB

0607087.4 2006.04.07 GB

0607088.2 2006.04.07 GB

0609902.2 2006.05.18 GB

0620336.8 2006.10.12 GB

0620337.6 2006.10.12 GB

0620815.1 2006.10.19 GB

0620816.9 2006.10.19 GB

PCT/GB2006/004634 2006.12.12 GB

(62) 分案原申请数据

200680053139.6 2006.12.20

(73) 专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 R.L.比曼斯 N.M.-J.加孔

P.V.赫尔曼德 J.普尔曼

M.P.范梅歇伦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 任晓华 杨骥

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1635904 A, 2005.07.06

CN 1477970 A, 2004.02.25

CN 1668329 A, 2005.09.14

审查员 李紫嘉

权利要求书1页 说明书51页

序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

疫苗

(57) 摘要

本发明涉及包含多价肺炎链球菌疫苗的婴儿用免疫原性组合物在制备用于治疗或预防由肺炎链球菌感染引起的疾病的药物中的用途,所述多价肺炎链球菌疫苗包含12种来自血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜糖缀合物,其中所述组合物包含血清型22F糖缀合物,其中所述疾病是人类婴儿的中耳炎、脑膜炎、菌血症、肺炎和/或结膜炎,并且所述22F糖缀合物与CRM197或PhtD缀合,并且其他血清型与独立选自以下的载体蛋白缀合:TT、DT、CRM197、TT的C片段、PhtD、PhtDE融合体、去毒型肺炎球菌溶血素和D蛋白。

1. 包含多价肺炎链球菌疫苗的供0-2岁婴儿用免疫原性组合物在制备用于在0-2岁人类婴儿中刺激免疫应答的药物中的用途,所述多价肺炎链球菌疫苗包含13种来自血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F以及血清型22F的荚膜糖缀合物,并且所述22F糖缀合物是与CRM197或PhTD缀合,其中22F糖的平均大小 M_w 在50-800kDa之间,并且载体蛋白对22F糖的比例在4:1至1:1(w/w)之间,并且其他血清型与独立选自以下的载体蛋白缀合:TT、DT、CRM197、TT的C片段、PhTD、PhTDE融合体、去毒型肺炎球菌溶血素和D蛋白。

2. 权利要求1的用途,其中2种不同的载体蛋白分别与至少2种不同的肺炎链球菌荚膜糖血清型缀合。

3. 权利要求1-2中任一项的用途,其中22F荚膜糖通过接头与载体蛋白缀合。

4. 权利要求3的用途,其中所述接头是ADH。

5. 权利要求3的用途,其中所述接头通过碳二亚胺化学与载体蛋白连接。

6. 权利要求3的用途,其中使用CDAP化学,将糖22F与载体蛋白或与接头缀合。

7. 权利要求1的用途,所述免疫原性组合物包含22F糖缀合物,其中载体蛋白对22F糖的比例在2:1至1:1(w/w)之间。

8. 权利要求1的用途,所述免疫原性组合物包含22F糖缀合物,其中22F糖的平均大小高于100kDa。

9. 权利要求8的用途,其中所述22F糖的平均大小 M_w 在110-700kDa、110-300、120-200、130-180或150-170kDa之间。

10. 权利要求1的用途,所述免疫原性组合物还包含一种或多种未缀合型或缀合型肺炎链球菌蛋白。

11. 权利要求10的用途,其中所述一种或更多种肺炎链球菌蛋白选自:多组氨酸三联体家族(PhTX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、CbpX截短物、LytX家族、LytX截短物、CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白、去毒型肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125和Sp133。

12. 权利要求1的用途,所述免疫原性组合物还包含佐剂。

13. 权利要求1的用途,其中所述多价肺炎链球菌疫苗还包含药学上可接受的赋形剂。

疫苗

[0001] 本申请是申请日为2006年12月20日,申请号为200680053139.6的发明专利申请的申请号为201310036445.0分案申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及改进的肺炎链球菌疫苗。

背景技术

[0003] 不足2岁的儿童对大多数多糖疫苗不产生免疫应答反应,所以一直有必要通过与蛋白载体化学缀合而使多糖具有免疫原性。使作为胸腺不依赖抗原的多糖与作为胸腺依赖性抗原的蛋白偶联,赋予多糖胸腺依赖性特性,包括同种型转换、亲和力成熟和记忆诱导。

[0004] 然而,重复给予多糖-蛋白缀合物或者联合多糖-蛋白缀合物形成多价疫苗可能有问题。例如据报道,按照标准的婴儿免疫程序,,通过与破伤风类毒素(TT)(或无TT)和肺炎球菌多糖-TT缀合疫苗同时免疫接种用,对一定剂量范围的使用TT)作为蛋白载体的b型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)多糖(PRP)进行了测试。随着肺炎球菌疫苗剂量的增加,对Hib缀合疫苗PRP多糖部分的免疫应答则下降,这表明了可能通过使用相同的载体蛋白对该多糖有免疫干涉(Dagan等, *Infect immun.* (1998), 66:2093-2098)。

[0005] 还载证实体-蛋白的剂量针对该蛋白自身的体液应答的影响具有多面性。据报道,人类婴儿中增加四价破伤风类毒素缀合物的剂量导致对破伤风载体的应答被减弱(Dagan等,见上文)。对联合疫苗这些效果的典型分析已描述为载体诱导的表位阻抑,其仍没被完全了解,但据信归因于过量的载体蛋白(Fattom, *Vaccine* 17:126 (1999))。这似乎导致B细胞与载体蛋白、以及B细胞与多糖竞争Th细胞。如果B细胞相对于载体蛋白占优势,则没有足够的Th细胞可用来为对该多糖特异性的B细胞提供必要的帮助。然而,观测到的免疫效果与载体蛋白的总量是不一致的,在某些情况下提高免疫应答,而在其他情况下降低免疫应答。

[0006] 因此将多种多糖缀合物联合成为单一而有效的疫苗制剂在技术上仍存在困难。

[0007] 肺炎链球菌是革兰氏阳性细菌,可导致相当高的病死率(特别是在幼龄人和老年人中),并引起诸如肺炎、菌血症和脑膜炎的侵入性疾病以及诸如急性中耳炎的与建群相关的疾病。美国超过60岁的人患肺炎球菌肺炎的比例估计是每100,000人有3-8位。20%的病例中这导致菌血症和诸如脑膜炎的其他表现形式,即使使用了抗生素治疗,也有接近30%的死亡率。

[0008] 肺炎球菌包被有赋予血清型特异性的化学连接的多糖。有90种已知的肺炎球菌血清型,并且荚膜是肺炎球菌的主要毒力决定簇,因为荚膜不仅保护细菌的内表面免受补体作用,而且其自身的免疫原性差。多糖是胸腺不依赖性抗原,并且不能被加工或不能呈递到MHC分子上与T细胞相互作用。然而它们可以通过牵涉B细胞表面受体的交联的替代机制来刺激免疫系统。

[0009] 若干实验表明,抗侵入性肺炎球菌疾病的保护作用与对荚膜特异性的抗体最为相关,并且该保护作用是血清型特异性的。

[0010] 肺炎链球菌是婴幼儿中侵入性细菌性疾病和中耳炎的最为常见的病因。同样地,老年人对肺炎球菌疫苗产生的应答差[Roghmann等,(1987),J.Gerontol.42:265-270],因此这些人群中细菌性肺炎的发生率有所增加[Verghese和Berk,(1983) Medicine (Baltimore)62:271-285]。

[0011] 由肺炎链球菌引起的主要临床综合征在所有权威的医学教科书中被广泛地纳入并有论述(Fedson DS,Muscher DM.In:Plotkin SA,Orenstein WA编辑.Vaccine.第4版.PhiladelphiaWB Saunders Co,2004a:529-588)。例如,侵入性肺炎球菌性疾病(IPD)定义为:其中可从血液或其他正常无菌的部位分离到肺炎链球菌的任何感染(Musher DM Streptococcus pneumoniae(肺炎链球菌).载于Mandell GL,Bennett JE,Dolin R(编辑) Principles and Practice of Infectious diseases(第5版).New York,Churchill Livingstone,2001,p2128-2147)。慢性阻塞性肺病(COPD)被认为包括经常共存的若干病症(气道梗阻、慢性支气管炎、细支气管炎或小气道疾病和肺气肿)。患者的与气喘加剧相关的病症加重,并且经常咳嗽增加,可能出现粘液或脓痰(Wilson,Eur Respir J2001 17:995-1007)。生理上COPD定义为:慢性支气管炎和/或肺气肿患者中出现不可逆或部分可逆的气道梗阻(Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease(慢性阻塞肺病患者的诊断和护理标准).American Thoracic Society.Am J Respir Crit Care Med.1995Nov;152(5Pt 2):S77-121)。COPD的加重通常由细菌(例如肺炎球菌)感染引起(Sethi S,Murphy TF.Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000:a state-of-the-art review(2000年慢性阻塞性肺病中的细菌感染:本领域现状的综述).Clin Microbiol Rev.2001Apr;14(2):336-63)。

[0012] 因此本发明的目的是开发多价血清型肺炎链球菌多糖缀合疫苗的改进制剂。

附图说明

[0013] 图1条形图,显示在老龄恒河猴中11价缀合物的免疫原性(第二次接种后的抗PS IgG水平)。浅色条代表两次接种磷酸铝佐剂中的11价缀合物之后的GMC。深色条代表两次接种C佐剂中的11价缀合物之后的GMC。

[0014] 图2条形图,其显示在老龄恒河猴中缀合物的免疫原性(第二次接种后的抗PS3记忆B细胞频率),显示接种在C佐剂或磷酸铝佐剂中的11价缀合物之后的针对PS3的记忆B细胞。

[0015] 图3条形图,其显示Balb/C小鼠中PS19F免疫原性,显示对于4价无添加的多糖和4价dPly缀合物的Balb/C小鼠中抗19F多糖的免疫原性。

[0016] 图4条形图,其显示Balb/C小鼠中PS22F免疫原性,显示对于4价无添加的多糖和4价PhdD缀合物的Balb/C小鼠中的抗22F多糖的免疫原性。

[0017] 图5条形图,其显示血清抗PS IgG抗体水平,显示Balb/c小鼠中的抗22F IgG应答。

[0018] 图6条形图,显示Balb/c小鼠中抗22F的调理吞噬的效价。

[0019] 图7条形图,其显示用新佐剂诱导的IgG应答与用AlPO₄诱导的应答比较,显示比较

了免疫接种配制于不同佐剂中的13价缀合物疫苗之后,在幼龄C57B小鼠中诱导的IgG应答。

[0020] 图8条形图,其显示恒河猴中PhtD+dPly蛋白组合抗19F性肺部建群的保护效力,显示在猴肺炎模型中不同疫苗组合的保护功效。

[0021] 图9条形图,其显示血清抗PhtD IgG应答,显示免疫接种22F-PhtD或22F-AH-PhtD缀合物之后Balb/c小鼠中抗PhtD的IgG应答。

[0022] 图10免疫接种22F-PhtD或22F-AH-PhtD之后小鼠中抗4型肺炎球菌攻击的保护作用。

发明内容

[0023] 本发明提供了用于婴儿的免疫原性免疫原性组合物,所述组合物包含多价肺炎链球菌疫苗,所述多价肺炎链球菌疫苗包含2种或更多种(例如7、8、9、10、11、12、13、14、15种)来自不同血清型的荚膜糖缀合物,其中该组合物包含22F糖缀合物。

[0024] 尽管儿童期感染22F血清型的肺炎球菌并不非常普遍,但发明人认为,儿童期肺炎球菌疫苗中存在22F将有利于诱导该人群中的群体免疫,这致使可以预防由该血清型所引起的严重老年人疾病的发病或减轻其严重程度(例如肺炎和/或侵入性肺炎球菌疾病(IPD)和/或慢性阻塞性肺病(COPD)的病情加重)。对于本发明之目的,“使人类宿主免疫以对抗COPD的加重”或者“治疗或预防COPD加重”或者“降低COPD加重的严重程度”指的是降低COPD加重的发生率或比例(例如0.1、0.5、1、2、5、10、20%或更多的比例降低)或者降低如以上所定义的COPD加重的严重程度,例如在用本发明的组合物或疫苗免疫过的患者组内降低COPD加重的发生率或比例或者降低所述COPD加重的严重程度。

[0025] 因此在一个实施方案中,提供了预防老龄人类宿主患由22F血清型肺炎链球菌感染引起的肺炎球菌性疾病(或降低其严重程度)的方法,所述的方法包括对人类婴儿宿主(或婴儿人群)给予免疫保护剂量的本发明的免疫原性免疫原性组合物或疫苗。本发明的免疫原性组合物或疫苗在制备用于预防或减缓老龄人类患者中由22F血清型肺炎链球菌感染引起的疾病的严重程度的药物的应用,其中对人类婴儿(或婴儿人群)给予免疫保护剂量的所述组合物或疫苗。

[0026] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含来自19A和19F血清群的肺炎链球菌荚膜糖缀合物,任选地其中19A与第一细菌类毒素缀合,而19F与第二细菌类毒素缀合。

[0027] 术语荚膜糖包括:荚膜多糖和衍生自荚膜多糖的寡糖。寡糖含有至少4个糖残基。

[0028] 术语细菌类毒素包括:通过基因突变、化学处理或缀合而被灭活的细菌毒素。合适的细菌类毒素包括破伤风类毒素、白喉类毒素、百日咳类毒素、细菌溶细胞素或肺炎球菌溶血素。对降低肺炎球菌溶血素毒性的肺炎球菌溶血素(Ply)突变已有描述(WO 90/06951, W099/03884)。同样地,降低白喉毒素毒性的白喉毒素基因突变也是已知的(参见下文)。白喉毒素的基因去毒类似物包括CRM197和其他突变体,其描述于US 4,709,017、US 5,843,711、US 5,601,827和US5,917,017。CRM197是白喉毒素的无毒形式,但在免疫上无异于白喉毒素。CRM197由感染不产毒噬菌体 β 197tox的白喉棒杆菌(*C.diphtheriae*)产生,噬菌体 β 197tox通过亚硝基胍诱变产毒素carynephage b而产生(Uchida等Nature New Biology (1971)233;8-11)。CRM197蛋白具有与白喉毒素相同的分子量,但与白喉毒素不同的是结构基因中单个碱基改变。这导致第52位的氨基酸由甘氨酸转变为谷氨酰胺,该转变致使片段A

不能与NAD结合并因此而不具毒性 (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983p560-564)。

[0029] 第一细菌类毒素和第二细菌类毒素可以相同或不同。当第一细菌类毒素和第二细菌类毒素不同时,指的是它们具有不同的氨基酸序列。

[0030] 例如,19A和19F可以分别与以下毒素缀合:破伤风类毒素和破伤风类毒素;白喉类毒素和白喉类毒素;Crm197和CRM197,肺炎球菌溶血素,肺炎球菌溶血素;破伤风类毒素和白喉类毒素;破伤风类毒素和CRM197;破伤风类毒素和肺炎球菌溶血素;白喉类毒素和破伤风类毒素;白喉类毒素和CRM197,白喉类毒素和肺炎球菌溶血素;CRM197和破伤风类毒素,CRM197和白喉类毒素;CRM197和肺炎球菌溶血素;肺炎球菌溶血素和破伤风类毒素;肺炎球菌溶血素和白喉类毒素;或肺炎球菌溶血素CRM197。

[0031] 在一个实施方案中,除了包含22F(且可以任选包含19A和19F)的肺炎链球菌糖缀合物之外,免疫原性组合物还包含肺炎链球菌的4、6B、9V、14、18C和23F荚膜糖缀合物。

[0032] 在一个实施方案中,除了包含22F(且可以任选包含19A和19F)的肺炎链球菌糖缀合物之外,免疫原性组合物还包含肺炎链球菌的1、4、5、6B、7F、9V、14、18C和23F荚膜糖缀合物。

[0033] 在一个实施方案中,除了包含22F(且可以任选包含19A和19F)的肺炎链球菌糖缀合物之外,免疫原性组合物还包含肺炎链球菌的1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F和23F荚膜糖缀合物。

[0034] 在一个实施方案中,除了包含22F(且可以任选包含19A和19F)的肺炎链球菌糖缀合物之外,免疫原性组合物还包含肺炎链球菌的1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F和23F荚膜糖缀合物。

[0035] 在一个实施方案中,除了包含22F(且可以任选包含19A和19F)的肺炎链球菌糖缀合物之外,免疫原性组合物还包含肺炎链球菌的1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、22F和23F荚膜糖缀合物。

[0036] 本发明的肺炎链球菌疫苗通常将包含荚膜糖抗原(优选缀合的荚膜糖抗原),其中该糖衍生自至少十种肺炎链球菌血清型。肺炎链球菌荚膜糖的数量可以从10种不同血清型(或“V”价)到23种不同血清型(23V)。在一个实施方案中,有10、11、12、13、14或15种不同的血清型。本发明的另一个实施方案中,该疫苗可以包含缀合型肺炎链球菌糖和未缀合型肺炎链球菌糖。优选糖血清型的总数少于或等于23种。例如,本发明可以包含10种缀合的血清型和13种不缀合的糖。类似地,该疫苗可以包含11、12、13、14或16种缀合型糖和分别包含12、11、10、9或7种未缀合型糖。

[0037] 在一个实施方案中,本发明的多价肺炎球菌疫苗将选自以下血清型:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F,尽管人们会认识到可以根据疫苗受者的年龄和将施用疫苗的地理位置而用一种或两种其他血清型代替。例如,10价疫苗可包含来自血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F的多糖。11价疫苗还可以包含来自血清型3的糖。12或13价儿科用(婴儿用)疫苗同样可以包括补充了以下血清型的所述10或11价制剂:6A和19A、6A和22F、19A和22F、6A和15B、19A和15B、或者22F和15B;而13价老年人疫苗可以包括补充了以下血清型的所述11价制剂:19A和22F、8和12F、8和15B、8和19A、8和22F、12F和15B、12F和19A、12F和22F、15B和19A、或者15B和22F。14价儿科

疫苗可以包括补充了以下血清型的前文描述的10价制剂：血清型3、6A、19A和22F；血清型6A、8、19A和22F；血清型6A、12F、19A和22F；血清型6A、15B、19A和22F；血清型3、8、19A和22F1；血清型3、12F、19A和22F；血清型3、15B、19A和22F；血清型3、6A、8和22F；血清型3、6A、12F和22F；或者血清型3、6A、15B和22F。

[0038] 在一个实施方案中，该组合物包括来源于血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F的荚膜糖（优选缀合型）。本发明的又一个实施方案中，包括了至少11种（价）糖抗原（优选缀合型），例如来源于血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F的荚膜糖。本发明的再一实施方案中，包含至少12或13种（价）糖抗原，例如疫苗可以包含来源于血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜糖，或者来源于血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F和23F的荚膜糖，尽管本发明还包括糖抗原，例如23价的糖抗原（如血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F）。

[0039] 本发明的疫苗可以包含来自流感嗜血杆菌的蛋白（PD）（参见例如EP 0594610）。流感嗜血杆菌是引起中耳炎的关键致病生物体，本发明人已表明，包含此蛋白于肺炎链球菌疫苗中将会提供一定水平的抗流感嗜血杆菌相关性中耳炎的保护作用（参考POET publication（出版物））。在一个实施方案中，疫苗组合物包含D蛋白。一方面，PD作为一种或更多种糖的载体蛋白存在。另一方面，D蛋白可以作为游离蛋白在疫苗组合物中存在。又一方面，D蛋白可以既作为载体蛋白又作为游离蛋白存在。D蛋白可以全长蛋白或者片段使用（W00056360）。再一方面，D蛋白作为大多数糖的载体蛋白存在，例如6、7、8、9或更多种糖可以与D蛋白缀合。在此方面，D蛋白同样可以作为游离蛋白存在。

[0040] 本发明疫苗包含一种、两种或更多种不同类型的载体蛋白。每种类型的载体蛋白可以用作不止一种糖的载体，其中所述糖可以相同或不同。例如，血清型3和4可以与相同的载体蛋白缀合，或者与载体蛋白的相同分子或与相同载体蛋白的不同分子缀合。在一个实施方案中，两种或更多种不同的糖可以与相同的载体蛋白缀合，或者与载体蛋白的相同分子或与相同载体蛋白的不同分子缀合。

[0041] 本发明免疫原性组合物中存在的任何肺炎链球菌荚膜糖可以与独立选自以下的载体蛋白缀合：TT、DT、CRM197、TT的C片段、PhtD、PhtDE融合体（特别是描述于W0 01/98334和W0 03/54007中的融合体）、去毒型肺炎球菌溶血素和D蛋白。可以用于本发明的缀合物的蛋白载体的更详尽清单于下文给出。

[0042] 本发明免疫原性组合物中存在的缀合物中的与一种或更多种肺炎链球菌荚膜糖缀合的载体蛋白，任选是多组氨酸三联体家族（Pht, polyhistidine triad family）蛋白成员、其片段或其融合蛋白中的成员。PhtA蛋白、PhtB蛋白、PhtD蛋白或PhtE蛋白的氨基酸序列可以与公开于W0 00/37105或W0 00/39299的序列（例如对于PhtD蛋白，与W0 00/37105的SEQ ID NO:4的氨基酸序列第1-838位或者第21-838位）有80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的同一性。例如，融合蛋白由PhtA蛋白、PhtB蛋白、PhtD蛋白和PhtE蛋白中的2、3或4种的全长或者片段组成。融合蛋白的实例是PhtA/B、PhtA/D、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/D、PhtB/E、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/E、PhtE/A、PhtE/B和PhtE/D，其中这些蛋白与肺炎链球菌荚膜糖在N-末端连接（参见例如W001/98334）。

[0043] 当使用Pht蛋白的片段（分别使用或作为融合蛋白的一部分使用）时，每个片段任选包含一个或更多个组氨酸三联体模体（histidine triad motif）和/或这些多肽的卷曲

螺旋区。组氨酸三联体模体是具有HxxHxH序列的多肽的一部分,其中H是组氨酸,而x是非组氨酸的氨基酸。卷曲螺旋区是由“Coils”算法(Lupus,A等(1991) Science 252;1162-1164)预测的区域。在一个实施方案中,该片段或个种片段既包含一个或更多个组氨酸三联体模体又包含至少一个卷曲螺旋区。在一个实施方案中,该片段或每个片段包含恰好或至少2、3、4或5个组氨酸三联体模体(任选在两个或更多个三体之间包含天然Pht序列,或者包含与天然肺炎球菌三体内Pht序列(intra-triad sequence)有超过50、60、70、80、90或100%相同的三体内序列—例如示于WO 00/37105中SEQ ID NO:4的PhtD的三体内序列)。在一个实施方案中,该片段或每个片段包含恰好或至少2、3或4个卷曲螺旋区。在一个实施方案中,于此公开的PhtD蛋白包含:连接了信号序列的全长蛋白、移除了信号肽(例如N-末端的20个氨基酸)的全长成熟蛋白、Pht蛋白的天然变异体以及Pht蛋白的免疫原性片段(例如如前文描述的片段或者包含W000/37105或W000/39299的氨基酸序列中至少15或20个连续氨基酸的多肽,其中所述多肽能够诱导针对W000/37105或W000/39299中所述氨基酸序列的特异性免疫应答反应)。

[0044] 详细地讲,在此使用的术语“PhtD”包括:连接了信号序列的全长蛋白、移除了信号肽(例如N-末端的20个氨基酸)的全长成熟蛋白、Pht蛋白的天然变异体以及Pht的免疫原性片段(例如如前文描述的片段或者包含W000/37105或W000/39299的氨基酸序列中至少15或20个连续氨基酸的多肽,其中所述多肽能够诱导针对W000/37105或W000/39299中的所述PhtD的氨基酸序列(例如对于PhtD而言,W000/37105中的SEQ ID NO:4)的特异性免疫应答反应。

[0045] 如果组合物中2种或更多种糖的蛋白载体是相同的,那么所述糖可以与蛋白载体(缀合了2种以上不同糖的载体分子)的相同分子缀合[参见例如WO 04/083251]。或者,这些糖可以各自分别与蛋白载体(其每个分子只缀合了一种类型糖的蛋白载体)的不同分子缀合。

[0046] 可用于本发明的载体蛋白的实例是DT(白喉类毒素)、TT(破伤风类毒素)或TT的C片段、DT CRM197(DT突变体);其他DT点突变体,如CRM176、CRM228、CRM 45(Uchida等J.Biol.Chem.218;3838-3844,1973)、CRM 9、CRM 45、CRM102、CRM 103和CRM107;以及由Nicholls和Youle描述于Genetically Engineered Toxins(基因工程毒素),Frankel编辑,Maecel Dekker Inc,1992的其它突变;Glu-148缺失或突变成Asp、Gln或Ser和/或Ala 158缺失或突变成Gly和公开于US 4709017或US 4950740的其他突变;Lys 516、Lys 526、Phe 530和/或Lys 534残基中的至少一个或更多个残基的突变以及公开于US5917017或US 6455673的其他突变;或者公开于US 5843711的片段、肺炎球菌的肺炎球菌溶血素(Kuo等(1995) Infect Immun63;2706-13),所述肺炎球菌的肺炎球菌溶血素包括:通过某种形式去毒的ply例如dPLY-GMBS(WO 04081515,PCT/EP2005/010258)或者dPLY-formol,包括PhtA、PhtB、PhtD、PhtE的PhtX以及Pht蛋白的融合体,例如PhtDE融合体、PhtBE融合体(WO 01/98334和WO 03/54007)、(Pht A-E于下文有更详细的描述) OMPC(脑膜炎球菌外膜蛋白,通常从脑膜炎奈瑟氏球菌(N.meningitidis) B血清群中提取,EP0372501)、PorB(来自脑膜炎奈瑟氏球菌)、PD(流感嗜血杆菌D蛋白,参见例如EP 0594610B)、或其免疫功能等同物、合成肽(EP0378881、EP0427347)、热休克蛋白(WO 93/17712、W094/03208)、百日咳蛋白(W098/58668、EP0471177)、细胞因子、淋巴因子、生长因子或激素(WO 91/01146);人工蛋白,所述

人工蛋白包括多种来自各种病原体来源的抗原的人CD4+T细胞表位 (Falugi等 (2001) Eur J Immunol 31;3816-3824), 例如N19蛋白 (Baraldoi等 (2004) Infect Immun 72;4884-7)、肺炎球菌表面蛋白PspA(WO 02/091998)、铁摄取蛋白(WO 01/72337)、艰难梭菌(C.difficile)的毒素A或B(WO 00/61761)。

[0047] Nurkka等Pediatric Infectious Disease Journal.23(11):1008-14,2004Nov. 描述了具有与PD缀合的所有血清型的11价肺炎球菌疫苗。然而,本发明人已表明:与具有和PD缀合的19F的缀合物比较,对于用具有和DT缀合的19F的缀合物诱导的抗体而言,调理吞噬活性得到改进。此外,本发明人已表明,用与DT缀合的19F,可以看到对19A有更强的交叉反应性。因此本发明组合物的特征是血清型19F与细菌类毒素缀合,细菌类毒素例如为TT、肺炎球菌溶血素、DT或者CRM 197。一方面,血清型19F与DT缀。本发明的另一个特征是血清型19A与细菌类毒素例如TT、肺炎球菌溶血素、DT或CRM 197缀合。免疫原性组合物的其余糖血清型可以与一种或更多种非DT的载体蛋白缀合(即只有19F与DT缀合),或者可以在一种或更多种非DT的和DT自身的载体蛋白之间分摊。在一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而所有其余血清型与PD缀合。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而其余血清型在PD与TT或DT或CRM 197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,而只是一种糖与TT缀合。此实施方案的一方面,所述一种糖是18C或12F。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而只是两种糖与TT缀合。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而其余血清型在PD、TT and DT或CRM 197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而其余血清型在PD、TT和肺炎球菌溶血素之间之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM 197缀合,而其余血清型在PD、TT和CRM 197之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,而其余血清型在之间PD、TT、肺炎球菌溶血素和任选的PhtD或PhtD/E融合蛋白之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎球菌溶血素或TT缀合,而其余血清型在PD、TT、肺炎球菌溶血素和任选的PhtD或PhtD/E融合蛋白之间分摊。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎球菌溶血素或TT缀合,再一种糖与TT缀合,再一种糖PhtD或PhtD/E与缀合,并且所有另外的糖与PD缀合。在又一个实施方案中,19F与DT或CRM197缀合,19A与肺炎球菌溶血素缀合,再一种糖与TT缀合,再一种糖与肺炎球菌溶血素缀合,另外2种糖与PhtD或PhtD/E缀合,而所有其他糖与PD缀合。

[0048] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自流感嗜血杆菌的D蛋白。在此实施方案中,如果PD不是用于与任何非19F的糖缀合的载体蛋白之一(例如19F与DT缀合),同时其他的血清型与一种或更多种不同的非PD的载体蛋白缀合,那么PD将会作为游离蛋白存在于疫苗组合物中。如果PD是用于与任何非19F的糖缀合的载体蛋白之一,那么PD可以任选地作为游离蛋白存在于疫苗组合物中。

[0049] 整篇说明书中的术语“糖”可以指多糖或寡糖,并且包括这两者。通过已知的方法(参见例如EP497524和EP497525),优选通过微流化,可以使多糖从细菌中分离并将其大小调整(sized)到某种程度。可以调整多糖的大小以降低多糖样品中的粘度和/或以改进缀合产物的过滤性。寡糖具有少数的重复单元(一般为5-30个重复单元),并且一般是经水解的多糖。

[0050] 肺炎链球菌的荚膜多糖包含可含多至8个糖残基的重复寡糖单元。有关关键肺炎链球菌血清型的寡糖单元的综述参见JONES,Christopher.Vaccine based on the cell

surface carbohydrates of pathogenic bacteria(基于致病细菌细胞表面糖类的疫苗).An.Acad.Bras.*Ciênc.*,June 2005,vol.77,no.2,p293-324.ISSN 0001-3765。在一个实施方案中,荚膜糖抗原可以是全长多糖;然而在其他实施方案中,它可以是一个寡糖单元,或者比重寡糖单元的天然长度的糖链更短。在一个实施方案中,疫苗中存在的所有糖都是多糖。全长多糖可以经“大小调整”,例如它们的大小可以通过各种方法缩减,例如通过酸解处理、过氧化物处理、通过emulsiflex®随后通过过氧化物处理以产生寡糖片段从而调整其大小,或者通过微流化(microfluidization)。

[0051] 本发明人同样已经注意到,本领域中焦点一直是使用寡糖以易于进行缀合物生产。本发明人已发现,通过使用天然的或略经大小改变的多糖缀合物,可实现以下的一种或更多种优点:1)可过滤的高免疫原性缀合物,2)可以改变缀合物中多糖对蛋白的比例,致使缀合物中多糖对蛋白的比例(w/w)可以得到提高(这可能对载体阻抑效应应有影响),3)易于水解的免疫原性缀合物通过使用更大糖进行缀合而得以稳定。使用更大的多糖可以导致与缀合载体有更多交联并且可以减少游离糖从缀合物中释放。现有技术所描述的缀合疫苗倾向于在缀合之前解使多糖聚合以改进缀合。本发明人已经发现,保留了更大的糖的缀合疫苗可以提供对抗肺炎球菌疾病的良好免疫应答。

[0052] 因此本发明的免疫原性组合物可以包含一种或更多种糖缀合物,其中缀合前每种糖的平均大小(例如重均分子量; M_w)高于80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa或1000kDa。在一个实施方案中,一种或更多种本发明的糖缀合物应该具有缀合前平均大小为50-1600、80-1400、100-1000、150-500或200-400kDa的糖(请注意,其中平均大小是 M_w ,‘kDa’单位于此应当用‘ $\times 10^3$ ’代替)。在一个实施方案中,缀合后的缀合物应该容易通过0.2微米的过滤器过滤,致使与过滤前的样品相比,过滤后获得高于50、60、70、80、90或95%的产率。

[0053] 对于本发明的目的,“天然多糖”指的是未经加工(例如纯化后)的糖,所述加工的目的是为了调整糖的大小。在正常的纯化程序期间多糖的大小可以略微调整。这种糖仍是天然的。仅当用调整大小的技术处理多糖时,所述多糖才被认为不是天然的。

[0054] 对于本发明的目的,“大小调整多至 $\times 2$ ”是指使糖经过意图缩减糖的大小但保留超过天然多糖的一半大小的加工。 $\times 3$ 、 $\times 4$ 等可以同样的方式解释,即使糖经过意图缩减糖的大小但保留超过天然多糖的1/3或1/4等大小的加工。

[0055] 本发明的一个方面,免疫原性组合物包含与载体蛋白缀合的、来自至少10种血清型的肺炎链球菌糖,其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9种或每种肺炎链球菌糖是天然多糖。

[0056] 本发明的一个方面,免疫原性组合物包含与载体蛋白缀合的、来自至少10种血清型的肺炎链球菌糖,其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9种或每种肺炎链球菌糖的大小调整多至 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或者 $\times 10$ 。在这个方面的一个实施方案中,大部分糖,例如6、7、8或更多种糖的大小调整多至 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或者 $\times 10$ 。

[0057] 糖的分子量或平均分子量(或大小)于此指的是在缀合之前检测的糖的重均分子量(M_w)并用MALLS检测。

[0058] MALLS技术是本领域所熟知的,并且通常按照实施例2所描述的来实施。对于肺炎链球菌糖的MALLS分析,可以联用两个柱(TSKG6000和5000PWx1)并用水洗脱糖。糖使用光散射检测器(例如配备了10mW氩激光器的Wyatt Dawn DSP,于488nm检测)和干涉仪折射计

(inferometric refractometer) (例如配备了P100和红光过光器的Wyatt Otilab DSP,于498nm检测)。

[0059] 在一个实施方案中,肺炎链球菌糖是天然多糖或者在常规提取过程中经大小调整的天然多糖。

[0060] 在一个实施方案中,肺炎链球菌糖通过机械剪切,例如通过微流化或超声处理来缩减。微流化和超声处理的优点是降低较大的天然多糖的大小,以足够提供可过滤的缀合物。大小调整不多于 $\times 20$ 、 $\times 10$ 、 $\times 8$ 、 $\times 6$ 、 $\times 5$ 、 $\times 4$ 、 $\times 3$ 或 $\times 2$ 。

[0061] 在一个实施方案中,免疫原性组合物包含肺炎链球菌缀合物,所述肺炎链球菌缀合物由天然多糖和大小被调整不多于 $\times 20$ 的糖的混合物制成。此实施方案的一方面,大多数糖,例如6、7、8或更多种糖的大小被调整多至 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 或者 $\times 6$ 。

[0062] 在一个实施方案中,肺炎链球菌糖通过接头(linker),例如双功能接头,与载体蛋白缀合。接头任选是异双功能或者同双功能性的,具有例如活性氨基和活性羧酸基、2个活性氨基或两个活性羧酸基。接头具有例如4-20、4-12、5-10个碳原子。一个可能的接头是ADH。其他接头包括B-丙酰氨基(WO 00/10599)、硝基苯乙胺(Gever等(1979) Med.Microbiol.Immunol.165;171-288)、卤代烷基卤(US4057685)、糖苷键(US4673574、US4808700)、己二胺和6-氨基己酸(US4459286)。在一个实施方案中,使用ADH作为接头用于缀合来自血清型18C的糖。在一个实施方案中,使用ADH作为接头用于缀合来自血清型22F的糖。

[0063] 本发明免疫原性组合物中存在的糖缀合物可以通过任何已知的偶联技术制备。缀合方法可以依靠用四氟硼酸1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓(CDAP)来活化糖从而形成氰酸酯。因此活化的糖可以直接或通过间隔物(接头)基团与载体蛋白上的氨基缀合。例如,间隔物可以是肼胺或半肼胺,以产生硫醇化(thiolated)多糖,后者可以通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如使用GMBS)或与卤代乙酰化载体蛋白(例如使用碘乙酰亚胺[例如乙基碘乙酰亚胺HC1]或溴乙酸N-丁二酰亚胺基酯或SIAB、或SIA、或SBAP)反应后获得的硫醚键,与载体偶联。优选该氰酸酯(任选通CDAP化学制备的)与己二胺或ADH偶联,并且氨基衍生化的糖使用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学通过蛋白载体上的羧基与载体蛋白缀合。这些缀合物描述于PCT公开说明书W093/15760Uniformed Services University和W0 95/08348和W096/29094中。

[0064] 其他合适的技术使用碳二亚胺、酰肼、活化酯、降冰片烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多技术描述于WO 98/42721中。缀合可以牵涉羰基接头,其可以通过糖游离羟基与CDI反应(Bethell等J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4、Hearn等J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18),随后与蛋白反应形成氨基甲酸酯键而形成。这可以牵涉还原异头末端成为伯羟基,任选牵涉伯羟基与CDI的反应而对伯羟基保护/去保护,以形成CDI氨基甲酸酯中间体,并使该CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基偶联。

[0065] 缀合物同样可以通过如US 4365170 (Jennings)和US 4673574 (Anderson)所描述的直接还原性胺化方法制备。其他方法描述于EP-0-161-188、EP-208375和EP-0-477508。

[0066] 又一方法包括用己二酸二酰肼(ADH)衍生化的经溴化氢(或CDAP)活化的糖通过碳二亚胺缩合(Chu C.等Infect. Immunity, 1983 245-256),例如使用EDAC,与蛋白载体偶联。

[0067] 在一个实施方案中,糖上的羟基(优选活化的羟基,例如经活化以形成氰酸酯的羟

基[例如用CDAP])与蛋白上的氨基或羧基直接或间接地(通过接头)连接。当存在接头时,糖上的羟基优选与接头上的氨基连接,例如通过使用CDAP缀合连接。接头(例如ADH)中的另一氨基可以与蛋白上的羧酸基缀合,例如通过使用碳二亚胺化学法,例如通过使用EDAC来缀合。在一个实施方案中,在接头与载体蛋白缀合之前,首先将肺炎球菌荚膜糖与接头缀合。或者接头可以在与糖缀合之前,先与载体缀合。

[0068] 同样可以使用技术的组合,某些糖-蛋白缀合物通过CDAP制备,而某些则通过还原胺化制备。

[0069] 一般来说,蛋白载体上的以下类型的化学基团可以用于偶联/缀合:

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

[0071] B) 氨基(例如通过赖氨酸)。在一个实施方案中,该基团与糖上的羧基直接连接,或者用碳二亚胺化学(例如用EDAC)与接头上的羧基连接。在另一个实施方案中,该基团与糖上的用CDAP或CNBr活化的羟基直接连接;与接头上的这些基团连接;与带有醛基的糖或接头连接;或者与带有丁二酰亚胺酯基的糖或接头连接。

[0072] C) 巯基(例如通过半胱氨酸)。在一个实施方案中,用马来酰亚胺化学,使该基团与溴乙酰化或卤乙酰化的糖或接头连接马来酰亚胺。在一个实施方案中,该基团用双重氮对二氨基联苯(bis diazobenzidine)活化/修饰。

[0073] D) 羟基(例如通过酪氨酸)。在一个实施方案中,该基团用双重氮对二氨基联苯活化/修饰。

[0074] E) 咪唑基(例如通过组氨酸)。在一个实施方案中,该基团用双重氮对二氨基联苯活化/修饰。

[0075] F) 胍基(例如通过精氨酸)。

[0076] G) 吡啶基(例如通过色氨酸)。

[0077] 一般来说,以下糖上的基团可以用于偶联:OH、COOH或NH₂。可以在本领域已知的不同处理后产生醛基,所述处理例如有高碘酸盐或酯、酸解、过氧化氢等。

[0078] 直接偶联法:

[0079] 糖-OH+CNBr或CDAP--->氰酸酯+NH₂-Prot--->缀合物

[0080] 糖-醛+NH₂-Prot--->席夫碱+NaCNBH₃--->缀合物

[0081] 糖-COOH+NH₂-Prot+EDAC--->缀合物

[0082] 糖-NH₂+COOH-Prot+EDAC--->缀合物

[0083] 通过间隔物(接头)间接偶联法:

[0084] 糖-OH+CNBr或CDAP--->氰酸酯+NH₂----NH₂---->糖----NH₂+COOH-Prot+EDAC----->缀合物

[0085] 糖-OH+CNBr或CDAP---->氰酸酯+NH₂----SH---->糖----SH+SH-Prot(带外露的半胱氨酸或通过例如SPDP修饰蛋白的氨基而获得的天然蛋白)--->糖-S-S-Prot

[0086] 糖-OH+CNBr或CDAP--->氰酸酯+NH₂----SH----->糖----SH+马来酰亚胺-Prot(修饰氨基)--->缀合物

[0087] 糖-OH+CNBr或CDAP--->氰酸酯+NH₂-----SH---->糖-SH+卤乙酰化-Prot---->缀合物

[0088] 糖-COOH+EDAC+NH₂----NH₂--->糖-----NH₂+EDAC+C₆H₅-Prot--->缀合物

[0089] 糖-COOH+EDAC+NH₂----SH--->糖-----SH+SH-Prot (带外露的半胱氨酸或通过例如SPDP修饰蛋白的氨基而获得的天然蛋白) --->糖-S-S-Prot

[0090] 糖-COOH+EDAC+NH₂----SH--->糖---SH+马来酰亚胺-Prot (修饰氨基) --->缀合物

[0091] 糖-COOH+EDAC+NH₂---SH--->糖-SH+卤乙酰化-Prot--->缀合物

[0092] 糖-醛+NH₂-----NH₂--->糖---NH₂+EDAC+C₆H₅-Prot--->缀合物

[0093] 注意:可以使用任何合适的碳二亚胺代替前文的EDAC。

[0094] 总之,一般可以用于与糖偶联的蛋白载体化学基团的类型是氨基(例如赖氨酸残基上的)、C₆H₅基团(例如天冬氨酸和谷氨酸残基上的)和SH基团(若可及的话)(例如半胱氨酸残基上的)。

[0095] 优选载体蛋白对肺炎链球菌糖之比在1:5和5:1之;例如1:0.5-4:1、1:1-3.5:1、1.2:1-3:1、1.5:1-2.5:1,例如1:2-2.5:1;1:1-2:1(w/w)。在一个实施方案中,大多数的缀合物,例如6、7、8、9或更多种缀合物的载体蛋白对糖的比例高于1:1,例如1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1或1.6:1。

[0096] 在一个实施方案中,可以用CDAP和EDAC通过接头使至少一种肺炎链球菌糖与载体蛋白缀合。例如,可以使用CDAP和EDAC如前文所描述,通过接头(例如末端带有两个胍基的接头,例如ADH)使18C或22F与蛋白缀合。使用接头时,CDAP可以用于使糖与接头缀合,而EDAC然后可以用于使该接头与蛋白缀合;或者,可以首先用EDAC使接头与蛋白缀合,之后可以用CDAP使接头与糖缀合。

[0097] 一般来说,本发明的免疫原性组合物可以包含0.1-20μg、1-10μg或1-3μg糖的剂量的每种糖缀合物。

[0098] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含剂量为0.1-20μg、0.5-10μg、0.5-5μg或1-3μg糖的每种肺炎链球菌荚膜糖。在一个实施方案中,荚膜糖可以以不同的剂量存在,例如某些荚膜糖可以以1μg的精确剂量存在,或者某些荚膜糖可以以3μg的精确剂量存在。在一个实施方案中,来自血清型3、18C和19F(或4、18C和19F)的糖以比其他糖更高的剂量存在。此实施方案的一方面,血清型3、18C和19F(或者4、18C和19F)以3μg的精确或大约剂量存在,同时免疫原性组合物中的其他糖以1μg的精确或大约剂量存在。

[0099] 对于本发明的目的而言,“大约”或“左右”定义为在给定数值上下10%的范围内。

[0100] 在一个实施方案中,至少一种肺炎链球菌荚膜糖与载体蛋白直接缀合(例如使用前文描述的化学之一);优选至少一种肺炎链球菌荚膜糖通过CDAP直接缀合。在一个实施方案中,大多数的荚膜糖,例如5、6、7、8、9或更多种荚膜糖,直接通过CDAP与载体蛋白连接(参见WO 95/08348和WO 96/29094)。

[0101] 免疫原性组合物可以包含肺炎链球菌蛋白,于此称为本发明的肺炎链球菌蛋白。这些蛋白可以作为载体蛋白使用,或可以作为游离蛋白存在,或可以既作为载体蛋白又作为游离蛋白存在。本发明的肺炎链球菌蛋白要么表面外露,至少是在肺炎球菌的部分生命周期期间,要么是由肺炎球菌分泌或释放的蛋白。优选本发明的蛋白选自以下类别:例如具有LXXC的II型信号序列模体的蛋白(其中X是任何氨基酸,例如多组氨酸三联体家族(PhxX))、胆碱结合蛋白(CbpX)、具有I型信号序列模体的蛋白(例如,Sp101)、具有LPXTG模体的蛋白

(其中X是任何氨基酸,例如,Sp128、Sp130)以及毒素(例如Ply)。这些类别(或模体)中的优选实例是以下的蛋白或其免疫功能等同物。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少1种选自以下的蛋白:多组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、CbpX截短物、LytX家族、LytX截短物、CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125和Sp133。在又一个实施方案中,免疫原性组合物包含2种或更多种选自以下的蛋白:多组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、CbpX截短物、LytX家族、LytX截短物、CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA和Sp128。在又一个实施方案中,免疫原性组合物包含2种或更多种选自以下的蛋白:多组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、CbpX截短物、LytX家族、LytX截短物、CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)和Sp128。

[0103] Pht(Poly Histidine Triad(多组氨酸三联体))家族包括蛋白PhtA、PhtB、PhtD和PhtE。该家族的特征为:脂化序列;通过富脯氨酸区和若干组氨酸三联体分开的两个结构域,其可能参与金属或核苷结合活性或酶活性;(3-5个)卷曲螺旋区、保守的N末端和异质的C末端。它存在于所有检测过的肺炎球菌菌株中。在其他的链球菌和奈瑟氏菌中也发现了同源蛋白。在本发明的一个实施方案中,本发明的Pht蛋白是PhtD。然而应该理解,术语Pht A、B、D和E指的是:具有以下引用文献中所公开序列的蛋白,以及具有与参比蛋白有至少90%相同的序列同源性的天然(和人造的)变异体。优选它至少95%相同,最优选97%相同。

[0104] 关于PhtX蛋白,PhtA在W0 98/18930中公开,并且也被称为Sp36。如前文所指出的,它是来自多组氨酸三联体家族的蛋白并具有LXXC的II型信号模体。PhtD在W0 00/37105中公开,并且也被称为Sp036D。如上所述,它也是来自多组氨酸三联体家族的蛋白并具有LXXC的II型信号模体。PhtB在W0 00/37105中公开,并且也称为Sp036B。PhtB家族的另一个成员是C3降解性多肽,在W0 00/17370中公开。该蛋白同样是来自多组氨酸三联体家族的蛋白并具有LXXC的II型信号模体。优选的免疫功能等同物是公开于W0 98/18930中的Sp42蛋白。PhtB截短物(大约79kD)在W099/15675中公开,其也被认为是PhtX家族成员。PhtE在W000/30299中公开并且称为BVH-3。当于此提及任何Pht蛋白时,其意思是可以使用Pht蛋白的免疫原性片段或其融合体。例如,提及PhtX时包括来自任何Pht蛋白的免疫原性片段或其融合体。提及PhtD或PhtB时,也是提及如在例如W00198334中发现的PhtDE或PhtBE融合体。

[0105] 肺炎球菌溶血素是一种具有不同溶细胞(溶血)活性和补体激活活性的多功能毒素(Rubins等,Am.Respi.Cit.Care.Med,153.1339-1346(1996))。该毒素并不由肺炎球菌分泌,但它在自溶素的影响下裂解肺炎球菌时释放。其作用包括例如刺激人单核细胞产生炎性细胞因子、抑制人呼吸道上皮的纤毛摆动并降低嗜中性粒细胞的杀菌活性和迁移。肺炎球菌溶血素最明显的作用在于裂解红细胞,其包括结合胆固醇。因为它是一种毒素,所以在它能够体内施用之前进行去毒(即当以适于保护的剂量提供时对人类无毒)。野生型或天然肺炎球菌溶血素的表达和克隆为本领域所知。参见例如Walker等(Infect Immun,55:1184-1189(1987))、Mitchell等(Biochim Biophys Acta,1007:67-72(1989)和Mitchell等(NAR,18:4010(1990))。ply的去毒通过化学方法实施,例如经过福尔马林或戊二醛处理或两者的组合(W004081515、PCT/EP2005/010258)。用于各种毒素的这些方法是本领域所熟知的。或者ply可以通过基因去毒。因此,本发明包括肺炎球菌蛋白的衍生物,其可以是例如突变的

蛋白。于此使用的术语“突变的”或“突变型”指的是使用已熟知的用于定点突变的技术或任何其他常规方法,使其经历了一个或多个氨基酸缺失、插入或替换的分子。例如,如前文所描述的,可以改变突变型ply蛋白,致使其无生物活性同时仍保留其免疫原性表位,参见例如,W090/06951,Berry等(*Infect Immun*,67:981-985(1999))和W099/03884。

[0106] 如于此所使用的,应该明白术语“Ply”指的是适合医药应用的突变型或去毒型肺炎球菌溶血素(即无毒的)。

[0107] 关于胆碱结合蛋白家族(CbpX),该家族的成员最初被确定为可以通过胆碱亲和色谱法纯化的肺炎球菌蛋白。所有胆碱结合蛋白与细胞壁磷壁酸的以及膜相关脂磷壁酸的磷酸胆碱部分(phosphorylcholine moieties)非共价结合。整个家族中它们具有若干共同的区域,尽管这些蛋白的确切性质(氨基酸序列、长度等)可以不同。一般来说,胆碱结合蛋白包含N末端区域(N)、保守的重复区(R1和/或R2)、富脯氨酸区(P)以及由包含了约该蛋白一半的多个重复序列组成的保守胆碱结合区(C)。正如本说明所使用的,术语“胆碱结合蛋白家族(CbpX)”选自在W097/41 151中公开的胆碱结合蛋白、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD以及CbpG。CbpA在W097/41151中公开。CbpD和CbpG在W000/29434中公开。PspC在W097/09994中公开。PbcA在W098/21337中公开。SpsA是在W0 98/39450中公开的胆碱结合蛋白。优选胆碱结合蛋白选自CbpA、PbcA、SpsA和PspC。

[0108] 另一个优选的实施方案是CbpX截短物,其中“CbpX”在上文有定义,而“截短物”指的是缺少50%或以上胆碱结合区(C)的CbpX蛋白。优选这种蛋白缺少整个胆碱结合区。更优选这种蛋白截短物缺少:(i)胆碱结合区和(ii)蛋白N-末端一半的一部分,但保留至少一个重复区(R1或R2)。再更优选截短物具有2个重复区(R1和R2)。这种优选实施方案的实例是如W099/51266或W099/51188中说明的NR1×R2和R1×R2,然而,缺少类似胆碱结合区的其他胆碱结合蛋白同样意图包括在本发明的范围内。

[0109] LytX家族是与细胞裂解有关的膜相关蛋白。N-末端结构域包含一个或多个胆碱结合结构域,然而LytX家族并不具有前文所述的在CbpA家族中发现的所有特征,因此对于本发明来说,LytX家族被认为是区别于CbpX家族的。与CbpX家族相对比,C-末端结构域包含LytX蛋白家族的催化结构域。该家族包括LytA、B和C。关于LytX家族,LytA在Ronda等,*Eur J Biochem*,164:621-624(1987)中公开。LytB在W0 98/18930中公开,并且也称为Sp46。LytC同样在W098/18930中公开,并且也称为Sp91。该家族的优选成员是LytC。

[0110] 另一个优选的方案是LytX截短物,其中“LytX”如上文定义,而“截短物”指的是缺少50%或以上胆碱结合区(C)的LytX蛋白。优选这些蛋白缺少整个胆碱结合区。本发明的再一个优选方案是CbpX截短物-LytX截短物嵌合蛋白(或融合体)。优选其包含CbpX的NR1×R2(或R1×R2)和LytX的C-末端部分(Cterm,即缺少胆碱结合结构域)(例如,LytCCterm或Sp91Cterm)。更优选CbpX选自CbpA、PbcA、SpsA和PspC。还更优选它是CbpA。优选LytX是LytC(也称为Sp91)。本发明另一个实施方案是PsaA、或缺少胆碱结合结构域(C)并作为具有LytX的融合蛋白表达的PsaA截短物。优选LytX是LytC。

[0111] 关于PsaA和PspA,均为本领域所知。例如,PsaA和其跨膜缺失变异体已经由Berry和Paton,*Infect Immun*1996Dec;64(12):5255-62描述。PspA和其跨膜缺失变异体已经在例如US5804193、W092/14488和W099/53940中公开。

[0112] Sp128和Sp130在W000/76540中公开。Sp125是具有LPXTG(其中X是任何氨基酸)的

细胞壁锚定模体的肺炎球菌表面蛋白的实例。该类别肺炎球菌表面蛋白中具有该模体的任何蛋白已被发现在本发明的范围中是有用的,因此被认为是本发明的又一蛋白。Sp125其自身在WO 98/18930中公开,并且也被称为ZmpB(一种锌金属蛋白酶)。Sp101在WO 98/06734中公开(其中它参考编号为y85993)。其特征是I型信号序列。Sp133在WO98/06734中公开(其中它参考编号为y85992)。其特征同样是I型信号序列。

[0113] 可以包含在联合疫苗(尤其是用于预防中耳炎)中的优选卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)蛋白抗原的实例是:OMP106[WO97/41731 (Antex) 和WO96/34960 (PMC)];OMP21或其片段(WO0018910)、LbpA和/或LbpB[WO98/55606 (PMC)];TbpA和/或TbpB[WO97/13785和WO97/32980 (PMC)];CopB[Helminen ME,等(1993) *Infect. Immun.* 61:2003-2010];UspA1和/或UspA2[WO 93/03761 (University of Texas)];OmpCD;HasR (PCT/EP99/03824);PilQ (PCT/EP99/03823);OMP85 (PCT/EP00/01468);lipo06 (GB 9917977.2)、lipo10 (GB 9918208.1);lipo11 (GB 9918302.2);lipo18 (GB 9918038.2);P6 (PCT/EP99/03038);D15 (PCT/EP99/03822);OmplA1 (PCT/EP99/06781);Hly3 (PCT/EP99/03257);和OmpE。可以包含在联合疫苗(尤其是用于预防中耳炎)的无法分型的流感嗜血杆菌抗原或其片段的实例包括:丝束蛋白(Fimbrin)[(US 5766608-Ohio State Research Foundation)]和包含来自该蛋白的肽的融合体[例如LB1 (f) 肽融合体;US 5843464 (OSU) 或WO 99/64067];OMP26[WO 97/01638 (Cortecs)];P6[EP 281673 (State University of New York)];TbpA和/或TbpB;Hia;Hsf;Hin47;Hif;Hmw1;Hmw2;Hmw3;Hmw4;Hap;D15 (WO 94/12641);P2;以及P5 (WO 94/26304)。

[0114] 本发明的蛋白也可以有益地联合。联合是指:免疫原性组合物包含来自以下组合中的所有蛋白,所述蛋白作为载体蛋白、作为游离蛋白或者作为两者的混合物。例如,如下文中所陈述的两种蛋白的组合中,这两种蛋白可以作为载体蛋白使用;或者两种蛋白可以作为游离蛋白存在;或者两者可以作为载体和作为游离蛋白存在;或一种可以作为载体蛋白和游离蛋白存在,同时另一种仅作为载体蛋白或仅作为游离蛋白存在,或一种可以作为载体蛋白存在,而另一种作为游离蛋白存在。当给出三种蛋白的组合时,存在类似的可能性。优选的组合包括但不限于:PhtD+NR1×R2、PhtD+NR1×R2-Sp91Cterm嵌合或融合蛋白、PhtD+Ply、PhtD+Sp128、PhtD+PsaA、PhtD+PspA、PhtA+NR1×R2、PhtA+NR1×R2-Sp91Cterm嵌合或融合蛋白、PhtA+Ply、PhtA+Sp128、PhtA+PsaA、PhtA+PspA、NR1×R2+LytC、NR1×R2+PspA、NR1×R2+PsaA、NR1×R2+Sp128、R1×R2+LytC、R1×R2+PspA、R1×R2+PsaA、R1×R2+Sp128、R1×R2+PhtD、和R1×R2+PhtA。优选NR1×R2(或R1×R2)来自CbpA或PspC。更优选其来自CbpA。其他组合包括3种蛋白的组合,例如PhtD+NR1×R2+Ply、以及PhtA+NR1×R2+PhtD。在一个实施方案中,疫苗组合物包含去毒型肺炎球菌溶血素以及作为载体蛋白的PhtD或PhtDE。在又一个实施方案中,疫苗组合物包含去毒型肺炎球菌溶血素和作为游离蛋白的PhtD或PhtDE。

[0115] 在独立的一方面,本发明提供了免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含至少四种含有来自不同肺炎链球菌血清型的糖的肺炎链球菌荚膜糖缀合物,其中至少一种糖与PhtD或其融合蛋白缀合,并且该免疫原性组合物能够诱导抗PhtD的有效免疫应答。

[0116] 例如通过保护测定法,诸如在实施例15中描述的保护测定法,检测抗PhtD或其融合蛋白的有效免疫应答。在用异种的菌株攻击之后7天,有效免疫应答提供至少40%、50%、

60%、70%、80%或90%存活率。已知攻击菌株是异种的,所以所赋予的保护作用归因于抗PhtD或其融合蛋白的免疫应答。

[0117] 或者,用如实施例14中描述的ELISA检测抗PhtD的有效免疫应答。有效免疫应答产生至少250、300、350、400、500、550或600 μ g/ml GMC的抗PhtD IgG应答。

[0118] 例如,免疫原性组合物包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10种与PhtD或其融合蛋白缀合的来自不同血清型的肺炎链球菌荚膜糖。例如血清型22F和另外1、2、3、4、5、6或7种选自血清型1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、23F和33F的血清型与PhtD缀合。在一个实施方案中,血清型3、6A和22F中的两种或三种与PhtD或其融合蛋白缀合。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种肺炎链球菌荚膜糖,其中所述荚膜糖与PhtD或其融合蛋白通过接头(例如ADH)缀合。在一个实施方案中,使用以下列举的缀合化学之一。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种与PhtD或其融合蛋白缀合的肺炎链球菌荚膜糖,其中缀合物中PhtD对糖的比例是6:1-1:5、6:1-2:1、6:1-2.5:1、6:1-3:1、6:1-35:1(w/w)或高于(即包含更高比例的PhtD)2.0:1、2.5:1、3.0:1、3.5:1或4.0:1(w/w)。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含肺炎球菌溶素。

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

[0123] 本发明的疫苗可以添加佐剂,尤其是当意图用于老年人群中以及用于婴儿人群中时。合适的佐剂包括:诸如氢氧化铝凝胶、磷酸铝或明矾的铝盐,但也可以是诸如钙盐、镁盐、铁盐或锌盐的其他金属盐;或者可以是酰化酪氨酸、或酰化糖、阳离子衍生化或阴离子衍生化的糖或含聚磷腈的不溶性混悬液。

[0124] 优选选择佐剂作为Th1型应答的优先诱导物。这种高水平的Th1型细胞因子往往有利于诱导对特定抗原的细胞介导免疫应答,同时高水平的Th2型细胞因子往往有利于诱导对特定抗原的体液免疫应答。

[0125] Th1型和Th2型免疫应答的差别并非绝对的。现实中,个体会支持被描述为以Th1为主的或以Th2为主的免疫应答反应。然而方便的是,按照由Mosmann和Coffman在鼠CD4+ve T细胞克隆中所述的(Mosmann,T.R.和Coffman,R.L.(1989)TH1 and TH2 cells:different patterns of lymphokine secretion lead to different properties.(TH1与TH2细胞:不同形式的淋巴因子分泌导致不同的特性)Annual Review of Immunology,7,p145-173)来限定细胞因子家族。传统上,Th1型应答与T淋巴细胞产生INF- γ 和IL-2细胞因子相关。通常直接与诱导Th1型免疫应答相关的其他细胞因子并不由T细胞产生,例如IL-12。相比之下,Th2型应答与IL-4、IL-5、IL-6、IL-10的分泌相关。促进以Th1应答为主的合适的佐剂体系包括:单磷酸脂质A或其衍生物(或一般为去毒型脂质A,参见例如WO 2005107798),尤其是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)(其制备参见GB 2220211 A);以及单磷酸脂质A(优选3-脱-O-酰化单磷酸脂质A)与铝盐(例如磷酸铝或氢氧化铝)或水包油乳剂的组合。在这些组合中,抗原与3D-MPL包含在相同的微粒结构中,允许更有效地传送抗原信号和免疫刺激性信号。研究业已表明,3D-MPL能够进一步增强明矾吸附抗原的免疫原性[Thoelen等Vaccine(1998)16:708-14;EP 689454-B1]。

[0126] 增强型体系包括单磷酸脂质A和皂苷衍生物的组合,尤其是在WO 94/00153中公开的QS21和3D-MPL的组合,或反应原性较低的组合物,其中用例如胆固醇淬灭QS21,如在WO 96/33739中公开的。涉及水包油乳剂中的QS21、3D-MP和生育酚的特别有效的佐剂制剂描述于WO 95/17210中。在一个实施方案中,免疫原性组合物另外包括皂苷,后者可以是QS21。所述制剂同样可以包含水包油乳剂和生育酚(WO 95/17210)。含有未甲基化CpG的寡核苷酸(WO 96/02555)和其他免疫调节性寡核苷酸(W00226757和W003507822)也是TH1应答的优先诱导物并且适合在本发明使用。

[0127] 特定的佐剂是选自以下的佐剂:金属盐、水包油乳剂、Toll样受体激动剂(特别是Toll样受体2激动剂、Toll样受体3激动剂、Toll样受体4激动剂、Toll样受体7激动剂、Toll样受体8激动剂以及Toll样受体9激动剂)、皂苷类或其组合。

[0128] 可以与本发明的疫苗组合物一起使用的佐剂是来自革兰氏阴性细菌菌株的泡(bleb)或外膜小泡(outer membrane vesicle)的制备物,例如由W002/09746所讲授的制备物(尤其是脑膜炎奈瑟氏球菌泡(N.meningitidis blebs))。泡的佐剂特性可以通过保留其表面的LOS(脂寡糖)得到改进(例如通过用低浓度的去污剂[例如0-0.1%的脱氧胆酸盐]提取)。LOS可以通过W002/09746中讨论的msbB(-)或htrB(-)突变去毒。佐剂特性同样可以通过于脑膜炎球菌泡(blebs)中保留PorB(任选地除去PorA)得到改进。佐剂特性也可以通过截短脑膜炎球菌泡上LOS的外部核心糖结构而得到改进,例如通过在W02004/014417中讨论的IgtB(-)突变。或者,前述的LOS(例如从msbB(-)和/或IgtB(-)菌株中分离的LOS)可以经过纯化并在本发明的组合物中作为佐剂使用。

[0129] 可以与本发明组合物一起使用的又一佐剂可以选自:皂苷、脂质A或其衍生物、免疫刺激性寡核苷酸、烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯、水包油乳剂或其组合。又一优选佐剂是与另一佐剂组合的金属盐。优选佐剂是Toll样受体激动剂,特别是Toll样受体2、3、4、7、8或9的激动剂;或皂苷,特别是Qs21。更优选佐剂体系包含两种或更多种前文所列举的佐剂。特别是,这些组合优选含有皂苷(特别是Qs21)佐剂和/或Toll样受体9激动剂(例如含CpG的免疫刺激性寡核苷酸)。其他的优选组合包括皂苷(特别是QS21)与Toll样受体4激动剂例如单磷酸脂质A或其3脱酰化衍生物(3D-MPL);或皂苷(特别是QS21)与Toll样受体4配体例如烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯。

[0130] 特别优选的佐剂是3D-MPL和QS21的组合(EP 0 671 948 B1)、包含3D-MPL和QS21的水包油乳剂(WO 95/17210、WO 98/56414)或与其他载体配制的3D-MPL(EP 0 689 454 B1)。其他优选佐剂体系包括如US6558670、US6544518中描述的3D-MPL、QS21和CpG寡核苷酸的组合。

[0131] 在一个实施方案中,佐剂是(或包含)Toll样受体(TLR)4配体,优选是激动剂,例如脂质A的衍生物,特别是单磷酸脂质A或者更特别是3脱酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)。

[0132] 3D-MPL可得自GlaxoSmithKline Biologicals North America,并且主要促进IFN- γ (Th1)表型的CD4⁺T细胞应答。它可以按照在GB 2 220 211 A中公开的方法制备。化学上,它是具有3、4、5或6条酰化链的3-脱酰化单磷酸脂质A的混合物。优选在本发明组合物中使用小微粒3D-MPL。小微粒3D-MPL具有的粒径使其能够通过0.22 μ m过滤器而被除菌过滤。这些制品描述于国际专利申请公开号W094/21292中。合成的脂质A衍生物是已知的并且被认为是TLR 4激动剂,包括但不限于:

[0133] OM174 (2-脱氧-6- α -[2-脱氧-2-[(R)-3-月桂酰氧基-十四烷酰氨基]-4- α -磷酸基- β -D-吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]- α -D-吡喃葡萄糖基磷酸二氢酯) (WO 95/14026)

[0134] OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-月桂酰氧基十四烷酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]癸-1,10-二醇,1,10-双(磷酸二氢酯) (WO 99/64301和WO 00/0462)

[0135] OM 197MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-月桂酰氧基十四烷酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]癸-1,10-二醇,1-磷酸二氢酯,10-(6-氨基己酸酯) (WO 01/46127)

[0136] 可以使用的其他TLR4配体是烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯 (AGP),例如在W09850399或US6303347中公开的(也公开了制备AGP的方法),或者在US6764840中公开的AGP的药理学上可接受的盐。有些AGP是TLR4的激动剂,而有些是TLR4的拮抗剂。两者均被认为可以用作佐剂。

[0137] 用于本发明中的另一种优选的免疫刺激物是Quil A及其衍生物。Quil A是从南美奎拉雅属皂树(*Quilaja Saponaria Molina*)中分离的皂苷制剂,并且最初由Dalsgaard等在1974年描述为具有佐剂活性("Saponin adjuvants"("皂苷佐剂")),Archiv.für die gesamte Virusforschung,Vol.44,Springer Verlag,Berlin,p243-254)。Quil A的纯化片段已经通过HPLC被分离,其保留了佐剂活性并且没有Quil A相关的毒性(EP 0 362 278),例如QS7和QS21(也称为QA7和QA21)。QS-21是获自奎拉雅属皂树树皮的天然皂苷,其诱导CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)、Th1细胞以及占优势的IgG2a抗体应答,而且在本发明的范围内是优选的皂苷。

[0138] QS21的具体制剂已经有描述,其特别优选,这些制剂还包含固醇(W096/33739)。构成本发明部分的皂苷类可以以胶束、混合胶束(优先地但非排他地与胆汁盐混合)的形式分散;或者可以以ISCOM基质(ISCOM maxtrices)(EP 0 109 942 B1)、脂质体或相关的胶体结构例如蠕虫状或环状多聚复合物、或当与胆固醇和脂质配制时的脂质/层状结构(lipidic/layered structure)和薄层(lamellae)的形式分散;或者可以以水包油乳剂的形式分散(例如如WO 95/17210中所述)。皂苷可以优选与金属盐例如氢氧化铝或磷酸铝结合(WO 98/15287)。优选皂苷以脂质体、ISCOM或水包油乳剂的形式存在。

[0139] 增强型体系包括单磷酸脂质A(或去毒型脂质A)和皂苷衍生物的组合,特别是WO 94/00153中公开的QS21和3D-MPL的组合,或反应原性较低的组合物,其中如WO 96/33739中公开的,QS21用胆固醇淬灭。包括水包油乳剂中的有或无QS21的生育酚和/或3D-MPL的特别有效的佐剂制剂在WO 95/17210中有描述。在一个实施方案中,免疫原性组合物另外还包含皂苷,所述皂苷可以是QS21。

[0140] 免疫刺激性寡核苷酸或任何其他Toll样受体(TLR)9激动剂也可以使用。用于本发明佐剂或疫苗中的优选寡核苷酸是含有CpG的寡核苷酸,优选含有由至少3个、更优选至少六个或更多个核苷酸隔开的两个或更多个二核苷酸CpG模体。CpG模体是胞苷酸后接鸟苷酸。本发明的此CpG寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在一个优选实施方案中,寡核苷酸中的核苷酸间(internucleotide)是二硫代磷酸酯,或更优选硫代磷酸酯键,尽管磷酸二酯键和其他核苷酸间键也包括在本发明的范围内。在本发明的范围内的还有带混合的核苷酸间键的寡核苷酸。产生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法在US5,666,153、US5,278,

302和W095/26204中描述。

[0141] 优选寡核苷酸的实例具有以下序列。所述序列优选含有用硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键合。

[0142] OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG1826)

[0143] OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

[0144] OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

[0145] OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

[0146] OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG1668)

[0147] OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG5456)

[0148] 或者, CpG寡核苷酸可以包含以上优选序列, 因为它们具有无关紧要的缺失或插入。

[0149] 本发明中利用的CpG寡核苷酸可以通过本领域已知的任何方法来合成 (例如参见 EP 468520)。方便的是, 该寡核苷酸可以利用自动合成仪来合成。

[0150] 佐剂可以是水包油乳剂或可以包含与其他佐剂联合的水包油乳剂。乳剂系统的油相优选包括可代谢油。术语可代谢油的意思为本领域所熟知。可代谢的可以定义为“能够通过代谢转化” (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (第25版) (1974))。该油可以是对接受者无毒并且能够通过代谢转化的任何植物油、鱼油、动物油或合成油。坚果、种子和谷物是植物油的一般来源。合成油同样属于本发明的部分并且可以包括市售的油例如NEOBEE®及其他油。角鲨烯 (2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯) 是不饱和油, 其大量存在于鱼肝油中, 而以较低量存在于橄榄油、麦芽油、米糠油和酵母中; 并且是用于本发明的特别优选的油。角鲨烯由于以下事实是可代谢油: 它是胆固醇生物合成的中间体 (Merck index, 10th Edition (第10版), entry no.8619)。

[0151] 母育酚 (例如维生素E) 也经常用于油乳剂佐剂 (EP 0 382 271 B1、US5667784、W0 95/17210)。用于本发明油乳剂 (优选水包油乳剂) 的母育酚可以按照EP 0 382 271 B1中描述的方法配制, 因为母育酚可以是母育酚小滴的分散体, 该分散体任选包含乳化剂, 所述小滴优选直径少于1微米。或者, 母育酚可以与另一种油联用, 以形成油乳剂的油相。可以与母育酚联用的油乳剂的实例于此中有描述, 例如前文描述的可代谢油。

[0152] 已经提出, 水包油乳剂佐剂自身可用作佐剂组合物 (EP 0 399 843B), 同样水包油乳剂与其他活性试剂的组合已经被描述作为疫苗用佐剂 (W0 95/17210、W0 98/56414、W0 99/12565、W0 99/11241)。其他油乳剂佐剂已有描述, 例如油包水乳剂 (US 5,422,109、EP 0 480 982 B2) 以及水包油包水乳剂 (US 5,424,067、EP 0 480 981 B)。以上提及的全部都构成本发明的佐剂和组合物的优选油乳剂系统 (特别是当加入母育酚的时候)。

[0153] 最优选该油乳剂 (例如水包油乳剂) 还包括乳化剂例如吐温80 (TWEEN80) 和/或固醇例如胆固醇。

[0154] 优选的油乳剂 (优选水包油乳剂) 包含可代谢的无毒油例如角鲨烷、角鲨烯的, 或者生育酚例如 α -生育酚 (优选既有角鲨烯又有 α 生育酚); 并且任选包含乳化剂 (或表面活性剂), 例如吐温80。也可以包括固醇 (优选胆固醇)。

[0155] 产生水包油乳剂的方法为本领域的技术人员所熟知。一般来说, 该方法包括将含

有母育酚的油相与表面活性剂(例如PBS/TWEEN80™溶液)混合,随后使用均化器均化,本领域的技术人员所清楚的是,包括使该混合物通过注射器针头两次的方法将适合于使小体积液体均化。同样地,在微射流仪(microfluidiser)中的乳化过程(M110S微射流设备(Microfluidics machine),在2分钟时间内于6巴最大压力输入(约850巴输出压力)下,最多通过50次)可以由本领域的技术人员修改,以产生更小或更大体积的乳剂。修改可以通过常规的实验实现,包括测量产生的乳剂,直到获得具有所需直径的小油滴的制剂。在水包油乳剂中,油和乳化剂应该是处于水性载体中。水性载体可以是例如磷酸缓冲盐水。

[0156] 通过光子相关光谱检测,在稳定的水包油乳剂中小油滴的大小优选少于1微米,可以在基本上为30-600nm的范围,优选直径基本上大约30-500nm,最优选直径基本上是150-500nm,特别是约150nm直径。在这方面,以数量计80%的小油滴应该在此优选范围之内,更优选以数量计超过90%、最优选以数量计超过95%的小油滴在此定义的大小范围之内。在本发明油乳剂中组分的含量常规上在以下范围内:0.5-20%或2-10%的油(按总剂量体积计),例如角鲨烯;2-10%的 α 生育酚(如果存在的话);和0.3-3%的表面活性剂,例如聚氧乙烯山梨坦单油酸酯。优选油(优选角鲨烯):母育酚(优选 α -生育酚)的比例等于或小于1,因为这提供更稳定的乳剂。乳化剂例如吐温80或Span 85也可以以约1%的水平存在。在某些情况下,本发明的疫苗进一步含有稳定剂可能是有利的。

[0157] 优选的乳剂系统的实例描述于WO 95/17210、WO 99/11241和WO 99/12565中,文中公开了基于角鲨烯、 α -生育酚和吐温80的乳剂佐剂,所述乳剂佐剂任选与免疫刺激物QS21和/或3D-MPL一起配制。因此,本发明的一个特别优选的实施方案中,本发明的佐剂可以附加地包含另外的免疫刺激物,例如LPS或其衍生物,和/或皂苷类。另外的免疫刺激物的实例描述于此以及描述于“Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach”1995Pharmaceutical Biotechnology,Volume6,Powell,M F和Newman编辑,M J.,Plenum Press,New York and London,ISBN 0-306-44867-X。

[0158] 在优选的方面,本发明的佐剂和免疫原性组合物包含:在如前文所述的油乳剂中的皂苷(优选QS21)和/或LPS衍生物(优选3D-MPL),任选地含有固醇(优选胆固醇)。另外,油乳剂(优选水包油乳剂)可以含有Span 85和/或卵磷脂和/或三辛酸甘油酯。包含水包油乳剂、固醇和皂苷的佐剂描述于WO 99/12565中。

[0159] 通常对于人类试用而言,皂苷(优选QS21)和/或LPS衍生物(优选3D-MPL)将以1 μ g-200 μ g/剂的范围,例如10-100 μ g/剂,优选10 μ g-50 μ g/剂存在于人用剂量的免疫原性组合物中。通常油乳剂(优选水包油乳剂)会包含2%-10%的可代谢油。优选其包含2%-10%的角鲨烯、2%-10%的 α 生育酚和0.3%-3%的(优选0.4-2%)的乳化剂(优选吐温80[聚氧乙烯山梨坦单油酸酯])。当既存在角鲨烯又存在 α 生育酚时,优选角鲨烯: α 生育酚的比例等于或小于1,因为这提供更稳定的乳剂。Span 85(山梨坦三油酸酯)也可以以0.5-1%的水平存在于本发明使用的乳剂中。在某些情况下,本发明的免疫原性组合物和疫苗进一步含有稳定剂例如其他乳化剂/表面活性剂(包括辛酸)(merck index 10th Edition,entry no1739)可能是有利的,其中特别优选三辛酸甘油酯。

[0160] 当包括角鲨烯和皂苷(优选QS21)时,在制剂中也包括固醇(优选胆固醇)会有益处,因为这允许降低乳剂中的总油量。这将导致生产成本降低,疫苗的总适度改进以及所产生的免疫应答在数量和质量上得到改进,例如IFN- γ 的产量提高。因此,本发明的佐剂系

统典型地包含范围从200:1到300:1的可代谢油:皂苷比例(w/w),本发明也可以以“低油”的形式使用,其优选的范围是1:1-200:1,优选20:1-100:1,最优选基本上是48:1,此疫苗保留了所有组分的有利佐剂特性,并且反应原性特征(profile)大大降低。因此,特别优选的实施方案中,角鲨烯:QS21(w/w)的比例范围从1:1到250:1,优选范围是20:1-200:1,优选20:1-到200:1,最优选基本上是48:1。优选也包括固醇(最优选胆固醇),并以此描述的皂苷:固醇的比例存在。

[0161] 本发明的乳剂系统优选具有亚微米范围的小油滴大小。更优选该小油滴的大小在120-750nm的范围内,最优选直径为120-600nm。

[0162] 特别有效的佐剂制剂(对于在本发明的免疫原性组合中最终与A1P04组合)包括皂苷(优选QS21)、LPS衍生物(优选3D-MPL)和油乳剂(优选水包油乳剂中的角鲨烯和 α 生育酚),如WO 95/17210或W099/12565中所描述的(特别是在实施例2表1中的佐剂制剂11)。

[0163] TLR 2激动剂的实例包括肽聚糖或脂蛋白。咪唑并喹啉,例如咪唑莫特(Imiquimod)和雷西莫特(Resiquimod)是已知的TLR7激动剂。单链RNA也是已知的TLR激动剂(人类中的TLR8和小鼠中的TLR7),而双链RNA和poly IC(聚肌胞苷酸——一种市售的合成的病毒RNA模拟物)是典型的TLR3激动剂。3D-MPL是TLR4激动剂的实例,同时CPG是TLR9激动剂的实例。

[0164] 免疫原性组合可以包含吸附在金属盐上的抗原和免疫刺激物。铝基疫苗制剂描述于EP 0 576 478 B1、EP 0 689 454 B1和EP 0 633 784 B1中,其中抗原与免疫刺激物3-de-O-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)吸附在同一微粒上。在这些例子中,抗原首先吸附在铝盐上,随后使免疫刺激物3D-MPL吸附在同一铝盐微粒上。这些方法首先涉及通过在水浴中超声处理直到微粒大小达到80-500nm而使3D-MPL悬浮。通常在室温中搅拌一小时使抗原吸附到铝盐上。然后将3D-MPL悬浮液加到已吸附的抗原中,该制剂于室温下温育1小时,然后在4℃下保存待用。

[0165] 在另一种方法中,免疫刺激物和抗原在不同的金属微粒上,如EP1126876中所述。改进的方法包括使免疫刺激物吸附在金属盐微粒上,随后使抗原吸附在另一金属盐微粒上,随后混合这些离散的金属微粒以形成疫苗。用于本发明的佐剂可以是包含吸附在金属盐微粒上的免疫刺激物的佐剂组合,其特征为金属盐微粒基本上无其他抗原。此外,疫苗由本发明提供并且其特征为免疫刺激物吸附在金属盐微粒上,所述金属盐微粒基本上无其他抗原,并且在吸附了抗原的金属盐微粒中基本上无其他免疫刺激物。

[0166] 因此,本发明提供包含免疫刺激物的佐剂制剂,所述免疫刺激物已经吸附在金属盐微粒上,其特征是所述组合基本上无其他抗原。此外,此佐剂制剂可以是中间体,如果使用该佐剂,则此佐剂制剂是疫苗制造所需的。因此,提供了疫苗的制备方法,其包括将佐剂组合与抗原混合,其中所述佐剂组合是一种或更多种吸附在金属微粒上的免疫刺激物。优选所述抗原已经预先吸附在金属盐上。所述金属盐可以等同于或类似于吸附在免疫刺激物上的金属盐。优选所述金属盐是铝盐,例如磷酸铝或氢氧化铝。本发明还提供疫苗组合,所述疫苗组合包含吸附在第一金属盐微粒上的免疫刺激物、和吸附在金属盐上的抗原,其特征为第一和第二金属盐微粒是单独的微粒。

[0167] 于此描述的LPS或LOS衍生物或突变体或脂质A衍生物被设计为比天然脂多糖(例如3D-MPL)毒性低,并且就本文描述的这些部分的任何使用而言,是可互换的等同物。它们

可以是前文描述的TLR4配体。其他的这些衍生物描述于W0020786737、W09850399、W00134617、W00212258和W003065806中。

[0168] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的佐剂包括脂质载体(通过已知的技术从磷脂(例如二油酰磷脂酰胆碱[DOPC])和任选的固醇[例如胆固醇]制得)。这些脂质载体可以携带脂质A衍生物[例如3D-MPL,参见上文]和/或皂苷(例如QS21,参见上文)。在一个实施方案中,佐剂包含(每0.5mL剂量):0.1-10mg、0.2-7、0.3-5、0.4-2或0.5-1mg(例如0.4-0.6、0.9-1.1、0.5或1mg)的磷脂(例如DOPC);0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3或0.125-0.25mg(例如0.2-0.3、0.1-0.15、0.25或0.125mg)的固醇(例如胆固醇);5-60、10-50或20-30 μ g(例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g)的脂质A衍生物(例如3D-MPL);和5-60、10-50或20-30 μ g(例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g)的皂苷(例如QS21)。

[0169] 此佐剂特别适于老年人用疫苗制剂。在一个实施方案中,包括此佐剂的疫苗组合物包含:来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并且可以也包含来自血清型3、6A、19A和22F的一种或更多种糖缀合物),其中针对疫苗组分4、6B、9V、14、18C、19F和23F中的一种或更多种(或所有)诱导的GMC抗体效价并不显著差于由**Pprevnar®**疫苗在人类接种者中诱导的效价。

[0170] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的佐剂包含:由可代谢油(例如角鲨烯)、乳化剂(例如吐温80)和任选的母育酚(例如 α -生育酚)制得的水包油乳剂。在一个实施方案中,佐剂包含(每0.5mL剂量):0.5-15、1-13、2-11、4-8或5-6mg(例如2-3、5-6或10-11mg)的可代谢油(例如角鲨烯);0.1-10、0.3-8、0.6-6、0.9-5、1-4或2-3mg(例如0.9-1.1、2-3或4-5mg)的乳化剂(例如吐温80)和任选的0.5-20、1-15、2-12、4-10、5-7mg(例如11-13、5-6或2-3mg)的母育酚(例如 α -生育酚)。

[0171] 此佐剂可以任选地进一步包含5-60、10-50或20-30 μ g(例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g)的脂质A衍生物(例如3D-MPL)。

[0172] 这些佐剂特别适合于婴儿或老年人用疫苗制剂。在一个实施方案中,包含此佐剂的疫苗组合物包含:来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并且可以也包含来自血清型3、6A、19A和22F的一种或更多种糖缀合物),其中针对疫苗组分4、6B、9V、14、18C、19F和23F中的一种或更多种(或所有)的GMC抗体效价并不显著差于由**Pprevnar®**疫苗在人类接种者中诱导的效价。

[0173] 此佐剂可以任选含有:0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3或0.125-0.25mg(例如0.2-0.3、0.1-0.15、0.25或0.125mg)的固醇(例如胆固醇);5-60、10-50或20-30 μ g(例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g)的脂质A衍生物(例如3D-MPL);和5-60、10-50或20-30 μ g(例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g)的皂苷(例如QS21)。

[0174] 此佐剂特别适合于婴儿或老年人用疫苗制剂。在一个实施方案中,包含此佐剂的疫苗组合物包含:来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(并且可以也包含来自血清型3、6A、19A和22F的一种或更多种糖缀合物),其中针对疫苗组分4、6B、9V、14、18C、19F和23F中的一种或更多种(或所有)的GMC抗体效价并不显著差于由**Pprevnar®**疫苗在人类接种者中诱导的效价。

[0175] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的佐剂包括磷酸铝和脂质A衍生物(例如3D-MPL)。该佐剂可以包含(每0.5mL剂量)100-750、200-500或300-400 μ g作为磷酸铝的A1和

5-60、10-50或20-30 μ g (例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μ g) 的脂质A衍生物 (例如3D-MPL)。

[0176] 此佐剂特别地适合于老年人或婴儿用疫苗制剂。在一个实施方案中,包含此佐剂的疫苗组合物包含:来源于至少以下所有血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F (并且可以也包含来自血清型3、6A、19A和22F的一种或更多种糖缀合物),其中针对疫苗组分4、6B、9V、14、18C、19F和23F中的一种或更多种(或所有)的GMC抗体效价并不显著差于由Prevnar®疫苗在人类接种者中诱导的效价。

[0177] 含有本发明免疫原性组合物的疫苗制剂可以通过系统途径或粘膜途径施用所述疫苗,用于保护或治疗易于感染的哺乳动物。这些施用可以包括通过肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射;或通过粘膜施用到口腔/消化道、呼吸道、泌尿生殖道。优选鼻内施用疫苗以治疗肺炎或中耳炎 (因为可以更有效地预防鼻咽携带肺炎球菌,因此在感染的最早期削弱感染)。尽管本发明的疫苗可以作为单一剂量给药,但其组分也可以于同一时间或不同时间共同施用 (例如可以同时地或在施用疫苗的任何细菌蛋白组分1-2周后,单独施用肺炎球菌糖缀合物,使两者相互之间的免疫应答达到最佳的配合)。对于共同施用,可以在任何或所有不同的施用中存在任选的Th1佐剂。除了单一的施用途径以外,还可以使用2种不同的施用途径。例如,糖或糖缀合物可以IM (或ID) 施用,而细菌蛋白可以IN (或ID) 施用。此外,本发明的疫苗对于起始剂量可以IM施用,而对于增强剂量可以IN施用。

[0178] 疫苗中蛋白抗原的含量将通常在1-100 μ g的范围内,优选5-50 μ g,最优选5-25 μ g的范围内。在初次接种疫苗之后,受试者可以在足够的时间间隔内接受一次或若干次增强免疫接种。

[0179] 疫苗制备在Vaccine Design中有详细的描述 (“The subunit and adjuvant approach” (亚单位与佐剂方法) (Powell M.F.和Newman M.J.编辑) (1995) Plenum Press New Yor)。在脂质体中包封则由Fullerton,美国专利4,235,877描述。

[0180] 本发明的疫苗可以贮存于溶液中或冻干。优选溶液在糖 (例如蔗糖或乳糖) 的存在下冻干。更优选使它们冻干并在使用之前临时复原。冻干可以产生更稳定的组合物 (疫苗),并且在3D-MPL存在而铝碱佐剂不存在的情况下可能会产生更高的抗体效价。

[0181] 一方面,本发明提供了疫苗药盒,所述药盒包括装有本发明免疫原性组合物 (任选以冻干的形式) 的小瓶;并且进一步包括装于此描述的佐剂的小瓶。设想了在本发明的这个方面,佐剂将可以用于复原冻干的免疫原性组合物。

[0182] 尽管本发明疫苗可以以任何途径施用,但将所述疫苗施用到皮肤 (ID) 构成了本发明的一个实施方案。人类皮肤包括“角质”外层,称为角质层,该角质层覆盖表皮。在此表皮下面是称为真皮的一层,其又覆盖皮下组织。研究人员已经表明,将疫苗注射进皮肤,特别是注射进真皮,刺激免疫应答,这也可能与许多另外的优点相关。用于此描述的疫苗进行皮内疫苗接种,构成了本发明的优选特征。

[0183] 传统的皮内注射技术-“芒图操作 (mantoux procedure)”,包括以下步骤:清洁皮肤,然后用一只手展开皮肤,并以小号针 (26-31号) 的斜面向上,以10-15°的角度将针插入。一旦插入针头的斜面,将针筒压低并进一步推进,同时提供轻微的压力使针头在皮肤下提升。然后非常慢地将液体注入,从而在皮肤表面形成一个小泡或肿块,随后缓慢地撤回针头。

[0184] 最近,特别涉及用于施用液体药剂进入或跨越皮肤的装置已有描述,例如在W0 99/34850和EP 1092444中描述的装置,也有在例如以下文献中描述的喷射式注射装置(jet injection devices):W001/13977、US5,480,381、US5,599,302、US5,334,144、US5,993,412、US 5,649,912、US 5,569,189、US 5,704,911、US 5,383,851、US5,893,397、US 5,466,220、US 5,339,163、US 5,312,335、US 5,503,627、US 5,064,413、US 5,520,639、US 4,596,556、US 4,790,824、US4,941,880、US 4,940,460、W0 97/37705和W0 97/13537。皮内施用疫苗制剂的可供选择的方法可以包括:传统的注射器和针、设计用于弹道递送固体疫苗的装置(W0 99/27961)、透皮贴剂(W0 97/48440;W098/28037)或者应用到皮肤表面(透皮或经皮递送W0 98/20734、W098/28037)。

[0185] 当要将本发明的疫苗施用于皮肤时,或更具体地说施用到真皮内时,疫苗是以少量的液体体积,特别是约0.05ml-0.2ml的体积。

[0186] 本发明的皮肤或皮内疫苗中的抗原含量可以类似于肌肉施用疫苗的常规剂量(参见上文)。然而,皮肤或皮内疫苗的特征是制剂可以是“低剂量”。因此,“低剂量”疫苗中的蛋白抗原优选以少至0.1-10 μ g/剂量、优选0.1-5 μ g/剂量存在;而糖(优选缀合型)抗原可以以0.01-1 μ g/剂量、优选0.01-0.5 μ g糖/剂量的范围存在。

[0187] 正如于此所使用的,术语“皮内递送”是指将疫苗递送到皮肤中的真皮部位。然而,疫苗不一定仅位于真皮中。真皮是皮肤中位于距离人类表皮约1.0-2.0mm的皮层,但在个体之间以及在身体不同的部位间存在一定量的变化。一般来说,通过在皮肤表面下进入1.5mm可以预期到达真皮。真皮处于角质层和表面的表皮之间,并且处于皮下层之下。根据递送的方式,疫苗可以最终仅处于或主要处于真皮之内,或者它可以最终分布到表皮和真皮之内。

[0188] 本发明还通过加入流感嗜血杆菌蛋白(例如游离或缀合形式的D蛋白)提供用于预防或改善由流感嗜血杆菌引起的中耳炎的改进型疫苗。此外,通过依靠将一种或两种作为游离或缀合蛋白的肺炎球菌蛋白添加到本发明的肺炎链球菌缀合物中,本发明还提供用于预防或改善婴儿中肺炎球菌感染(例如中耳炎)的改进型疫苗。所述肺炎球菌游离蛋白可以是与用作载体蛋白的任何肺炎链球菌蛋白相同或不同。一种或更多种卡他莫拉菌蛋白抗原也可以以游离形式或缀合形式包括在联合疫苗中。因此,本发明是诱导抗婴儿中耳炎的(保护性)免疫应答的改进方法。

[0189] 在另在一个实施方案中,本发明是一种改进的方法,所述方法通过施用安全有效量的本发明疫苗[儿科疫苗],诱导抗婴儿(在本发明的范围内定义为0-2岁)中耳炎的(保护性)免疫应答。本发明的进一步实施方案包括:提供用于医药的本发明的抗原性肺炎链球菌缀合物组合物;以及本发明的抗原性肺炎链球菌缀合物组合物在制备用于预防(或治疗)肺炎球菌性疾病的药物中的应用。

[0190] 在又一个实施方案中,本发明是一种改进的方法,所述方法通过施用安全有效量的本发明疫苗,优选与一种或两种作为游离蛋白或缀合蛋白的肺炎链球菌蛋白结合,在老年人群(在本发明的范围内,如果患者是50岁以上,通常超过55岁,普遍超过60岁,则他们被认为是老年人)中诱导的(保护性)免疫应答,所述肺炎链球菌蛋白可以与任何用作载体蛋白的肺炎链球菌蛋白相同或不同。

[0191] 本发明的另一方面是:使人类宿主免疫以对抗由肺炎链球菌引起的和任选由流感嗜血杆菌感染引起的疾病的方法,所述方法包括对宿主施用免疫保护剂量的本发明免疫原

性组合物或疫苗或药盒。

[0192] 本发明的另一方面是：用于治疗或预防由起肺炎链球菌和任选由流感嗜血杆菌感染引起的疾病的本发明免疫原性组合物。

[0193] 本发明的另一方面是：本发明的免疫原性组合物或疫苗或药盒在制备用于治疗或预防由肺炎链球菌和任选由流感嗜血杆菌感染引起的疾病的药物中的应用。

[0194] 在每种情况下，于此的术语“包含”和“包括”由发明人意图用于任选地用术语“由……组成”代替。

[0195] 本文涉及本发明的“疫苗组合物”的实施方案也适用于涉及本发明的“免疫原性组合物”的实施方案，反之亦然。

[0196] 在本专利说明书中引用的所有参考文献或专利申请在此引作参考。

[0197] 为了使本发明可被更好地理解，陈列以下实施例。这些实施例仅为阐明意图，而不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0198] 实施例1：D蛋白的表达

[0199] 流感嗜血杆菌D蛋白

[0200] 用于D蛋白表达的遗传构建体

[0201] 原始材料

[0202] 编码D蛋白的DNA

[0203] D蛋白在所有血清型和无法分型的流感嗜血杆菌菌株中高度保守。包含编码整个D蛋白基因的DNA序列的pHIC348载体已获自A Forsgren博士, Department of Medical Microbiology, University of Lund, **Malmö** General Hospital, **Malmö**, Sweden (瑞典)。D蛋白的DNA序列已由Janson等. (1991) Infect. Immun. 59:119-125公开。

[0204] 表达载体pMG1

[0205] 表达载体pMG1是pBR322的衍生物 (Gross等, 1985), 其中引入了获自λ噬菌体的用于转录和翻译外源插入基因的调控元件 (Shatzman等, 1983)。此外, 用卡那霉素抗性基因置换了氨苄青霉素抗基因。

[0206] 大肠杆菌菌株AR58

[0207] 大肠杆菌菌株AR58通过用预先在SA500衍生物 (galE::TN10, λKil⁻c1857 ΔH1) 中培养的P1噬菌体原种转导N99而产生。N99和SA500是获自the National Institute of Health中的Martin Rosenberg博士实验室的大肠杆菌K12菌株。

[0208] 表达载体pMG 1

[0209] 为了生产D蛋白, 将编码D蛋白的DNA克隆到pMG 1表达载体中。此质粒利用来自λ噬菌体DNA的信号以驱动所插入的外源基因的转录和翻译。该载体包含PL启动子、OL操纵基因以及两个利用位点 (NutL和NutR) 以缓和当提供N蛋白时的转录极性效应 (Gross等, 1985)。将包含PL启动子的载体导入大肠杆菌溶源性宿主以稳定该质粒DNA。溶源性宿主菌株含有整合到其基因组中的复制缺陷型λ噬菌体DNA (Shatzman等, 1983)。染色体的λ噬菌体DNA指导c1阻遏蛋白合成, 该阻遏蛋白与载体的OL阻遏物结合并防止RNA聚合酶与PL启动子结合, 从而转录所插入的基因。表达菌株AR58的c1基因包含温度敏感突变体, 致使PL指导的转录

可以通过温度变化来调节,即培养温度的升高使阻遏物失活并启动外源蛋白合成。该表达体系允许外源蛋白的受控合成,尤其是对细胞有毒的外源蛋白的受控表达(Shimatoka和Rosenberg,1981)。

[0210] 大肠杆菌菌株AR58

[0211] 用于产生D蛋白载体的AR58溶源性大肠杆菌菌株是标准NIH大肠杆菌K12菌株N99的衍生物($F^{-}su^{-}galK2, lacZ^{-}thr^{-}$)。它包含缺陷型溶源性 λ 噬菌体($galE::TN10, \lambda Ki1^{-}c1857 \Delta H1$)。 $Ki1^{-}$ 表型防止关闭宿主大分子合成。 $c1857$ 突变给 $c1$ 阻遏物赋予了温度敏感型损伤。 $\Delta H1$ 缺失移除了 λ 噬菌体右边的操纵子以及宿主的 bio 、 $uvr3$ 和 $chlA$ 基因座。菌株AR58通过用预先在SA500衍生物($galE::TN10, \lambda Ki1^{-}c1857 \Delta H1$)中培养的P1噬菌体原种转导N99而产生。缺陷型溶源体导入到N99用四环素来选择,这是因为在邻近的 $galE$ 基因中存在编码四环素抗性的TN10转座子。

[0212] 构建载体pMGMDPPrD

[0213] 用含有禽流感病毒的非结构S1蛋白编码基因的pMG 1载体(pMGNSI)构建pMGMDPPrD。通过PCR用在5'端和3'端分别含有NcoI和XbaI限制位点的PCR引物,从pHIC348载体中扩增D蛋白基因(Janson等1991 Infect. Immun. 59:119-125)。然后将NcoI/XbaI片段导入pMGNS1的NcoI和XbaI之间,从而产生含有NS1蛋白的N-末端81个氨基酸后接PD蛋白的融合蛋白。此载体标记为pMGNS1PrD。

[0214] 基于前文描述的构建体,产生用于表达D蛋白的最终载体。从pMGNS1PrD中移除BamHI/BamHI片段。该DNA水解移除了NS1编码区,剩下前三个N-末端残基。通过载体的重新连接,产生编码带有以下N-末端氨基酸序列的融合蛋白的基因:

[0215] -----MDP SSHSSNMANT-----

[0216] NS1 D蛋白

[0217] D蛋白不含前导肽或与脂链正常连接的N-末端半胱氨酸。因此,该蛋白既不分泌到周质中也不能脂质化,而是以可溶的形式保留在细胞质中。

[0218] 通过37℃的热激将最终的pMG-MDPPrD构建体导入AR58宿主菌株。含有质粒的细菌在卡那霉素存在下进行选择。编码D蛋白的DNA插入片段的存在通过用所选择的核酸内切酶消化分离的质粒DNA而得到证实。重组的大肠杆菌菌株称为ECD4。

[0219] D蛋白的表达处于 λP_L 启动子/ O_L 操纵基因控制下。宿主菌株AR58在基因组中含有温度敏感型 $c1$ 基因,该基因在低温下通过与 O_L 结合来阻断源于 λP_L 的表达。一旦提升温度, $c1$ 则从 O_L 中释放,而D蛋白则得到表达。

[0220] 小规模制备

[0221] 在发酵结束时,将细胞浓缩并冷冻。

[0222] 如下从收集的细胞提取并纯化D蛋白。使冷冻的细胞培养物沉淀解冻并使其重新悬浮在细胞裂解溶液中(柠檬酸缓冲液pH 6.0)至终OD₆₅₀=60。使悬浮液两次通过P=1000巴的高压匀浆器。细胞培养物匀浆通过离心澄清,细胞碎片通过过滤移除。纯化的第一步中,经过滤的溶解产物上样于阳离子交换层析柱(SP Sepharose Fast Flow)。PD通过离子相互作用与凝胶基质结合,并通过一步提高(a step increase)洗脱缓冲液的离子强度而被洗脱。

[0223] 纯化的第二步中,杂质保留在阴离子交换基质上(Q Sepharose Fast Flow)。PD不

结合到凝胶上,并可以在流出液中收集。

[0224] 在两个柱层析步骤中均利用OD监视分部收集物。含有纯化的D蛋白的阴离子交换柱层析的流出液通过超滤浓缩。

[0225] 最后,使含有D蛋白的超滤截留物质通过0.2 μ m膜。

[0226] 大规模制备

[0227] 如下从收集的细胞提取D蛋白并纯化。冷却收集的培养液,并使其两次直接通过800巴左右的高压匀浆器。

[0228] 纯化的第一步中,稀释细胞培养物匀浆并上样于阳离子交换层析柱(SP Sepharose Big beads)。PD通过离子相互作用与凝胶基质结合并通过一步提高洗脱缓冲液的离子强度而被洗脱。

[0229] 纯化的第二步中,杂质被保留在阴离子交换基质上(Q Sepharose Fast Flow)。PD不结合到凝胶上并可以在流出液中收集。

[0230] 在两个柱层析步骤中均利用OD监视分部收集物。含有纯化D蛋白的阴离子交换柱层析的流出液通过超滤浓缩。

[0231] 最后,使含有D蛋白的超滤截留物质通过0.2 μ m膜。

[0232] 实施例1b:表达PhTD

[0233] PhTD蛋白是肺炎球菌组氨酸三联体(PhT)蛋白家族的成员,其特征存在于存在组氨酸三联体(HXXHXXH模体)。PhTD是有838个氨基酸的分子并带有5个组氨酸三联体(参见MedImmune W000/37105 SEQ ID NO:4的氨基酸序列和SEQ ED NO:5的DNA序列)。PhTD的中间也含有富脯氨酸区(氨基酸第348-380位)。PhTD具有带LXXC模体的20个氨基酸的N-末端信号序列。

[0234] 基因构建体

[0235] 使用携带p λ 启动子的自制pTCMP14载体,将成熟的MedImmune PhTD蛋白(aa 21-aa 838)的基因序列重组转移到大肠杆菌中。大肠杆菌宿主菌株是AR58,其携带了cI857热敏阻遏物,使得能够热诱导所述启动子。

[0236] 进行聚合酶链反应,以从MedImmune质粒扩增phtD基因(携带来自肺炎链球菌菌株Norway 4(血清型4)的phtD基因-SEQ ID NO:5,于W0 00/37105中描述)。用仅对phtD基因特异性的引物以两个片段扩增phtD基因。引物携带NdeI和KpnI限制位点,或携带KpnI和XbaI限制位点。这些引物不与任何来自该载体的核苷酸杂交,而仅与phtD特异性基因序列杂交。用携带NdeI限制位点的第一引物插入人工ATG起始密码子。然后将产生的PCR产物插入pGEM-T克隆载体中(Promega),并确认了DNA序列。使用标准的技术将片段亚克隆到TCMP14表达载体中,并将载体转化入AR58大肠杆菌。

[0237] PhTD纯化

[0238] PhTD纯化如下实现:

[0239] • 在卡那霉素存在下培养大肠杆菌细胞:在30℃下培养30小时,然后在39.5℃下诱导18小时。

[0240] • 在作为蛋白酶抑制剂的5mM EDTA和2mM PMSF存在下破碎来自OD $\pm$ 115的整个培养物的大肠杆菌细胞:Rannie,2次通过,1000巴。

[0241] • 用膨胀床式Streamline Q XL层析于室温(20℃)下进行抗原捕获和细胞残渣去

除;用NaCl 150mM+Empigen 0.25%pH 6.5洗涤层析柱,用NaCl 400mM+Empigen 0.25%的25mM磷酸钾缓冲液pH 7.4进行洗脱。

[0242] • 在Sartobran 150柱体(0.45+0.2 μ m)上过滤。

[0243] • 4℃下在5mM咪唑存在下在pH 7.4,抗原结合在Zn⁺⁺Chelating Sepharose FF IMAC层析;用5mM咪唑和1%Empigen洗涤层析柱,用50mM咪唑洗脱,两者均在25mM磷酸钾缓冲液pH 8.0中。

[0244] • 以阳离子模式在Fractogel EMD DEAE上在pH 8.0(25mM磷酸钾)于4℃下进行弱阴离子交换层析;层析柱用140mMNaCl洗涤并用200mM NaCl洗脱,而杂质(蛋白和DNA)仍吸附在交换柱中。

[0245] • 用2mM磷酸Na/K pH 7.15在50kDa膜上浓缩并超滤。

[0246] • 纯化的半成品(bulk)在Millipak-200.2 μ m过滤柱体上进行除菌过滤。

[0247] 实施例1c:表达肺炎球菌溶血素

[0248] 肺炎球菌的肺炎球菌溶血素根据W02004/081515和W02006/032499所描述的制备并去毒。

[0249] 实施例2:

[0250] 制备缀合物

[0251] 如何制备纯化的肺炎球菌多糖为本领域所熟知。出于这些实施例的意图,基本上按照EP072513中描述的方法或通过密切相关的方法制备多糖。在缀合之前,可以通过以下描述的微流化来调整多糖的大小。

[0252] 对于每种多糖而言,活化和偶联条件是特异的。这些条件在表1给出。经大小调整的多糖(除了PS5、6B和23F以外)溶解于2M NaCl、0.2M NaCl或注射用水(WFI)中。评估所有血清型的最适多糖浓度。除了血清型18C以外,所有的血清型如以下详述直接与载体蛋白缀合。制备两种可供选择的血清型22F缀合物:其中一种直接缀合,另外一种通过ADH接头缀合。

[0253] 由在乙腈或乙腈/水50%/50%溶液中的100mg/ml储备液,将CDAP(CDAP/PS比例为0.5-1.5mg/mg PS)加到多糖溶液中。1.5分钟以后,加入0.2M-0.3M NaOH,以达到特定的活化pH。在该pH下于25℃下3分钟进行多糖的活化。将纯化的蛋白(D蛋白、PhtD、肺炎球菌溶血素或DT)(加入量取决于起始的PS/载体蛋白比例)加到活化的多糖中,在该特定pH下(在pH调节下)进行2小时(根据血清型而定)的偶联反应。为了淬灭未反应的氰酸酯基团,将2M甘氨酸溶液加到混合物中。调整pH到淬灭pH(pH 9.0)。于25℃下搅拌溶液30分钟,随后于2-8℃下过夜,同时进行连续的搅拌。

[0254] 18C的制备:

[0255] 18C通过接头(己二酸二酰肼(ADH))与载体蛋白连接。多糖血清型18C在缀合前经过微流化处理。

[0256] 用EDAC对破伤风类毒素衍生化

[0257] 为衍生化破伤风类毒素,将纯化的TT在0.2M NaCl中稀释到25mg/ml,然后加入ADH间隔物,使最终浓度达到0.2M。当间隔物完全溶解后,将pH调整到6.2。然后加入EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺)至终浓度为0.02M,并在pH调节下搅拌混合物1小时。通过于25℃提高pH值到9.0达至少30分钟,终止该缩合反应。然后将衍生化的TT渗滤(10kDa

CO膜),以除去残余的ADH和EDAC试剂。

[0258] 最后将TT_{AH}半成品(bulk)过滤除菌直至偶联步骤,并储存于-70℃。

[0259] TT_{AH}与PS 18C的化学偶联

[0260] 缀合参数的具体内容可在表1中找到。

[0261] 用水稀释2克经微流化处理的PS至规定的浓度,通过加入NaCl粉末调整到2M NaCl。

[0262] 加入CDAP溶液(100mg/ml,新鲜制备于50/50v/v乙腈/WFI中)以达到适当的CDAP/PS比例。

[0263] 通过加入0.3M NaOH使pH升高至活化pH 9.0,使其稳定在此pH下直到TT_{AH}的加入。

[0264] 3分钟以后,加入衍生化的TT_{AH}(20mg/ml,在0.2M NaCl中)至TT_{AH}/PS比例为2;调整pH到偶联pH 9.0。在pH调节下搁置溶液1小时。

[0265] 为了淬灭,将2M甘氨酸溶液加到PS/TTAH/CDAP混合物中。

[0266] 将pH调整到淬灭pH(pH 9.0)。

[0267] 于25℃下搅拌溶液30min,然后在2-8℃下连续缓慢搅拌下过夜。

[0268] PS22F_{AH}-PhtD缀合物

[0269] 在此糖的第二种缀合方法中(第一种是直接PS22-PhtD缀合法,见表1),22F通过接头(己二酸二酰肼(ADH))与载体蛋白连接。多糖血清型22F在缀合前经过微流化处理。

[0270] PS 22F的衍生化

[0271] 活化和偶联通过在控温水浴中连续搅拌下于25℃进行。

[0272] 稀释经微流化处理的PS22F,以在0.2M NaCl中获得6mg/ml的最终PS浓度,用0.1N HCl使溶液的pH调整至6.05±0.2。

[0273] 加入CDAP溶液(100mg/ml,新鲜制备于乙腈/WFI,50/50中)达到适当的CDAP/PS比例(1.5/1ww)。

[0274] 通过加入0.5M NaOH,使pH升至活化pH 9.00±0.05,并稳定在此pH下直到加入ADH。

[0275] 3分钟以后,加入ADH以达到适当的ADH/PS比例(8.9/1w/w);调整pH到偶联pH 9.0。在pH调节下搁置溶液1小时。

[0276] 将PS_{AH}衍生物浓缩并进行渗滤。

[0277] 偶联

[0278] 将在0.2M NaCl中的浓度为10mg/ml的PhtD加到PS22F_{AH}衍生物中,以使PhtD/PS22F_{AH}比例达到4/1(w/w)。用HCl将pH调整到5.0±0.05。将EDAC溶液(20mg/ml,在0.1M Tris-HCl pH 7.5中)在10min内手动加入(250μl/min),以达到1mg EDAC/mg PS22F_{AH}。获得的溶液在搅拌和pH调节下于25℃温育150min(尽管也可以使用60min)。通过加入1M Tris-HCl pH 7.5(1/10终体积)使溶液中和并于25℃放置30min。

[0279] 在Sephacryl S400HR上洗脱之前,此缀合物通过5μm Minisart过滤器澄清。

[0280] 所得的缀合物的最终PhtD/PS比为4.1(w/w),游离PS的含量低于1%,抗原性(α-PS/α-PS)为36.3%,而抗PhtD抗原性为7.4%。

[0281] 缀合物的纯化:

[0282] 使用经0.15M NaCl平衡的Sephacryl S400HR(18C用S500HR)凝胶过滤柱凝胶过滤

来纯化所述缀合物,以去除小分子(包括DMAP)与未缀合PS和蛋白。基于反应组分不同的分子大小,PS-PD、PS-TT、PS-PhtD、PS-肺炎球菌溶血素或PS-DT缀合物首先被洗脱,随后是游离的PS,然后是游离的PD或游离的DT,最后是DMAP和其它盐(NaCl、甘氨酸)。

[0283] 含有缀合物的级分通过 UV_{280nm} 检测。根据级分的 K_d 将它们合并,除菌过滤($0.22\mu m$)并储存于 $+2-8^{\circ}C$ 中。测定缀合物制备物中PS/蛋白的比例。

[0284] 肺炎链球菌PS-D蛋白/TT/DT/PhtD/Ply缀合物的具体活化/偶联/淬灭条件

[0285] 其中“ $\mu fluid$ ”在首行中出现,它表明:在缀合前所述糖通过微流化调整大小。微流化处理后糖的大小在表2中给出。

[0286] 表1肺炎链球菌PS-D蛋白/TT/DT/PhtD/Ply缀合物的具体活化/偶联/淬灭条件

[0287]

血清型	1 μfluid	4 μfluid	5	6A	6B	7F μfluid
PS 浓度 (mg/ml)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS 溶解	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
起始 PD/PS 比 例 (w/w)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

[0288]

血清型	9V μfluid	14 μfluid	18C μfluid	19A μfluid	19F μfluid	22F μfluid	23F
PS 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	10.0 (Ply)	20.0 (DT)	10.0 (PhtD)	5.0
起始载体蛋白 /PS 比例 (w/w)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

[0289] 注意: pH_a, c, q 分别对应于活化pH、偶联pH和淬灭pH

[0290] 表征:

[0291] 对每种缀合物进行表征,它们都符合表2中描述的标准。多糖含量($\mu g/ml$)通过Resorcinol试验检测,而蛋白含量($\mu g/ml$)通过Lowry试验检测。通过浓度比例确定最终的PS/PD比例(w/w)。

[0292] 游离多糖含量(%)：

[0293] 取4℃下贮存或在37℃下保存7天的游离缀合物，与 α -载体蛋白抗体和饱和硫酸铵一起温育，随后离心，通过所获得的上清液测定缀合物中的游离多糖含量。

[0294] 用 α -PS/ α -PS ELISA定量上清液中的游离多糖。通过 α -载体蛋白/ α -PS ELISA，以不存在缀合物作为对照。

[0295] 抗原性：

[0296] 通过夹心型ELISA分析相同缀合物上的抗原性，其中抗体捕捉和抗体检测的分别是 α -PS和 α -蛋白。

[0297] 游离蛋白含量(%)：

[0298] 未缀合的载体蛋白可以在纯化步骤中与缀合物分离。使用大小排阻层析(TSK 5000-PWXL)，随后用UV检测(214nm)，测定游离的残余蛋白的含量。洗脱条件使游离载体蛋白与缀合物分离。缀合物半成品中游离蛋白含量通过与标准曲线比较而确定(0-50 μ g/ml载体蛋白)。如下获得游离载体蛋白%： $\% \text{游离载体} = (\text{游离载体}(\mu\text{g/ml}) / (\text{通过Lowry法检测的相应载体蛋白的总浓度}(\mu\text{g/ml}) * 100\%))$ 。

[0299] 稳定性：

[0300] 通过HPLC-SEC凝胶过滤(TSK 5000-PWXL)，测量4℃下贮存和在37℃下保存7天的缀合物的分子量分布(K_{av})和稳定性。

[0301] 10/11/13/14-价的特征描述在表2中给出(参见该表下的注释)。

[0302] 可将蛋白缀合物吸附到磷酸铝上并合并形成最终的疫苗。

[0303] 结论：

[0304] 已经制备了免疫原性缀合物，所述免疫原性组合物一直以来都表现为有前景疫苗的组分。

[0305] 表2缀合物的特征

[0306]

缀合物	PS 大小 (Da $\times 10^3$)	载体/PS 比例	游离 PS (Elisa)	游离载体	PS 抗原性 (Elisa)	缀合物 大小(kDa)
PS1-PD	349-382*	1.5-1.6	1.0%-1.2%	3.9%-4.8%	87%-95%	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7-6.5%	3.2%-4.0%	90%-96%	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0.80	8.7-11.2%	2.2%-3.8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0.61	4.5%	未进行	45.9%	未进行
PS6B-PD***	1069-1391	0.7-0.8	1.3-1.6%	<2.0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430-3779
PS18C-TT [™]	89-97*	2.2-2.4	1.5-2.2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3.2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1.4-1.5	4.1%-5.9%	<1.2%-<1.3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2.17	5.8	未进行	37%	未进行
PS22F-AHPhtD*159-167		3.66-4.34	<1%	未进行	28-31%	未进行
PS23F-PD***	914-980	0.5	1.4-1.9%	3.7%-4.9%	137%-154%	2933-3152

[0307] *微射流处理大然PS后的PS大小

[0308] 通过混合血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F缀合物(例如剂量分别为1、3、1、1、1、1、1、3、3、1 μ g糖/人用剂量)制得10价疫苗。11价疫苗通过进一步加入来自表5的血清型3缀合物(例如1 μ g糖/人用剂量)制得。13价疫苗通过进一步加入前文所述血清型19A和22F缀合物制得(22F直接与PhtD连接,或通过ADH接头连接)[例如剂量为3 μ g每种糖/人用剂量]。14价疫苗可以通过进一步加入前文所述血清型6A缀合物[例如剂量为1 μ g糖/人用剂量]制得。

[0309] 实施例3:在本发明的免疫原性组合中含有流感嗜血杆菌D蛋白可以提供对抗急性中耳炎(AOM)的改进保护作用的证据。

[0310] 研究设计

[0311] 本研究使用了11Pn-PD疫苗,其包含血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F,其中每种都与来自流感嗜血杆菌的D蛋白缀合(参考实施例4中的表5)。受试者随机地分成两组,在其约3、4、5和12-15月龄时接受四剂11Pn-PD疫苗或Havrix。所有受试者在其3、4和5月龄时接受GSK Biologicals的Infanrix-hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib)疫苗。Infanrix-hexa是在给药之前混合的Pediarix和Hib的组合。施用第三剂疫苗的2周后,开始“依照方案”的分析进行效力随访,并一直持续到24-27月龄。肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的鼻咽携带情况在所选择的受试者亚群中进行评价。

[0312] 如果孩子患病、出现耳痛、鼓膜的自发性穿孔或自发性耳溢液,则建议其双亲咨询研究人员。如果研究人员怀疑是AOM发作,则该孩子直接转移至耳鼻喉(ENT)专科医生处以确诊。AOM的临床诊断基于目测鼓膜外观(即红肿、膨胀、丧失光反射)或出现中耳液体渗出物(通过简易耳镜或气式耳镜或通过显微镜检查证实)。此外,必须出现以下体征或症状中的至少两种:耳痛、耳溢液、听力受损、发热、嗜睡、过敏、食欲减退、呕吐或腹泻。如果ENT专

科医生确认了临床诊断,则通过鼓膜穿刺术收集中耳液的样本以进行细菌学检验。

[0313] 对于因复发疾病就诊的受试者,如果从之前的AOM发作开始已过去了超过30天,则认为已经开始了新的AOM发作。此外,如果分离的细菌/血清型不同于上次的分离株,则无论这两次连续发作的时间间隔有多久,都认为AOM发作是新的细菌发作。

[0314] 试验结果

[0315] 总共登记了4968名婴儿,2489名在11Pn-PD组中,而2479名在对照组中。这两组之间在人口统计特征或风险因素上不存在显著的差异。

[0316] 临床发作与AOM病例定义

[0317] 在依照方案的随访期间,在11Pn-PD组中总共记录了333例临床AOM发作,而在对照组中记录了499例。

[0318] 表3表明了11Pn-PD疫苗和之前在芬兰测试过的两种7价疫苗(Eskola等N Engl J Med2001;344:403-409和Kilpi等Clin Infect Dis2003 37:1155-64)对抗任何AOM发作和由不同肺炎球菌血清型、流感嗜血杆菌、NTHi和卡他莫拉菌引起的AOM发作的保护功效。使用11Pn-PD,实现了总体AOM疾病负荷量统计学显著地和临床相关地降低了33.6%,而与病原学无关(表3)。

[0319] 对抗归因于包含在11Pn-PD疫苗中的11种肺炎球菌血清型中任一种的AOM发作的总体功效是57.6%(表3)。

[0320] 该研究中的另一个重要发现是:由11Pn-PD疫苗提供了对抗流感嗜血杆菌引起的AOM的35.6%保护作用(特别是由NTHi提供了35.3%的保护作用)。已知在肺炎球菌缀合疫苗时代中流感嗜血杆菌作为AOM主要病因的重要性增加,因此这一发现具有重要的临床意义。与抗AOM的保护作用相一致的是,在出生的第二年接种增强剂量后,11Pn-PD疫苗同样减少了流感嗜血杆菌的鼻咽携带情况。这些发现与之前在芬兰的观察结果形成对比,在芬兰的观察结果中对于两种7价肺炎球菌缀合疫苗,观察到由流感嗜血杆菌引起的AOM发作有所增加(Eskola等和Kilpi等),以此作为病因取代的证据。

[0321] 抗由Hi引起的AOM发作的保护作用与抗载体D蛋白的抗体水平之间不能建立明确的相关性,因为在11Pn-PD疫苗接种者(仍未出现Hi AOM发作)中的首次接种后的抗PD IgG抗体浓度,基本上与在功效随访期间出现至少一次Hi AOM发作的疫苗接种者的首次接种后抗PD IgG抗体浓度相同。然而,尽管在疫苗的生物影响与首次接种后IgG抗PD免疫原性之间不能建立相关性,但是仍然有理由推测:在流感嗜血杆菌菌株中高度保守的PD载体蛋白很大程度上有助于诱导抗Hi的保护作用。

[0322] 对AOM疾病的作用与对鼻咽携带的作用相伴随,后者对于疫苗血清型肺炎球菌和对流感嗜血杆菌而言程度相似(图1)。在PD-缀合物疫苗接种者中流感嗜血杆菌鼻咽携带的这种减少支持了以下假设:即使保护性效力不能与通过ELISA检测的抗PD IgG免疫应答相关联,但是PD-缀合物疫苗仍然具有抗流感嗜血杆菌的直接保护作用。

[0323] 在以下的实验中,使用毛丝鼠(chinchilla)中耳炎模型和来自免疫接种了此实施例的11价制剂或实施例2的10价疫苗(也参见表1和表2以及下面的注释)的婴儿的血清合并液。与免疫前血清合并液比较,两种血清合并液致使患中耳炎动物的百分比显著地降低。在10价和11价免疫合并液之间没有显著差异。这表明,两种疫苗在该模型中诱导对抗无法分型流感嗜血杆菌所致中耳炎的保护作用的潜力相似。

[0324]

表 3

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

NP=未公开; N=在 ATP 功效组群中的受试者数目; n=发作为数目
*疫苗肺炎链球菌血清型: 对于 11Pn-PD=11 种血清型, 对于 Pprevnar 和 7v-OMP=7 种血清型
MEF=中耳液体

- [0325] 实施例4:
- [0326] 用于血清型19F的载体蛋白的选择

[0327] 使用的ELISA法

[0328] 22F抑制ELISA法基本上基于由Concepcion和Frasch在2001年提议并由Henckaerts等2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360报道的测定法。简单地说,将纯化的肺炎球菌多糖与甲基化人血清白蛋白混合,并吸附在Nunc Maxisorp™ (Roskilde,DK) 高结合微量滴定板上于4℃过夜。用10%胎牛血清(FBS)的PBS溶液在室温下搅拌1小时以封闭这些板。血清样品稀释在含有10%FBS、10μg/mL细胞壁多糖(SSI)和2μg/mL肺炎球菌多糖血清型22F(ATCC)的PBS中,并用相同缓冲液在微量滴定板上进一步稀释。使用89-SF中的血清型特异性IgG的浓度来针对89-SF校准的内部参比物,用相同的方法处理并包括于每一板上。洗涤以后,使用在10%FBS(在PBS中)中稀释并在室温在搅拌下温育1小时的过氧化物酶缀合抗人IgG单克隆抗体(Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) (in PBS),检测结合的抗体。使用现成的单一组分四甲基联苯胺过氧化物酶免疫检测底物试剂盒(BioRad, Hercules, CA, US),在室温黑暗中进行显色。用0.18M H₂SO₄终止反应,在450nm读取光密度。通过在内标血清曲线上查阅规定范围内的光密度点,计算出样品中血清型特异性IgG的浓度(以μg/mL为单位),该内标血清曲线通过用SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 软件计算的4参数逻辑斯蒂对数方程建模。考虑到检测限和定量极限,对于所有血清型ELISA的截留值都是0.05μg/mL IgG。

[0329] 调理吞噬测定

[0330] 在2003年六月的WHO consultation meeting (WHO研讨会)上,推荐使用Romero-Steiner等Clin Diagn Lab Immunol 200310(6):pp1019-1024所述的OPA测定。在以下试验中,用该方案测试血清型的OPA活性。

[0331] 缀合物的制备

[0332] 在研究11Pn-PD&Di-001与11Pn-PD&Di-007中,包括了三种11价疫苗制剂(表4),其中是3μg 19F多糖与白喉类毒素缀合(19F-DT),而不是1μg多糖与D蛋白缀合(19F-PD)。用于研究11Pn-PD、11Pn-PD&Di-001以及11Pn-PD&Di-007的缀合参数分别在表5、6和7中公开。

[0333] 首次接种这些19F-DT制剂后1个月的抗肺炎球菌抗体应答和抗血清型19F的OPA活性分别出示于表8和9。

[0334] 表10显示了在23价普通多糖增强疫苗接种之前和之后,22F-ELISA抗体浓度和到达0.2μg/mL阈值的受试者的百分比。

[0335] 通过在初次接种后一个月血清阳性率(调理吞噬效价≥1:8)和OPA GMT更高表明,对于由这些19F-DT制剂诱导的抗体而言,调理吞噬活性表现出明显提高(表9)。在增强接种23价普通多糖后一个月,对于初次接种19F-DT制剂的儿童而言,19F抗体的调理吞噬活性仍显著更佳(表11)。

[0336] 表12给出了与第4次接种连续剂量的Prenvat®相比较先前初次接种了19F-DT或19F-PD缀合物的学步儿童再接种11Pn-PD增强剂量之后的免疫原性数据。已知在美国引入Prenvar®后报告的突破情况,因此当与DT载体蛋白缀合时血清型19F的调理吞噬活性提高对于候选疫苗可能是优点。

[0337] 表13提供了关于交叉反应的血清型19A的19F-DT缀合物的ELISA和OPA数据。可以发现19F-DT诱导了低量但显著的抗19A的OPA活性。

[0338] 表4用于临床研究的肺炎球菌缀合疫苗制剂

[0339]

制剂	肺炎球菌血清型 $\mu\text{g}/\text{载体蛋白}$											Al^{3+} mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0.8
19F-DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤ 0.35
剂型 1												
19F-DT	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0.35
剂型 2												
19F-DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0.5
剂型 3												

[0340]

表5PS肺炎链球菌-D蛋白/TT/DT缀合物的特定活化/偶联/淬灭条件

[0341]

血清型	1 天然的	3 μfluid	4 天然的	5 天然的	6B 天然的	7F 天然的
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS 溶解	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
起始 PS/PD 比例 (w/w)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
$\text{pH}_a=\text{pH}_c=\text{pH}_q$	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
偶联时间	60 min	60 min	45 min	40 min	60 min	60 min

[0342]

血清型	9V 天然的	14 天然的	18C 天然的	19F 天然的	23F 天然的
PS 浓度 (mg/ml)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
起始 PS/PD 比 例(w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
$\text{pH}_a=\text{pH}_c=\text{pH}_q$	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 min	60 min	45 min	30 min	60 min

[0343] 表6用于11Pn-PD&Di-001研究的PS肺炎链球菌-D蛋白/TT/DT缀合物的具体活化/偶联/淬灭条件

[0344]	血清型	1 μfluid	3 μfluid	4 μfluid	5 μfluid	6B μfluid	7F 天然的
	PS 浓度 (mg/ml)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
	PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
	PD 浓度 (mg/ml)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
	起始 PD/PS 比例(w/w)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
	CDAP 浓度 (mg/mg PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
	pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
	偶联时间	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min

[0345]	血清型	9V 天然的	14 天然的	18C μfluid	19F μfluid	23F μfluid
	PS 浓度(mg/ml)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
	PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
	载体蛋白浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
	起始载体蛋白 /PS 比例(w/w)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
	CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	0.75
	pH _a =pH _c =pH _q	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
	偶联时间	60 min	60 min	30 min	60 min	60 min

[0346] 表7用于11Pn-PD&Di-007研究的PS肺炎链球菌-D蛋白/TT/DT缀合物的具体活化/偶联/淬灭条件

[0347]

血清型	1 天然的	3 μfluid	4 天然的	5 天然的	6B 天然的	7F μfluid
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS 溶解	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
起始 PD/PS 比例 (w/w)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9
偶联时间	60 min	60 min	45 min	40 min	60 min	60 min

[0348]

血清型	9V μfluid	14 μfluid	18C 天然的	19F μfluid	19F μfluid	23F μfluid
PS 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
载体蛋白浓 度(mg/ml)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
起始载体蛋 白/PS 比例 (w/w)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP 浓 度 (mg/mg PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 min	60 min	45 min	120 min	120 min	60 min

[0349] 表8初次疫苗接种1μg 19F-PD、3μg 19F-DT或Prevnar (2μg19F-CRM) 后一个月,19F 抗体浓度≥0.20μg/mL的受试者的百分比和19F抗体的几何平均抗体浓度(95%CI下的GMC; μg/mL) (总群组)

[0350]

组	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/mL) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/mL) (95% CI)
11Pn-PD	152	98.7 (95.3-99.8)	1.93 (1.67-2.22)	50	100 (92.9-100)	2.78 (2.31-3.36)
19F-DT 剂型 1 ^Γ	146	99.3 (96.2-100)	2.88 (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT 剂型 2 ^Γ	150	96.0 (91.5-98.5)	2.43 (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT 剂型 3 ^Γ	-	-	-	50	96.0 (86.3-99.5)	3.70 (2.58-5.30)
<i>Pprevnar</i>	148	98.6 (95.2-99.8)	2.98 (2.60-3.41)	41	97.6 (87.1-99.9)	2.91 (2.15-3.94)

[0351] ^Γ不同制剂的组成在表4中提供

[0352] 表9初次疫苗接种1μg 19F-PD、3μg 19F-DT或Pprevnar (2μg19F-CRM) 后一个月,19F OPA效价≥1:8的受试者的百分比和19F OPA GMT (总群组)

[0353]

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

[0354] ^Γ不同制剂的组成在表4中提供

[0355] 表10初次疫苗接种1μg 19F-PD、3μg 19F-DT或Pprevnar (2μg19F-CRM) 的儿童接受23价普通多糖增强剂量之前和之后一个月,19F抗体浓度≥0.20μg/mL的受试者的百分比和19F抗体GMC (μg/mL) (总群组)

[0356]

初次组	11Pn-PD 和 Di-002 (22F ELISA)					
	增强疫苗接种前			23 价 PS 增强接种后一个月		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT 剂型 1 ^Γ	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT 剂型 2 ^Γ	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
<i>Prevnar</i>	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

[0357] Γ 不同制剂的组成在表4中提供

[0358] 表11初次疫苗接种1μg 19F-PD、3μg 19F-DT或Pevnar (2μg19F-CRM) 的儿童接受23价普通多糖增强剂量之前和之后一个月,19F OPA效价≥1:8的受试者的百分比和19F OPA GMT (总群组)

[0359]

初次组	11Pn-PD 和 Di-002					
	增强免疫接种前			23 价 PS 增强接种后一个月		
	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT 制剂 1 ^Γ	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT 制剂 2 ^Γ	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
<i>Pevnar</i>	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

[0360] Γ 不同制剂的组成在表4中提供

[0361] 表12初次疫苗接种1μg 19F-PD、3μg 19F-DT或Pevnar (2μg19F-CRM) 的儿童在接受11Pn-PD或Pevnar增强剂量后一个月,抗体浓度≥0.20μg/mL、OPA≥1:8的受试者的百分比和抗19F肺炎球菌的GMC/GMT (总群组)。

初次组	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA 法			OPA 法		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94.9-100)	4.52 (3.7-5.5)	21	100 (83.9-100)	255.6 (135.5-481.9)
19F-DT 剂型 1 ^Γ	66	98.5 (91.8-100)	3.45 (2.8-4.3)	23	95.7 (78.1-99.9)	374.0 (192.6-726.2)
19F-DT 剂型 2 ^Γ	70	98.6 (92.3-100)	3.80 (2.9-4.9)	29	96.6 (82.2-99.9)	249.1 (144.7-428.7)
<i>Pprevnar</i>	69	97.1 (89.9-99.6)	2.56 (2.0-3.3)	31	96.8 (83.3-99.9)	528.7 (319.4-875.2)

[0363] ^Γ不同制剂的组成在表4中提供

[0364] 表13初次疫苗接种1μg19F-PD、3μg 19F-DT或Pprevnar (2μg19F-CRM) 后一个月,抗体浓度≥0.20μg/mL、OPA≥1:8的受试者的百分比和抗19A肺炎球菌的GMC/GMT (总群组)

组	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA 法			OPA 法		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/mL) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28.9 (16.4-44.3)	0.09 (0.07-0.11)	52	7.7 (2.1-18.5)	5.2 (4.0-6.8)
19F-DT 剂型 2 ^Γ	51	29.4 (17.5-43.8)	0.11 (0.08-0.16)	59	27.1 (16.4-40.3)	12.4 (7.6-20.3)
<i>Pprevnar</i>	55	18.2 (9.1-30.9)	0.10 (0.08-0.12)	61	3.3 (0.4-11.3)	4.6 (3.8-5.6)

[0366] ^Γ不同制剂的组成在表4中提供

[0367] 实施例5:临床前模型中的佐剂实验:对老龄恒河猴中肺炎球菌11价多糖缀合物的免疫原性的影响

[0368] 为了优化老年人群中针对缀合肺炎球菌疫苗产生的免疫应答,GSK用新型佐剂-C佐剂配制了11价多糖(PS)缀合物疫苗,参见下文。

[0369] 对5只老龄恒河猴(14-28岁)的组别进行肌肉(IM)免疫接种:在第0天和第28天,用500μl的吸附在315μg AlPO₄上的11价PS缀合物或用500μl与C佐剂混合的11价PS缀合物接种。

[0370] 两种疫苗制剂中,每种11价PS缀合物由以下缀合物组成:PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-PD、PS19F-PD、PS23F-DT和PS6B-DT。所使用疫苗剂量是按照表6条件(实施例4)缀合的疫苗的人用剂量的1/5 (除了6B[10μg]以外,每种糖5μg/人用剂量),唯有19F按照以下CDAP法条件制备:9mg/ml经大小调整的糖,5mg/m PD,起始PD/PS比例为1.2/1,CDAP浓度为0.75mg/mg PS,pH_a=pH_c=pH_q 9.0/9.0/9.0,偶联时间为60min。

[0371] 测定在第42天收集的血清中的抗PS ELISA IgG水平和调理吞噬效价。通过酶联免疫斑点 (Elispot) 由在第42天收集的外周血细胞测量抗PS3恒河猴B细胞的频率。

[0372] 根据以下出示的结果,相对于采用A1P04的缀合物的免疫原性而言,C佐剂显著地改进了老龄恒河猴中的11价PS缀合物的免疫原性。该新型佐剂增强了抗PS的IgG应答(图1)和调理吞噬抗体效价(表14)。还有支持性证据表明,PS3特异性记忆B细胞的频率由于C佐剂的使用而升高(图2)。

[0373] 表14,老龄恒河猴中缀合物的免疫原性(第二次接种后(post-II) 调理吞噬效价)

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
[0374]	11 价 A1PO4	免疫前	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8
		第二次后 14 天	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64
	11 价 Adj-C	免疫前	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8
		第二次后 14 天	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048

[0375] B细胞酶联免疫斑点 (Elispot)

[0376] 该测定的原理依赖于以下事实:在用CpG培养5天后,记忆B细胞在体外成熟为浆细胞。体外产生的抗原特异性浆细胞可以容易地检测,并且因此可以使用B细胞酶联免疫斑点法计数。特异性浆细胞的数量反映在开始培养时的记忆B细胞频率。

[0377] 简要地说,体外产生的浆细胞在包被了抗原的培养平板中温育。抗原特异性的浆细胞形成抗体/抗原斑点,后者通过传统的酶联免疫步骤检测并被计作是记忆B细胞。在该研究中,已经用多糖包被培养平板,以计算各自的记忆B细胞数量。结果以1百万个记忆B细胞中的PS特异性记忆B细胞的频率来表示。

[0378] 研究表明,C佐剂能够缓解已知的PS3增强能力的问题(参见5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Disease, April 2-6 2006, Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 Pneumococcal conjugate (抗血清型3肺炎球菌缀合物的免疫应答的特异性). Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, P010.06)。

[0379] 实施例6,去毒型肺炎球菌溶血素(dP1y)作为蛋白载体增强幼龄Balb/c小鼠中PS 19F的免疫原性的效力

[0380] 对40只雌性Balb/c小鼠(4周龄)的组别进行IM免疫:在第0、14和28天,用50 μ l 4价普通PS或4价dP1y-缀合的PS,两者都与C佐剂混合。

[0381] 两种疫苗制剂都由0.1 μ g(糖量)的以下PS中的每一种组成:PS8、PS12F、PS19F和PS22F。

[0382] 在第42天收集的血清中测定抗PS ELISA IgG水平。

[0383] 如图3中所例示的,与接种了普通PS的小鼠相比,给予了4价dP1y缀合物的小鼠中抗PS19F应答得到强烈地提高。观察到抗PS8、12F和22F IgG应答有同样的改善(数据未出示)。

[0384] 实施例7,肺炎球菌组氨酸三联体D蛋白(PhtD)作为蛋白载体增强幼龄Balb/c小鼠中PS 22F的免疫原性的效力

[0385] 对40只雌性Balb/c小鼠(4周龄)的组别进行IM免疫:在第0、14和28天,用50 μ l 4价普通PS或4价PhtD-缀合的PS,两者都与C佐剂混合。

- [0386] 两种疫苗制剂都由各0.1 μ g (糖量)的以下缀合物组成:PS8、PS12F、PS19F和PS22F。
- [0387] 在第42天收集的血清中测定抗PS ELISA IgG水平。
- [0388] 如图4中所例示的,与接种了普通PS的小鼠相比,给予了4价PhTD缀合物的小鼠中抗PS22F应答得到强烈地提高。观察到抗PS8、12F和19F IgG应答有同样的改善(数据未出示)。
- [0389] 实施例8,含有19A-dPly和22F-PhTD的13价PS缀合物在老龄C57BI小鼠中的免疫原性
- [0390] 对30只老龄C57BI小鼠(>69周龄)的组别进行IM免疫:在第0、14和28天,用50 μ l 11价PS缀合物或13价PS缀合物,两者都与C佐剂混合(参见下文)。
- [0391] 11价疫苗制剂由各0.1 μ g糖量的以下缀合物组成:PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT和PS23F-PD(参见表1以及表2下面讨论的关于11价疫苗的评述)。13价疫苗制剂另外还含有0.1 μ g PS19A-dPly和PS22F-PhTD缀合物(参见表1以及表2下面讨论的关于13价疫苗的注释[使用直接缀合的22F])。在组2和组4中,用GMBS处理使肺炎球菌溶血素载体去毒,在组3和组5中,用甲醛去毒。在组2和组3中,用PhTD缀合PS 22F,在组4和组5中,使用了PhTD_E融合体(构建体VP147,来自WO 03/054007),在组6中,19A与白喉类毒素缀合,而22F与D蛋白缀合。
- [0392] 在第42天收集的各个血清中测定抗PS 19A和22F的ELISA IgG水平。
- [0393] 检测合并血清中针对其它PS产生的ELISA IgG应答。
- [0394] 在13价缀合疫苗制剂内施用的19A-dPly和22F-PhTD在老龄C57BI小鼠中表现出免疫原性(表15)。与接受了11价制剂的小鼠相比,在接受了13价制剂的小鼠中针对其他PS诱导的免疫应答没有受到负面影响。
- [0395] 表15,老龄C57BI小鼠中PS的免疫原性(第三次接种后(post-I11)的IgG水平)

[0396]

老龄 C57 Black 小鼠						
ELISA	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
	11V	11V	11V	11V	11V	11V
		19A-dPly	19A-dPly	19A-dPly	19A-dPly	19A-DT
		gmbS	甲醛	gmbS	甲醛	22F-PD
		22F-PhTD	22F-PhTD	22F-PhTD-E	22F-PhTD-E	
	0.1 μ g/50 μ l	0.1 μ g/50 μ l	0.1 μ g/50 μ l	0.1 μ g/50 μ l	0.1 μ g/50 μ l	0.1 μ g/50 μ l
	C 佐剂	C 佐剂	C 佐剂	C 佐剂	C 佐剂	C 佐剂

[0397]

1	平均值 合并	19.30	20.20	24.40	12.80	12.10	13.60
3	平均值 合并	6.32	4.84	5.21	6.74	2.38	2.54
4	平均值 合并	60.9	67.1	51.4	47.4	45.5	41.1
5	平均值 合并	1.34	3.81	3.06	2.75	1.26	1.23
6B	平均值 合并	4.41	4.12	5.88	1.58	2.31	5.64
7F	平均值 合并	0.83	0.81	1.65	1.98	0.89	0.99
9V	平均值 合并	13.8	23.7	20.0	13.1	15.5	9.6
14	平均值 合并	25.73	42.96	34.12	32.53	23.97	15.60
18C	平均值 合并	13.4	20.1	11.9	9.1	8.3	8.4
19F	平均值 合并	57.5	90.0	63.8	36.5	47.0	69.1
23F	平均值 合并	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC IC %血清	0.06 0.04-0.1 33%	0.09 0.05-0.14 47%	0.25 0.15-0.41 83%	0.08 0.06-0.12 53%	0.23 0.14-0.38 80%	0.19 0.09-0.3 73%

[0398]

22F	GMC IC %血清	NR 0%	5.81 3.2-10.6 97%	3.76 1.8-7.9 90%	0.54 0.3-1.1 77%	0.85 0.4-1.7 87%	2.02 1.2-3.4 97%
------------	--------------------------------	--------------	-------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

[0399] 实施例9, 含有19A-dP1y和22F-PhtD的13价PS缀合物在幼龄Balb/c小鼠中的免疫

原性

[0400] 对30只幼龄Balb/c小鼠(4周龄)的组别进行肌肉(IM)免疫:在第0、14和28天,用50 μ l 11价PS缀合物或13价PS缀合物,两者都与C佐剂混合(参见下文)。

[0401] 11价疫苗制剂由各0.1 μ g糖量的以下缀合物组成:PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT和PS23F-PD(参见表1以及表2下面讨论的关于11价疫苗的注释)。13价疫苗制剂另外还含有0.1 μ g PS19A-dPly和PS22F-PhtD缀合物(参见表1以及表2下面讨论的关于13价疫苗的注释[使用直接缀合的22F])。在组2和组4中,用GMBS处理使肺炎球菌溶血素载体去毒,在组3和组5中,用甲醛去毒。在组2和组3中,用PhtD缀合PS 22F,在组4和组5中,使用了PhtD_E融合体(构建体VP147,来自WO 03/054007),在组6中,19A与白喉类毒素缀合,而22F与D蛋白缀合。

[0402] 在第42天收集的各个血清中测定抗PS 19A和22F的ELISA IgG水平。

[0403] 检测合并血清中针对其它PS产生的ELISA IgG应答。

[0404] 在13价缀合疫苗制剂中施用的19A-dPly和22F-PhtD在幼龄Balb/c小鼠中表现出免疫原性(表16)。与接受了11价制剂的小鼠相比,接受了13价制剂的小鼠中针对其他PS诱导的免疫应答没有受到负面影响。

[0405] 表16,幼龄Balb/c小鼠中PS的免疫原性(第三次接种后的IgG水平)

[0406]

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

[0407]

19F	平均值 合并	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2
23F	平均值 合并	4.98	3.9	5.11	0.57	3.13	4.57
19A	GMC	0.4	32.8	25.1	21.6	18.9	23.5
	IC	0.2-0.6	26.4-40.7	20.6-30.6	17.5-26.7	15.1-23.5	19.5-28.5
	%血清	93%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	NR	3.99	3.76	6.27	8.70	18.76
	IC		1.9-8.42	1.8-8	3.8-10.4	5.4-13.9	15.2-23.1
	%血清	0%	93%	100%	100%	100%	100%

[0408] 实施例10, 含有19A-dPly和22F-PhtD的13价PS缀合物在豚鼠中的免疫原性

[0409] 对20只幼龄豚鼠(Hartley品系;5周龄)的组别进行IM免疫接种:在第0、14和28天, 用125 μ l 11价PS缀合物或13价PS缀合物, 两者都与C佐剂混合(参见下文)。

[0410] 11价疫苗制剂由各0.25 μ g糖量的以下缀合物组成:PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT和PS23F-PD(参见表1以及表2下面讨论关于的11价疫苗的注释)。13价疫苗制剂另外还含有0.1 μ g PS19A-dPly和PS22F-PhtD缀合物(参见表1以及表2下面讨论的13价疫苗的注释[使用直接缀合的22F])。在组2和组4中, 用GMBS处理使肺炎球菌溶血素载体去毒, 在组3和组5中, 用甲醛去毒。在组2和组3中, 用PhtD缀合PS 22F, 在组4和组5中, 使用了PhtD_E融合体(构建体VP147, 来自WO 03/054007), 在组6中, 19A与白喉类毒素缀合, 而22F与D蛋白缀合。

[0411] 在第42天收集的各个血清中测定抗PS 19A和22F的ELISA IgG水平。

[0412] 检测合并血清中针对其它PS产生的ELISA IgG应答。

[0413] 表17, 幼龄Balb/c小鼠中PS免疫原性(第三次接种后IgG的水平)

[0414]

豚鼠						
ELISA	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
	11V 0.1μg/50μl C 佐剂	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD 0.1μg/50μl C 佐剂	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1μg/50μl C 佐剂	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl C 佐剂	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl C 佐剂	11V 19A-DT 22F-PD 0.1μg/50μl C 佐剂
1 平均值 合并	78.00	77.21	76.15	68.77	68.59	81.04
3 平均值 合并	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4 平均值 合并	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5 平均值 合并	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40
6B 平均值 合并	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F 平均值 合并	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1
9V 平均值 合并	90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14 平均值 合并	71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C 平均值 合并	109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1

[0415]

19F	平均值 合并	73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23F	平均值 合并	19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A	GMC	0.4	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74
	IC	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
	%血清	75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
	IC	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
	%血清	10%	95%	95%	100%	100%	100%

[0416] 实施例11:制备和检测的制剂

[0417] a) 制备以下制剂(使用表1的13价疫苗和表5的血清型3—参见表2下面讨论的关于14价疫苗的注释[使用直接缀合的22F或通过ADH接头])。如下面所示的,糖与磷酸铝和3D-MPL一起配制。

[0418]

14V <u>25μg MPL</u> BAC 铝含量的总和 > FF 每剂:						14V <u>10μg MPL</u> BAC 铝含量的总和 > FF 每剂:					
PS	载体	μg PS	μg MPL	PS/AI 比 1/x	μg AI	PS	载体	μg PS	μg MPL	PS/AI 比 1/x	μg AI
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AH}	3		15	45	18C	TT _{AH}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhID	3		10	30	22F	PhID	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
FF 铝含量				总量 =	355	FF 铝含量				总和 =	295

[0419] b) 用每种以下的佐剂对相同的糖制剂进行佐剂化:

[0420] 一下表中出示了每500μl剂量的乳剂组分的浓度。

	佐剂A1	佐剂A2	佐剂A3
[0421] 成分	250μl o/w	125μl o/w	50μl o/w
	乳剂	乳剂	乳剂

α -生育酚	11.88mg	5.94mg	2.38mg
角鲨烯	10.7mg	5.35mg	2.14mg
吐温80	4.85mg	2.43mg	0.97mg

[0422]		佐剂A4	佐剂A5	佐剂A6	佐剂A7
	成分	250 μ l o/w	250 μ l o/w	125 μ l o/w	50 μ l o/w
		乳剂	乳剂	乳剂	乳剂
	α -生育酚	11.88mg	11.88mg	5.94mg	2.38mg
	角鲨烯	10.7mg	10.7mg	5.35mg	2.14mg
	吐温80	4.85mg	4.85mg	2.43mg	0.97mg
	3D-MPL	50 μ g	25 μ g	25 μ g	10 μ g

[0423] c) 糖还与两种基于脂质体的佐剂一起配制:

[0424] 佐剂B1的组成

[0425] 定性定量 (每0.5mL剂量)

[0426] 脂质体:

[0427] -DOPC 1mg

[0428] -胆固醇 0.25mg

[0429] 3DMPL 50 μ g

[0430] QS21 50 μ g

[0431] KH_2PO_4 3.124mg缓冲液

[0432] Na_2HPO_4 0.290mg缓冲液

[0433] NaCl 2.922mg

[0434] (100mM)

[0435] WFI q.s.ad 0.5ml溶剂

[0436] pH 6.1

[0437] 1. 总P04浓度=50mM

[0438] 佐剂B2的组成

[0439] 定性定量 (每0.5mL剂量)

[0440] 脂质体:

[0441] -DOPC 0.5mg

[0442] -胆固醇 0.125mg

[0443] 3DMPL 25 μ g

[0444] QS21 25 μ g

[0445] KH_2PO_4 3.124mg缓冲液

[0446] Na_2HPO_4 0.290mg缓冲液

[0447] NaCl 2.922mg

- [0448] (100mM)
- [0449] WFI q.s.ad 0.5ml溶剂
- [0450] pH 6.1
- [0451] d) 糖还与C佐剂一起配制(参见上文中已经用此佐剂的其他组合物):
- [0452] 定性定量(每0.5mL剂量)
- [0453] 水包油乳剂:50 μ l
- [0454] -角鲨烯 2.136mg
- [0455] - α -生育酚 2.372mg
- [0456] -吐温80 0.97mg
- [0457] -胆固醇 0.1mg
- [0458] 3DMPL 50 μ g
- [0459] QS21 50 μ g
- [0460] KH_2PO_4 0.470mg缓冲液
- [0461] Na_2HPO_4 0.219mg缓冲液
- [0462] NaCl 4.003mg
- [0463] (137mM)
- [0464] KCl 0.101mg
- [0465] (2.7mM)
- [0466] WFI q.s.ad 0.5ml溶剂
- [0467] pH 6.8
- [0468] 实施例12, 缀合化学对Balb/c小鼠中22F-PhtD缀合物的免疫原性的影响
- [0469] 对30只雌性Balb/c小鼠的组别进行肌肉(IM)途径免疫接种: 在第0、14和28天, 用含有PS1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F和23F的13价PS制剂(剂量: 对于PS 4、18C、19A、19F和22F是0.3 μ g糖/缀合物, 而对于其他PS是0.1 μ g糖/缀合物)。
- [0470] PS 18C与破伤风类毒素缀合, 19F与白喉类毒素缀合, 19A与甲醛去毒型Ply缀合, 22F与PhtD缀合, 而其他的PS与PD缀合。
- [0471] 比较了由通过直接CDAP化学制备的22F-PhtD或由22F-AH-PhtD (ADH衍生化的PS)组成的两种制剂。参见实施例2、表1以及表2下有关用22F直接缀合或通过ADH间隔物制备的13价疫苗特征的注释。所述疫苗制剂补充了C佐剂。
- [0472] 抗PS22F ELISA IgG水平和调理吞噬效价在第42天收集的血清中检测。
- [0473] 根据两者的IgG水平(图5)和调理吞噬效价(图6), 22F-AH-PhtD表现出远高于22F-PhtD的免疫原性。
- [0474] 实施例13. 新型佐剂对肺炎链球菌荚膜PS缀合物的免疫原性的影响
- [0475] 对40只雌性Balb/c小鼠的组别进行IM途径的免疫接种: 在第0、14和28天, 用含有PS1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F和23F的13价PS制剂(剂量: 对于PS4、18C、19A、19F和22F是0.3 μ g糖/缀合物, 而对于其他PS是0.1 μ g糖/缀合物)。
- [0476] PS18C与破伤风类毒素缀合, 19F与白喉类毒素缀合, 19A与甲醛去毒型Ply缀合, 22F与PhtD缀合, 而其他的PS与PD缀合。参见实施例2、表1以及表2下有关用直接缀合的22F配制的13价疫苗特征的注释。

[0477] 比较了补充A1PO₄、佐剂A1、佐剂A4或佐剂A5的四种制剂。

[0478] 检测在第42天收集的和每组合并的血清中抗PS、Ply、PhtD和PD的ELISA IgG水平。对每种抗原计算以下比例：用所测试的新型佐剂诱导的IgG水平/用A1PO₄诱导的IgG水平。

[0479] 与典型的A1PO₄制剂相比，测试的所有新型佐剂使对13价缀合物的免疫应答提高至少2倍(图7)。

[0480] 实施例14,肺炎球菌猴肺炎模型中的PhtD/去毒型Ply组合的保护功效

[0481] 6只恒河猴(3-8岁)的组别,选其作为具有最低预先存在的抗19F抗体水平的组,进行肌肉免疫接种:在第0和28天,使用11价PS缀合物(即1μg PS 1、3、5、6B、7F、9V、14和23F,3μg PS4、18C和19F[的糖])或PhtD(10μg)+甲醛去毒型Ply(10μg)或单独佐剂。

[0482] PS 18C与破伤风类毒素缀合,19F与白喉类毒素缀合,而其他的PS与PD缀合。参见实施例2、表1以及表2下有关11价疫苗特征的注释。所有制剂都补充了C佐剂。

[0483] 在第42天将19F型肺炎球菌($5 \cdot 10^8$ cfu)接种至右肺。计数在攻击后第1、3和7天收集的支气管肺泡灌洗液中的菌落。结果通过攻击后第七天每组中死亡、建群的肺部或清除了病菌的动物的数量来表示。

[0484] 如图8中所示,与单独使用佐剂的组相比,用11价缀合物和PhtD+dPly组合获得了接近统计显著性(尽管所用的动物数量少)的良好的保护作用($p < 0.12$, Fisher确切检验)。

[0485] 实施例15,缀合化学法对由22F-PhtD缀合物诱导的抗4型攻击的抗PhtD抗体应答和保护效力的影响。

[0486] 20只雌性OF1小鼠的组别通过肌肉途径进行免疫接种:在第0天和第14天,使用3μg的22F-PhtD(通过直接CDAP化学制备)、或22F-AH-PhtD(AH衍生化的PS)、或者单独的佐剂。两种单价22F缀合物通过实施例2的方法制备(同样见表1以及表2)。每种制剂都补充了C佐剂。

[0487] 抗PhtD的ELISA IgG水平在第27天收集的血清中检测。

[0488] 在第28天用 $5 \cdot 10^6$ cfu的4型肺炎球菌鼻内攻击小鼠(即未被所测试的疫苗制剂中存在的PS潜在地覆盖的肺炎球菌血清型)。监测导致的死亡率,直到攻击后第8天。

[0489] 22F-AH-PhtD比22F-PhtD诱导出显著更高的抗PhtD IgG应答和更好的针对4型攻击的保护作用。

[0001]	<110>葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司(GlaxoSmithKline Biologicals S.A.)	
[0002]	<120> 疫苗	
[0003]	<130> VB62170	
[0004]	<160> 7	
[0005]	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 20	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213>人工序列	
[0010]	<400> 1	
[0011]	tccatgacgt tcttgacgtt	20
[0012]	<210> 2	
[0013]	<211> 18	
[0014]	<212> DNA	
[0015]	<213>人工序列	
[0016]	<400> 2	
[0017]	tctcccagcg tgcgccat	18
[0018]	<210> 3	
[0019]	<211> 30	
[0020]	<212> DNA	
[0021]	<213>人工序列	
[0022]	<400> 3	
[0023]	accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
[0024]	<210> 4	
[0025]	<211> 24	
[0026]	<212> DNA	
[0027]	<213>人工序列	
[0028]	<400> 4	
[0029]	tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
[0030]	<210> 5	
[0031]	<211> 20	
[0032]	<212> DNA	
[0033]	<213>人工序列	
[0034]	<400> 5	
[0035]	tccatgacgt tctgatgct	20
[0036]	<210> 6	
[0037]	<211> 22	
[0038]	<212> DNA	

[0039]	<213>人工序列	
[0040]	<400> 6	
[0041]	tcgacgtttt cggcgcgcgc cg	22
[0042]	<210> 7	
[0043]	<211> 13	
[0044]	<212> PRT	
[0045]	<213>人工序列	
[0046]	<400> 7	
[0047]	Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr	
[0048]	1 5 10	

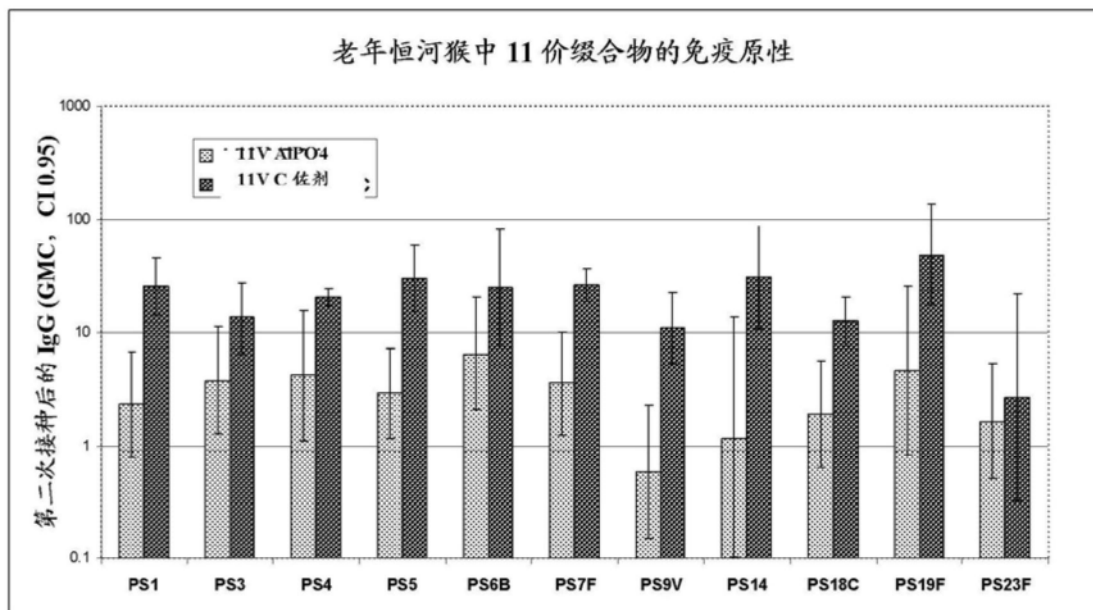


图1

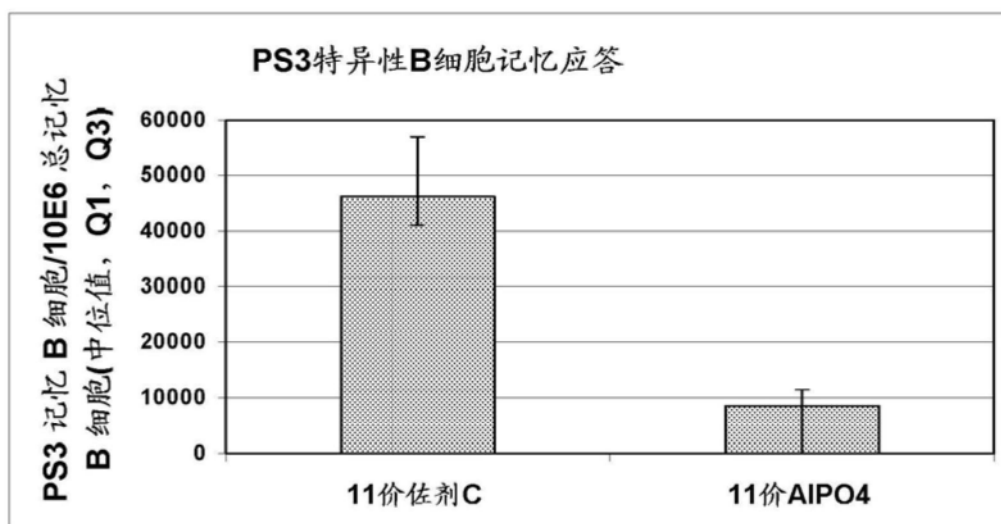


图2

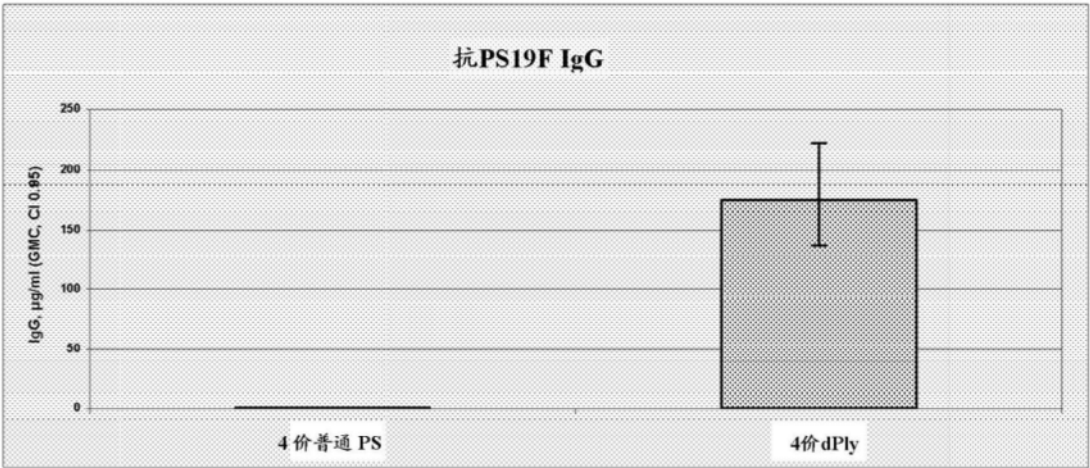


图3

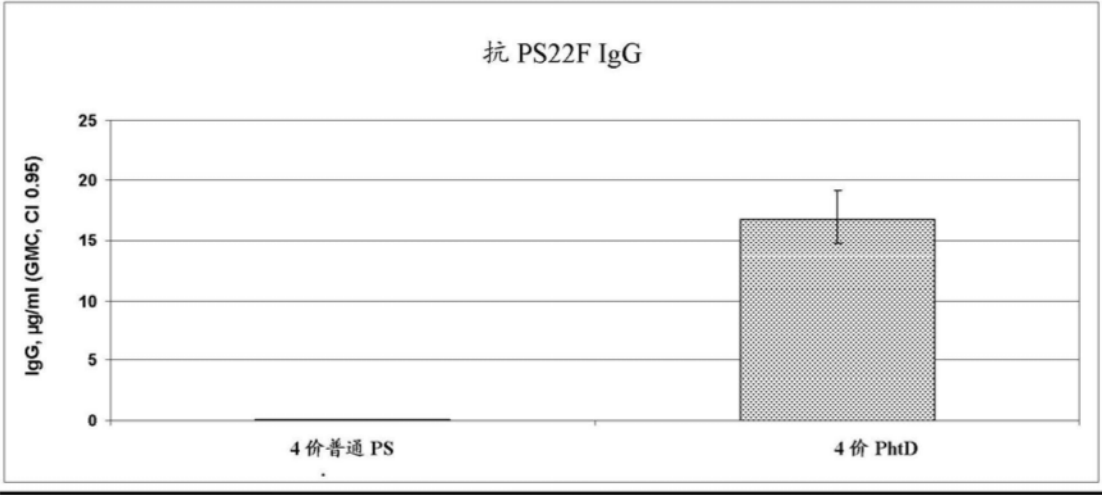


图4

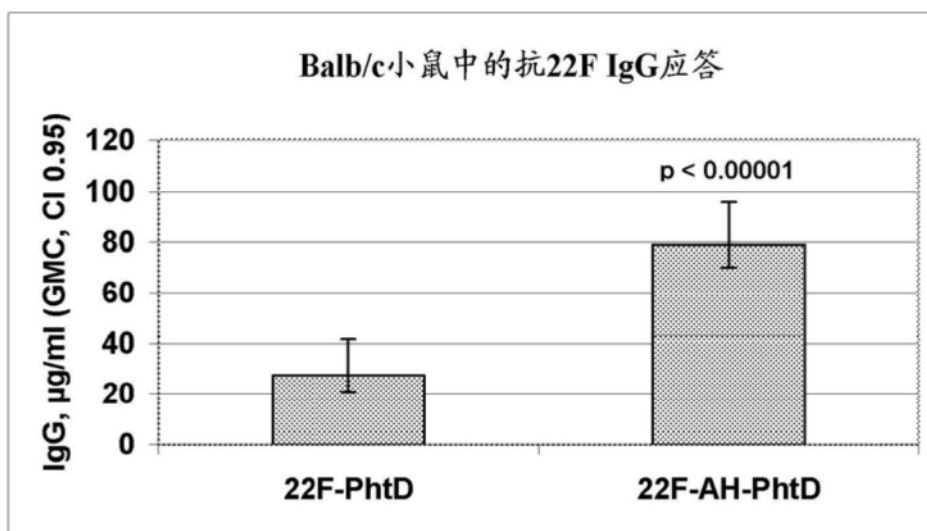


图5

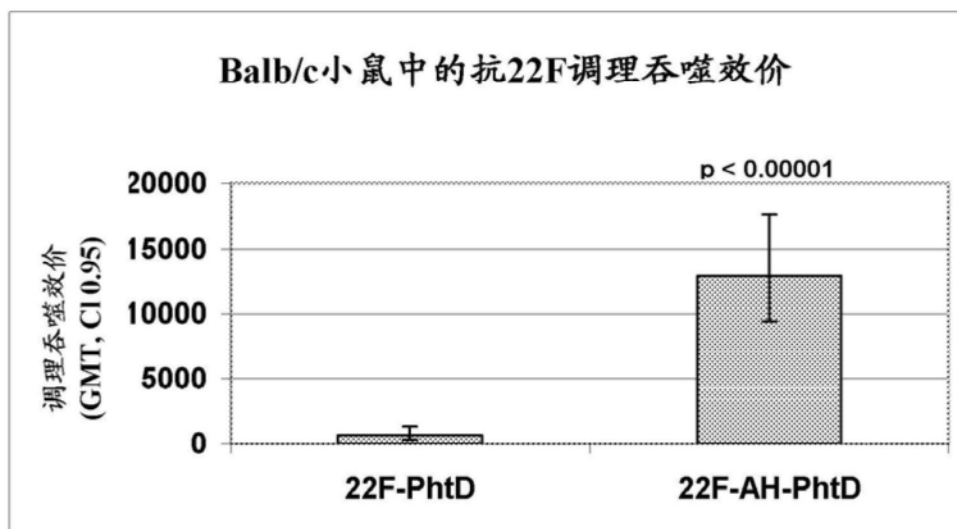


图6

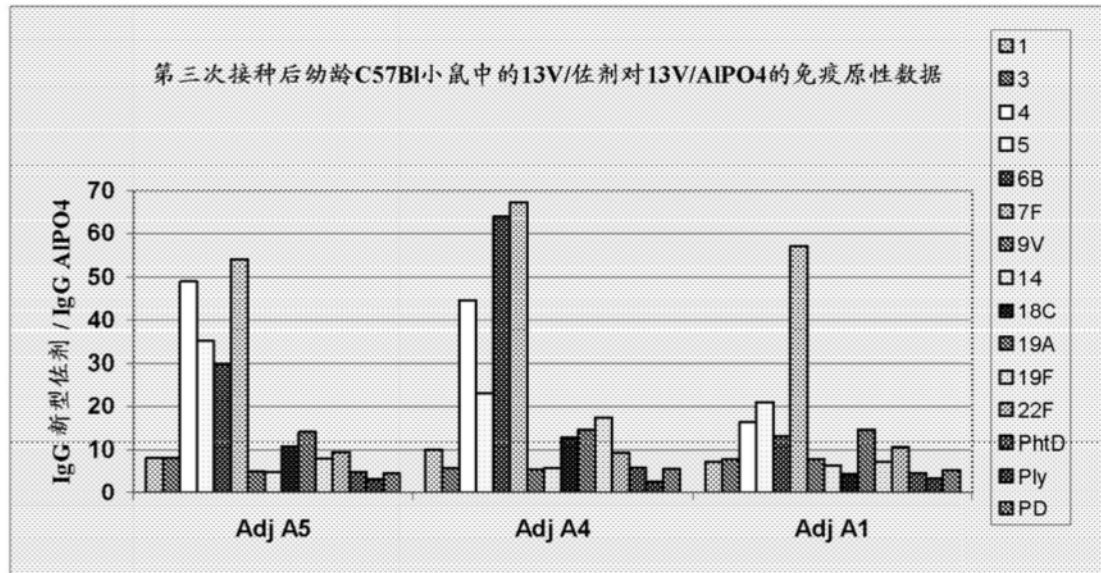


图7

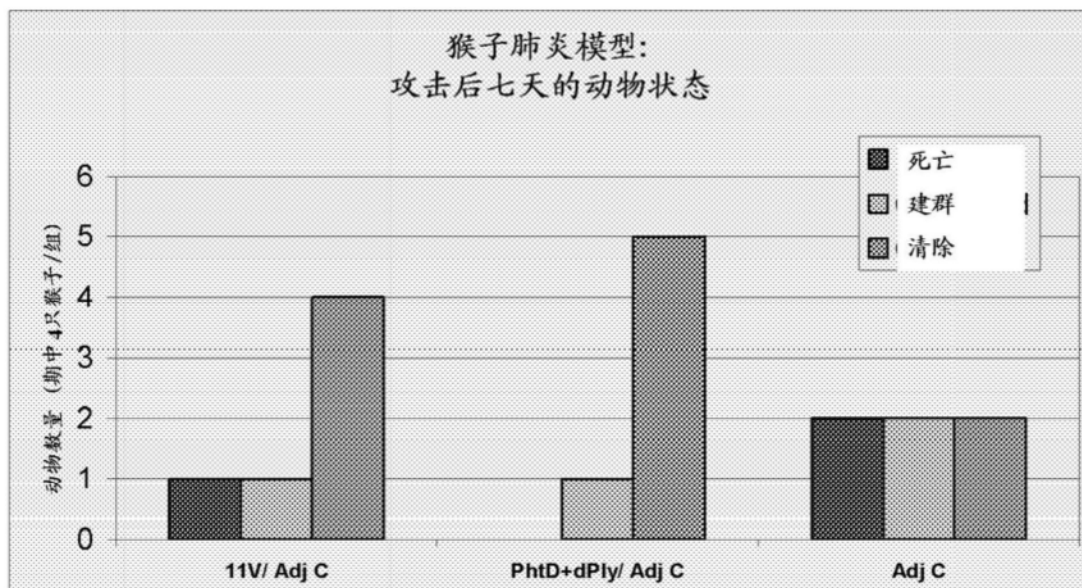


图8

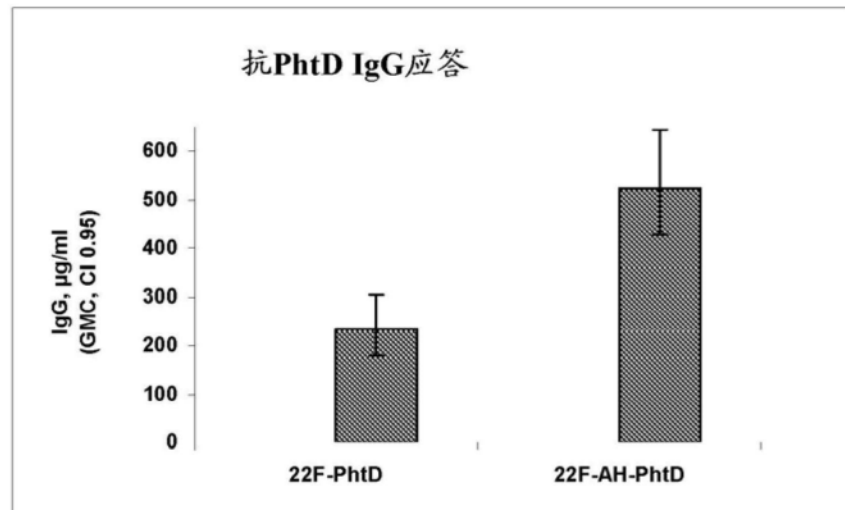


图9

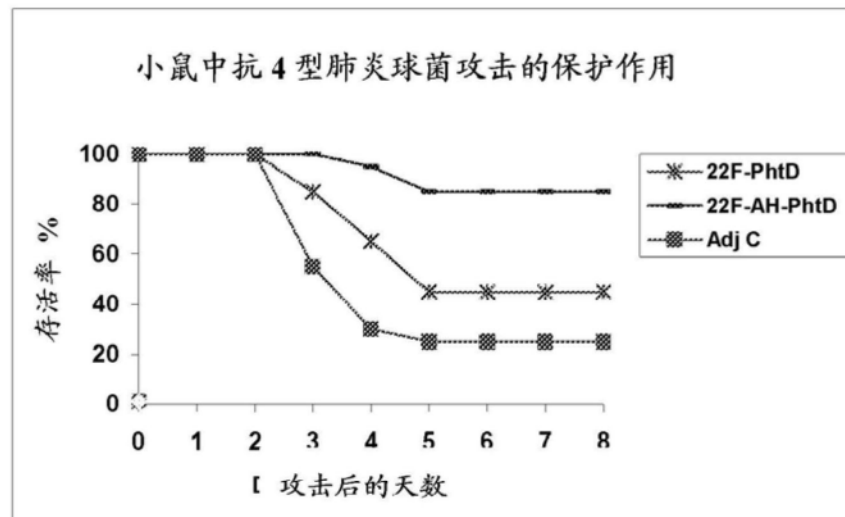


图10