



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1809380 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200380105896. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003.10.02

A61K 39/095 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/22 (2006.01)

0223741.0 2002.10.11 GB

A61P 31/04 (2006.01)

0305831.0 2003.03.13 GB

0309115.4 2003.04.22 GB

(56) 对比文件

WO 0164922 A1, 2000.11.09, 全文.

WO 0164920 A2, 2001.09.07, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 吴希哲

2005.06.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2003/004848 2003.10.02

(87) PCT申请的公布数据

W02004/032958 EN 2004.04.22

(73) 专利权人 启龙有限公司

地址 意大利锡耶纳

(72) 发明人 M·皮扎

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉

权利要求书 1 页 说明书 40 页

(54) 发明名称

广泛防御高毒性脑膜炎球菌谱系的多肽-疫苗

(57) 摘要

少量确定的抗原能提供抗脑膜炎球菌感染的广泛保护,发明提供的组合物在施用给受试者后能在该受试者中诱导抗体反应,其中抗体反应杀菌地抗脑膜炎奈瑟球菌 (*N.meningitidis*) 血清组 B 的高毒性谱系 A4、ET5 和谱系 3 中的 2 或 3 个。组合物包括 10 个或更少纯化抗原的混合物,而不是由单一抗原组成,且不应包括复杂或未确定的抗原混合物如外膜囊泡。特定使用 5 个蛋白抗原: (1) 'NadA' 蛋白; (2) '741' 蛋白; (3) '936' 蛋白; (4) '953' 蛋白和 (5) '287' 蛋白。

1. 一种组合物,施用给受试者后能在该受试者中诱导抗体反应,其特征在于,抗体反应是抗脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的高毒性谱系 A4、ET-5 和谱系 3 中的 2 个或多个的杀菌性,所述组合物包括:(1) 氨基酸序列 SEQ ID NO:2 的蛋白质;(2) 氨基酸序列 SEQ ID NO:7 的蛋白质;(3) 氨基酸序列 SEQ ID NO:8 的蛋白质。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述组合物进一步包括来目脑膜炎球菌血清组 Y、W135、C 的糖抗原。

3. 如权利要求 2 所述的组合物,其特征在于,所述组合物还进一步包括来自脑膜炎球菌血清组 A 的糖抗原。

4. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述组合物进一步包括来自流感嗜血杆菌 b 型的糖抗原。

5. 如权利要求 2 或 3 所述的组合物,其特征在于,糖抗原缀合载体蛋白。

6. 如权利要求 5 所述的组合物,其特征在于,所述糖抗原缀合于载体,选自:白喉类毒素、破伤风类毒素、CRM₁₉₇ 或流感嗜血杆菌蛋白 D。

7. 如权利要求 1 中所述的组合物,其特征在于,所述组合物进一步包括来自肺炎链球菌的抗原。

8. 权利要求 1 所述的组合物的用途,用于生产预防和治疗奈瑟球菌导致的疾病的药物。

广泛防御高毒性脑膜炎球菌谱系的多肽 - 疫苗

[0001] 本文引用的所有文献全部纳入供参考。

技术领域

[0002] 本发明在免疫学和疫苗学领域中。特别是它涉及来自脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseriameningitidis*) 的抗原和它们在免疫中的用途。

[0003] 背景领域

[0004] 脑膜炎奈瑟球菌是无活动、革兰氏阴性人病原体,定居于咽并导致脑膜炎(偶而在没有脑膜炎时引起败血病)。它导致地方病和流行病。引入抗流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 的缀合疫苗后,脑膜炎奈瑟球菌是在美国引起细菌性脑膜炎的主要原因。

[0005] 在生物体荚膜多糖的基础上,鉴定了多种脑膜炎奈瑟球菌的血清组。血清组 A 是最常涉及撒哈拉以南非洲流行病的病原体。血清组 B 和 C 引起美国和最发达国家的绝大部分病例。血清组 W135 和 Y 引起美国和发达国家的其余病例。血清组之后,分类包括血清型、血清亚型和然后的免疫型,标准命名列出血清组、血清型、血清亚型和免疫型,各由冒号隔开,如 B:4:P1.15:L3,7,9。在血清组 B 内,一些谱系导致疾病频繁(高侵入性),一些谱系引起比其它谱系更严重的疾病形式(高毒性),其它的根本不导致疾病。识别了 7 个高毒性谱系,即亚群 I、III 和 IV-1、ET-5 复合体、ET-37 复合体、A4 簇和谱系 3。它们通过多位点酶电泳 (MLEE) 确定,但多位点序列分型 (MLST) 也用于分类脑膜炎球菌[参考文献 1]。

[0006] 抗血清组 A、C、W135 和 Y 的多糖疫苗已知多年[2,3],但抗血清组 B 的疫苗难以证明。测试了以外膜囊泡为基础的疫苗[例如参见参考文献 4],但这些疫苗提供的保护通常限于用来制成疫苗的菌株。因此,仍需要广泛有效的血清组 B 疫苗。

[0007] 报导了脑膜炎球菌血清组 A[5] 和 B[6,7] 的基因组序列,研究了血清组 B 序列以鉴定疫苗抗原[例如参考文献 8 到 13]。操作候选抗原以改善异源表达[参考文献 14 到 16]。

[0008] 发明的一个目标是提供更多和改善的组合物,用于提供抗脑膜炎球菌病和/或感染的免疫,特别是用于提供抗血清组 B 脑膜炎球菌的广泛免疫。

[0009] 发明的描述

[0010] 抗病原体如乙肝病毒、白喉和破伤风的疫苗一般包含单一蛋白抗原(如 HBV 表面抗原或破伤风类毒素)。相反,非细胞性百日咳疫苗典型包含至少 3 种百日咳博德特氏菌 (*B. pertussis*) 蛋白且 Prevenar™ 肺炎球菌疫苗包含 7 种单独的缀合糖抗原。其它疫苗如细胞性百日咳疫苗、麻疹疫苗、灭活的脊髓灰质炎疫苗 (IPV) 和脑膜炎球菌 OMV 疫苗本质是大量抗原的复杂混合物。

[0011] 防御是否可由单一抗原、少量确定抗原或未确定抗原的复杂混合物引起,因此取决于所讨论的病原体。发明的基础是发现少量确定抗原能提供广泛防御脑膜炎球菌感染,发明提供的组合物在施用给受试者后能在该受试者中诱导体液反应,其中抗体反应是杀菌性的,抗脑膜炎奈瑟氏球菌血清组 B 的高毒性谱系 A4、ET-5 和谱系 3 中的 2 个或多个(如 2 或 3)。

[0012] 发明的组合物优选包括 10 个或更少（如 9、8、7、6、5、4、3、2）纯化抗原的混合物，而不是由单一抗原组成，且特定优选组合物不应包括复杂或未确定抗原的混合物，如优选组合物中不包括外膜囊泡。

[0013] 对于血清组 B 脑膜炎球菌，发现 5 种确定蛋白抗原的混合物引起良好的保护性免疫反应。因此，发明提供的组合物包括下列 5 种脑膜炎球菌蛋白抗原：(1) ‘NadA’ 蛋白；(2) ‘741’ 蛋白；(3) ‘936’ 蛋白；(4) ‘953’ 蛋白和 (5) ‘287’ 蛋白。这些抗原在本文称为“5 种基本抗原”。

[0014] NadA 蛋白

[0015] 来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的 ‘NadA’（奈瑟球菌粘附素 A）在参考文献 10 中示为蛋白 ‘961’（SEQ ID 2943 和 2944）且在参考文献 6 中示为 ‘NMB1994’（也参见 GenBank 登录号：11352904 和 7227256）。蛋白的详细描述可发现于参考文献 17。血清组 A 中没有对应蛋白 [5, 17]。

[0016] 当根据本发明使用时，NadA 可采用多种形式。优选的 NadA 形式是截断或缺失变体，如参考文献 14 到 16 中所示。特别是优选没有其 C 末端膜锚的 NadA（如对于菌株 2996，缺失残基 351-405[SEQ ID 1]），在本文中有时用 ‘C’ 上标区分，例如 NadA^(C)。在大肠杆菌（*E. coli*）中表达无其膜锚结构域的 NadA（如 SEQ ID 1）使蛋白分泌到培养物上清中，伴随去除其 23 聚体的前导肽（如对于菌株 2996，留下 327 聚体 [SEQ ID 2]）。无前导肽的多肽在本文中有时用 ‘NL’ 上标区分，例如 NadA^(NL) 或 NadA^{(C)(NL)}。

[0017] 优选的 NadA 序列与 SEQ ID 2 有 50% 或更多同一性（例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多）。这包括 NadA 变体（如等位基因变体、同源物、直系同源物、侧向同源物、突变体等）。NadA 的等位基因形式示于参考文献 18 的图 9。

[0018] 其它优选的 NadA 序列包括至少 n 个来自 SEQ ID 1 的连续氨基酸，其中 n 为 7 或更多（例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多）。优选的片段包括来自 NadA 的抗原表位。其它优选的片段缺乏 1 个或多个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多）来自 SEQ ID 1 C 末端和 / 或 N 末端的氨基酸（如 NadA^(C)、NadA^(NL)、NadA^{(C)(NL)}）。当缺失 N 末端残基时，优选缺失不应去除 NadA 附于人上皮细胞的能力。SEQ ID 1 的优选片段是 SEQ ID 2。

[0019] 易从培养物上清中制备高纯化形式的分泌性 NadA，所用方法包括步骤：通过超滤浓缩和相对缓冲液渗滤；阴离子柱层析；疏水柱层析；羟磷灰石陶瓷柱层析；相对缓冲液渗滤；滤器消毒。此方法的进一步细节在例子中给出。

[0020] NadA 优选以寡聚形式使用（如三聚形式）。

[0021] 741 蛋白

[0022] 来自血清组 B 的 ‘741’ 蛋白示于参考文献 10 (SEQ IDs 2535 和 2536) 且在参考文献 6 中示为 ‘NMB1870’（也参见 GenBank 登录号 GI :7227128）。血清组 A 中的对应蛋白 [5] 具有 GenBank 登录号 7379322。741 是天然脂蛋白。

[0023] 当根据本发明使用时，741 蛋白可采用多种形式。优选的 741 形式是截断或缺失变体，如参考文献 14 到 16 所示。特别 741 的 N 末端可缺失到和包括其聚甘氨酸序列（即对于菌株 MC58，缺失残基 1 到 72[SEQ ID 3]），在本文中有时用 ‘ΔG’ 前缀区分。此缺失能提高表达。缺失也去除 741 的脂化位点。

[0024] 优选的 741 序列与 SEQ ID 3 有 50% 或更多同一性（例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多）。这包括 741 变体（如等位基因变体、同源物、直系同源物、侧向同源物、突变体等）。741 的等位基因形式可发现于参考文献 16 的 SEQ IDs 1 到 22 和参考文献 19 的 SEQ IDs 1 到 23。参考文献 20 的 SEQ IDs 1-299 给出更多的 741 序列。

[0025] 其它优选的 741 序列包括至少 n 个来自 SEQ ID 3 的连续氨基酸，其中 n 为 7 或更多（例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多）。优选的片段包括来自 741 的抗原表位。其它优选的片段缺乏 1 个或多个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多）来自 SEQ ID 3C 末端和 / 或 N 末端的氨基酸。

[0026] 蛋白 741 是引起抗脑膜炎球菌抗体反应的极有效抗原，它在所有脑膜炎球菌血清组中表达。系统发育分析显示蛋白分裂成 2 组，这些分裂中之一再次分裂，产生总共 3 个变体 [21]，尽管抗特定变体培养的血清在相同变体组中是杀菌性的，它对表达另 2 个变体之一的菌株无活性，即有变体内交叉保护，但没有变体间交叉保护。因此，为了最大交叉菌株效率，组合物优选应包括大于 1 个蛋白 741 变体。来自各变体的示范序列在本文的 SEQ ID 10、11 和 12 中给出，起始是 741 脂蛋白形式中脂类共价附着的 N 末端半胱氨酸残基。

[0027] 因而，组合物优选应包括下列至少两种：(1) 第 1 种蛋白，所含氨基酸序列与 SEQ ID 10 有至少 a% 序列同一性和 / 或所含氨基酸序列由来自 SEQ ID 10 的至少 x 个连续氨基酸片段组成；(2) 第 2 种蛋白，所含氨基酸序列与 SEQ ID 11 有至少 b% 序列同一性和 / 或所含氨基酸序列由来自 SEQ ID 11 的至少 y 个连续氨基酸片段组成；(3) 第 3 种蛋白，所含氨基酸序列与 SEQ ID 12 有至少 c% 序列同一性和 / 或所含氨基酸序列由来自 SEQ ID 12 的至少 z 个连续氨基酸片段组成。

[0028] a 值至少是 85，例如 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5 或更多。b 值至少是 85，例如 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5 或更多。c 值至少是 85，例如 86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5 或更多。a、b 和 c 值彼此内在不相关。

[0029] x 值至少是 7，例如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、225、250。y 值至少是 7，例如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、225、250。z 值至少是 7，例如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、225、250。x、y 和 z 值彼此内在不相关。

[0030] 任何特定 741 氨基酸序列优选不属于大于一种类别 (1)、(2) 和 (3)。因此，任何特定 741 序列仅属于类别 (1)、(2) 和 (3) 之一。因而优选：蛋白 (1) 与蛋白 (2) 有小于 i% 的序列同一性；蛋白 (1) 与蛋白 (3) 有小于 j% 的序列同一性；蛋白 (2) 与蛋白 (3) 有小于 k% 的序列同一性。i 值是 60 或更多（例如 61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90 等）且至多是 a。j 值是 60 或更多（例如 61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90 等）且至多是 b。k 值是 60 或更多（例如 61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90 等）且至多是 c。i、j 和 k 值彼此内在不相关。

[0031] 936 蛋白

[0032] 来自血清组 B 的‘936’蛋白示于参考文献 10 (SEQ IDs 2883 和 2884) 且在参考文献 6 中示为‘NMB2091’ (也参见 GenBank 登录号 GI :7227353)。血清组 A 中的对应基因 [5] 具有 GenBank 登录号 7379093。

[0033] 当根据本发明使用时,936 蛋白可采用多种形式。优选的 936 形式是截断或缺失变体,如参考文献 14 到 16 中所示。特别是 936 的 N 末端前导肽可缺失 (即对于菌株 MC58,缺失残基 1 到 23 [SEQ ID 4]) 以产生 936^(NL)。

[0034] 优选的 936 序列与 SEQ ID 4 有 50% 或更多同一性 (例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多)。这包括变体 (如等位基因变体、同源物、直系同源物、侧向同源物、突变体等)。

[0035] 其它优选的 936 序列包括至少 n 个来自 SEQ ID 4 的连续氨基酸,其中 n 为 7 或更多 (例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多)。优选的片段包括来自 936 的抗原表位。其它优选的片段缺乏 1 个或多个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多) 来自 SEQ ID 4C 末端和 / 或 N 末端的氨基酸。

[0036] 953 蛋白

[0037] 来自血清组 B 的‘953’蛋白示于参考文献 10 (SEQ IDs 2917 和 2918) 且在参考文献 6 中示为‘NMB 1030’ (也参见 GenBank 登录号 GI :7226269)。血清组 A 中的对应蛋白 [5] 具有 GenBank 登录号 7380108。

[0038] 当根据本发明使用时,953 蛋白可采用多种形式。优选的 953 形式是截断或缺失变体,如参考文献 14 到 16 中所示。特别是 953 的 N 末端前导肽可缺失 (即对于菌株 MC58,缺失残基 1 到 19 [SEQ ID 5]) 以产生 953^(NL)。

[0039] 优选的 953 序列与 SEQ ID 5 有 50% 或更多同一性 (例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多)。这包括 953 变体 (如等位基因变体、同源物、直系同源物、侧向同源物、突变体等)。953 的等位基因形式可见于参考文献 12 的图 19。

[0040] 其它优选的 953 序列包括至少 n 个来自 SEQ ID 5 的连续氨基酸,其中 n 为 7 或更多 (例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多)。优选的片段包括来自 953 的抗原表位。其它优选的片段缺乏 1 个或多个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多) 来自 SEQ ID 5C 末端和 / 或 N 末端的氨基酸。

[0041] 287 蛋白

[0042] 来自血清组 B 的‘287’蛋白示于参考文献 10 (SEQ IDs 3103 和 3104) 且在参考文献 6 中示为‘NMB2132’,在参考文献 13 中示为‘GNA2132’ (也参见 GenBank 登录号 GI :7227388)。血清组 A 中的对应蛋白 [5] 具有 GenBank 登录号 7379057。

[0043] 当根据本发明使用时,287 蛋白可采用多种形式。优选的 287 形式是截断或缺失变体,如参考文献 14 到 16 中所示。287 的 N 末端可缺失到和包括其聚甘氨酸序列 (即对于菌株 MC58,缺失残基 1 到 24 [SEQ ID 6]), 在本文中有时用‘ΔG’前缀区分。此缺失能提高表达。

[0044] 优选的 287 序列与 SEQ ID 6 有 50% 或更多同一性 (例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多)。这包括 287 变体 (如等位基因变体、同源物、直系同源物、侧向同源物、突变体等)。287 的等位基因形式可见于参考文献 12 的图 5 和 15、参考文献 10 的例子 13

和图 21 (SEQ IDs 3179 到 3184)。

[0045] 其它优选的 287 序列包括至少 n 个来自 SEQ ID 6 的连续氨基酸, 其中 n 为 7 或更多 (例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多)。优选的片段包括来自 287 的抗原表位。其它优选的片段缺乏 1 个或多个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多) 来自 SEQ ID 6C 末端和 / 或 N 末端的氨基酸。

[0046] 融合蛋白

[0047] 5 种抗原作为 5 种单独蛋白存在于组合物中, 但优选至少 2 种抗原表达为单一多肽链 (‘杂合’蛋白 [参考文献 14 到 16]), 例如 5 种抗原形成少于 5 种多肽。杂合蛋白提供 2 个主要优点: 首先, 通过加入克服问题的合适杂合伴侣来协助本身不稳定或表达差的蛋白; 第二, 简化商业生产, 因为仅需使用 1 种表达和纯化便于生成 2 个单独有用的蛋白。

[0048] 发明组合物中包括的杂合蛋白可包含 2 种或更多 (即 2、3、4 或 5) 的 5 个基本抗原。优选由 5 个基本抗原中的 2 种所组成的杂合体。

[0049] 在 5 个基本抗原的组合内, 抗原可存在于大于 1 种杂合蛋白和 / 或作为非杂合蛋白。然而, 抗原优选作为杂合体或非杂合体存在, 但不是两者, 尽管包括蛋白 741 作为杂合和非杂合 (优选脂蛋白) 抗原可能有用, 特定是当使用超过 1 种 741 变体时。

[0050] 用于发明的二抗原杂合体包括: NadA 和 741; NadA 和 936; NadA 和 953; NadA 和 287; 741 和 936; 741 和 953; 741 和 287; 936 和 953; 936 和 287; 953 和 287。优选的二抗原杂合物包括: 741 和 936; 953 和 287。

[0051] 杂合蛋白可由公式 $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$ 表示, 其中: X 是 5 个基本抗原之一的氨基酸序列; L 是任选的接头氨基酸序列; A 是任选的 N 末端氨基酸序列; B 是任选的 C 末端氨基酸序列; n 是 2、3、4 或 5。

[0052] 如果 $-\text{X}-$ 部分在其野生型形式中有前导肽序列, 它可包括或省略于杂合蛋白。在一些实施方案中, 将缺失前导肽, 除了位于杂合蛋白 N 末端的 $-\text{X}-$ 部分, 即保留 X_1 的前导肽, 但省略 $\text{X}_2 \dots \text{X}_n$ 的前导肽。这相等于缺失所有前导肽并使用 X_1 的前导肽作为 $-\text{A}-$ 部分。

[0053] 对于各 $[-\text{X-L-}]$ 例子, 接头氨基酸序列 $-\text{L}-$ 可存在或缺乏。例如, 当 $n = 2$ 时, 杂合体可以是 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$ 等。接头氨基酸序列 $-\text{L}-$ 通常短 (例如 20 个或更少氨基酸, 即 19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1)。例子包括促进克隆的短肽序列、聚甘氨酸接头 (即包括 Gly_n , 其中 $n = 2、3、4、5、6、7、8、9、10$ 或更多)、和组氨酸标志 (即 His_n , 其中 $n = 3、4、5、6、7、8、9、10$ 或更多)。其它合适接头氨基酸序列对本领域技术人员是显而易见的。有用的接头是 GSGGGG (SEQ ID 9), Gly-Ser 二肽从 BamHI 限制性位点形成, 从而协助克隆和操作, (Gly_4) 四肽是典型的聚甘氨酸接头。如果 X_{n+1} 是 ΔG 蛋白且 L_n 是甘氨酸接头, 这可相等于 X_{n+1} 不是 ΔG 蛋白且缺乏 L_n 。

[0054] $-\text{A}-$ 是任选的 N 末端氨基酸序列。它通常短 (例如 40 个或更少氨基酸, 即 39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1)。例子包括指导蛋白运输的前导序列或者促进克隆或纯化的短肽序列 (如组氨酸标志, 即 His_n , 其中 $n = 3、4、5、6、7、8、9、10$ 或更多)。其它合适的 N 末端氨基酸序列对本领域技术人员是显而易见的。如果 X_1 缺乏其自身的 N 末端甲硫氨酸, $-\text{A}-$ 优选是提供 N 末端甲硫氨酸的寡肽 (例如有 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸)。

[0055] -B- 是任选的 C 末端氨基酸序列。它通常短（例如 40 个或更少氨基酸，即 39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例子包括指导蛋白运输的前导序列、促进克隆或纯化的短肽序列（如包括组氨酸标志，即 His_n ，其中 $n = 3、4、5、6、7、8、9、10$ 或更多）、或提高蛋白稳定性的序列。其它合适的 C 末端氨基酸序列对本领域技术人员是显而易见的。

[0056] 最优选 n 为 2。此类型的 2 种优选蛋白是： X_1 是 936 且 X_2 是 741； X_1 是 287 且 X_2 是 953。

[0057] 发明的 2 种特定优选杂合蛋白如下：

[0058]

n	A	X_1	L_1	X_2	L_2	B	[SEQ ID]
2	MA	Δ G287	GS GGGG	953 ^(NL)	—	—	7
2	M	936 ^(NL)	GS GGGG	Δ G741	—	—	8

[0059] 这 2 种蛋白可组合 NadA（特定有 SEQ ID 2）使用。

[0060] 易从大肠杆菌表达中制备高纯化形式的 936- Δ G741 杂合体，所用方法包括步骤：匀浆；离心、阳离子柱层析；阴离子柱层析；疏水柱层析；相对缓冲液渗滤和滤器消毒。此方法的进一步细节在例子中给出。

[0061] 序列

[0062] 发明提供氨基酸序列选自 SEQ IDs 1 到 8 的多肽。它也提供氨基酸序列与选自 SEQ IDs 1 到 8 的氨基酸序列有序列同一性的多肽。如上所述，序列同一性程度优选超过 50%（例如 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多）。

[0063] 发明还提供含脑膜炎奈瑟球菌 NadA 序列片段的多肽，其中所述片段保留 NadA 粘附人上皮细胞的能力。因此优选保留全长 NadA 氨基酸 24-87 的片段。优选的片段缺乏所述 NadA 的 N 末端前导肽和 / 或所述 NadA 的 C 末端膜锚结构域。本发明范围不包括现有技术所示的任何 NadA 片段，如参考文献 16 到 18 所示。参考全长 NadA[17]，SEQ ID 1 缺乏膜锚结构域，SEQ ID 2 缺乏前导肽。

[0064] 发明也提供编码这种多肽的核酸。此外，发明提供能与此核酸杂交的核酸，优选在“高严格”条件下（如 65°C，在 0.1xSSC、0.5% SDS 溶液中）。

[0065] 发明的多肽能通过多种方法（如重组表达、从细胞培养物中纯化、化学合成（至少部分）等）和以多种形式（如天然、融合、非糖基化、脂化等）制备。它们优选制成基本纯化的形式（即基本没有其它脑膜炎奈瑟球菌或宿主细胞蛋白）。

[0066] 根据发明的核酸能以许多方式制备（如通过化学合成（至少部分）、来自基因组或 cDNA 文库、来自生物体本身等）且可采用多种形式（如单链、双链、载体、探针等）。它们优选制成充分纯化的形式（即几乎没有其它脑膜炎奈瑟球菌或宿主细胞核酸）。

[0067] 术语“核酸”包括 DNA 和 RNA 以及它们的类似物，如含修饰主链（例如硫代磷酸等）以及肽核酸（PNA）等。发明包括所含序列与上述互补的核酸（例如用于反义或探测目的）。

[0068] 发明也提供生成发明多肽的方法，包括在诱导多肽表达的条件下用发明核酸培养

转化的宿主细胞的步骤。

[0069] 发明提供生成发明多肽的方法,包括通过化学方法合成至少部分多肽的步骤。

[0070] 发明提供生成发明核酸的方法,包括用基于引物的扩增方法(如 PCR) 扩增核酸的步骤。

[0071] 发明提供生成发明核酸的方法,包括通过化学方法合成至少部分核酸的步骤。

[0072] 菌株

[0073] 发明的优选蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 中发现的氨基酸序列。在血清组 b 内,优选的菌株是 2996、MC58、95N477 和 394/98。菌株 394/98 在本文中有时称为“NZ”,因为它是新西兰菌株。

[0074] 蛋白 287 优选来自菌株 2996,或更优选来自菌株 394/98。

[0075] 蛋白 741 优选来自血清组 B 菌株 MC58、2996、394/98 或 95N477,或来自血清组 C 菌株 90/18311。更优选菌株 MC58。

[0076] 蛋白 936、953 和 NadA 优选来自菌株 2996。

[0077] 菌株可作为下标表示,例如 741_{MC58} 是来自菌株 MC58 的蛋白 741。除非另有说明,本文所示蛋白(例如没有下标)来自脑膜炎奈瑟球菌菌株 2996,此菌株可作为‘参考’菌株。然而,要理解发明一般不受菌株限制。如上所示,一般参考蛋白(例如‘287’、‘919’等)可包括来自任何菌株的蛋白。通常,它与 2996 的序列同一性为 90%或更多(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)。

[0078] 当组合物包括特定蛋白抗原(如 741 或 287)时,组合物能包括大于 1 种变体形式的抗原,例如来自相同蛋白,但来自超过 1 种菌株。这些蛋白可作为串联或单独蛋白包括。

[0079] 当使用杂合蛋白时,杂合体(即个别的-X-部分)内的单独个原可来自 1 个或多个菌株。例如当 $n = 2$ 时, X_2 可来自与 X_1 相同的菌株或来自不同菌株。当 $n = 3$ 时,菌株可以是 (i) $X_1 = X_2 = X_3$ (ii) $X_1 = X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ 或 (v) $X_1 = X_2 \neq X_3$ 等。

[0080] 高毒性谱系和杀菌抗体反应

[0081] 一般,发明的组合物在施用给受试者后能诱导血清杀菌抗体反应。这些反应易在小鼠中测量且是疫苗功效的标准指示[例如参见参考文献 13 的尾注 14]。血清杀菌活性(SBA) 测量补体介导的细菌杀死,能用人或幼兔补体测定。WHO 标准要求疫苗在超过 90%受体中诱导 SBA 上升至少 4 倍。

[0082] 发明的组合物可诱导抗大于 1 种血清组 B 的高毒性谱系的杀菌抗体反应,而不是提供狭窄保护。特别是它们能诱导抗下列 3 种高毒性谱系中 2 或 3 种的杀菌反应:(i) 簇 A4;(ii) ET5 复合体和 (iii) 谱系 3。它们可另外诱导杀菌抗体反应,抗 1 种或多种高毒性谱系亚组 I、亚组 III、亚组 IV-1 或 ET-37 复合体和抗其它谱系如高侵入性谱系。

[0083] 这不一定意味着组合物能诱导杀菌抗体抗这些高毒性谱系内各个和每一个血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌菌株,而是特定高毒性谱系内 4 种或更多血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌菌株的任何特定组,组合物诱导的抗体是杀菌性的,抗至少 50%(例如 60%、70%、80%、90%或更多)组。优选的菌株组包括在至少 4 个下列国家中分离的菌株:大不列颠、澳大利亚、加拿大、挪威、意大利、美国、新西兰、荷兰、比利时和古巴。血清优选具有至少 1024 的杀菌效价(例如 2^{10} 、 2^{11} 、 2^{12} 、 2^{13} 、 2^{14} 、 2^{15} 、 2^{16} 、 2^{17} 、 2^{18} 或更多,优选至少 2^{14}),即当稀释 1/1024 时,血

清能杀死至少 50% 的特定菌株的测试细菌,如参考文献 13 所述。

[0084] 优选的组合物可诱导抗下列血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌菌株的杀菌反应:(i) 来自簇 A4, 菌株 961-5945 (B:2b:P1. 21,16) 和 / 或菌株 G2136 (B:-);(ii) 来自 ET-5 复合体, 菌株 MC58 (B:15:P1. 7,16b) 和 / 或菌株 44/76 (B:15:P1. 7,16);(iii) 来自谱系 3, 菌株 394/98 (B:4:P1. 4) 和 / 或菌株 BZ198 (B:NT:-)。更优选的组合物可诱导抗菌株 961-5945、44/76 和 394/98 的杀菌反应。

[0085] 菌株 961-5945 和 G2136 都是奈瑟球菌 MLST 参考菌株 [参考文献 22 中的 ids 638 和 1002]。菌株 MC58 广泛可用 (例如 ATCC BAA-335) 且是参考文献 6 中测序的菌株。菌株 44/76 广泛使用并鉴定的 (例如参考文献 23) 且是奈瑟球菌 MLST 参考菌株之一 [参考文献 22 中的 id 237;参考文献 1 中表 2 的第 32 行]。菌株 394/98 最初于 1998 年在新西兰分离,有一些使用此菌株的发表研究 (例如参考文献 24 和 25)。菌株 BZ198 是另一种奈瑟球菌 MLST 参考菌株 [参考文献 22 中的 id 409;参考文献 1 中表 2 的第 41 行]。

[0086] 组合物可另外诱导杀菌反应抗血清组 W135 菌株 LNP17592 (W135:2a:P1. 5,2), 来自 ET-37 复合体。这是 2000 年在法国分离的 Haji 菌株。

[0087] 异源宿主

[0088] 尽管发明蛋白的表达可在奈瑟球菌中发生,本发明优选使用异源宿主。异源宿主可以是原核 (如细菌) 或真核生物。它优选是大肠杆菌,但其它合适的宿主包括枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhimurium*)、乳酰胺奈瑟球菌 (*Neisseria lactamica*)、灰色奈瑟球菌 (*Neisseria cinerea*)、分枝杆菌 (*Mycobacteris*) (例如结核分枝杆菌)、酵母等。

[0089] 因此,发明提供的组合物在施用给受试者后能在该受试者中诱导抗体反应,其中抗体反应杀菌,抗脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的高毒性谱系 A4、ET5 和谱系 3 中的 2 种或多种 (如 2 或 3),其中产生抗体反应的组合物中的免疫原通过非奈瑟球菌宿主中重组表达获得。因此,发明组合物中的免疫原优选是重组免疫原。因而优选不包括 OMV 制品的组合物。

[0090] 免疫原性组合物和药物

[0091] 发明组合物是免疫原性,更优选是疫苗组合物。根据发明的疫苗可以是预防 (即防止感染) 或治疗性 (即治疗感染),但通常是预防性。

[0092] 组合物 pH 优选在 6 和 8 间,优选约 7。稳定 pH 可用缓冲液维持。当组合物包含氢氧化铝盐时,优选使用组氨酸缓冲液 [26]。组合物可以是无菌和 / 或无热原。发明组合物可相对人等渗。

[0093] 组合物可存在于小瓶中,或它们可存在于易充满的注射器中。提供的注射器可有或没有针。注射器包括单剂量组合物,而小瓶包括单剂量或多剂量。可注射组合物通常是液体溶液或悬浮液。另外,它们可以固体形式存在 (例如冷冻干燥) 用于液体载体中的溶液或悬浮液,然后注射。

[0094] 发明的组合物可以单位剂型或多剂型包装。对于多剂型,小瓶优选是预充满的注射器。有效剂量体积能常规确定,但用于注射的典型人剂量的组合物体积为 0.5ml。

[0095] 当发明的组合物在使用前临时制备 (如组分以冻干形式存在) 和作为试剂盒存在时,试剂盒可包括 2 个小瓶,或可包括 1 个易充满的注射器和 1 个小瓶,注射器的内含物用

于在注射前再活化小瓶的内含物。

[0096] 发明也提供发明组合物用作药物。药物优选能在哺乳动物中产生免疫反应（即它是免疫原性组合物）且更优选是疫苗。

[0097] 发明同样提供使用发明组合物生产药物，用于在哺乳动物中产生免疫反应。它也提供使用‘NadA’蛋白、‘741’蛋白、‘936’蛋白、‘953’蛋白和‘287’蛋白（和其它任选抗原）生产药物，用于在哺乳动物中产生免疫反应。药物优选是疫苗。

[0098] 发明也提供在哺乳动物中产生免疫反应的方法，包括施用有效量发明组合物的步骤。免疫反应优选是保护性且优选包括抗体。此方法可引起加强反应。

[0099] 哺乳动物优选是人。当疫苗用于预防用途时，人优选是儿童（例如学步的小孩或婴儿）；当疫苗用于治疗用途时，人优选是成人。用于儿童的疫苗也可施用给成人，如用于评估安全性、剂量、免疫原性等。

[0100] 这些使用和方法优选用于预防和治疗奈瑟球菌导致的疾病（例如脑膜炎、败血症、菌血症、淋病等）。优选预防和/或治疗细菌性或脑膜炎球菌性脑膜炎。

[0101] 一种检查治疗性处理功效的方法包括监控施用发明组合物后的奈瑟球菌感染。一种检查预防性处理功效的方法包括监控施用发明组合物后抗5个基本抗原的免疫反应。能确定发明组合物的免疫原性，通过将它们施用给测试受试者（如12-16个月龄的儿童或动物模型[27]）并然后确定标准参数，包括总和和高亲和力抗荚膜IgG的血清杀菌抗体（SBA）和ELISA效价（GMT）。这些免疫反应一般在组合物施用后约4周确定，与组合物施用前确定的值相比较。优选SBA增加至少4倍或8倍。当施用超过1个剂量组合物时，可进行大于1次的施用后确定。

[0102] 优选的发明组合物能赋予病人的抗体效价，效价高于可接受百分比人受试者各抗原成分的血清保护的标准。熟知有相关抗体效价的抗原，在其之上认为宿主是对抗原血清转换的，这种效价由组织如世界卫生组织（WHO）公布。优选大于80%的统计显著性受试者样品发生血清转换，更优选大于90%，更加优选大于93%且最优选96-100%。

[0103] 发明的组合物一般直接施用给病人。直接传递可伴随肠胃外注射（如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或到组织的间质间隙），或伴随直肠、口腔、阴道、局部、经皮肤、鼻内、眼睛、耳、肺或其它粘膜施用。优选肌肉内施用到大腿或上臂。注射可经针（例如皮下注射针），但可另外使用无针的注射。典型的肌肉内剂量是0.5ml。

[0104] 发明能用于引起全身和/或粘膜免疫。

[0105] 剂量处理可以是单剂量方案或多剂量方案。多剂量可用于初步的免疫方案和/或加强的免疫方案。初步的剂量方案可接着加强的免疫方案。致敏剂量间（例如4-16周间）和致敏与加强间的合适时间选择可常规确定。

[0106] 奈瑟球菌感染影响身体的多个区域，因此发明的组合物可制成多种形式。例如，组合物可制成注射剂，作为液体溶液或悬浮液。也可制备固体形式，它们适用于注射前液体载体中的溶液或悬浮液（例如冻干的组合物）。可制备组合物用于局部施用，如作为油膏、乳膏或粉末。可制备组合物用于口服施用，如作为片剂或胶囊或作为糖浆（任选调味）。可制备组合物用于肺部施用，如作为吸入剂，使用精细粉末或喷雾。组合物可制成栓剂或阴道栓剂。可制备组合物用于鼻、耳或眼睛施用，如作为喷雾、滴剂、凝胶或粉末[例如参考文献28和29]。已报导成功进行鼻施用肺炎球菌糖[30,31]、肺炎球菌多肽[32]、Hib糖[33]、

MenC 糖 [34]、Hib 和 MenC 糖缀合物的混合物。

[0107] 用作疫苗的免疫原性组合物包括免疫上有效量的抗原以及所需任何其它成分。‘免疫上有效量’指以单剂量或作为一系列的部分施用给个体的量对治疗或预防有效。此量可变化,取决于待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类组(例如非人的灵长类动物、灵长类动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需保护程度、疫苗制剂、治疗医生对医学情况的评估和其它相关因素。预期量在相对广泛的范围内,范围能通过常规试验确定,每剂量各脑膜炎球菌糖抗原的典型量在 $1\mu\text{g}$ 和 $200\mu\text{g}$ 间,例如约 $1\mu\text{g}$ 、约 $2.5\mu\text{g}$ 、约 $4\mu\text{g}$ 、约 $5\mu\text{g}$ 或约 $10\mu\text{g}$ (表示为糖)。

[0108] 更多的组合物非抗原成分

[0109] 除了以上提到的成分外,发明的组合物通常包括 1 种或多种‘药学上可接受载体’,药学上可接受载体所包括的载体本身不诱导对接受组合物个体有害的抗体生成。合适的载体一般是大、缓慢代谢的大分子,如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖 [36]、海藻糖 [37]、乳糖和脂质聚集物(例如油滴或脂质体)。这种载体对本领域普通技术人员熟知。疫苗也可包含稀释剂,如水、盐水、甘油等。另外,可存在辅助物质如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。无菌、无热原的磷酸缓冲生理盐水是典型的载体。关于药学上可接受赋形剂的详尽讨论可获得自参考文献 38。

[0110] 发明的组合物可包括抗菌剂,特别是当以多剂量形式包装时。

[0111] 发明的组合物可包括去垢剂,例如吐温(聚山梨醇酯),如吐温 80。去垢剂一般以低水平存在,如 $<0.01\%$ 。

[0112] 发明的组合物可包括钠盐(例如氯化钠)以产生渗透性。典型浓度为 $10\pm 2\text{mg/ml NaCl}$ 。

[0113] 发明的组合物一般包括缓冲液。典型是磷酸缓冲液。

[0114] 发明的组合物可包括糖醇(如甘露醇)或二糖(如蔗糖或海藻糖),例如约 $15\text{--}30\text{mg/ml}$ (如 25mg/ml),特别是如果它们要冻干或如果它们包括从冻干物质再复原的物质。用于冻干的组合物 pH 可调至约 6.1,然后冻干。

[0115] 发明的疫苗可结合免疫调节剂施用。尤其是,组合物通常包括佐剂。可用于发明组合物的佐剂包括但不限于:

[0116] A. 含矿物质的组合物

[0117] 含矿物质的组合物适合用作发明佐剂,包括无机盐,如铝盐和钙盐。发明包括无机盐如氢氧化物(例如羟基氧化物)、磷酸盐(例如羟磷酸盐、正磷酸盐)、硫酸盐等[例如参见参考文献 39 的第 8 和 9 章]或不同无机化合物的混合物,化合物采用任何合适的形式(例如凝胶、晶体、无定形等),优选吸收。含矿物质的组合物可制成金属盐的颗粒 [40]。

[0118] 特别优选磷酸铝,特别在包括流感嗜血杆菌糖抗原的组合物中,典型佐剂是无定形羟磷酸铝, PO_4/Al 摩尔比在 0.84 和 0.92 间,包括 $0.63\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。可使用低剂量磷酸铝的吸收,例如 50 到 $100\mu\text{g Al}^{3+}$ 每缀合物每剂量。当组合物中有大于 1 种缀合物时,不是所有缀合物都需吸收。

[0119] B. 油乳剂

[0120] 适合用作发明佐剂的油乳剂组合物包括鲨烯-水乳剂,如 MF59[参考文献 39 的第 10 章;也参见参考文献 41](5% 鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% Span 85,用微流化机制成亚微

米颗粒)。也可使用完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA)。

[0121] C. 皂苷制剂 [参考文献 39 的第 22 章]

[0122] 皂苷制剂也能用作发明的佐剂。皂苷是甾醇糖苷和三萜糖苷的异种组,在广范围的植物种类的树皮、叶、茎干、根和甚至花中发现。来自皂树 (*Quillaiasaponaria*) Molina 树皮的皂苷作为佐剂已广泛研究。皂苷也能商业获得自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、满天星 (*Gypsophilla paniculata*) (brides veil) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21 以及脂质制剂如 ISCOMs。QS21 以 Stimulon™ 出售。

[0123] 皂苷制剂用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化。鉴定了使用这些技术的特定纯化部分,包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。皂苷优选是 QS21。生成 QS21 的方法示于参考文献 42。皂苷制剂也可包括甾醇,如胆固醇 [43]。

[0124] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合体 (ISCOMs) 的独特颗粒 [参考文献 39 的第 23 章]。ISCOMs 通常也包括磷脂如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷可用于 ISCOMs。ISCOM 优选包括 1 种或多种 QuilA、QHA 和 QHC。ISCOMs 进一步描述于参考文献 43-45。ISCOMs 任选可缺乏另外的去垢剂 [46]。

[0125] 开发以皂苷为基础的佐剂的综述可发现于参考文献 47 和 48。

[0126] D. 病毒体和病毒样颗粒

[0127] 病毒体和病毒样颗粒 (VLPs) 也可用作发明的佐剂。这些结构一般包含 1 种或多种来自病毒的蛋白,病毒任选结合磷脂或用磷脂制成。它们通常不致病、不复制且一般不包含任何天然病毒基因组。病毒蛋白可从完整病毒中重组生成或分离。这些适用于病毒体或 VLPs 的病毒蛋白包括获得自流感病毒 (如 HA 或 NA)、乙肝病毒 (如核心或衣壳蛋白)、戊型肝炎病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺沃克病毒、人乳头瘤病毒、HIV、RNA- 噬菌体、Q β - 噬菌体 (如外被蛋白)、GA- 噬菌体、fr- 噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty (如反转录转座子 Ty 蛋白 p1) 的蛋白。VLPs 进一步讨论于参考文献 49-54。病毒体进一步讨论于例如参考文献 55。

[0128] E. 细菌或微生物衍生物

[0129] 适合用于发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物,如肠细菌脂多糖 (LPS) 的非毒性衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激性寡核苷酸和 ADP- 核糖基化毒素和其去毒衍生物。

[0130] LPS 的非毒性衍生物包括单磷酸脂质 A (MPL) 和 3-O- 脱酰 MPL (3d MPL)。3dMPL 是 3-O- 脱酰单磷酸脂质 A 与 4、5 或 6 条酰化链的混合物。3-O- 脱酰单磷酸脂质 A 的优选“小颗粒”形式示于参考文献 56。这种“小颗粒”3d MPL 小到足以经 0.22 μ m 膜无菌过滤 [56]。其它非毒性 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物,如氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物,例如 RC-529 [57, 58]。

[0131] 脂质 A 衍生物包括来自大肠杆菌的脂质 A 衍生物,如 OM-174。OM-174 描述于例如参考文献 59 和 60。

[0132] 适合用作发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含 CpG 基序 (二核苷酸序列,含通过磷酸键连接鸟苷的未甲基化胞嘧啶) 的核苷酸序列。含回文或聚 (dG) 序列的双链 RNAs 和寡核苷酸也显示是免疫刺激性的。

[0133] CpG 可包括核苷酸修饰 / 类似物如硫代磷酸修饰且可以是双链或单链。参考文献

61、62 和 63 揭示可能的类似物取代,如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。CpG 寡核苷酸的佐剂效果进一步讨论于参考文献 64-69。

[0134] CpG 序列可引向 TLR9,如基序 GTCGTT 或 TTCGTT[70]。CpG 序列可对诱导 Th1 免疫反应特异,如 CpG-A ODN,或它可对诱导 B 细胞反应更特异,如 CpG-BODN。CpG-A 和 CpG-B ODN 讨论于参考文献 71-73。CpG 优选是 CpG-A ODN。

[0135] 优选构成 CpG 寡核苷酸,使 5' 末端易接受受体识别。2 种 CpG 寡核苷酸序列可任选在其 3' 末端附着以形成“免疫聚体”(immunomers)。参见例如参考文献 70 和 74-76。

[0136] 细菌 ADP-核糖基化毒素和其去毒衍生物可用作发明的佐剂。蛋白优选获得自大肠杆菌(大肠杆菌热不稳定性肠毒素“LT”)、霍乱(“CT”)或百日咳(“PT”)。使用去毒 ADP-核糖基化毒素作为粘膜佐剂描述于参考文献 77 且用作肠胃外佐剂描述于参考文献 78。毒素或类毒素优选以全毒素形式,包括 A 和 B 亚基。A 亚基优选包含去毒突变;B 亚基优选不突变。佐剂优选是去毒 LT 突变体,如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。使用 ADP-核糖基化毒素和其去毒衍生物特定是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂可发现于参考文献 79-86。关于氨基酸取代的数字参考优选基于参考文献 87 所列 ADP-核糖基化毒素的 A 和 B 亚基排列,参考文献 87 特别地全部纳入本文供参考。

[0137] F. 人免疫调节剂

[0138] 适合用作发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子如白介素(例如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12[88]等)[89]、干扰素(例如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0139] G. 生物粘合剂和粘膜粘合剂

[0140] 生物粘合剂和粘膜粘合剂也可用作发明的佐剂。合适的生物粘合剂包括酯化透明质酸微球体[90]或粘膜粘合剂如聚(丙烯酸)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。壳聚糖和其衍生物也可用作发明的佐剂[91]。

[0141] H. 微粒

[0142] 微粒也可用作发明的佐剂。优选从可生物降解和非毒性物质(如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等)材料形成的微粒(即 $\sim 100\text{nm}$ 到 $\sim 150\text{nm}$ 直径的颗粒,更优选 $\sim 200\text{nm}$ 到 $\sim 30\mu\text{m}$ 直径,最优选 $\sim 500\text{nm}$ 到 $\sim 10\mu\text{m}$ 直径),优选具有聚交酯聚乙交酯共聚物,任选处理的以具有带负电的表面(例如用 SDS)或带正电的表面(例如用阳离子去垢剂,如 CTAB)。

[0143] I. 脂质体(参考文献 39 的第 13 和 14 章)

[0144] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子描述于参考文献 92-94。

[0145] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0146] 适用于发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯[95]。这种制剂进一步包括组合辛苯昔醇的聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂[96]以及组合至少 1 种另外非离子表面活性剂如辛苯昔醇的聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂[97]。优选的聚氧乙烯醚选自下列组:聚氧乙烯-9-月桂醚(laureth9)、聚氧乙烯-9-硬脂基醚、聚氧乙烯-8-硬脂基醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

[0147] K. 聚磷腈(PCPP)

[0148] PCPP 制剂描述于例如参考文献 98 和 99。

[0149] L. 胞壁酰肽

[0150] 适合用作发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括 N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP) 和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (MTP-PE)。

[0151] M. 咪唑啉诺酮 (imidazoquinolone) 化合物

[0152] 适合用作发明佐剂的咪唑啉诺酮化合物的例子包括咪唑莫特和其同源物 (例如“瑞喹莫德 3M”), 它们进一步描述于参考文献 100 和 101。

[0153] 发明也可包括 1 种或多种上面鉴定的佐剂的组合。例如, 下列佐剂组合物能用于发明: (1) 皂苷和水包油乳剂 [102]; (2) 皂苷 (例如 QS21)+ 非毒性 LPS 衍生物 (例如 3dMPL) [103]; (3) 皂苷 (例如 QS21)+ 非毒性 LPS 衍生物 (例如 3dMPL)+ 胆固醇; (4) 皂苷 (例如 QS21)+3dMPL+IL-12 (任选+甾醇) [104]; (5) 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳剂的组合 [105]; (6) SAF, 含 10% 鲨烯、0.4% 吐温 80TM、5% pluronic-嵌段共聚物 L121 和 thr-MDP, 微流化成亚微米乳剂或涡旋产生较大粒度乳剂; (7) RibiTM 佐剂体系 (RAS) (Ribi Immunochem), 含 2% 鲨烯、0.2% 吐温 80 和 1 种或多种来自单磷酸脂 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 的细菌细胞壁成分, 优选 MPL+CWS (DetoxTM); (8) 1 种或多种无机盐 (如铝盐)+ 非毒性 LPS 衍生物 (如 3dMPL)。

[0154] 其它用作免疫刺激剂的物质示于参考文献 39 的第 7 章。

[0155] 特别优选使用氢氧化铝或磷酸铝佐剂, 抗原一般吸附于这些盐。如果组合物包括 Hib 抗原, 优选避免氢氧化铝作为佐剂。当使用氢氧化铝且不需要抗原吸附于佐剂上时, 这通过溶液中包含游离磷酸离子来促进 (例如用磷酸缓冲液)。防止吸收也能通过选择抗原 / 佐剂混合期间的正确 pH、具有合适零电荷点的佐剂、组合物中混合不同抗原的适当顺序来获得 [106]。

[0156] 磷酸钙是另一种优选佐剂。

[0157] 更多的抗原

[0158] 发明的组合物包含 5 个基本脑膜炎球菌蛋白抗原。它们也能进一步包括更多的抗原, 尽管它可不包含除了 5 个基本抗原的脑膜炎球菌蛋白抗原。包括的更多抗原可以是例如:

[0159] - 来自流感嗜血杆菌 B 的糖抗原。

[0160] - 来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 A、C、W135 和 / 或 Y 的糖抗原, 如参考文献 107 所示来自血清组 C 的寡糖或参考文献 108 的寡糖。

[0161] - 来自肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的糖抗原 [例如 155, 156, 157]。

[0162] - 来自甲肝病毒的抗原, 如灭活病毒 [例如 109, 110]。

[0163] - 来自乙肝病毒的抗原, 如表面和 / 或核心抗原 [例如 110, 111]。

[0164] - 白喉抗原, 如白喉类毒素 [例如参考文献 112 的第 3 章], 例如 CRM₁₉₇ 突变体 [如 113]。

[0165] - 破伤风抗原, 如破伤风类毒素 [例如参考文献 112 的第 4 章]。

[0166] - 来自百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 的抗原, 如来自百日咳博德特氏菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA), 任选也组合百日咳粘附素 (pertactin) 和

/ 或凝集原 2 和 3[例如参考文献 114 和 115]。可使用细胞百日咳抗原。

[0167] - 来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的外膜囊泡 (OMV) 制品, 如参考文献 4、116、117、118 等所示。

[0168] - 脊髓灰质炎抗原 [例如 119, 120], 如 OPV 或优选 IPV。

[0169] 组合物可包括 1 种或多种这些更多的抗原。抗原通常各以至少 $1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度存在。一般, 任何特定抗原的浓度足以引起抗该抗原的免疫反应。单独糖抗原的保护功效优选不被结合它们而去除, 尽管实际免疫原性 (如 ELISA 效价) 可能降低。

[0170] 当组合物中包括白喉抗原时, 优选也包括破伤风抗原和百日咳抗原。类似地, 当包括破伤风抗原时, 优选也包括白喉和百日咳抗原。类似地, 当包括百日咳抗原时, 优选也包括白喉和破伤风抗原。这种 DTP 组合可用于重建冻干缀合物。

[0171] 当使用糖或碳水化合物抗原时, 它优选缀合载体蛋白以提高免疫原性 (见下)。

[0172] 有毒蛋白抗原必要时可去毒 (例如通过化学和 / 或遗传学方法使百日咳毒素去毒 [115])。

[0173] 除了在发明组合物中使用蛋白抗原外, 可使用编码抗原的核酸 [例如参考文献 121 到 129]。因此, 发明组合物的蛋白成分能用编码蛋白的核酸 (优选 DNA, 如以质粒的形式) 取代。类似地, 发明组合物可包括模拟糖抗原如模拟表位 [130] 或抗独特型抗体。它们可取代单独糖成分, 或能补充它们。例如, 疫苗可包括 MenC[131] 或 MenA[132] 荚膜多糖的肽模拟物取代糖本身。

[0174] 特别优选的发明组合物包括 1、2 或 3 种 : (a) 来自脑膜炎球菌血清组 Y、W135、C 和 (任选) A 的糖抗原 ; (b) 来自流感嗜血杆菌 B 型的糖抗原 ; 和 / 或 (c) 来自肺炎链球菌的抗原。特别优选含血清组 B 抗原和 Hib 缀合物的组合物。

[0175] 脑膜炎球菌血清组 Y、W135、C 和 (任选) A

[0176] 如上所示, 抗血清组 A、C、W135 和 Y 的多糖疫苗已知多年。这些疫苗 (MENCEVAX ACWY™ 和 MENOMUNE™) 以生物体荚膜多糖为基础, 尽管它们在青少年和成人中有效, 它们的免疫反应差且保护持续时间短, 它们不能用于婴儿。

[0177] 与这些疫苗中的未缀合多糖抗原相反, 最近批准的血清组 C 疫苗 (Menjugate™[133, 107]、Meningitec™ 和 NeisVac-C™) 包括缀合糖。Menjugate™ 和 Meningitec™ 有缀合 CRM₁₉₇ 载体的寡糖抗原, 而 NeisVac-C™ 使用缀合破伤风类毒素载体的完整多糖 (O- 脱酰的)。

[0178] 本发明组合物优选包括来自 1 种或多种脑膜炎球菌血清组 Y、W135、C 和 (任选) A 的荚膜糖抗原, 其中抗原缀合载体蛋白和 / 或抗原是寡糖。

[0179] 每剂量各脑膜炎球菌糖抗原的典型量在 $1 \mu\text{g}$ 和 $200 \mu\text{g}$ 间, 例如约 $1 \mu\text{g}$ 、约 $2.5 \mu\text{g}$ 、约 $4 \mu\text{g}$ 、约 $5 \mu\text{g}$ 或约 $10 \mu\text{g}$ (表示为糖)。

[0180] 当混合物包括来自血清组 A 和 C 的荚膜糖时, MenA 糖 : MenC 糖的比例 (w/w) 可大于 1 (例如 2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、10 : 1、或更多)。当混合物包括来自血清组 Y 以及血清组 C 和 W135 之一或两者的荚膜糖时, MenY 糖 : MenW135 糖的比例 (w/w) 可大于 1 (例如 2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、10 : 1、或更多) 和 / 或 MenY 糖 : MenC 糖的比例 (w/w) 可小于 1 (例如 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 或更低)。来自血清组 A : C : W135 : Y 的糖的优选比例 (w/w) 是 1 : 1 : 1 : 1; 1 : 1 : 1 : 2; 2 : 1 : 1 : 1; 4 : 2 : 1 : 1;

8 : 4 : 2 : 1 ; 4 : 2 : 1 : 2 ; 8 : 4 : 1 : 2 ; 4 : 2 : 2 : 1 ; 2 : 2 : 1 : 1 ; 4 : 4 : 2 : 1 ; 2 : 2 : 1 : 2 ; 4 : 4 : 1 : 2 和 2 : 2 : 2 : 1。来自血清组 C : W135 : Y 的糖的优选比例 (w/w) 是 1 : 1 : 1 ; 1 : 1 : 2 ; 1 : 1 : 1 ; 2 : 1 : 1 ; 4 : 2 : 1 ; 2 : 1 : 2 ; 4 : 1 : 2 ; 2 : 2 : 1 和 2 : 1 : 1。优选使用基本等质量的各糖。

[0181] 荚膜糖一般用于寡糖形式。它们易形成,通过断裂纯化的荚膜多糖(如水解),通常接着是纯化所需大小的片段。

[0182] 优选进行多糖断裂以产生小于 30 的寡糖中最终平均聚合度 (DP) (如对于血清组 A 在 10 和 20 间,优选约 10 ;对于血清组 W135 和 Y 在 15 和 25 间,优选约 15-20 ;对于血清组 C 在 12 和 22 间 ;等等)。DP 易通过离子交换层析或比色测定来测量。

[0183] 如果进行水解,水解产物一般是尺寸以取出长度短的寡糖 [135]。这能用多种方式完成,如超滤,接着是离子交换层析。对于血清组 A,优选取出聚合度小于或等于约 6 的寡糖,对于血清组 W135 和 Y,优选取出小于约 4 的寡糖。

[0184] 优选的 MenC 糖抗原示于参考文献 133,如 Menjugate™ 所用。

[0185] 糖抗原可化学修饰。这特定用于减少血清组 A 的水解 [136 ; 见下]。可进行脑膜炎球菌糖的 O- 脱酰。对于寡糖,修饰可在解聚之前或之后发生。

[0186] 当发明的组合物包括 MenA 糖抗原时,抗原优选是修饰糖,其中天然糖上的 1 个或多个羟基由阻断基团取代 [136]。此修饰改善对水解的抗性,意味着血清组 A 抗原可保存于和用于液体制剂,而不需要冻干。

[0187] 有阻断基团的单糖单位数可变化。例如,所有或大体所有单糖单位可具有阻断基团。另外,至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 单糖单位可具有阻断基团。至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个单糖单位可具有阻断基团。

[0188] 同样,单糖单位上的阻断基团数可变化。例如,单糖单位上的阻断基团数可以是 1 或 2。阻断基团一般是在单糖单位的 4 位置和 / 或 3 位置。

[0189] 末端单糖单位可以或可没有阻断基团来取代其天然羟基。优选在末端单糖单位上保留游离异头羟基以提供进一步反应(例如缀合)的柄。异头羟基可通过还原胺化(使用例如 $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$) 转变成氨基 ($-\text{NH}_2$ - 或 $-\text{NH}-\text{E}$, 其中 E 是氮保护基团),然后可在其它羟基转变成阻断基团后再生。

[0190] 取代羟基的阻断基团可直接接近,通过羟基的衍化反应,即羟基的氢原子由另一基团取代。作为阻断基团的合适羟基衍生物是例如氨基甲酸盐、磺酸盐、碳酸盐、酯、醚(例如硅烷基醚或烷基醚)和缩醛。这种阻断基团的一些特定例子是烯丙基、Alloc、苄基、BOM、t- 丁基、三苯甲基、TBS、TBDPS、TES、TMS、TIPS、PMB、MEM、MOM、MTM、THP 等。其它不能直接接近以及完全取代羟基的阻断基团包括 C_{1-12} 烷基、 C_{3-12} 烷基、 C_{5-12} 芳基、 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基、 NR^1R^2 (R^1 和 R^2 在下列段落中定义)、H、F、Cl、Br、 CO_2H 、 CO_2 (C_{1-6} 烷基)、CN、 CF_3 、 CCl_3 等。优选的阻断基团是吸电子基团。

[0191] 优选的阻断基团具有公式 $-\text{O}-\text{X}-\text{Y}$ 或 $-\text{OR}^3$, 其中 X 是 C(0)、S(0) 或 SO_2 ; Y 是 C_{1-12} 烷基、 C_{1-12} 烷氧基、 C_{3-12} 环烷基、 C_{5-12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基,各自可任选 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、 CO_2H 、 CO_2 (C_{1-6} 烷基)、CN、 CF_3 或 CCl_3 的基团取代;或 Y 是 NR^1R^2 ; R^1 和 R^2 独立选自 H、 C_{1-12} 烷基、 C_{3-12} 环烷基、 C_{5-12} 芳基、 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基;或 R^1 和 R^2 可连接以形

成 C_{3-12} 饱和杂环基团; R^3 是 C_{1-12} 烷基或 C_{3-12} 环烷基,各自可任选用 1、2 或 3 个独立选自 F、Cl、Br、 CO_2 (C_{1-6} 烷基)、CN、 CF_3 或 CCl_3 的基团取代;或 R^3 是 C_{5-12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基,各自可任选用 1、2、3、4 或 5 个选自 F、Cl、Br、 CO_2H 、 CO_2 (C_{1-6} 烷基)、CN、 CF_3 或 Cl_3 的基团取代。当 R^3 是 C_{1-12} 烷基或 C_{3-12} 环烷基时,它通常用 1、2 或 3 个上面定义的基团取代。当 R^1 和 R^2 连接以形成 C_{3-12} 饱和杂环基团时,意味着 R^1 和 R^2 与氮原子一起形成饱和杂环基团,含 3 到 12 间任意数量的碳原子(例如 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12})。除了氮原子,杂环基团可包含 1 或 2 个杂原子(如 N、O 或 S)。 C_{3-12} 饱和杂环基团的例子是吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基、咪唑烷基、氮杂环丁烷基和吡丙啶基。

[0192] 阻断基团 $-O-X-Y$ 和 $-OR^3$ 能制备自 $-OH$ 基团,通过标准衍生程序如羟基与酰基卤、烷基卤、磺酰卤等反应。因此, $-O-X-Y$ 中的氧原子优选是羟基的氧原子,而 $-O-X-Y$ 中的 $-X-Y$ 基团优选取代羟基的氢原子。

[0193] 另外,阻断基团可经取代反应接近,如 Mitsunobu- 型取代。这些和其它从羟基制备阻断基团的方法是熟知的。

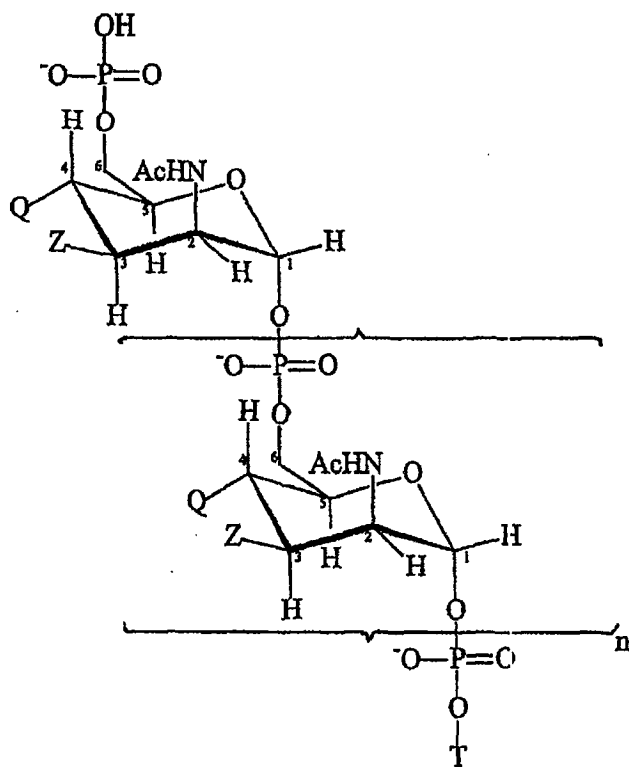
[0194] 阻断基团更优选是 $-OC(O)CF_3$ [137],或是氨基甲酸盐基团 $-OC(O)NR^1R^2$,其中 R^1 和 R^2 独立选自 C_{1-6} 烷基。 R^1 和 R^2 更优选都是甲基,即阻断基团是 $-OC(O)NMe_2$ 。氨基甲酸盐阻断基团对糖苷键有稳定作用且能在温和条件下制备。

[0195] 优选的修饰 MenA 糖包含 n 个单糖单位,其中至少 $h\%$ 单糖单位在 3 位和 4 位都没有 $-OH$ 基团。 h 值是 24 或更多(例如 25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98、99 或 100)且优选是 50 或更多。缺乏的 $-OH$ 基团优选是上面定义的阻断基团。

[0196] 其它优选的修饰 MenA 糖包括单糖单位,其中至少 s 单糖单位在 3 位没有 $-OH$ 和在 4 位没有 $-OH$ 。 s 值至少为 1(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90)。缺乏的 $-OH$ 基团优选是上面定义的阻断基团。

[0197] 用于发明的合适修饰 MenA 糖具有公式:

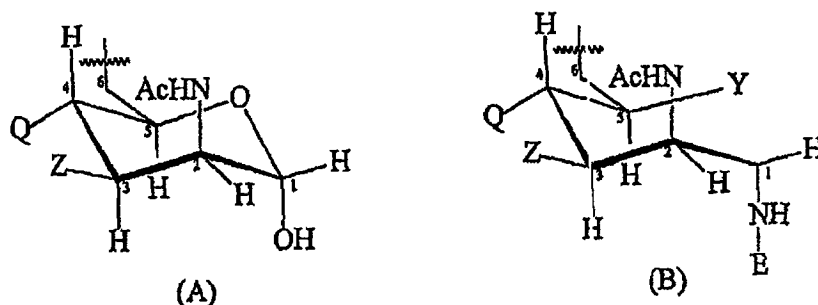
[0198]



[0199] 其中 n 是 1 到 100 的整数（优选 15 到 25 的整数）；

[0200] T 具有公式 (A) 或 (B)：

[0201]



[0202] 各 Z 基团独立选自 OH 或上面定义的阻断基团；和

[0203] 各 Q 基团独立选自 OH 或上面定义的阻断基团；

[0204] Y 选自 OH 或上面定义的阻断基团；

[0205] E 是 H 或氮保护基团；

[0206] 其中大于约 7%（例如 8%、9%、10% 或更多）的 Q 基团是阻断基团。

[0207] 各 $n+2Z$ 基团彼此可相同或不同。同样，各 $n+2Q$ 基团彼此可相同或不同。所有 Z 基团可以是 OH。另外，至少 10%、20%、30%、40%、50% 或 60% Z 基团可以是 OAc。优选约 70% Z 基团是 OAc，剩余 Z 基团是 OH 或上面定义的阻断基团。至少约 7% Q 基团是阻断基团。优选至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或甚至 100% Q 基团是阻断基团。

[0208] 优选的发明组合物可在 37°C 保存 28 天，此阶段后，小于 $f\%$ 初始总量的缀合 MenA 糖将非缀合，其中 f 是 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5 或更低。

[0209] 通常制备脑膜炎球菌荚膜多糖的方法包括步骤：多糖沉淀（例如用阳离子去垢

剂)、乙醇分级分离、冷酚抽提(以去除蛋白)和超离心(以去除LPS)[例如参考文献138]。然而,更优选的方法包括多糖沉淀,接着用低级醇溶解沉淀的多糖。沉淀可用阳离子去垢剂完成,如四丁基铵和鲸蜡基三甲基铵盐(例如溴盐)或海美溴铵和豆蔻基三甲基铵盐。特别优选鲸蜡基三甲基溴化铵(‘CTAB’)[139]。溶解沉淀物质用低级醇完成,如甲醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-2-丙醇、二醇等,但乙醇特别适合溶解CTAB-多糖复合体。优选加入乙醇到沉淀的多糖以使终浓度(以乙醇和水的总含量为基础)在50%和95%间。

[0210] 再溶解后,可进一步处理多糖以去除污染物。这在即使较少污染物也不能接受的情况(如用于人疫苗生产)中特别重要。它通常包括1个或多个过滤步骤,例如可使用深度过滤、经活性炭过滤、大小过滤和/或超滤。一旦过滤到去除污染物时,可沉淀多糖用于进一步处理和/或加工。这易通过阳离子交换完成(例如通过加入钙或钠盐)。

[0211] 除了纯化外,本发明的荚膜糖可通过全或部分合成获得,例如示于参考文献140的Hib合成和示于参考文献141的MenA合成。

[0212] 发明的组合物包括来自至少2个脑膜炎奈瑟球菌血清组的荚膜糖。糖优选单独制备(包括任何断裂、缀合、修饰等)并然后混合以产生发明的组合物。

[0213] 然而,当组合物包括来自血清组A的荚膜糖时,血清组A糖优选不结合其它糖直到使用之前不久,用于将水解可能降到最低。这易完成,通过使血清组A成分(通常与适当赋形剂一起)处于冻干形式和使其它血清组成分处于液体形式(也有适当赋形剂),准备使用时液体成分用于重建MenA成分。当使用铝盐佐剂时,优选包括佐剂于含液体疫苗的小瓶中并冻干无佐剂的MenA成分。

[0214] 因此,发明的组合物可从试剂盒制备,试剂盒包括:(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清组A的荚膜糖,以冻干形式;(b)更多来自组合物的抗原,以液体形式。发明也提供制备发明组合物的方法,包括混合来自脑膜炎奈瑟球菌血清组A的荚膜糖与更多抗原,其中所述更多抗原是以液体形式。

[0215] 发明也提供一种试剂盒,试剂盒包括:(a)第1个容器,含来自2个或多个脑膜炎奈瑟球菌血清组C、W135和Y的荚膜糖,都以冻干形式;(b)第2个容器,含液体形式的(i)组合物,施用给受试者后能在该受试者中诱导抗体反应,其中抗体反应杀菌,抗脑膜炎奈瑟球菌血清组B的高毒性谱系A4、ET-5和谱系3中的2个或多个(如2或3),(ii)来自非或1个脑膜炎奈瑟球菌血清组C、W135和Y的荚膜糖,任选(iii)更多不包括脑膜炎奈瑟球菌荚膜糖的抗原(见下),其中通过容器(b)的内含物重建容器(a)的内含物来提供发明组合物。

[0216] 在各剂量内,单独糖抗原量一般在1-50 μ g间(作为糖质量测量),各优选约为2.5 μ g、5 μ g或10 μ g。A:C:W135:Y重量比例为1:1:1:1;1:1:1:2;2:1:1:1;4:2:1:1;8:4:2:1;4:2:1:2;8:4:1:2;4:2:2:1;2:2:1:1;4:4:2:1;2:2:1:2;4:4:1:2和2:2:2:1,因此,图1所示量优选约为2.5 μ g、5 μ g或10 μ g。因而,对于1:1:1:1比例的A:C:W:Y组合物和10 μ g每糖,施用40 μ g糖每剂量。优选的组合物具有大约下列 μ g糖每剂量:

[0217]

A	10	0	0	0	10	5	2.5
C	10	10	5	2.5	5	5	2.5
W135	10	10	5	2.5	5	5	2.5
Y	10	10	5	2.5	5	5	2.5

[0218] 优选的发明组合物包括小于 50 μ g 的脑膜炎球菌糖每剂量。其它优选组合物包括 $\leq 40 \mu$ g 脑膜炎球菌糖每剂量。另外的优选组合物包括 $\leq 30 \mu$ g 脑膜炎球菌糖每剂量。其它优选组合物包括 $\leq 25 \mu$ g 脑膜炎球菌糖每剂量。另外的优选组合物包括 $\leq 20 \mu$ g 脑膜炎球菌糖每剂量。其它优选组合物包括 $\leq 10 \mu$ g 脑膜炎球菌糖每剂量,但发明的组合物理想上包括至少 10 μ g 脑膜炎球菌糖每剂量。

[0219] Menjugate™ 和 NeisVac™ MenC 缀合物使用氢氧化物佐剂,而 Meningitec™ 使用磷酸盐。在发明的组合物中,可能一些抗原吸附于氢氧化铝,但其它抗原与磷酸铝相联。对于例如四价血清组组合,可得到下列排列:

[0220]

血清组	铝盐 (H=氢氧化物; P=磷酸)													
	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H
A	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H
C	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H
W135	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H
Y	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H	P	H

[0221] 对于三价脑膜炎奈瑟球菌血清组组合,可得到下列排列:

[0222]

血清组	铝盐 (H=氢氧化物; P=磷酸)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

[0223] 流感嗜血杆菌 b 型

[0224] 当组合物包括流感嗜血杆菌 B 型抗原时,它通常是 Hib 荚膜糖抗原。来自流感嗜血杆菌的糖抗原是熟知的。

[0225] 有利的是,Hib 糖与载体蛋白共价缀合以提高其免疫原性,尤其是在儿童中的免疫原性。一般多糖缀合物制备和特定 Hib 荚膜多糖制备在文献中详细记载 [例如参考文献 142 到 150 等]。发明可使用任何合适的 Hib 缀合物。合适载体蛋白描述于下,用于 Hib 糖的优选载体是 CRM₁₉₇ (‘HbOC’)、破伤风类毒素 (‘PRP-T’) 和脑膜炎奈瑟球菌的外膜复合体 (‘PRP-OMP’)。

[0226] 缀合物的糖部分可以是多糖 (例如全长磷酸多核糖基核糖醇 (PRP)),但优选水解多糖以形成寡糖 (例如 MW 从 ~1 到 ~5kDa)。

[0227] 优选的缀合物包括 Hib 寡糖,经己二酸接头共价连接 CRM₁₉₇ [151,152]。破伤风类毒素也是优选载体。

[0228] 施用 Hib 抗原优选使抗 PRP 抗体浓度 $\geq 0.15 \mu\text{g/ml}$,更优选 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ 。

[0229] 发明的组合物可包括大于 1 个 Hib 抗原。

[0230] 当组合物包括 Hib 糖抗原时,它优选也不包括氢氧化铝佐剂。如果组合物包括磷酸铝佐剂,则 Hib 糖抗原可吸附于佐剂 [153] 或可以不吸收 [154]。

[0231] Hib 抗原能冻干,例如与脑膜炎球菌抗原一起。

[0232] 肺炎链球菌

[0233] 当组合物包括肺炎链球菌抗原时,它通常是荚膜糖抗原,此抗原优选与载体蛋白缀合 [例如参考文献 155 到 157]。优选包括来自多于 1 种肺炎链球菌血清型的糖。例如,广泛使用来自 23 种不同血清型的多糖混合物,有来自 5 到 11 种不同血清型的多糖的缀合疫苗也广泛使用 [158]。例如,PrevNar™ [159] 包含来自 7 种血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F) 的抗原,各糖通过还原胺化单独缀合 CRM₁₉₇,用 $2 \mu\text{g}$ 各糖每 0.5ml 剂量 ($4 \mu\text{g}$ 血清型 6B),缀合物吸附于磷酸铝佐剂上。发明的组合物优选包括至少血清型 6B、14、19F 和 23F。缀合物可吸附于磷酸铝上。

[0234] 除了使用来自肺炎球菌的糖抗原外,组合物可包括 1 种或多种多肽抗原。一些肺炎球菌菌株的基因组序列是有用的 [160,161] 并能经受反向疫苗学 [162-165] 以鉴定合适的多肽抗原 [166,167]。例如,组合物可包括 1 种或多种下列抗原: PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、SpsA、LytB、LytC、LytA、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130 和 Sp130,如参考文献 168 所定义。组合物可包括多于 1 种 (例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14) 的这些抗原。

[0235] 在一些实施方案中,组合物可包括来自肺炎球菌的糖和多肽抗原。这些能用于简单混合物,或肺炎球菌糖抗原可缀合肺炎球菌蛋白。这些实施方案的合适载体蛋白包括前面段落中所列抗原 [168]。

[0236] 肺炎球菌抗原可冻干,例如与脑膜炎球菌和 / 或 Hib 抗原一起。

[0237] 共价缀合

[0238] 发明组合物中的荚膜糖通常缀合载体蛋白。一般,缀合提高糖的免疫原性,因为它们从 T- 不依赖性抗原转变成 T- 依赖性抗原,因而能刺激免疫记忆。缀合特定用于儿科疫苗且是熟知的技术 [如参考文献 169 和 142-150 所综述]。

[0239] 优选的载体蛋白是细菌毒素或类毒素,如白喉类毒素或破伤风类毒素。特别优选 CRM₁₉₇ 白喉类毒素 [170-172]。其它合适的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [173]、合成肽 [174,175]、热激蛋白 [176,177]、百日咳蛋白 [178,179]、细胞因子 [180]、淋巴因子 [180]、激素 [180]、生长因子 [180]、人工蛋白,含多个来自不同病原体衍生抗原的人 CD4⁺T 细胞抗原表位 [181]、来自流感嗜血杆菌的蛋白 D [182,183]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [184]、铁吸收蛋白 [185]、来自艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B [186] 等。优选的载体是白喉类毒素、破伤风类毒素、流感嗜血杆菌蛋白 D 和 CRM₁₉₇。

[0240] 在发明的组合物内,可能使用多于 1 种的载体蛋白,例如用于降低载体抑制风险。因此,不同载体蛋白可用于不同血清组,例如血清组 A 糖可能缀合 CRM₁₉₇,而血清组 C 糖可能缀合破伤风类毒素。也可能使用多于 1 种的载体蛋白用于特定糖抗原,例如血清组 A 糖可能在 2 组中,一些缀合 CRM₁₉₇,其它的缀合破伤风类毒素。然而,一般优选对所有糖使用相同载体蛋白。

[0241] 单一载体蛋白可携带多于 1 种的糖抗原 [187]。例如,单一载体蛋白可缀合其来自血清组 A 和 C 的糖。为达到此目标,糖能在缀合反应前混合。然而,一般优选各血清组有单独缀合物。

[0242] 优选糖:蛋白比例 (w/w) 在 1 : 5 (即过量蛋白) 和 5 : 1 (即过量糖) 间的缀合物。优选 1 : 2 和 5 : 1 间的比例,更优选 1 : 1.25 和 1 : 2.5 间的比例。过量载体蛋白优选用于 MenA 和 MenC。

[0243] 缀合物可用于缀合游离载体蛋白 [188]。当特定载体蛋白在游离和缀合形式的发明组合物中都存在时,未缀合形式优选大体上不超过 5% 的组合物中载体蛋白总量,更优选以小于 2% 重量存在。

[0244] 可使用任何合适的缀合反应,必要时可有任意合适的接头。

[0245] 糖一般在缀合前活化或功能化。活化可包括例如氰化剂 (cyanylating) 如 CDAP (如 1- 氰基 -4- 二甲氨基吡啶鎓四氟硼酸盐 [189,190 等])。其它合适技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、去甲硼烷 (norborane)、p- 硝基苯甲酸、N- 羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU ; 也参见参考文献 148 的导言)。

[0246] 经接头基团连接可用任何已知方法进行,例如参见参考文献 191 和 192 所述方法。一类连接包括还原胺化多肽,偶联所得氨基与己二酸接头基团的一末端,然后偶联蛋白到己二酸接头基团的另一末端 [146,193,194]。其它接头包括 B- 丙酰胺基 [195]、硝基苯基 - 乙胺 [196]、卤酰基卤化物 (haloacyl halides) [197]、糖苷键 [198]、6- 氨基己酸 [199]、ADH [200]、C₄ 到 C₁₂ 部分 [20] 等。除了使用接头外,可使用直接连接。直接连接蛋白可包括氧化多糖,接着与蛋白还原胺化,如参考文献 202 和 203 所述。

[0247] 优选的方法包括引入氨基到糖 (如通过用 -NH₂ 取代末端 = O 基团) 中,接着用己二酸二酯 (例如己二酸 N- 羟基琥珀酰亚胺基二酯) 衍生。优选与载体蛋白反应。另一种

优选反应使用具有蛋白 D 载体的 CDAP 活化,例如用于 MenA 或 MenC。

[0248] 缀合后,可分离游离和缀合的糖。有许多合适的方法,包括疏水层析、切向超滤、渗滤等[也参见参考文献 204 和 205 等]。

[0249] 当发明的组合物包括缀合寡糖时,优选寡糖制备先于缀合。

[0250] 更多和另外的血清组 B 多肽抗原

[0251] 发明提供的组合物在施用给受试者后能在该受试者中诱导抗体反应,其中抗体反应杀菌,抗脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的高毒性谱系 A4、ET-5 和谱系 3 中的 2 个或多个。

[0252] 尽管 NadA、741、936、953 和 287 是获得此广泛保护的优选抗原,发明组合物中可包括的其它 MenB 多肽抗原(任选组合 1 种或多种 5 个基本抗原)包含具有下列氨基酸序列的抗原:来自参考文献 8 的 SEQ ID NO:650;来自参考文献 8 的 SEQ ID NO:878;来自参考文献 8 的 SEQ ID NO:884;来自参考文献 9 的 SEQ ID NO:4;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:598;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:818;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:864;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:866;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:1196;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:1272;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:1274;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:1640;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:1788;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2288;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2466;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2554;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2576;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2606;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2608;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2616;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2668;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2780;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2932;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2958;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2970;来自参考文献 10 的 SEQ ID NO:2988,或多肽,多肽包括的氨基酸序列:(a) 与所述序列有 50%或更多同一性(例如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多)和/或(b) 包括来自所述序列至少 n 个连续氨基酸的片段,其中 n 为 7 或更多(例如 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更多)。用于(b)的优选片段包括来自相关序列的抗原表位。可包括大于 1 种(例如 2、3、4、5、6)的这些多肽。

[0253] 综合

[0254] 术语“包含”指“包含”以及“由...组成”,例如“包含”X 的组合物可由 X 唯一组成或包括另外成分,例如 X+Y。

[0255] 涉及数值 x 的术语“约”指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0256] 单词“基本上”不排除“完全”,例如,“基本没有”Y 的组合物可完全没有 Y。必要时,单词“基本上”可从发明定义中省略。

[0257] 关于 2 种氨基酸序列间的百分比序列同一性,是指排列时,比较 2 种序列中氨基酸百分比是相同的。此排列和百分比同源性或序列同一性可用本领域已知软件程序确定,如参考文献 206 的 7.7.18 部分所述。优选的排列通过 Smith-Waterman 同源性搜索算法确定,使用仿射间隙搜索,间隙开放罚分为 12 且间隙延伸罚分为 2, BLOSUM 矩阵为 62。Smith-Waterman 同源性搜索算法教授于参考文献 207。

[0258] 术语“烷基”指直和分支形式的烷基。烷基能用 1、2 或 3 个杂原子间断,杂原子选自 -O-、-NH- 或 -S-。烷基也能用 1、2 或 3 个双和/或三键间断。然而,术语“烷基”通常指没有杂原子间断或双或三键间断的烷基。当提及 C_{1-12} 烷基时,烷基可包含 1 到 12 间任意数

量的碳原子（例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} ）。类似地，当提及 C_{1-6} 烷基时，烷基可包含 1 到 6 间任意数量的碳原子（例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 ）。

[0259] 术语“环烷基”包括环烷基、聚环烷基和环链烯基以及这些与烷基的组合，如环烷基烷基。环烷基能用 1、2 或 3 个杂原子间断，杂原子选自 $-O-$ 、 $-NH-$ 或 $-S-$ 。然而，术语“环烷基”通常指没有杂原子间断的环烷基。环烷基的例子包括环戊基、环己基、环己烯基、环己基甲基和金刚烷基。当提及 C_{3-12} 环烷基时，环烷基可包含 3 到 12 间任意数量的碳原子（例如 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} ）。

[0260] 术语“芳基”指芳族基，如苯基或萘基。当提及 C_{5-12} 芳基时，芳基可包含 5 到 12 间任意数量的碳原子（例如 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} ）。

[0261] 术语“ C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基”指基团如苄基、苄乙基和萘甲基。

[0262] 氮保护基团包括甲硅烷基（如 TMS、TES、TBS、TIPS）、酰基衍生物（如邻苯二甲酰亚胺、三氟乙酰胺、甲氧基羰基、乙氧基羰基、*t*-丁氧基羰基（Boc）、苄氧基羰基（Z 或 Cbz）、9-芴甲氧基羰基（Fmoc）、2-（三甲基甲硅烷基）乙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基（Troc）、磺酰衍生物（如 β -三甲基甲硅烷基乙磺酰（SES）、亚磺酰衍生物、 C_{1-12} 烷基、苄基、二苯甲基、三苯甲基、9-苯基芴等。优选的氮保护基团是 Fmoc。

[0263] 包括用于促进克隆或纯化等的序列不一定有助于发明且可省略或去除。

[0264] 应理解糖环能以开放或闭合形式存在，尽管本文的结构式中显示闭合形式，发明也包括开放形式。

[0265] 完成发明的模式

[0266] Δ G287-953 杂合蛋白

[0267] 消化 DNA，DNA 编码来自脑膜炎球菌血清组 B 菌株 394/98 的蛋白 287 和来自脑膜炎球菌血清组 B 菌株 2996 的蛋白 953，消化的 DNA 与短接头序列一起连接以产生编码氨基酸序列 SEQ ID 7 的质粒。质粒转染到大肠杆菌中，细菌生长以表达蛋白。

[0268] 适当生长后，收集细菌并纯化蛋白。从培养物中离心细菌，沉淀在 50mM 乙酸缓冲液（pH5）存在时匀浆，沉淀：缓冲液体积比例为 1：8。用高压均浆器（Avestin，于 14000psi 4 个循环）进行裂解。裂解后，加入尿素到 5M 的终浓度，接着室温搅拌 1 小时。pH 从 6 降到 5，使用 200mM 乙酸缓冲液（pH4）+5M 尿素。混合物以 16800g 在 2-8℃ 离心 60 分钟。收集上清并通过 SARTOBran P（0.45-0.22 μ m SARTORIUS）过滤。

[0269] 过滤上清中的蛋白在 -20℃ 稳定 ≥ 30 天且在 2-8℃ 稳定 ≥ 15 天。

[0270] 蛋白在阳离子交换柱（SPFF，Amersham Biosciences）上进一步纯化，用 350mM NaCl+50mM 乙酸盐+5M 尿素 pH5.00 洗脱。大部分杂质存在于流动中。用较低 NaCl 浓度（180mM）预洗脱洗涤有利去除 2 种污染的大肠杆菌蛋白。

[0271] 洗脱物质调至 pH8（用 200mM TRIS/HCl+5M 尿素 pH9）并在 Q Sepharose HP 柱（Amersham）上进一步纯化，用 5M 尿素中的 150mM NaCl+20mM TRIS/HCl pH8.00 洗脱。此外，用减少的盐（90mM）预洗脱洗涤对去除杂质有用。

[0272] 来自 Q HP 柱的过滤洗脱物质用 PBS pH7.00（150mM NaCl+10mM 磷酸钾，pH7.00）1：2 稀释，然后通过切向超滤相对 10 体积 PBS pH7.00 渗滤。渗滤结束时，物质浓缩 1.6 倍到约 1.2mg/ml 总蛋白。使用 30,000Da 截留膜（再生纤维素膜 50cm²，Millipore PLCK 30）能透析物质，产量约为 90%。

[0273] 936-ΔG741 杂合蛋白

[0274] 消化 DNA, DNA 编码来自脑膜炎球菌血清组 B 菌株 2996 的蛋白 936 和来自脑膜炎球菌血清组 B 菌株 MC58 的蛋白 741, 消化的 DNA 与短接头序列一起连接以产生编码氨基酸序列 SEQ ID 8 的质粒。质粒转染到大肠杆菌中, 细菌生长以表达蛋白。重组蛋白不分泌, 但保持溶于细菌内。

[0275] 适当生长后, 离心细菌以产生湿糊状物并如下处理:

[0276] - 存在 20mM 磷酸钠 pH7.00 的情况下通过高压系统匀浆。

[0277] - 离心和通过正交过滤来澄清。

[0278] - 阳离子柱层析 (SP Sepharose Fast Flow), 用 20mM 磷酸钠 pH7.00 中的 150mM NaCl 洗脱。

[0279] - 阴离子柱层析 (Q Sepharose XL), 流通收集。

[0280] - 疏水柱层析 (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub), 用 20mM 磷酸钠 pH7.00 洗脱。

[0281] - 相对 PBS pH7.4 渗滤, 10Kd 截留。

[0282] - 终无菌过滤和 -20℃ 贮存。

[0283] NadA^{(NL)(C)} 蛋白

[0284] 消化 DNA 以去除编码其 C 末端的序列, DNA 编码来自脑膜炎球菌血清组 B 菌株 2996 的 NadA 蛋白, 以产生编码氨基酸序列 SEQ ID 1 的质粒。质粒转染到大肠杆菌中, 细菌生长以表达蛋白。重组蛋白分泌到培养基中, 分泌蛋白 (SEQ ID2) 中缺乏前导肽。上清处理如下:

[0285] - 浓缩 7X 和通过交叉流动 UF (截留 30Kd) 相对缓冲液 20mM TRIS/HCl pH7.6 渗滤。

[0286] - 阴离子柱层析 (Q Sepharose XL), 用 20mM TRIS/HCl pH7.6 中的 400mM NaCl 洗脱。

[0287] - 疏水柱层析步骤 (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub), 用 TRIS/HCl pH7.6 中的 50mM NaCl 洗脱。

[0288] - 羟磷灰石陶瓷柱层析 (HA Macro.Prep), 用 200mM 磷酸钠 pH7.4 洗脱。

[0289] - 相对 PBS pH7.4 渗滤 (截留 30Kd)。

[0290] - 终无菌过滤和 -20℃ 保贮。

[0291] 终物质中的蛋白在 -20℃ 和 2-8℃ 稳定至少 6 个月。

[0292] NadA 蛋白对降解敏感, NadA 的截断形式可通过蛋白质印迹或质谱 (如 MALDI-TOF) 检测, 表明多至 10kDa MW 损失。降解产物可通过凝胶过滤从天然 NadA 中分离 (例如用柱 TSK 300SWXL、预柱 TSKSWXL、TOSOHAAS)。这种过滤产生 3 个峰: (i) 第 1 个峰的保留时间为 12.637 分钟且表观 MW 为 885.036Da; (ii) 保留时间为 13.871 分钟且表观 MW 为 530.388Da; (iii) 保留时间为 13.871 分钟且表观 MW 为 530.388Da。3 个峰的光散射分析显示实际 MW 值为 (i) 208500Da, (ii) 98460Da, (iii) 78760Da。因此, 第 1 个峰包含 NadA 聚集物, 第 3 个峰包含降解产物。

[0293] 由于 NadA^{(NL)(C)} 的预测分子量是 34.113Da, 峰 (ii) 包含三聚蛋白, 它就是所需抗原。

[0294] 抗原组合

[0295] 小鼠用组合物免疫,组合物包括 3 种蛋白和氢氧化铝佐剂。为了比较目的,也逐一地测试 3 种蛋白。每组使用 10 只小鼠。混合物能诱导抗多种菌株的高杀菌效价:

[0296]

脑膜炎球菌菌株(血清组)									
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)	
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000	
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4	
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000	
混合物	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000	

‘-’ 表明此菌株不包含 NadA 基因

观察个体小鼠，发现三倍混合物诱导高和一致的杀菌效价，抗 3 种获得单独抗原的血清组 B 菌株：

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

[0297] 与 OMVs 的组合和比较

[0298] 在进一步的实验中，佐剂抗原 (20 μg 各抗原每剂量) 与 10 μg OMVs 联合施用，

OMVs 制备自菌株 H44/76 (挪威) 或菌株 394/98 (新西兰)。对于血清组 B, 正对照是抗荚膜 SEAM-3mAb, 或对于其它菌株是 CRM197- 缀合荚膜糖。结果 (杀菌效价) 示于表 1。混合物几乎总是产生好于简单 OMVs 的效价, 此外, 加入混合物到 OMVs 几乎总是显著提高 OMVs 的功效。另外, 在许多情况中, 抗原混合物与正对照所见反应匹配或超出。

[0299] 高毒性谱系测试

[0300] 测试下列抗原抗来自多种高毒性谱系的各种血清组 B 菌株:

[0301] (a) NadA^(NL) (c)

[0302] (b) Δ G287-953

[0303] (c) 936- Δ G741

[0304] (d) (a)、(b) 和 (c) 的混合物

[0305] (e) 制备自菌株 H44/76 (挪威) 的 OMVs

[0306] (f) 制备自菌株 394/98 (新西兰) 的 OMVs

[0307] (g) Δ G287 和 (e) 的混合物

[0308] (h) (d) 和 (e) 的混合物

[0309] (i) (d) 和 (f) 的混合物

[0310] SEAM-3 用作正对照。

[0311] 结果如下, 表示为血清杀菌效价超过 1024 时所示高毒性谱系中的菌株百分比:

[0312]

	#菌株	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
谱系 3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

[0313]

抗特定参考菌株，杀菌效价如下：

	#菌株	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	262144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
谱系 3	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024

[0314] 因此，组合物 (d)、(h) 和 (i) 包括杀菌抗体反应，抗来自高毒性谱系 A4、ET-5 和谱系 3 的多种血清组 B 脑膜炎球菌菌株。用组合物 (h) 和 (i) 的效价一般高于用 (d)，但在高毒性谱系 A4、ET-5 和谱系 3 内的菌株覆盖不佳。

[0315] 未分类菌株的覆盖用组合物 (d)、(h) 和 (i) 也高。

[0316] 分析 NadA N 末端结构域

[0317] 已知纯化的脑膜炎奈瑟球菌 NadA 蛋白结合人上皮细胞 [17] (例如 Chang 细胞、HeLa 细胞、Hep-2 细胞), 表达 NadA 的重组大肠杆菌显示粘附表型 [18]。这些大肠杆菌也能侵入上皮细胞, 胞内 NadA⁺ 大肠杆菌能通过免疫荧光 (膜渗透后) 和电子显微镜在 Chang 细胞中检测。因此, 认为 NadA 功能是作为粘附素和侵入上皮细胞。

[0318] 在二级结构分析的基础上, 成熟 NadA 再分成 3 个推定结构域: N 末端球状结构域 (aa 24-87)、具有高卷曲螺旋倾向的 α -螺旋内部区 (aa 88-350) 和 C 末端膜锚 (aa351-405)。研究了 N 末端球状结构域在宿主-细胞相互作用中的功能。

[0319] 截断的 nadA 基因编码缺乏氨基酸 30-87 的蛋白, 此基因克隆到 pET-21 载体 (pET-NadA Δ 30-87) 中并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中表达。保留氨基酸 24-29 以允许加工前导肽和纠正蛋白成熟。蛋白质印迹和 FACS 分析确认 NadA Δ 30-87 在大肠杆菌细胞表面上表达并形成寡聚体, 即缺失 N 末端结构域不干扰 NadA 的表达、输出和膜定位。然而, 重组大肠杆菌菌株完全失去粘附 Chang 上皮细胞的能力。因此, N 末端结构域和粘附素活性有连带关系。

[0320] 为进一步研究哪部分 N 末端结构域参与相互作用, 此区域另外分成 3 个推定亚域: 氨基酸 24-42, 含有疏水残基的预测 α -螺旋区; 氨基酸 43-70, 无预测确定二级结构的内部部分; 氨基酸 71-87, 含其它预测 α -螺旋结构。产生 3 个构建物, 各编码缺失单个亚域的蛋白, 然后引入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 获得下列菌株: BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 24-42、BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 43-70 和 BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 71-87。寡聚体的表面定位通过蛋白质印迹和 FACS 分析确认, 但粘附 Chang 上皮细胞不好于对照 BL21 (DE3)/pET 大肠杆菌菌株。这些结果也用免疫荧光显微镜分析确认, 表明 NadA 的完整球状 N 末端结构域对与人细胞相互作用是重要的。

[0321] 与脑膜炎球菌和 / 或 Hib 缀合物的组合

[0322] 三重 MenB 组合物结合血清组 C、W135 和 Y 的寡糖缀合物混合物, 产生含下列抗原的疫苗:

[0323]

成分	量每 0.5ml 剂量
血清组 C 缀合物	10 μ g 糖 +12.5-25 μ g CRM ₁₉₇
血清组 W135 缀合物	10 μ g 糖 +6.6-20 μ g CRM ₁₉₇
血清组 Y 缀合物	10 μ g 糖 +6.6-20 μ g CRM ₁₉₇
Δ G287-953	20 μ g 多肽
936- Δ G741	20 μ g 多肽

成分	量每 0.5ml 剂量
NadA	20 μ g 多肽

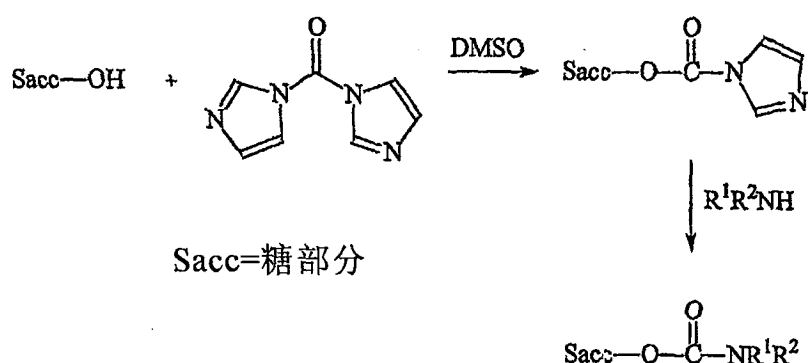
[0324] 制备类似地疫苗,包括 MenA 缀合物 (10 μ g 糖 + 12.5–33 μ g CRM₁₉₇) 和 / 或 HbOCHib 缀合物 (10 μ g 糖 + 2–5 μ g CRM₁₉₇)。

[0325] 使用修饰的 MenA 糖

[0326] 从 MenA 中纯化荚膜多糖,水解以产生 MenA 寡糖。多糖 (2g) 在 50mM 乙酸钠缓冲液 pH4.75 中 50°C 水解约 4 小时,多糖浓度为 10mg/mL [135]。水解后,溶液通过旋转蒸发来干燥。

[0327] 寡糖用下列反应流程活化:

[0328]



[0329] 寡糖溶解于 DMSO 以产生 10mg/mL 的糖浓度。根据 1 : 20 的寡糖 : CDI 摩尔比,然后加入 21.262g CDI 且反应混合物室温搅拌 16 小时。通过在 80 : 20 (v/v) 丙酮 : DMSO 混合物中选择性沉淀,接着离心纯化所得 MenA-CDI 化合物。通过确定游离咪唑与结合咪唑的比例计算活化反应效率约为 67.9%。

[0330] 在第 2 个反应步骤中, MenA-CDI 寡糖溶解于 DMSO,糖浓度约为 10mg/mL。根据 1 : 100 的 MenA-CDI 单位 : DMA 摩尔比,加入 36.288g 99% 盐酸二甲胺 (即 R¹ 和 R² = Me) 且反应混合物室温搅拌 16 小时。反应产物冷冻干燥并再溶解于 10mg/mL 水溶液。

[0331] 为从寡糖制品中去除低分子量反应试剂 (特别是二甲胺 (DMA)),经 3.5kDaMWC0 膜 (Spectra/Por™) 进行透析步骤。完成 4 个透析步骤:(i) 相对 2L 1M 氯化钠透析 16 小时 (透析因子 1 : 20),(ii) 相对 2L 0.5M 氯化钠透析 16 小时 (透析因子 1 : 20),(iii) 和 (iv) 相对 2L WFI 透析 16 小时 (透析因子 1 : 20)。为改善纯化,也经 1kDaMWC0 膜 (Centricon™) 进行透析步骤。

[0332] 纯化的 MenA-CDI-DMA 产物在 25mM L- 组氨酸 (Fluka™) 中缓冲于 pH6.5。

[0333] 为制备修饰的 MenA 糖缀合物 (MenA-CDI-DMA),总方法如下:

[0334] - 水解多糖以产生寡糖片段

[0335] - 寡糖片段的尺寸定位

[0336] - 还原胺化依大小排列的寡糖上的末端醛基

[0337] - 在 CDI 反应前通过 Fmoc 基团保护末端 -NH₂ 基团

[0338] - 在 DMA 反应期间内部去保护 -NH₂ 基团

[0339] - 通过 SIDEA (N- 羟基琥珀酰亚胺己二酸) 活化末端 -NH₂ 基团

[0340] - 共价附着于 CRM₁₉₇ 蛋白

[0341] 修饰的 MenA 寡糖缀合物在升高温时对水解的抗性比其天然对应物大许多。例如，37℃ 28 天后，修饰寡糖的释放糖百分比为 6.4%，相比之下，天然抗原为 23.5%。此外，修饰寡糖诱导的效价不显著低于用天然糖结构获得的效价。

[0342] 修饰的 MenA 缀合物结合 MenC、MenW135 和 MenY 缀合物，作为替代未修饰寡糖的缀合物。此四价混合物与 3 种 MenB 多肽混合以产生单剂量有效抗脑膜炎奈瑟球菌血清组 A、B、C、W135 和 Y 的疫苗。

[0343] 肺炎球菌组合

[0344] 3 种组合的 MenB 蛋白与肺炎球菌糖缀合物混合以产生终浓度为 2 μg/剂量的各肺炎球菌血清型（血清型 6B 双倍）。因此，重建的疫苗包含下列抗原：

[0345]

成分	量每 0.5ml 剂量
血清组 a 缀合物	5 μg 糖 +6.25-16.5 μg CRM ₁₉₇
血清组 c 缀合物	5 μg 糖 +6.25-12.5 μg CRM ₁₉₇
血清组 W135 缀合物	5 μg 糖 +3.3-10 μg CRM ₁₉₇
血清组 Y 缀合物	5 μg 糖 +3.3-10 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 4 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 9V 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 14 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 18C 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 19F 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 23F 缀合物	2 μg 糖 +2.5 μg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 6B 缀合物	4 μg 糖 +5 μg CRM ₁₉₇

[0346] 应理解发明仅通过例子描述，可进行修改而仍在发明的范围和精神内。

[0347] 表 1：

[0348]

	2996	NGH38	M4215	MC58	44/76	CU385	N44/89	354/98	W01-2010	NAB92	NM008	BZ198	W01-9945	G2138	5/99	F6124	BZ133	LPW7302	240530
分类	B-2-PL3,2	B-2-PL3	B-15-PL7,8	B-15-PL7,10	B-15-PL7,16	B-15-PL15	B-15-PL15,16	B-15-PL14	B-15-PL7,4	B-15-PL14	B-15-PL14	B-2-PL7	B-2-PL2,10	B-2-PL1,2	B-2-PL1,2	A	C-2-TE	W135	PL3
ET:	other	other	n.d.	ET5	ET5	ET5	ET5	lin.3	lin.3	lin.3	lin.3	lin.3	A4	A4	A4	III	II		
正对照	32768	32768	32768	16384	16384	>16384	8192	16384	8192	32768	8192	16384	8192	32768	8192	1024		1024	4096
抗原混合物	4096	4096	65536	32768	65536	>65536	>4096	8192	2048	>4096	4096	4096	2048	2048	>4096	8192	16384	4096	>8192
抗原 + H44/76 OMVs	16384	8192	>65536	32768	624288	>65536	>4096	16384	8192	>4096	>4096	>4096	>8192	2048	>4096	32768	32768	16384	>8192
抗原 + 394/98 OMV	8192	8192	>65536	32768	>65536	>65536	>4096	65536	>8192	>4096	>4096	>4096	2048	8192	>4096	65536	65536	65536	>8192
OMVs (挪威)	<4	1024	8192	2048	262144	256	<8	4096	<4	<8	<8	<4	>8192	<8	<8	1024	<4	<8	>4096
OMVs (NZ)	512	<4	128	2048	<4	<8	<8	32768	>8192	4096	1024	4096	<16	n.d.	<8	4096	1024	<8	>4096

[0349] 参考文献 (其内容参考引用于此)

[0350] [1]Maiden 等人 (1998)PNAS USA 95 :3140-3145.

[0351] [2]Armand 等人 (1982)J. Biol. Stand. 10 :335-339.

[0352] [3]Cadoz 等人 (1985)Vaccine 3 :340-342.

[0353] [4]Bjune 等人 (1991)Lancet 338(8775):1093-96[5]Parkhill 等人 (2000)Nature404 :502-506

[0354] [6]Tettelin 等人 (2000)Science 287 :1809-1815.

[0355] [7]W000/66791.

[0356] [8]W099/24578.

[0357] [9]W099/36544.

[0358] [10]W099/57280.

[0359] [11]W000/22430.

[0360] [12]W000/66741.

[0361] [13]Pizza 等人 (2000)Science 287 :1816-1820.

[0362] [14]W001/64920.

[0363] [15]W001/64922.

[0364] [16]W003/020756.

[0365] [17]Comanducci 等人 (2002)J Exp. Med. 195 :1445-1454.

[0366] [18]W003/010194.

[0367] [19]UK 专利申请 0227346. 4.

[0368] [20]W003/063766.

[0369] [21]Masignani 等人 (2003)JExp Med 197 :789-799.

[0370] [22]<http://neisseria.org/nmltyping/nmlst1>

[0371] [23]Pettersson 等人 (1994)Microb Pathog 17(6):395-408.

[0372] [24]Welsch 等人 (2002)Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway;Sept.1-6,2002. Genome-derived antigen(GNA)2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.

[0373] [25]Santos 等人 (2002)Thirteenth International Pathogenic Neisseria

Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway ;Sept.1-6,2002.
Serumbactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N.meningitidis*.

[0374] [26]W003/009869.

[0375] [27]W001/30390.

[0376] [28]Almeida & Alpar(1996)*J Drug Targeting* 3 :455-467.

[0377] [29]Agarwal & Mishra(1999)*Indian JExp Biol* 37 :6-16.

[0378] [30]W000/53221.

[0379] [31]Jakobsen 等人 (2002)*Infect Immun* 70 :1443-1452.

[0380] [32]Wu 等人 (1997)*J Infect Dis* 175 :839-846.

[0381] [33]Bergquist 等人 (1998)*APMIS* 106 :800-806.

[0382] [34]Baudner 等人 (2002)*Infect Immun* 70 :4785-4790.

[0383] [35]Ugozzoli 等人 (2002)*J Infect Dis* 186 :1358-1361.

[0384] [36]Paoletti 等人 (2001)*Vaccine* 19 :2118-2126.

[0385] [37]W000/56365.

[0386] [38]Gennaro(2000)*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN :0683306472.

[0387] [39]*Vaccine Design...* (1995)eds.Powell & Newman. ISBN :030644867X. Plenum.

[0388] [40]W000/23105.

[0389] [41]W090/14837.

[0390] [42]US 专利 5, 057, 540.

[0391] [43]W096/33739.

[0392] [44]EP-A-0109942.

[0393] [45]W096/11711.

[0394] [46]W000/07621.

[0395] [47]Barr 等人 (1998)*Advanced Drug Delivery Reviews* 32 :247-271.

[0396] [48]Sjolander 等人 (1998)*Advanced Drug Delivery Reviews* 32 :321-338.

[0397] [49]Niikura 等人 (2002)*Virology* 293 :273-280.

[0398] [50]Lenz 等人 (2001)*J Immunol* 166 :5346-5355.

[0399] [51]Pinto 等人 (2003)*J Infect Dis* 188 :327-338.

[0400] [52]Gerber 等人 (2001)*Virology* 75 :4752-4760.

[0401] [53]W003/024480

[0402] [54]W003/024481

[0403] [55]Gluck 等人 (2002)*Vaccine* 20 :B 10-B 16.

[0404] [56]EP-A-0689454.

[0405] [57]Johnson 等人 (1999)*Bioorg Med Chem Lett* 9 :2273-2278.

[0406] [58]Evans 等人 (2003)*Expert Rev Vaccines* 2 :219-229.

[0407] [59]Meraldi 等人 (2003)*Vaccine* 21 :2485-2491.

- [0408] [60]Pajak 等人 (2003)Vaccine21 :836-842.
- [0409] [61]Kandimalla 等人 (2003)Nucleic Acids Research 31 :2393-2400.
- [0410] [62]W002/26757.
- [0411] [63]W099/62923.
- [0412] [64]Krieg(2003)Nature Medicine 9 :831-835.
- [0413] [65]McCluskie etal. (2002)FEMSImmunology and Medical Microbiology 32 : 179-185.
- [0414] [66]W098/40100.
- [0415] [67]US patent 6, 207, 646.
- [0416] [68]US patent 6, 239, 116.
- [0417] [69]US patent 6, 429, 199.
- [0418] [70]Kandimalla 等人 (2003)Biochemical Society Transactions 31(part 3) : 654-658.
- [0419] [71]Blackwell 等人 (2003)Immunol 170 :4061-4068.
- [0420] [72]Krieg(2002)Trends Inamuszol 23 :64-65.
- [0421] [73]W001/95935.
- [0422] [74]Kandimalla 等人 (2003)BBRC 306 :948-953.
- [0423] [75]Bhagat 等人 (2003)BBRC 300 :853-861.
- [0424] [76]W003/035836.
- [0425] [77]W095/17211.
- [0426] [78]W098/42375.
- [0427] [79]Beignon 等人 (2002)Infect Immun 70 :3012-3019.
- [0428] [80]Pizza 等人 (2001)Vaccine 19 :2534-2541.
- [0429] [81]Pizza 等人 (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461.
- [0430] [82]Scharton-Kersten 等人 (2000)Infect Immun 68 :5306-5313.
- [0431] [83]Ryan 等人 (1999)Infect Immun 67 :6270-6280.
- [0432] [84]Partidos 等人 (1999)Immunol Lett 67 :209-216.
- [0433] [85]Peppoloni 等人 (2003)Expert Rev Vaccines 2 :285-293.
- [0434] [86]Pine 等人 (2002)JControlRelease 85 :263-270.
- [0435] [87]Domenighini 等人 (1995)Mol Microbiol 15 :1165-1167.
- [0436] [88]W099/40936.
- [0437] [89]W099/44636.
- [0438] [90]Singh 等人 (2001)JContRelease 70 :267-276.
- [0439] [91]W099/27960.
- [0440] [92]US 专利 6, 090, 406
- [0441] [93]US 专利 5, 916, 588
- [0442] [94]EP-A-0626169.
- [0443] [95]W099/52549.
- [0444] [96]W001/21207.

- [0445] [97]W001/21152.
- [0446] [98]Andrianov 等人 (1998)Biomaterials 19 :109-115.
- [0447] [99]Payne 等人 (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196.
- [0448] [100]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27 :571-577.
- [0449] [101]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4 :214-218.
- [0450] [102]W099/11241.
- [0451] [103]W094/00153.
- [0452] [104]W098/57659.
- [0453] [105] 欧洲专利申请 0835318,0735898 和 0761231.
- [0454] [106]W096/37222 ;US 专利 6, 333, 036. .
- [0455] [107]Costantino 等人 (1992)Vaccine 10 :691-698.
- [0456] [108]W003/007985.
- [0457] [109]Bell(2000)Pediatr Infect Dis J19 :1187-1188.
- [0458] [110]Iwarson(1995)APMIS 103 :321-326.
- [0459] [111]Gerlich 等人 (1990)Vaccine 8 Suppl :S63-68 & 79-80.
- [0460] [112]Vaccines(1988)eds.Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [0461] [113]Del Guidice 等人 (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70.
- [0462] [114]Gustafsson 等人 (1996)N. Engl. J Med 334 :349-355.
- [0463] [115]Rappuoli 等人 (1991)TIBTECH9 :232-238.
- [0464] [116]W001/52885.
- [0465] [117]Fukasawa 等人 (1999)Vaccine 17 :2951-2958.
- [0466] [118]Rosenqvist 等人 (1998)Dev. Biol. Stand. 92 :323-333.
- [0467] [119]Sutter 等人 (2000)Pediatr Clin North Am 47 :287-308.
- [0468] [120]Zimmerman& Spann(1999)Am Fam Physician 59 :113-118,125-126.
- [0469] [121]Robinson & Torres(1997)Seminars in Immunology 9 :271-283.
- [0470] [122]Donnelly 等人 (1997)Annu Rev Immunol 15 :617-648.
- [0471] [123]Scott-Taylor & Dalgleish(2000)Expert Opin Investig Drugs 9 :471-480.
- [0472] [124]Apostolopoulos & Plebanski(2000)Curr Opin Mol Ther 2 :441-447.
- [0473] [125]Ilan(1999)Curr Opin Mol Ther 1 :116-120.
- [0474] [126]Dubensky 等人 (2000)Mol Med 6 :723-732.
- [0475] [127]Robinson & Pertmer(2000)Adv Virus Res 55 :1-74.
- [0476] [128]Donnelly 等人 (2000)Am JRespir Crit Care Med 162(4 Pt 2) :S190-193.
- [0477] [129]Davis(1999)Mt. Sinai J. Med. 66 :84-90.
- [0478] [130]Charalambous & Feavers(2001)JMed Microbiol 50 :937-939.
- [0479] [131]Westerink(2001)IntRev Inimmunol 20 :251-261.
- [0480] [132]Grothaus 等人 (2000)Vaccine 18 :1253-1263.
- [0481] [133]Jones(2001)Curr Opin Investig Drugs 2 :47-49.
- [0482] [134]Ravenscroft 等人 (1999)Vaccine 17 :2802-2816.

- [0483] [135]Costantino 等人 (1999)Vaccine 17 :1251-1263.
- [0484] [136]W003/080678.
- [0485] [137]Nilsson & Svensson(1979)Carbohydrate Research 69 :292-296) [138] Frash(1990)p.123-145 of Advances in Biotechnological Processes vol.13(eds. Mizrahi &Van Wezel) [139]Inzana(1987)Infect. Immun. 55 :1573-1579.
- [0486] [140]Kandil 等人 (1997)Glycoconj J 14 :13-17.
- [0487] [141]Berkin 等人 (2002)Chemistry 8 :4424-4433.
- [0488] [142]Lindberg(1999)Vaccine 17 Suppl 2 :S28-36.
- [0489] [143]Buttery & Moxon(2000)JR Coll Physicians Lond 34 :163-168.
- [0490] [144]Ahmad & Chapnick(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :113-33, vii.
- [0491] [145]Goldblatt(1998)J ;Med. Microbiol. 47 :563-567.
- [0492] [146]European 专利 0477508.
- [0493] [147]US 专利 5, 306, 492.
- [0494] [148]W098/42721.
- [0495] [149]Dick 等 人 in Conjugate Vaccines(eds. Cruse et al.)Karger, Basel, 1989, 10 :48-114.
- [0496] [150]Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego(1996) ISBN :0123423368.
- [0497] [151]Kanra 等人 (1999)The Turkish Journal of Paediatrics 42 :421-427.
- [0498] [152]Ravenscroft 等人 (2000)Dev Biol(Basel)103 :35-47.
- [0499] [153]W097/00697.
- [0500] [154]W002/00249.
- [0501] [155]Watson(2000)PediatrInfectDis J 19 :331-332.
- [0502] [156]Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v.
- [0503] [157]Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207.
- [0504] [158]Zielen 等人 (2000)Infect. Immun. 68 :1435-1440.
- [0505] [159]Darkes & Plosker(2002)Paediatr Drugs 4 :609-630.
- [0506] [160]Tettelin 等人 (2001)Science 293 :498-506.
- [0507] [161]Hoskins et al(2001)JBacteriol 183 :5709-5717.
- [0508] [162]Rappuoli(2000)Curr Opin Microbiol 3 :445-450 [163]Rappuoli(2001) Vaccine 19 :2688-2691.
- [0509] [164]Masignani 等人 (2002)Expert Opin Biol Ther 2 :895-905.
- [0510] [165]Mora 等人 (2003)DrugDiscov Today 8 :459-464.
- [0511] [166]Wizemann 等人 (2001)Infect Immun 69 :1593-1598.
- [0512] [167]Rigden 等人 (2003)Crit Rev Biochem Mol Biol 38 :143-168.
- [0513] [168]W002/22167.
- [0514] [169]Ramsay 等人 (2001)Lancet 357(9251) :195-196.
- [0515] [170]Anonymous(Jan 2002)Research Disclosure, 453077.
- [0516] [171]Anderson(1983)Infect Immun 39(1) :233-238.

- [0517] [172]Anderson 等人 (1985)JClin Invest 76(1):52-59.
- [0518] [173]EP-A-0372501.
- [0519] [174]EP-A-0378881.
- [0520] [175]EP-A-0427347.
- [0521] [176]W093/17712
- [0522] [177]W094/03208.
- [0523] [178]W098/58668.
- [0524] [179]EP-A-0471177.
- [0525] [180]W091/01146
- [0526] [181]Falugi 等人 (2001)EurJ Immunol 31:3816-3824.
- [0527] [182]EP-A-0594610.
- [0528] [183]W000/56360.
- [0529] [184]W002/091998.
- [0530] [185]W001/72337
- [0531] [186]W000/61761.
- [0532] [187]W099/42130
- [0533] [188]W096/40242
- [0534] [189]Lees 等人 (1996)Vaccine 14:190-198.
- [0535] [190]W095/08348.
- [0536] [191]US 专利 4,882,317
- [0537] [192]US 专利 4,695,624
- [0538] [193]Porro 等人 (1985)Mol Immunol 22:907-919. s
- [0539] [194]EP-A-0208375
- [0540] [195]W000/10599
- [0541] [196]Gever 等人 Med. Microbiol. Immunol, 165:171-288(1979).
- [0542] [197]US 专利 4,057,685.
- [0543] [198]US 专利 4,673,574 ;4,761,283 ;4,808,700.
- [0544] [199]US 专利 4,459,286.
- [0545] [200]US 专利 4,965,338
- [0546] [201]US 专利 4,663,160.
- [0547] [202]US 专利 4,761,283
- [0548] [203]US 专利 4,356,170
- [0549] [204]Lei 等人 (2000)Dev Biol(Basel)103:259-264.
- [0550] [205]W000/38711 ;US 专利 6,146,902.
- [0551] [206]Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel et al., eds., 1987)Supplement 30.
- [0552] [207]Smith & Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482-489.
- [0553] 序列表
- [0554] SEQ ID 1- 来自菌株 2996 的 NadA,有 C 末端缺失

[0555] MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAAATNDDDVKKAATVAIAAAAYNNGQEINGFKAGBTIYDIDEDGTITKK
DATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTCTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKL
GENITTFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKA
AETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLD
RLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

[0556] SEQ ID 2- 来自菌株 2996 的 NadA, 有 C 末端缺失且前导肽加工

[0557] ATNDDDVKKAATVAIAAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTN
LTCTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIVKIDEKLE
AVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAASETAAGKAEAAAAGTANTAADKAE
AVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTV
SDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

[0558] SEQ ID 3- 来自 MC58 菌株的 Δ G741

[0559] VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFR
DFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYR
GTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQGGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSGLIFGGK
AQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAQK

[0560] SEQ ID 4- 来自 MC58 菌株的 936, 有前导肽加工

[0561] VSAVIGSAAVGAASAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQ
VATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMG
ILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR

[0562] SEQ ID 5- 来自 MC58 菌株的 953, 有前导肽加工

[0563] ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPIANLQSGSQHFTDHLKS
ADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFGKKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWG
MDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

[0564] SEQ ID 6- 来自 Mc58 菌株的 Δ G287

[0565] SPDVKASDTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPK
NEDEVAQNMDMPQNAAGTDSSTPNHTPDNMLAGNMENQATDAGESSQANQPDMANAADGMQGGDDPSAGGQAGNT
AAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGSNFGRVDLANGVLIDGPSQNIITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLK
SEFEKLSADAKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRFRSARSRRSLPAEMPLIPVNQ
ADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAGKEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGR
PYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIIDSGDDLHMGTKQFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSY
RPTDAEKGFGFVAGKKEQD

[0566] SEQ ID 7-287-953 杂合体

[0567] MASPDVKASDTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATDKP
KNEDEGAQNMDMPQNAADTDSLTPNHTPASNPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGGDDPSAGGENAGNT
AAQGTNQAENNQTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRTNVGNVVIDGPSQNIITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSE
FEKLSADAKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRFRSARSRRSLPAEMPLIPVNQ
ADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPS
PSRGRFAAKVDFGSKSVDGIIIDSGDGLHMGTKQFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTD

AEKGGFGVFAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANL
QSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFNQYQSPMAKTEVCGG
DFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ *

[0568] SEQ ID 8-936-741 杂合体

[0569] MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLG
QVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVM
GILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNE
KLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSG
KMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADI
KPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ *

[0570] SEQ ID 9- 接头

[0571] GSGGGG

[0572] SEQ ID 10-741 序列

[0573] CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK
NDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPE
GGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYS
LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

[0574] SEQ ID 11-741 序列

[0575] CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLK
NDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPD
GKA EYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHL
ALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

[0576] SEQ ID 12-741 序列

[0577] CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDN
SLNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPKTD SLINQRSFLVSGLGGEH
TAFNQLPGGKA EYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGS
EEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ