



(21) 申请号 201980072018.3

(22) 申请日 2019.11.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112996538 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(30) 优先权数据
18204691.2 2018.11.06 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/080120 2019.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/094580 EN 2020.05.14

(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 M·孔托尔尼 M·皮扎
A·佐伊贝特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

专利代理人 翟建伟 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014155294 A1, 2014.10.02

US 2016193322 A1, 2016.07.07

US 2014302558 A1, 2014.10.09

Nico Marr等.Substitution of the Bordetella pertussis lipid A phosphate groups with glucosamine is required for robust NF-kappaB activation and release of proinflammatory cytokines in cells expressing human but not murine Toll-like receptor 4-MD-2-CD14. INFECTION AND IMMUNITY. 2010, 第78卷(第5期), 第2060-2069页.

审查员 王雅倩

权利要求书2页 说明书28页

序列表1页 附图19页

(54) 发明名称

免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明提供了免疫原性组合物,其包含OMV以及(a)无细胞百日咳抗原、(b)破伤风类毒素和(c)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌。本发明还提供了用于在患者中产生免疫应答的方法中使用的组合物,所述方法包括向所述患者施用本发明的组合物的步骤。

1. 免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自S1基因已被修饰的百日咳博德特氏菌菌株,并且所述修饰是突变R9K和E129G,并且所述百日咳博德特氏菌菌株表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,并且其中ArnT基因已经被敲除或缺失,并且其中所述无细胞百日咳抗原包含解毒的百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)和百日咳杆菌粘附素(PRN)。

2. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中PT、FHA和PRN以通过重量测量的16:16:5的比率存在。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以每0.5ml剂量4Lf/ml至8Lf/ml的浓度存在。

4. 根据权利要求3所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以每0.5ml剂量4Lf的浓度存在。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以每0.5ml剂量20至50Lf/ml的浓度存在。

6. 根据权利要求5所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以每0.5ml剂量25Lf的浓度存在。

7. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中破伤风类毒素以每0.5ml剂量5至10Lf的浓度存在。

8. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的大于1的白喉类毒素:破伤风类毒素比率存在。

9. 根据权利要求8所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的2:1至3:1的白喉类毒素:破伤风类毒素比率存在。

10. 根据权利要求9所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的2.5:1的白喉类毒素:破伤风类毒素比率存在。

11. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的大于1的破伤风类毒素:白喉类毒素比率存在。

12. 根据权利要求11所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的1.5:1至2.5:1的破伤风类毒素:白喉类毒素比率存在。

13. 根据权利要求12所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以Lf单位测量的2:1的破伤风类毒素:白喉类毒素比率存在。

14. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物含有佐剂。

15. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物含有铝盐佐剂。

16. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是可注射液体溶液或悬浮液。

17. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是冻干的。

18. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物不含防腐剂。

19. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是疫苗。

20. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物用于施用于人。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物在制备药物中的用途,所述药

物用于在患者中产生针对白喉棒状杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌和百日咳博德特氏菌的免疫应答。

免疫原性组合物

技术领域

[0001] 本发明处于组合疫苗领域中,所述组合疫苗是含有来自多于一种病原体的免疫原的混合物的疫苗,使得所述疫苗的施用可以同时针对多于一种病原体对受试者进行免疫。更具体地,本发明涉及用于白喉、破伤风和百日咳的加强疫苗。

[0002] 发明背景

[0003] 在单一剂量内含有来自多于一种病原生物体的抗原的疫苗被称为“多价”或“组合”疫苗。组合疫苗为患者提供了接受减少次数的注射的优势,这可以导致增加依从性的临床优势(例如,参见参考文献1的第29章)。各种组合疫苗已经在欧洲和美国被批准用于人类使用,包括用于针对白喉、破伤风和百日咳进行保护的三价疫苗。此类疫苗可以被称为DTaP和Tdap。尽管DTaP和Tdap均为针对白喉、破伤风和百日咳的组合疫苗,但DTaP疫苗用于初次免疫,而Tdap疫苗用于后续的加强接种疫苗。初次和加强疫苗组合物之间的差异在于剂量。更具体地,关于加强疫苗,通常这些疫苗包含较低剂量的一些抗原组合,例如,BOOSTRIX的白喉类毒素含量比INFANRIX的白喉类毒素含量低10倍。这通过使用小写字母‘d’(是指较低量的白喉类毒素)指示。

[0004] 抗原组分的比率也可以改变。例如,白喉和破伤风类毒素的比率在INFANRIX中为2.5:1,但在BOOSTRIX中为1:2。因此,这些加强疫苗在绝对量以及相对于破伤风类毒素含量方面均显示白喉类毒素的剂量的大大降低。

[0005] 然而,近年来,甚至在具有高疫苗覆盖率的家中,也已经观察到由百日咳博德特氏菌引起的疾病的复发。尽管这种复发的确切原因不清楚,但潜在的原因包括免疫力下降和流行毒株的流行病学变化。

[0006] 因此,本发明的一个目标是提供进一步和改进的组合疫苗,用于针对白喉棒状杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌和百日咳博德特氏菌进行保护。本发明的一个目标还是提供适合于人类使用的进一步和改进的Tdap疫苗,作为先前已接受儿童免疫的成人、青少年和四岁及以上的儿童中的加强剂。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明基于包含来自百日咳博德特氏菌的外膜囊泡(OMV)的组合疫苗的研究。发明人已经发现这些组合疫苗引发针对相应抗原的特异性抗体滴度,其中在各种抗原之间几乎没有免疫干扰或没有免疫干扰。来自百日咳博德特氏菌的OMV的存在提供了针对博德特氏菌的提高了的抗体应答,并且令人惊讶地还提高针对组合物中的其他抗原的抗体应答。

[0009] 因此,在第一个方面,提供了免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌。具体地,所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素的百日咳博德特氏菌菌株。更具体地,所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株。

[0010] 因此,本发明提供了免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素、特别是基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏

菌菌株。

[0011] 本发明进一步提供了免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素,特别是PT 9K/129G,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0012] 本发明又进一步提供了免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素,特别是PT 9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺(G1cN)取代,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0013] PT-9K/129G基因解毒的百日咳类毒素在S1亚基内包含两个氨基酸取代,尤其是R9K和E129G(参见例如EP0396964)。因此,仍又更具体地,所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。又更具体地,所述外膜囊泡中的100%百日咳类毒素是基因解毒的PT,特别是PT 9K/129G。

[0014] 在一些实施方案中,本发明所使用的百日咳博德特氏菌OMV具有在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺(G1cN)取代的修饰的脂质A结构。在一些实施方案中,由其获得OMV的百日咳博德特氏菌菌株包含ArnT的敲除,特别是ArnT编码基因的缺失(Δ ArnT)。因此,本发明所使用且源自此类菌株的OMV可以具有在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺(G1cN)取代的修饰的脂质A结构。

[0015] 具体地,本发明所使用的OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢或其组合处理。更具体地,本发明所使用的OMV未通过用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢或其组合处理来化学解毒。

[0016] 合适的无细胞百日咳抗原包括解毒的百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)、百日咳杆菌粘附素(PRN)、菌毛蛋白2(FIM2)、菌毛蛋白3(FIM3)及其组合。在某些实施方案中,所述无细胞百日咳抗原包含至少两种、例如至少三种抗原,所述抗原选自解毒的百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)、百日咳杆菌粘附素(PRN)、菌毛蛋白2(FIM2)、菌毛蛋白3(FIM3)。用于本发明中的无细胞百日咳抗原的特定组合包括:(1) PT、FHA和PRN;(2) PT、FHA、PRN、FIM2和FIM3;(3) PT和FHA和(4) PT、FHA、FIM2和FIM3。

[0017] 具体地,所述免疫原性组合物是疫苗。更具体地,所述疫苗用于施用于人。所述疫苗可以用于初次免疫。又更具体地,所述疫苗用作加强剂,例如,在二次免疫中。仍又更具体地,所述白喉类毒素以约4 Lf/ml至约8 Lf/ml的浓度存在。更具体地,所述白喉类毒素以每0.5 ml剂量约2Lf、每0.5 ml剂量约2.5 Lf、每0.5 ml剂量约3 Lf、每0.5 ml剂量约3.5 Lf或每0.5 ml剂量约4 Lf的浓度存在。所述破伤风类毒素可以以每0.5 ml剂量约5 Lf的浓度存在。

[0018] 具体地,所述破伤风类毒素和白喉类毒素以1.5:1至2.5:1(以Lf单位测量)、例如约2:1(以Lf单位测量)的破伤风类毒素:白喉类毒素比率存在。

[0019] 所述免疫原性组合物可以包含佐剂,特别是铝盐佐剂。

[0020] 在本发明的第二个方面,提供了用于在患者中产生免疫应答的方法中使用的免疫原性组合物,所述方法包括向所述患者施用根据本发明的免疫原性组合物的步骤。

[0021] 在本发明的第三个方面,提供了用于制备根据本发明的免疫原性组合物的方法,

其包括混合包含外膜囊泡 (OMV) 的第一组分和包含无细胞百日咳抗原、破伤风类毒素和白喉类毒素的第二组分。在本发明的第三个方面的某些实施方案中,将所述第一组分中的OMV冻干,并且所述第二组分包含水性形式的抗原。因此,所述方法可以进一步包括用所述第二组分的水性抗原重构所述第一组分中的冻干的OMV的步骤。

[0022] 在本发明的第四个方面,提供了用于制备根据本发明的免疫原性组合物的试剂盒,其含有包含所述OMV的第一组分和包含无细胞百日咳抗原、破伤风类毒素和白喉类毒素的第二组分,其中所述两种组分在分开的容器中。在本发明的第四个方面的某些实施方案中,将所述第一组分中的OMV冻干,并且所述第二组分包含水性形式的抗原。

[0023] 附图简述

[0024] 图1:W28 9K/129G $\Delta arnT$ 与W28 9K/129G疫苗菌株相比的体外反应原性。图1(a)来自用WTL 9K/129G (Bp WT)和W28 9K/129G *arnTKO* (Bp $\Delta arnT$)活化hTLR4的萤光素酶报告基因测定的结果。使用不同浓度的细菌刺激HEK293细胞,报告与PBS相比的诱导倍数。图1(b):用不同浓度的细菌刺激后,人PBMC上清液中的IL-6检测的ELISA。

[0025] 图2:从疫苗菌株制备的OMV含有FHA、69K和PT无细胞百日咳抗原。与1 μ g来自W28 PT 9K/129G (WT)和W28 PT 9K/129G *arnTKO* ($\Delta arnT$)菌株的OMV一起以所示量加载的纯化的FHA、69K和PT无细胞百日咳抗原亚基的滴定标准品的Western印迹,其用抗FHA;抗69K和抗PT抗血清免疫染色。

[0026] 图3:用OMV免疫导致小鼠中的低水平的抗aP抗原抗体。小鼠用2.5 μ g来自W28 PT 9K/129G (Bp-OMV (WT))和W28 PT 9K/129G *arnTKO* (BP-OMV ($\Delta ArnT$))的OMV腹膜内免疫3次,分开3周。尽管在第1次免疫后仅可以检测到抗69K抗体,但在第二剂量和第三剂量后通过Luminex测定法可检测到低水平的所有3种抗原(FHA、69K和PT)。图3(a):抗FHA IgG滴度;图3(b):抗69K IgG滴度;图3(c):抗PT IgG滴度。

[0027] 图4:与单独的Tdap相比,用Tdap与OMV的组合免疫导致显著更高水平的针对大多数疫苗抗原的抗体

[0028] 小鼠用Tdap (1/5人剂量)在有或没有2.5 mg来自W28 PT 9K/129G *arnTKO*菌株的OMV的组合的情况下肌肉内免疫,并且在两次免疫后收集血清并通过Luminex测定法分析以测量针对每种Tdap抗原的抗体水平。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0029] 图5:与wP疫苗类似,OMV引发在体外抑制百日咳博德特氏菌粘附上皮细胞的抗体。将来自OMV(来自W28 9K/129G *arnTKO*)、全细菌(来自W28 9K/129G *arnTKO*)、Tdap疫苗或作为对照的氢氧化铝(nil)免疫的每组10只小鼠的血清合并,在感染培养基中系列稀释并与标记的野生型百日咳博德特氏菌BP536孵育1 h。然后用细菌/血清混合物感染A549细胞1 h,并且在大量洗涤以除去未结合的细菌后,通过在Ex/Em 485/535 nm处的荧光读数来定量细胞缔合的细菌。结果代表各自一式三份进行的三次独立实验的一次代表的平均值 \pm S.D.。

[0030] 图6:OMV引发类似于wP疫苗标准品的针对Kendrick测试中的百日咳博德特氏菌的颅内攻击的有效保护性应答。小鼠用全细胞疫苗或OMV制剂腹膜内免疫一次,并在免疫后2周用颅内施用的百日咳博德特氏菌菌株18323的悬浮液攻击。根据Kendrick颅内攻击功效测试,在攻击后2周报告小鼠的存活率。疫苗制剂包括1/10、1/50和1/250人剂量的wP全细胞百日咳疫苗(标准品)和指定剂量的来自W28 9K/129G菌株的OMV (OMV)。

[0031] 图7:FHA-特异性总IgG(图7(a))和IgG2c(图7(b))血清滴度与OMV疫苗剂量成正比。通过ELISA分析在攻击当天在免疫小鼠的血清中存在的FHA-特异性抗体。 $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, n.s. = 不显著。图7(c)用OMV的单次免疫促进百日咳博德特氏菌-特异性Th1/Th17应答。在超声处理的百日咳博德特氏菌(SBP, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在的情况下培养来自接种疫苗的C57BL6小鼠的脾细胞($2 \times 10^6/\text{mL}$)。72小时后,通过ELISA分析上清液中的IFN γ (TH1-指示物)、IL-13 (TH2-指示物)和IL-17 (TH17-指示物)的浓度。 $***p < 0.001$ 。

[0032] 图8:从肺清除百日咳博德特氏菌的速率与OMV疫苗剂量成正比。在攻击前3周,用PBS、wP、OMV 0.4、OMV 2或OMV 10免疫C57BL6小鼠。小鼠然后用百日咳博德特氏菌的毒性菌株(Bp338)感染,并通过在指示的时间点对系列稀释的肺匀浆进行CFU计数来评价肺中的细菌负荷。虚线指示检测限值。 $***p < 0.001$ wP vs OMV 0.4, $### p < 0.001$, $\# p < 0.05$ wP vs OMV 10, $\blacklozenge \blacklozenge \blacklozenge p < 0.001$, $\blacklozenge p < 0.05$ wP vs OMV 2。

[0033] 图9:用OMV配制的aP促进FHA-特异性血清IgG2c。通过ELISA分析在攻击当天免疫小鼠的血清中存在的FHA-特异性抗体。 $***p < 0.001$, $*p < 0.05$ 。

[0034] 图10:用wP、aP、aP+OMV和单独的OMV的免疫赋予针对百日咳博德特氏菌攻击的保护。在攻击前3周,用PBS、wP、aP、aP+OMV或单独的OMV免疫C57BL6小鼠。小鼠然后用百日咳博德特氏菌的毒性菌株(Bp338)感染,并通过在指示的时间点对系列稀释的肺匀浆进行CFU计数来评价肺中的细菌负荷。 $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ 。

[0035] 图11:向aP疫苗添加OMV驱动有利的TH1应答。在超声处理的百日咳博德特氏菌(SBP, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在的情况下培养来自接种疫苗的C57BL6小鼠的脾细胞($2 \times 10^6/\text{mL}$)。72小时后,通过ELISA分析上清液中的IFN γ 的浓度。 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。

[0036] 图12 aP+OMV加强剂促进aP引发的小鼠中的抗原特异性IFN γ 产生。

[0037] 在FHA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、PRN (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、超声处理的百日咳博德特氏菌(SBP, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或单独的培养基存在的情况下培养来自接种疫苗的C57BL6小鼠的脾细胞($2 \times 10^6/\text{mL}$)。72小时后,通过ELISA分析上清液中的IFN γ 、IL-17和IL-13的浓度。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明基于对包含源自百日咳博德特氏菌的外膜囊泡(OMV)的组合物的研究。发明人已经发现,包含OMV和抗原、诸如无细胞百日咳抗原两者的免疫原性组合物能够诱导的免疫应答大于用单独的OMV或单独的无细胞百日咳抗原免疫后看到的免疫应答。此外,OMV还提高对其他非博德特氏菌抗原(诸如破伤风类毒素和白喉类毒素)的免疫应答。术语“源自”的使用将OMV的来源称为源自百日咳博德特氏菌,即OMV由其产生或来源的细菌菌株。因此,本发明提供了免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌OMV, (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0040] 术语“免疫原性组合物”广泛地指可以施用以引发针对组合物中存在的抗原的免疫应答、诸如抗体或细胞免疫应答的任何组合物。因此,本发明的组合物是免疫原性的。当免疫原性组合物预防、改善、减轻或消除受试者的疾病时,则此类组合物可以称为疫苗。根据本发明的疫苗优选为预防性的(即预防感染)。预防性疫苗并不保证完全保护免于疾病,因为即使患者产生抗体,在免疫系统能够击退感染之前可能存在滞后或延迟。因此,且为了避免疑问,术语预防性疫苗也可以指例如通过降低这种感染的严重程度或持续时间来改善

未来感染的效果的疫苗。术语“针对感染的保护”和/或“提供保护性免疫”意指已经引发(例如通过接种疫苗)受试者的免疫系统以触发免疫应答并排斥感染。具体地,触发的免疫应答能够针对许多病原体、诸如不同细菌菌株排斥感染。因此,接种疫苗的受试者可以被感染,但是能够比对照受试者更好地排斥感染。

[0041] OMV

[0042] OMV是本领域中众所周知的,并被细菌自发释放至培养基中。OMV含有培养细菌的细菌外膜的组分,诸如蛋白和脂质组分。‘天然OMV’(‘nOMV’ [2])和去垢剂提取的OMV(dOMV)都形成本发明的一部分,并且在本文中统称为OMV。术语“膜抗原的通用模块”也可以用于指获得自突变细菌的OMV。在本发明的一些实施方案中,所述OMV是天然OMV。

[0043] OMV可以获得自百日咳博德特氏菌的培养物。OMV从培养细菌的外膜制备。可以通过破坏细菌的外膜或从细菌的外膜自然‘起泡’以由其形成囊泡来获得囊泡。

[0044] 它们可以获得自在液体培养基或固体培养基中生长的细菌,例如,通过从培养基分离细菌细胞(例如,通过过滤或通过低速离心以使细胞沉淀),裂解细胞(不用去垢剂),以及将外膜级分与细胞质分子分离(例如,通过过滤,通过外膜和/或OMV的差异沉淀或聚集,通过使用特异性识别外膜分子的配体的亲和分离方法,或通过沉淀外膜和/或OMV的高速离心)。

[0045] OMV也可以从百日咳博德特氏菌人工制备,例如使用去垢剂处理(例如用脱氧胆酸盐或酰肌氨酸(sarkosyl))或通过非去垢剂方式(例如参见参考文献3)制备。用于人工形成OMV的技术包括:用胆汁酸盐去垢剂(例如,石胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、熊胆酸等的盐,与脱氧胆酸钠[4和5])在不沉淀去垢剂的足够高pH下[6]处理细菌。其他技术基本上可以在去垢剂不存在的情况下[3]使用技术诸如超声处理、均质化、微流化、空化、渗透压休克、研磨、弗氏压碎器压碎(French press)、混合等来进行。

[0046] 用于OMV制备的一种有用方法描述于参考文献7中,并且涉及粗制OMV的超滤,而非代替高速离心。该方法可以涉及在超滤进行之后的超离心的步骤。

[0047] 本发明中使用的OMV的制备物通常将基本上不含全细菌,无论是活的还是死的。囊泡的大小意指它们可以容易地通过过滤从全细菌分离,例如如通常用于过滤除菌。

[0048] 当施用于哺乳动物时,OMV能够引发针对百日咳博德特氏菌的免疫应答。所述免疫应答可以是细胞或体液免疫应答。具体地,所述免疫应答是抗体应答。又更具体地,所述免疫应答是可以中和百日咳博德特氏菌的感染和/或毒力的T-细胞免疫应答。由OMV引发的免疫应答可以指向或针对OMV存在中的一种或多种百日咳博德特氏菌蛋白抗原。

[0049] 尽管是分泌的毒素,但百日咳毒素存在于OMV中,例如源自周质空间。作为结果,本领域中使用的OMV已经用化学试剂、诸如福尔马林处理以化学解毒任何PT。除了除去残留福尔马林的问题以外,化学处理还可以负面影响OMV的免疫原性,例如通过蛋白交联。

[0050] 因此,使用源自表达基因解毒的百日咳类毒素的百日咳博德特氏菌菌株的OMV是有利的,并且在本领域中没有提出。特别有利的是源自表达基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株的OMV。具体地,为了用于本发明中,发明人已经从百日咳博德特氏菌菌株分离OMV,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。因此,通过用化学品、诸如甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢及其组合处理来对OMV进行化学解毒不是必需的。具体地,

本发明的OMV未化学解毒,更具体地,本发明的OMV未化学解毒和/或用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢及其组合处理。

[0051] 使用其中已经敲除或缺失ArnT基因的百日咳博德特氏菌菌株也是有利的。源自此类菌株的OMV包含脂质A,所述脂质A具有在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代的修饰结构。作为结果,与源自具有功能性ArnT基因的菌株的OMV相比,这些OMV表现出降低的TLR4活化水平。

[0052] 本发明的免疫原性组合物包含OMV组分(a)和无细胞百日咳抗原组分(b)两者。外膜囊泡组分(a)包含与膜缔合或在OMV内含有的许多蛋白,包括例如少量的PT、FHA或百日咳杆菌粘附素。然而,这些OMV缔合的组分不应被解释为如下所述的无细胞百日咳抗原组分(b),其通常将以纯化形式与OMV分开提供,例如,作为分离的重组蛋白抗原。

[0053] 在本发明的一些实施方案中,从本发明排除包含源自百日咳博德特氏菌的OMV的组合物。

[0054] 白喉类毒素

[0055] 白喉由白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*) (一种革兰氏阳性非形成孢子的需氧细菌)引起。该生物体表达原噬菌体编码的ADP-核糖基化外毒素(“白喉毒素”),其可以进行处理(例如使用甲醛)以得到类毒素,所述类毒素不再有毒性但保留抗原性,且能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献8的第13章中更详细地公开了白喉类毒素。优选的白喉类毒素是通过甲醛处理制备的那些。通过使白喉棒状杆菌(*C. diphtheriae*) 在可补充有牛提取物的生长培养基(例如Fenton培养基,或Linggoud & Fenton培养基)中生长,随后进行甲醛处理、超滤和沉淀,可获得白喉类毒素。然后可通过包括无菌过滤和/或透析的方法来处理所述类毒素化的材料。

[0056] 白喉类毒素的数量可以国际单位(IU)表示。例如,NIBSC [9]提供了‘Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999’ [10,11],其每安瓿含有160 IU。作为IU系统的替代方案,‘Lf’单位(“絮凝单位”,“边界絮凝剂量”或“絮凝限值”)被定义为当与一个国际单位的抗毒素混合时,产生最优絮凝混合物的类毒素的量[12]。例如,NIBSC提供了‘Diphtheria Toxoid, Plain’ [13],其每安瓿含有300 lf; ‘The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test’ [14],其每安瓿含有900 Lf。IU和Lf系统之间的转换取决于特定的类毒素制备物。

[0057] 在白喉棒状杆菌的培养物中使用牛材料的情况下,它们应当获得自无牛海绵状脑病(BSE)或其他可传播的海绵状脑病(TSE)的来源。

[0058] 本发明的免疫原性组合物中的白喉类毒素通常以在施用时能够引发免疫应答的量存在。理想地,白喉类毒素可以引发保护性免疫应答。本发明的免疫原性组合物中白喉类毒素的量通常为1-50 Lf/剂量。用于青少年和成人的加强疫苗通常含有4 Lf/ml至8 Lf/ml的白喉类毒素,例如每0.5 ml剂量2.5 Lf,优选4 Lf。小儿疫苗通常含有20至50 Lf/ml的白喉类毒素,例如每0.5 ml剂量10 Lf或25 Lf。

[0059] 对于小儿组合疫苗,白喉类毒素与破伤风类毒素的比率通常大于1(即小儿疫苗通常具有过量的白喉类毒素),且通常为2:1至3:1(以Lf单位测量),例如2.5:1。相反,对于向青少年或成人(其通常已接受至少一种包含白喉类毒素和破伤风类毒素的小儿组合疫苗)的加强疫苗,破伤风类毒素与白喉类毒素的比率通常大于1(即加强疫苗通常具有过量的破

伤风类毒素),且通常为1.5:1至2.5:1,例如2:1。所述白喉类毒素通常是未缀合的。

[0060] 白喉类毒素的总量可以等同于1-50 Lf/剂量,例如,在加强疫苗中浓度为4 Lf/ml至8 Lf/ml,例如每0.5ml剂量2.5 Lf或每0.5ml剂量4 Lf;在小儿疫苗中浓度为20至50 Lf/ml,例如每0.5ml剂量10 Lf或每0.5ml剂量25 Lf。在其中不存在化学解毒的白喉类毒素的具体实施方案中,存在的基因解毒的白喉类毒素、特别是CRM197的量可以等同于1-50Lf/剂量,例如在加强疫苗中浓度为4 Lf/ml至8 Lf/ml,例如每0.5ml剂量为2.5 Lf或每0.5ml剂量4 Lf,并且在小儿疫苗中浓度为20至50 Lf/ml,例如每0.5ml剂量10 Lf或每0.5ml剂量25 Lf。

[0061] 所述白喉类毒素可以被吸附至氢氧化铝佐剂上。

[0062] 通常,包含白喉类毒素抗原的免疫原性组合物基本上不含任何水银防腐剂。

[0063] 破伤风类毒素

[0064] 破伤风由破伤风梭状芽孢杆菌(*Clostridium tetani*) (一种革兰氏阳性芽孢形成杆菌)引起。该生物体表达内肽酶(“破伤风毒素”),其可以进行处理以得到类毒素,所述类毒素不再具有毒性但保留抗原性,并且能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献1的第27章中更详细地公开了破伤风类毒素。优选的破伤风类毒素是通过甲醛处理制备的那些。通过使破伤风梭状芽孢杆菌(*C. tetani*)在生长培养基(例如衍生自牛酪蛋白的Latham培养基)中生长,随后进行甲醛处理、超滤和沉淀,可以获得破伤风类毒素。然后通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理该材料。

[0065] 破伤风类毒素的数量可以国际单位(IU)表示。例如,NIBSC [15]提供了‘Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000’ [16,17],其每安瓿含有469 IU。作为IU系统的替代方案,‘Lf’单位被定义为类毒素的量,当与一个国际单位的抗毒素混合时,其产生最佳絮凝混合物[18]。例如,NIBSC提供了‘The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test’ [19],其每安瓿含有1000 LF。IU和Lf系统之间的转换取决于特定的类毒素制备物。

[0066] 在破伤风梭状芽孢杆菌的培养物中使用牛材料的情况下,它们应当获得自无牛海绵状脑病(BSE)或其他可传播的海绵状脑病(TSE)的来源。

[0067] 本发明的免疫原性组合物中的破伤风类毒素通常以在施用时能够引发免疫应答的量存在。理想地,破伤风类毒素可以引发保护性免疫应答。本发明的免疫原性组合物中破伤风类毒素的量通常为1-20 Lf/剂量。用于青少年和成人的加强疫苗通常含有每0.5 ml剂量5 Lf的破伤风类毒素。小儿疫苗通常含有每0.5 ml剂量5至10 Lf的破伤风类毒素。

[0068] 对于本领域技术人员将显而易见的是,在一些实施方案中,破伤风类毒素可以以游离的(未缀合的)和缀合的形式存在或主要以缀合形式存在,也就是说大于80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%的破伤风类毒素以缀合形式存在。因此,本发明的免疫原性组合物中的破伤风类毒素的量可以指单独的未缀合的破伤风类毒素,单独的缀合的破伤风类毒素或未缀合的和缀合的破伤风类毒素的总和。然而,优选地,所述破伤风类毒素是游离的,未缀合的。在优选实施方案中,本发明的免疫原性组合物中的破伤风类毒素的量是指单独的未缀合的破伤风类毒素。

[0069] 所述破伤风类毒素可以吸附至氢氧化铝佐剂上,但这不是必需的(例如,可以使用总破伤风类毒素的0-10%的吸附)。

[0070] 通常,包含破伤风类毒素的免疫原性组合物基本上不含任何水银防腐剂。

[0071] 无细胞百日咳抗原

[0072] 百日咳博德特氏菌是一种革兰氏阴性非形成孢子的需氧细菌,其引起百日咳。如参考文献1的第21章中更详细描述,针对百日咳博德特氏菌的疫苗已经可得多年,并且分为两类:细胞(wP)和非细胞(aP)。细胞疫苗包含已被杀死并灭活(例如通过用福尔马林和/或热处理)的百日咳博德特氏菌全细胞,而无细胞疫苗包含特定纯化的百日咳博德特氏菌抗原,其从天然细菌纯化或在重组宿主中表达后纯化。

[0073] 本发明可以在单一疫苗中使用多于一种无细胞百日咳(aP)抗原,例如以下众所周知且充分表征的百日咳博德特氏菌抗原中的至少两种或至少三种:(1)解毒的百日咳毒素(百日咳类毒素或‘PT’);(2)丝状血凝素(‘FHA’);(3)百日咳杆菌粘附素(‘PRN’,也称为‘69千道尔顿外膜蛋白’或‘69K’)。最优选的是,应当使用这些抗原中的所有三种。这三种抗原优选通过从例如在改良的Stainer-Scholte液体培养基中生长的百日咳博德特氏菌培养物分离而制备,并且可以从发酵液体培养基分离PT和FHA(例如通过吸附在羟基磷灰石凝胶上),而可以通过热处理和絮凝(例如使用氯化钡)从细胞提取百日咳杆菌粘附素。可以在连续的色谱和/或沉淀步骤中纯化抗原。PT和FHA可以通过疏水色谱、亲和色谱和大小排阻色谱纯化。百日咳杆菌粘附素可以通过离子交换色谱、疏水色谱和大小排阻色谱进行纯化。用于纯化PT、FHA和百日咳杆菌粘附素的方法是本领域中已知的。

[0074] FHA和百日咳杆菌粘附素可以在根据本发明使用之前用甲醛处理。PT可以通过用甲醛和/或戊二醛处理来解毒。作为该化学解毒程序的替代方案,在优选的实施方案中,PT可以是突变的PT,其中酶促活性已经通过诱变[20]降低[例如9K/129G双重突变体]。当包括基因解毒的PT时,可以使用减少的量。例如,组合物中的基因解毒的百日咳类毒素的浓度可以为 $\leq 5 \mu\text{g/ml}$,例如 <4 、 <3 、 <2.5 、 <2 、 $<1 \mu\text{g/ml}$ 等。因此,在典型的0.5ml单位剂量体积中,基因解毒的百日咳类毒素的量小于 $2.5 \mu\text{g}$,例如 <2 、 <1.5 、 <1 、 $<0.5 \mu\text{g}$,例如,约 $0.5\mu\text{g}$ 至约 $2.5\mu\text{g}$ 。

[0075] 可以使用的另外的无细胞百日咳抗原包括菌毛蛋白(fimbriae)(例如凝集原2和3,也称为FIM2和FIM3)。

[0076] aP抗原可以以未吸附状态使用,但优选在使用前将它们吸附至一种或多种铝盐佐剂上。aP抗原优选被吸附至氢氧化铝佐剂上。

[0077] 通常,包含aP抗原的免疫原性组合物基本上不含水银防腐剂(例如硫柳汞)。

[0078] 无细胞百日咳抗原通常以在施用时能够引发免疫应答的量存在于本发明的免疫原性组合物中。理想地,所述无细胞百日咳抗原可以引发保护性免疫应答。无细胞百日咳抗原的数量通常以微克表示。疫苗中PT的浓度通常为5至 $50\mu\text{g/ml}$ 。典型的PT浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $16\mu\text{g/ml}$ 、 $20\mu\text{g/ml}$ 或 $50\mu\text{g/ml}$ 。疫苗中FHA的浓度通常为10至 $50\mu\text{g/ml}$ 。典型的FHA浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $16\mu\text{g/ml}$ 或 $50\mu\text{g/ml}$ 。疫苗中百日咳杆菌粘附素的浓度通常为5至 $16\mu\text{g/ml}$ 。典型的百日咳杆菌粘附素浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $6\mu\text{g/ml}$ 或 $16\mu\text{g/ml}$ 。例如,用于青少年和成人的加强疫苗通常每0.5 ml剂量含有2.5至 $8 \mu\text{g}$ PT,4至 $8 \mu\text{g}$ FHA(例如,4至 $8 \mu\text{g}$ FHA)和2.5至 $8 \mu\text{g}$ 百日咳杆菌粘附素(例如,2.5至 $8 \mu\text{g}$ 百日咳杆菌粘附素)。通常,加强疫苗每0.5ml剂量包含 $4 \mu\text{g}$ PT、 $4 \mu\text{g}$ FHA和 $8 \mu\text{g}$ 百日咳杆菌粘附素,更优选 $5 \mu\text{g}$ PT、 $2.5 \mu\text{g}$ FHA和 $2.5 \mu\text{g}$ 百日咳杆菌粘附素。小儿疫苗通常每0.5 ml剂量包含 $7 \mu\text{g}$ PT、 $10 \mu\text{g}$ FHA和 $10 \mu\text{g}$ 百日咳杆菌粘附素。

[0079] 在水性组分包括PT、FHA和百日咳杆菌粘附素中的每一种时,它们的重量比可以不同,但可以是例如约16:16:5,约5:10:6,约20:20:3,约25:25:8,或约10:5:3 (PT:FHA:PRN)。

[0080] 本发明的具体免疫原性组合物

[0081] 本发明的具体设想的免疫原性组合物包含:

[0082] · (i) 百日咳博德特氏菌OMV, (ii) 白喉类毒素, (iii) 破伤风类毒素, (iv) 无细胞百日咳抗原。

[0083] · (i) 百日咳博德特氏菌OMV, (ii) 白喉类毒素, (iii) 破伤风类毒素, (iv) 解毒的百日咳毒素, (v) 丝状血凝素和(vi) 百日咳杆菌粘附素。

[0084] · (i) 百日咳博德特氏菌OMV, (ii) 白喉类毒素, (iii) 破伤风类毒素, (iv) 基因解毒的百日咳毒素, (v) 丝状血凝素和(vi) 百日咳杆菌粘附素。

[0085] · (i) 百日咳博德特氏菌OMV, (ii) 白喉类毒素, (iii) 破伤风类毒素, (iv) 解毒的百日咳毒素, (v) 丝状血凝素, (vi) 百日咳杆菌粘附素, (vii) 来自脊髓灰质炎病毒1型毒株的抗原, (viii) 来自脊髓灰质炎病毒2型毒株的抗原, 和(ix) 来自脊髓灰质炎病毒3型毒株的抗原。

[0086] 本发明的免疫原性组合物引发增强的TH1和增强的TH2应答, 即, IgG1和IgG2a产生均增加。更具体地, 相对于用单独的OMV或单独的TdaP免疫, 所述组合物引发增加的TH1免疫应答和/或增加的TH2免疫应答。

[0087] 制药方法和用途

[0088] 本发明的免疫原性组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。典型的‘药学上可接受的载体’包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体通常是大的缓慢代谢的大分子、诸如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖[21]、海藻糖[22]、乳糖和脂质聚集体(诸如油小滴或脂质体)。此类载体是本领域普通技术人员众所周知的。疫苗也可以含有稀释剂, 诸如水、盐水、甘油等。另外, 可以存在辅助物质, 诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。无菌无热原的磷酸盐缓冲生理盐水是典型的载体。药学上可接受的赋形剂的详细讨论可在参考文献23中获得。

[0089] 本发明的组合物可以是水性形式(即溶液或悬浮液)或干燥形式(例如冻干的)。如果使用干燥疫苗, 则在注射之前将其重构为液体介质。疫苗的冻干是本领域中已知的, 例如Menjugate™产品以冻干形式呈现。当本发明的免疫原性组合物包括冻干组分时, 通常分开制备该组分, 混合且然后冻干。为了在冻干期间稳定抗原, 可以在冷冻干燥之前添加非活性组分, 例如作为稳定剂。用于包括的优选稳定剂是乳糖、蔗糖和甘露醇, 以及其混合物, 例如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。通过冻干材料的水性重构获得的最终疫苗因此可以含有乳糖和/或蔗糖。优选当制备冻干疫苗时使用无定形的赋形剂和/或无定形的缓冲剂[24]。

[0090] 可以优选在组合物中包括例如1mg/ml至30mg/ml(例如约25 mg/ml)的糖醇(例如甘露醇)和/或二糖(例如蔗糖或海藻糖)。

[0091] 组合物可以在小瓶中呈现, 或者它们可以在填充好的注射器中呈现。注射器可以带有或不带有针头而提供。注射器将包括单一剂量的组合物, 而小瓶可以包括单一剂量或多剂量。

[0092] 本发明的组合物优选以0.5ml单位剂量施用于患者。提及0.5ml剂量将被理解为包括正常差异,例如 $0.5\text{ml} \pm 0.05\text{ml}$ 。对于多剂量情况,将提取多个剂量的量,并且一起包装在单个容器中,例如对于10剂量多剂量容器的5ml (或5.5ml, 10%过度填充)。

[0093] 本发明的水性组合物也适用于从冻干形式重构其他疫苗。在本发明的组合物用于这种即时重构的情况下,本发明提供了试剂盒,其可以包含两个小瓶,或者可以包含一个填充好的注射器和一个小瓶,其中注射器的内容物用于在注射前重新活化小瓶的内容物。

[0094] 疫苗也可以以以下形式制备,其中疫苗可以在使用的时间/点通过将两种组分混合在一起而即时制备。此类两组分实施方案包括液体/液体混合和液体/固体混合,例如通过混合水性材料与冻干的材料。

[0095] 因此,可用于本发明的试剂盒含有包含OMV组分的第一组分和包含(a)无细胞百日咳抗原、(b)破伤风类毒素、(c)白喉类毒素的第二组分;其中所述两种组分在分开的容器(例如小瓶和/或注射器)中。所述第一组分中的OMV组分是冻干的。在一些实施方案中,所述第一组分不包含佐剂。所述第二组分可以包含水性抗原。在一些实施方案中,所述第二组分包含佐剂,例如铝盐佐剂。

[0096] 本发明还提供了用于制备本发明的免疫原性组合物的方法,其包括混合包含所述OMV的第一组分和包含(a)无细胞百日咳抗原、(b)破伤风类毒素和(c)白喉类毒素的第二组分。所述第一组分中的OMV可以是冻干的。所述第二组分可以包含水性抗原。所述方法可以包括用所述第二组分的水性抗原重构所述第一组分中的冻干的OMV的进一步步骤。所述第一组分可以不包含佐剂。所述第二组分可以包含佐剂,例如铝盐佐剂。

[0097] 本发明的组合物可以以单位剂量形式或多剂量形式包装。对于多剂量形式,小瓶优于预填充注射器。可以常规建立有效的剂量体积,但组合物的典型人剂量具有0.5ml的体积例如用于肌肉内注射。

[0098] 组合物的pH优选为6至8,优选约7。可以通过使用缓冲液维持稳定的pH。施用于患者的水性组合物可具有5.0至7.5的pH,且更通常针对最佳稳定性为5.0至6.0;在存在白喉类毒素和/或破伤风类毒素的情况下,pH理想地为6.0至7.0。

[0099] 本发明的免疫原性组合物通常包含磷酸二氢钾缓冲液。磷酸二氢钾缓冲液可包含约1-10mM磷酸二氢钾,例如1.25 mM、2.5 mM或5.0 mM。如果组合物包含氢氧化铝盐,则优选使用组氨酸缓冲液[25]。该组合物可以是无菌的和/或无热原的。本发明的组合物就人而言可以是等渗的。

[0100] 本发明的组合物是免疫原性的,且更优选为疫苗组合物。根据本发明的疫苗可以是预防性的(即预防感染)或治疗性的(即治疗感染),但将通常是预防性的。预防性疫苗并不保证完全保护免于疾病,因为即使患者产生抗体,在免疫系统能够击退感染之前可能存在滞后或延迟。因此,且为了避免疑问,术语预防性疫苗也可以指例如通过降低这种感染的严重程度或持续时间来改善未来感染的效果的疫苗。

[0101] 术语“针对感染的保护”和/或“提供保护性免疫”意指已经引发(例如通过接种疫苗)受试者的免疫系统以触发免疫应答并排斥感染。具体地,触发的免疫应答能够针对许多病原体、诸如不同细菌菌株排斥感染。因此,接种疫苗的受试者可以被感染,但是能够比对照受试者更好地排斥感染。用作疫苗的免疫原性组合物根据需要包含免疫有效量的抗原以及任何其他组分。‘免疫有效量’意指以单一剂量或作为一系列剂量的部分向个体施用该量

对于治疗或预防是有效的。通常,期望的结果是产生能够或有助于针对病原体保护受试者的抗原(例如,病原体)-特异性免疫应答。该量取决于待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的年龄、分类组(例如非人灵长类动物、灵长类动物等)、个体的免疫系统合成抗体的能力、期望的保护程度、疫苗制剂、治疗医生对医学情况的评价和其他相关因素而不同。预期所述量将落入可通过常规试验确定的相对宽范围内。

[0102] 可将本发明的组合物以各种形式制备。例如,可将所述组合物制备为可注射剂,作为液体溶液或悬浮液。可以将所述组合物制备用于使用细粉或喷雾进行肺部施用,例如作为吸入剂。可以将所述组合物制备为栓剂或子宫托。可以将所述组合物制备用于经鼻、经耳或经眼施用,例如作为喷雾剂、滴剂、凝胶或粉末[例如参考文献26和27]。已报道了肺炎球菌糖[28,29]、Hib糖[30]、MenC糖[31]以及Hib和MenC糖缀合物的混合物[32]的经鼻施用的成功。

[0103] 本发明的组合物可以包括抗微生物剂,特别是当以多剂量形式包装时。

[0104] 本发明的组合物可以包含去垢剂例如Tween(聚山梨酸酯),诸如Tween 80。去垢剂通常以低水平例如<0.01%存在。

[0105] 本发明的组合物可以包括钠盐(例如氯化钠)以提供张力。 10 ± 2 mg/ml NaCl的浓度是典型的。在一些实施方案中,可使用4-10 mg/ml NaCl的浓度,例如,9.0、7.0、6.75或4.5 mg/ml。

[0106] 组合物将通常具有200 mOsm/kg至400 mOsm/kg,优选240-360 mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度(osmolality),且更优选落在280-320 mOsm/kg的范围内。先前已经报道重量摩尔渗透压浓度对由接种疫苗引起的疼痛不具有影响[33],但尽管如此将重量摩尔渗透压浓度保持在该范围内是优选的。

[0107] 本发明的组合物通常将包括缓冲液。磷酸盐缓冲液是典型的。

[0108] 本发明的组合物可以与其他免疫调节剂结合施用。具体地,组合物可以包括一种或多种佐剂。此类佐剂包括但不限于含有矿物质的组合物。

[0109] 适用作本发明中的佐剂的含有矿物质的组合物包括矿物盐,诸如铝盐和钙盐(或其混合物)。钙盐包括磷酸钙(例如参考文献34中公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等,其中所述盐采用任何合适形式(例如凝胶、结晶、无定形等)。优选吸附至这些盐。也可将含有矿物质的组合物配制为金属盐的颗粒[35]。

[0110] 可使用已知为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规的,但仅出于方便使用,因为其均不是存在的实际化学化合物的准确描述(例如参见参考文献36的第9章)。本发明可使用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。称为“氢氧化铝”的佐剂通常是羟基氧化铝盐(aluminum oxyhydroxide salts)(通常至少部分为晶体)。已知为“磷酸铝”的佐剂通常是羟基磷酸铝,经常还含有少量硫酸盐(即硫酸羟基磷酸铝)。它们可通过沉淀获得,并且沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中的羟基的程度。

[0111] 纤维形态(例如,如透射电子显微图中所见)对于氢氧化铝佐剂是典型的。氢氧化铝佐剂的pI通常为约11,即在生理pH下佐剂本身具有表面正电荷。对于氢氧化铝佐剂已经报道在pH7.4具有1.8-2.6 mg蛋白/mg Al^{+++} 的吸附容量。

[0112] 磷酸铝佐剂的 $PO_4/A1$ 摩尔比通常为0.3至1.2,优选0.8至1.2,并且更优选 0.95 ± 0.1 。磷酸铝将通常是无定形的,尤其对于羟基磷酸盐。典型的佐剂是 $PO_4/A1$ 摩尔比为0.84

至0.92(在0.6mg Al³⁺/ml包括)的无定形羟基磷酸铝。磷酸铝将通常是颗粒(例如,如透射电子显微图中所见的板状形态)。在任何抗原吸附后,颗粒的典型直径在范围0.5-20 μ m(例如约5-10 μ m)内。对于磷酸铝佐剂已经报道在pH7.4 具有0.7-1.5 mg蛋白/mg Al⁺⁺⁺的吸附容量。

[0113] 磷酸铝的零电荷点(PZC)与磷酸根对羟基的取代程度负相关,并且这种取代程度可取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度而不同。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根=更酸性PZC)或通过添加缓冲剂诸如组氨酸缓冲剂(使PZC碱性更强)来改变PZC。根据本发明使用的磷酸铝将通常具有4.0至7.0,更优选5.0至6.5,例如约5.7的PZC。

[0114] 用于制备本发明的组合物的铝盐悬浮液可含有缓冲剂(例如,磷酸盐或组氨酸或Tris缓冲剂),但这不总是必要的。所述悬浮液优选无菌且无热原的。悬浮液可包括游离的水性磷酸根离子,例如以1.0至20mM、优选5至15 mM、且更优选约10 mM的浓度存在。所述悬浮液还可以包含氯化钠。

[0115] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝两者的混合物。在这种情况下,可以存在比氢氧化铝更多的磷酸铝,例如重量比为至少2:1,例如, $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ 等。

[0116] 用于施用于患者的组合物中的Al⁺⁺⁺的浓度优选小于10mg/ml,例如 ≤ 5 mg/ml、 ≤ 4 mg/ml、 ≤ 3 mg/ml、 ≤ 2 mg/ml、 ≤ 1 mg/ml等。优选的范围是0.3-1mg/ml。优选0.85mg/剂量的最大值。

[0117] 典型的佐剂磷酸铝佐剂是PO₄/Al摩尔比为0.84至0.92(在0.6mg Al³⁺/ml包括)的无定形羟基磷酸铝。例如,可以使用以低剂量(例如每剂50至100 μ g Al³⁺)的磷酸铝吸附。

[0118] 使用铝盐佐剂是特别优选的,并且抗原通常吸附至此类盐。在本发明的组合物中可能将一些抗原吸附至氢氧化铝,但使其他抗原与磷酸铝缔合。然而,一般而言,优选仅使用单一盐,例如氢氧化物或磷酸盐,但不同时使用两者。并非所有抗原都需要被吸附,即一些或全部可以在溶液中游离。

[0119] 治疗方法

[0120] 本发明还提供了免疫原性组合物,其用于在哺乳动物中产生免疫应答,其包括向所述哺乳动物施用本发明的免疫原性组合物。所述免疫原性组合物优选地能够在哺乳动物中产生免疫应答。所述免疫应答优选是保护性的,并且优选涉及抗体,并且更优选为疫苗。在一些实施方案中,所述疫苗用于初次接种疫苗中。所述免疫原性组合物可以产生加强应答。本发明的组合物优选以0.5ml剂量(如上所讨论)施用于患者。

[0121] 本发明还提供了用于在哺乳动物中产生免疫应答的方法,其包括向所述哺乳动物施用本发明的免疫原性组合物。所述免疫应答优选是保护性的,并且优选涉及抗体。所述方法可以产生加强应答。本发明的组合物优选以0.5ml剂量(如上所讨论)施用于患者。

[0122] 所述哺乳动物优选是人。在所述疫苗用于预防性使用的情况下,所述人优选为儿童(例如幼童或婴儿,特别是新生儿)或青少年。意欲用于儿童的疫苗也可施用于成人,例如,以评价安全性、剂量、免疫原性等。用于治疗的人的优选类别是生育年龄的女性(例如,青少年及以上)。另一种优选的类别是怀孕的女性。

[0123] 在一些实施方案中,所述患者已经用白喉类毒素或其衍生物进行预免疫。在其他实施方案中,所述患者已经用破伤风类毒素或其衍生物进行预免疫。在一些实施方案中,所

述患者已经用白喉类毒素或其衍生物和破伤风类毒素或其衍生物两者进行预免疫。

[0124] 本发明还提供了本发明的组合物,其用作药物。

[0125] 本发明还提供了本发明的组合物在制备用于在哺乳动物中产生免疫应答的药物中的用途。

[0126] 这些用途和方法优选地用于预防和/或治疗由白喉棒状杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌和百日咳博德特氏菌中的一种或多种引起的疾病。白喉棒状杆菌可以引起白喉病;破伤风梭状芽孢杆菌可以引起破伤风;百日咳博德特氏菌可以引起百日咳。

[0127] 其中预防疾病的受试者可以与接受本发明的免疫原性组合物的受试者不同。例如,可以将免疫原性组合物(在怀孕之前或期间)施用于女性以保护后代(所谓的‘母体免疫’ [37-39])。怀孕女性的免疫通过被动的母体免疫为婴儿提供抗体介导的免疫。当母体抗体通过胎盘转移至胎儿时,被动免疫自然发生。被动免疫对婴儿尤其重要,因为他们没有任何主动获得的免疫的情况下出生。向怀孕女性施用本发明的组合物增强女性中的免疫,并且抗体通过胎盘传递给新生儿,对婴儿赋予被动的母体免疫。然而,婴儿中的被动免疫仅仅是暂时的,并且在生命的最初几周或几个月后开始降低。由于被动免疫仅仅是暂时的,因此对于婴儿,在被动免疫减弱之前接受本发明的组合物的施用以在婴儿中诱导主动免疫可能是重要的。在出生后向婴儿施用第二种免疫原性组合物在婴儿中诱导主动免疫,并延长在怀孕期间从母亲传递的免疫。

[0128] 如本文所用,婴儿是一岁以下(例如,小于一日龄、1周龄、2周龄、3周龄、4周龄、2个月龄、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月龄、9个月龄、10个月龄、11个月龄、小于12个月龄)的个体。

[0129] 可以在其怀孕期间的任何时间向怀孕的女性施用本发明的组合物。例如,可以在其怀孕的第一、第二或第三个三个月期间向所述女性施用所述组合物。在一些实施方案中,在怀孕的最后6-12周期间(例如,28周妊娠、29周妊娠、30周妊娠、31周妊娠、32周妊娠、33周妊娠、34周妊娠、35周妊娠、36周妊娠、37周妊娠、38周妊娠、39周妊娠)向所述女性施用所述组合物。具体地,在分娩婴儿之前至少四周向怀孕的女性施用本发明的组合物。在一些实施方案中,在第32周和第36周妊娠之间向怀孕的女性施用一剂方案。在其他实施方案中,向怀孕的女性施用两剂方案,其中第一剂在近似32周妊娠时施用,且第二剂在近似36周妊娠时施用。

[0130] 可以在生命的第一年以及其后(如果期望)期间的任何时间向所述婴儿施用所述组合物。通常,在生命的第一年期间将所述组合物施用于所述婴儿一次、两次、三次、四次或更多次。例如,本发明的组合物可以在选自以下的一次或多次施用于所述婴儿:在出生时,在2周龄、4周龄、6周龄、2个月龄、3个月龄、4个月龄、6个月龄、9个月龄和12个月龄。具体地,本发明的组合物在母体抗体已经降低至非保护性滴度之前的时间施用于所述婴儿。随后的施用可以按任何期望的时间表进行。

[0131] 在一个实施方案中,提供了针对由白喉棒状杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌和百日咳博德特氏菌中的一种或多种引起的疾病保护婴儿的方法,其包括以下步骤:(a)在怀有所述婴儿期间向女性施用本发明的组合物;和(b)任选地向从怀孕出生的婴儿施用本发明的组合物。

[0132] 因此,还提供了针对白喉、破伤风和百日咳中的一种或多种保护婴儿的方法,其包

括以下步骤：(a) 在怀有所述婴儿期间向女性施用本发明的组合物；和 (b) 任选地向从怀孕出生的婴儿施用本发明的组合物。

[0133] 本发明的优选组合物可以在患者中赋予抗体滴度，所述抗体滴度优于各抗原组分对于可接受百分比的人受试者的血清保护的标准。具有相关抗体滴度的抗原是众所周知的，高于所述相关抗体滴度，宿主被认为针对抗原是血清转化的，并且此类滴度由组织诸如WHO公布。优选多于80%、更优选多于90%、仍更优选多于93%且最优选96-100%的统计学显著的受试者的样品发生血清转化。

[0134] 本发明的组合物将通常直接施用于患者。直接递送可通过肠胃外注射（例如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或至组织间隙），或通过直肠、经口、阴道、局部、透皮、鼻内、经眼、经耳、经肺或其他粘膜施用完成。优选肌肉内施用至腿部或上臂。注射可以经由针头（例如皮下针头）进行，但或者可以使用无针注射。典型的肌肉内剂量为0.5 ml。

[0135] 本发明可用于引发全身和/或粘膜免疫。

[0136] 本发明的免疫原性组合物可以单剂量或多剂量施用。在本发明中优选施用单剂量。或者，在一个单位剂量之后进行进一步的一个单位剂量可能是有效的。通常，第二（或第三、第四、第五等）单位剂量与第一单位剂量相同。通常，本发明的免疫原性组合物以三个单位剂量施用。通常，本发明的免疫原性组合物将肌肉内施用，例如通过肌肉内施用至腿部或上臂。

[0137] 可以在初次免疫时间表/或加强免疫时间表中使用的多剂量。初次剂量时间表可以随后为加强剂量时间表。引发剂量之间（例如4-16周之间）以及引发和加强之间的合适时机可以常规确定。

[0138] 为了具有完全效力，典型的初始免疫时间表（特别对于儿童）可涉及施用多于一个剂量。例如，剂量可以在：0和6个月（时间0是第一剂量）；在0、1、2和6个月；在第0天、第21天，且然后在6和12个月之间的第三剂量；在2、4和6个月；在3、4和5个月；在6、10和14周；在2、3和4个月；或在0、1、2、6和12个月。小儿组合物也可以用作加强剂量，例如对于儿童，在生命的第二年中。

[0139] 组合物也可以用作加强剂量，例如对于儿童，在生命的第二年中。本发明的青少年加强疫苗组合物以单剂量施用于10岁及以上的人。可以将本发明的免疫原性组合物作为加强疫苗施用于先前已经针对白喉和破伤风且优选还针对百日咳接种疫苗的患者。通过具有针对先前疫苗的免疫记忆应答，可以将这些患者与普通群体区分开。所述患者可能在接受本发明的疫苗之前至少五年接受其最近的白喉和/或破伤风疫苗。接受所述疫苗的患者年龄可能为4至65岁，例如11-64岁，10-18岁等。

[0140] 可以使用任何合适的施用途径。例如，可以肌肉内、腹膜内、皮下、透皮或皮内施用组合物。如果期望，可以通过粘膜内途径、诸如口内、鼻内、阴道内和直肠内施用所述组合物。向怀孕女性和婴儿施用可以通过相同途径或不同途径进行。本发明的组合物可以通过肌肉内注射、例如注射至手臂或腿部进行施用。

[0141] 由本发明产生的疫苗可以与分开的疫苗同时、例如与肺炎球菌缀合物疫苗（诸如PREVNAR™）同时、与流感疫苗同时、与轮状病毒疫苗同时、与MMR疫苗同时等施用于患者。

[0142] 在本发明的组合物包括基于铝的佐剂的情况下，组分的沉降可在储存期间发生。所述组合物因此应当在向患者施用之前摇动。经摇动的组合物将是混浊的白色悬浮液。

[0143] 实施方案

[0144] 实施方案1.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌。

[0145] 实施方案2.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0146] 实施方案3.根据实施方案1或实施方案2所述的免疫原性组合物,其中所述无细胞百日咳抗原选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN)。

[0147] 实施方案4.根据实施方案3所述的免疫原性组合物,其中所述无细胞百日咳抗原包含PT、FHA和PRN。

[0148] 实施方案5.根据实施方案4所述的免疫原性组合物,其中PT、FHA和PRN以16:16:5的比率(通过重量测量)存在。

[0149] 实施方案6.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以4 Lf/ml至8 Lf/ml、例如每0.5 ml剂量4 Lf的浓度存在。

[0150] 实施方案7.根据实施方案1至6中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素以20至50 Lf/ml、例如每0.5 ml剂量25 Lf的浓度存在。

[0151] 实施方案8.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中破伤风类毒素以每0.5 ml剂量约5 Lf的浓度存在。

[0152] 实施方案9.根据实施方案1至8中任一项所述的免疫原性组合物,其中破伤风类毒素以每0.5 ml剂量5至10 Lf的浓度存在。

[0153] 实施方案10.根据实施方案1至9中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以大于1、例如2:1至3:1(以Lf单位测量)、诸如2.5:1的白喉类毒素:破伤风类毒素比率存在。

[0154] 实施方案11.根据实施方案1至9中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述白喉类毒素和破伤风类毒素以大于1、例如1.5:1至2.5:1(以Lf单位测量)、诸如2:1的破伤风类毒素:白喉类毒素比率存在。

[0155] 实施方案12.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物含有佐剂。

[0156] 实施方案13.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物含有铝盐佐剂。

[0157] 实施方案14.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是可注射液体溶液或悬浮液。

[0158] 实施方案15.根据实施方案1至14中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是冻干的。

[0159] 实施方案16.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是不含防腐剂。

[0160] 实施方案17.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是疫苗。

[0161] 实施方案18.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合

物用于施用于人。

[0162] 实施方案19.根据前述实施方案中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物用作药物。

[0163] 实施方案20.用于在患者中产生免疫应答的方法,其包括向所述患者施用根据前述实施方案中任一项所述的组合物的步骤。

[0164] 实施方案21.用于在患者中产生免疫应答的方法,其包括向所述患者施用组合物的步骤,所述组合物包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0165] 实施方案22.用于制备根据实施方案1-19中任一项所述的免疫原性组合物的方法,其包括混合包含外膜囊泡(OMV)的第一组分和包含无细胞百日咳抗原、破伤风类毒素和白喉类毒素的第二组分。

[0166] 实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中所述第一组分中的OMV是冻干的。

[0167] 实施方案24.根据实施方案22或实施方案23所述的方法,其中所述第二组分包含水性抗原。

[0168] 实施方案25.根据实施方案24所述的方法,其包括用所述第二组分的水性抗原重构所述第一组分中的冻干的OMV的进一步步骤。

[0169] 实施方案26.根据实施方案22至25中任一项所述的方法,其中所述第一组分不包含佐剂。

[0170] 实施方案27.根据实施方案22至26中任一项所述的方法,其中所述第二组分包含佐剂,例如铝盐佐剂。

[0171] 实施方案28.用于制备根据实施方案1-19中任一项所述的免疫原性组合物的试剂盒,其含有包含所述OMV的第一组分和包含无细胞百日咳抗原、破伤风类毒素和白喉类毒素的第二组分,其中所述两种组分在分开的容器中。

[0172] 实施方案29.实施方案28的试剂盒,其中所述第一组分中的OMV是冻干的。

[0173] 实施方案30.根据实施方案28或实施方案29所述的试剂盒,其中所述第二组分包含水性抗原。

[0174] 实施方案31.根据实施方案28-30中任一项所述的试剂盒,其中所述第一组分不包含佐剂。

[0175] 实施方案32.根据实施方案28-31中任一项所述的试剂盒,其中所述第二组分包含佐剂,例如铝盐佐剂。

[0176] 实施方案33.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素、特别是基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株。

[0177] 实施方案34.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株。

[0178] 实施方案35.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳

类毒素PT-9K/129G。

[0179] 实施方案36.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0180] 实施方案37.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0181] 实施方案38.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代。

[0182] 实施方案39.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0183] 实施方案40.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。

[0184] 实施方案41.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0185] 实施方案42.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0186] 实施方案43.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。

[0187] 实施方案44.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0188] 实施方案45.免疫原性组合物,其包含(a)外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0189] 实施方案46.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素、特别是基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株。

[0190] 实施方案47.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自表达基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G的百日咳博德特氏菌菌株。

[0191] 实施方案48.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。

[0192] 实施方案49.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0193] 实施方案50.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0194] 实施方案51.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达

基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代。

[0195] 实施方案52.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中ArnT基因已经被敲除或缺失,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代。

[0196] 实施方案53.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0197] 实施方案54.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV), (b)无细胞百日咳抗原, (c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中ArnT基因已经被敲除或缺失,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0198] 实施方案55.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。

[0199] 实施方案56.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0200] 实施方案57.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV); (b)无细胞百日咳抗原,其选自(i)解毒的百日咳毒素(PT), (ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN); (c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因,且其中ArnT基因已经被敲除或缺失,且所述百日咳博德特氏菌菌株表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0201] 实施方案58.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G。

[0202] 实施方案59.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未被化学解毒。

[0203] 实施方案60.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV);(b)(i)解毒的百日咳毒素(PT),(ii)丝状血凝素(FHA)和(iii)百日咳杆菌粘附素(PRN);(c)破伤风类毒素;和(d)白喉类毒素,其中所述OMV源自百日咳博德特氏菌菌株,所述百日咳博德特氏菌菌株包含已被修饰以包括突变R9K和E129G的S1基因且表达基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,且其中ArnT基因已经被敲除或缺失,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上没有葡萄糖胺(G1cN)取代,且其中所述OMV未用甲醛、福尔马林、戊二醛、过氧化氢和其组合或衍生物化学解毒和/或处理。

[0204] 实施方案61.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0205] 实施方案62.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺(G1cN)取代,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0206] 实施方案63.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0207] 实施方案64.免疫原性组合物,其包含(a)百日咳博德特氏菌外膜囊泡(OMV),其包含基因解毒的百日咳类毒素PT-9K/129G,其中所述OMV中的脂质A具有修饰的结构,其在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺(G1cN)取代,(b)无细胞百日咳抗原,(c)破伤风类毒素和(d)白喉类毒素。

[0208] 实施方案65.实施方案61至64的免疫原性组合物,其中所述外膜囊泡中的100%百日咳类毒素是基因解毒的PT。

[0209] 实施方案66.实施方案61至65的免疫原性组合物,其中所述外膜囊泡中的100%百日咳类毒素是基因解毒的百日咳类毒素PT 9K/129G。

[0210] 通用

[0211] 术语“包含”涵盖“包括”,例如,“包含”X的组合物可以包括额外物质,例如X+Y。词语“基本上”不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可能完全不含Y。在一些实施方式中,术语“包含”是指包括指示的活性剂、诸如所述的多肽,以及包括其他活性剂,以及药

学上可接受的载体、赋形剂、润肤剂、稳定剂等,如医药工业中已知的。在一些实施方式中,术语“基本上由…组成”是指其唯一的活性成分是指示的活性成分、例如抗原的组合物,然而,可以包括其他化合物,其用于制剂的稳定、保存等,但不直接涉及指示的活性成分的治疗效果。过渡短语“基本上由…组成”的使用意指权利要求的范围应解释为涵盖权利要求中所述的指定材料或步骤,以及不实质上影响请求保护的发明的基本和新型特征的材料或步骤。参见In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (原文中的重点);还参见MPEP § 2111.03。因此,当在本发明的权利要求中使用术语“基本上由…组成”并不预期解释为等同于“包含”。除非另有明确说明,否则术语“由…组成”及其变化意指限于”。在某些领域中,可以使用术语“包含由…组成的活性成分”代替“基本上由…组成”。与数值 x 相关的术语“约”意指,例如 $x \pm 10\%$ 、 $x \pm 5\%$ 、 $x \pm 4\%$ 、 $x \pm 3\%$ 、 $x \pm 2\%$ 、 $x \pm 1\%$ 。词语“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可能完全不含Y。必要时,可以从本发明的定义中省略词语“基本上”。在方法将施用步骤称为例如(a)、(b)、(c)等的情况下,这些步骤预期是依次的,即步骤(c)在步骤(b)之后,所述步骤(b)之前为步骤(a)。抗体将通常对于其靶标是特异性的,即,它们对于靶标的亲和力将大于对于无关对照蛋白(诸如牛血清白蛋白)的亲和力。

[0212] 除非特别说明,包括混合两种或更多种组分的步骤的方法不要求混合的任何特定顺序。因此,组分可以任何顺序混合。在存在三种组分的情况下,则两种组分可以彼此组合,且然后该组合可以与第三组分组合,等。

[0213] 抗体将通常对于其靶标是特异性的。因此,它们对于靶标的亲和力将大于对于无关对照蛋白(诸如牛血清白蛋白)的亲和力。

[0214] 在将组分描述为“吸附”至佐剂的情况下,优选至少50%(以重量计)、例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更多的该抗原被吸附。如果组分被完全吸附,则离心后在组合物的上清液中应当检测不到任何组分。

[0215] 缀合物的量通常以糖的质量给出(即,缀合物(载体+糖)的剂量作为整体将高于所述剂量)以避免由于载体选择导致的变化。

[0216] 在动物(且特别是牛)材料在细胞培养中使用的情况下,它们应当获得自无传染性海绵状脑病(TSE)、特别是无牛海绵状脑病(BSE)的来源。

[0217] 用于实施本发明的方式

[0218] 材料和方法

[0219] TdaP疫苗

[0220] 使用市售的TdaP疫苗。所述TdaP疫苗用氢氧化铝佐剂化,并且含有破伤风类毒素、白喉类毒素和无细胞百日咳抗原(PT、FHA和69K,也称为百日咳杆菌粘附素或PRN)。

[0221] 细菌菌株和生长条件

[0222] 在本研究中使用了以下百日咳博德特氏菌菌株:携带基因解毒的百日咳毒素的W28 PT 9K/129G(Pizza等人,1989),以及如下所述生成的其缺乏 $arnT$ 基因的 $arnT$ 敲除(KO)衍生物。细菌通常如Gasperini等人,2018中所述储存和生长,并且简要如下:将细菌储存在 80°C 下,并通过铺板在补充有15% (v/v) 绵羊血液的Bordet-Gengou (BG) 琼脂板上在 37°C 下持续3天来恢复。然后在补充有0.4% (w/v) L-半胱氨酸单盐酸盐、0.1% (w/v) FeSO_4 、0.2% (w/v) 抗坏血酸、0.04% (w/v) 烟酸、1% (w/v) 还原型谷胱甘肽的Stainer-Scholte培

培养基中以0.05-0.1的初始600 nm光学密度(OD600)接种细菌。培养物在旋转振荡器中在37℃下生长。将重组DH5大肠杆菌菌株储存在80℃下,通过铺板在补充有20 g/ml氯霉素的LB琼脂板上在37℃下持续16 h来恢复。对于液体培养,将细菌接种在补充有20 g/ml氯霉素的LB培养基中,并在旋转振荡器中在37℃下生长16 h。

[0223] *arnT* KO的构建

[0224] 为了构建百日咳博德特氏菌*arnT*突变菌株,类似于Geurtsen等人,2009中所述,我们通过使用含有EcoRI和BamHI位点(加下划线)的引物5'-ATAGAATTCACGCGGTGCGGCGCCAGCGC-3'(SEQ ID NO:1)和5'-ATAGGATCCGCCAGGACCTGGCCTGGCC-3'(SEQ ID NO:2)从百日咳博德特氏菌菌株W28 PT-9K/129G扩增*arnT*的上游的一部分DNA。另外,通过用含有BamHI和HindIII位点(加下划线)的引物5'-ATAGGATCCGGACGAAGCCTTCAAGGGGC-3'(SEQ ID NO:3)和5'-ATAAAGCTTCGTCCAGGCGGCCAGCGC-3'(SEQ ID NO:4)的PCR,获得*arnT*的下游的DNA片段。将两个PCR产物与在两个末端均含有BamHI位点的卡那霉素抗性盒(KanR)一起克隆至pUC19中。用EcoRI和HindIII限制性酶消化所得质粒pUC19-*arnT*_上-KanR-*arnT*_下,并将所得的EcoRI-HindIII片段连接至EcoRI-HindIII限制化的自杀载体pSORTP1中。最终的构建体,称为pSORTP1-*arnT*_{KO},用于通过等位基因交换构建百日咳博德特氏菌(菌株W28 PT 9K/129G)*arnT*突变体。通过使用各种引物对的PCR筛选转化体。

[0225] OMV纯化

[0226] 从W28 PT 9K/129G及其*arnTKO*衍生物生成OMV。在250 mL带挡板的烧瓶中生长3天后,回收百日咳博德特氏菌的液体培养物。液-气体积比导致对OMV生产产率至关重要,并且保持在1:5比率。然后通过以5,000 x g离心30分钟来使细菌沉淀。回收无细胞的上清液,并通过0.22 μm Stericups过滤器(Millipore)过滤。以175,000 x g超速离心2小时后,将所得的OMV沉淀物用Dulbecco氏磷酸盐缓冲盐水(D-PBS)洗涤,进一步以175,000 x g超速离心2小时,且最后重悬浮于100 μl D-PBS中。遵循制造商的说明,对于总蛋白含量,通过Lowry测定法(DC Protein Assay, BioRad)定量OMV。

[0227] 结果

[0228] 从以下两种百日咳博德特氏菌解毒的疫苗菌株制备外膜囊泡制备物:表达基因解毒的百日咳毒素的W28 PT 9K/129G菌株,和通过缺失ArnT编码基因而具有基因修饰的脂质A结构的菌株W28 PT 9K/129G *arnTKO*的衍生物,所述基因修饰的脂质A结构在核心结构的远端磷酸酯基团上缺乏葡萄糖胺取代。W28 PT 9K/129G的*arnT* KO突变体(Bp-Δ*arnT*)表现出比W28 PT 9K/129G (Bp-WT)菌株低10倍的TLR4参与(图1(a)),并且诱导比W28 PT 9K/129G (Bp-WT)菌株显著更少的从PBMC的IL-6分泌(图1(b))。

[0229] 显示来自W28 9K/129G (Bp WT)和W28 9K/129G *arnTKO* (Bp Δ*arnT*)疫苗菌株的两种OMV均含有少量的FHA、69K和百日咳毒素组分(图2)。并且用两种OMV免疫的小鼠引发可检测水平的针对所有三种无细胞百日咳组分的抗体(图3)。

[0230] 小鼠免疫用于生成小鼠抗血清

[0231] BALB/c小鼠(雌性,6周龄)(Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, MA)分隔三周接受三次腹膜内(IP)免疫,或者分隔四周接受两次肌肉内(IM)免疫,用100 μl制剂(50 μL/腿)。每次免疫后2周收集血清。将OMV以对于每次研究指

定的剂量配制于2 mg/mL Al(OH)₃中。对于组合制剂,将OMV以0.1、0.5和2.5 µg剂量的剂量与1/5人剂量的Tdap抗原(参见下文)以100 µl的总体积配制于2 mg/mL Al(OH)₃中。

| Tdap 疫苗人剂量(0.5 mL) | | | | | |
|--------------------|------|------|---------------|---------------|---------------------|
| PT | FHA | 69K | D | T | Al(OH) ₃ |
| 4 µg | 4 µg | 8 µg | 2 Lf (1.2 µg) | 5 Lf (3.2 µg) | 1 mg |

[0233] 对小鼠抗血清的Luminex免疫测定

[0234] 通过如(Agnolon等人, 2015)所述且如下的Luminex五重免疫测定法分析针对所有疫苗抗原的总IgG滴度。滴度表示为每ml的相对Luminex单位(RLU/ml),其产生自通过超免疫参考抗血清转化登记的荧光强度中值(MFI)。根据制造商的说明,开发了一种基于MagPlex微球的Luminex五重免疫测定法,以定量小鼠血清中的抗Tdap抗体滴度。在将抗原-偶联的微球与稀释的血清(1:10000,第1次后;1:20000,第2次后)孵育后,测定单个动物中的IgG滴度。藻红蛋白-缀合的二抗用于检测(1:400)。使用Bio-Plex Manager 5.0软件(Bio-Rad, Hercules, CA)在Luminex FLEXMAP 3D分析仪(Luminex Corporation, Austin, TX)上将IgG测量值测定为中值荧光强度(MFI)。使用对每种抗原特异性的抗血清作为参考,以便以RLU/ml(相对Luminex单位)转化总IgG的MFI值。确定每种抗原的测定的定量限值(LOQ),并被视为阳性结果的阈值。结果显示于图4中。

[0235] 粘附抑制测定

[0236] 对于百日咳博德特氏菌粘附抑制测定,细菌在液体培养物中生长16 h,且然后以8000 × g沉淀5 min,并且以OD₆₀₀ 0.5重悬浮于d-PBS中。对于百日咳博德特氏菌细胞的荧光标记,然后将体积为445 µl的细菌悬浮液与50 µl的1 m NaHCO₃和5 µl的Alexa Fluor 488羧酸,琥珀酰亚胺酯(Life Technologies, Waltham, MA)混合并在37°C下孵育15 min。在室温下以8,000 × g离心5 min后,除去上清液,并将沉淀物用1 ml d-PBS洗涤一次以除去未结合的染料,且最后将细菌以OD₆₀₀ 0.2重悬浮于F12-K培养基中。将合并的小鼠血清在含有1% (v/v) 幼稚小鼠血清的F-12K培养基中进行4倍系列稀释,并在37°C下以1:1比率与标记的百日咳博德特氏菌一起孵育1 h。将一百微升细菌/血清混合物一式三份转移至铺板的A549细胞上。将感染的细胞在37°C下孵育1 h。彻底洗涤以除去未结合的细菌后,通过Tecan Infinite F200PRO微孔板阅读器在激发/发射485/535 nm处测量荧光。

[0237] 用wP或三种不同的OMV剂量免疫小鼠导致诱导抗体,所述抗体可以抑制百日咳博德特氏菌粘附至上皮A549细胞的体外细胞培养物的能力。来自用灭活的全细菌免疫的小鼠的血清具有最高水平的细菌粘附抑制,并且由OMV疫苗诱导的细菌粘附抑制与抗原剂量成正比。Tdap疫苗没有在小鼠中诱导高水平的抑制荧光标记的细菌的粘附的抗体,并且只有低血清稀释度(1/40及更低)导致测定中的荧光降低。发现10 µg的最高剂量的OMV在接种疫苗后诱导抗体,所述抗体赋予最高水平的细菌粘附抑制,这与全细菌对照诱导的细菌粘附抑制相当(图5)。

[0238] Kendrick氏颅内攻击功效测试

[0239] CD1小鼠(6周龄)用500 µL疫苗制剂腹膜内(i.p.)接种疫苗一次,并在免疫后2周

用颅内施用的30 μ l百日咳博德特氏菌菌株18323的悬浮液攻击,并且在攻击后根据Kendrick颅内攻击功效测试(Kendrick等人, 1947)且根据欧洲药典指南追踪小鼠的存活2周。三种剂量(1/10、1/50和1/250人剂量)的NIBSC标准品用作阳性对照,并将OMV以0.4、2和10 μ g剂量配制于2 mg/mL Al(OH)₃中。

[0240] 脑内小鼠保护测试(Kendrick测试)对于确定全细胞百日咳疫苗的功效是有效的,并且是已经显示与儿童中的保护的相关性的唯一测试(Xing等人, 2014)。用递增剂量(以0.4、2和10 μ g剂量)的OMV免疫小鼠赋予递增水平的针对用百日咳博德特氏菌的颅内攻击的保护(图6),这与wP NIBSC标准品相当。由OMV疫苗诱导的保护与抗原剂量成正比,并且成功地引发与wP的保护应答相当的有效保护应答(图6)。

[0241] 气溶胶攻击

[0242] 将C57BL/6小鼠(雌性,10周龄)用100 μ l疫苗制剂腹膜内(i.p.)接种疫苗一次,并在3周后攻击,如先前(Misiak等人, 2017a)和下文所述。如所示,以1/5或1/10的人剂量,全细胞百日咳(wP)疫苗用作阳性对照。将OMV以如所示的0.4、2和10 μ g剂量配制于2 mg/mL Al(OH)₃中。对于组合制剂,将OMV以2,5 μ g剂量与1/5的人剂量的TdaP抗原(参见下文)以100 μ l的总体积配制于2 mg/mL Al(OH)₃中。

| | | | | | | | |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| [0243] | TdaP 人剂量 (0.5mL 剂量体积) | PT (8 μg) | FHA (8 μg) | PRN (2.5 μg) | TT (5 Lf) | DT (2 Lf) | 明矾 (1 mg) |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|

[0244] 攻击前一天,在接种疫苗后3周,从免疫小鼠(每组4只小鼠)收集血清和脾脏。通过ELISA分析脾细胞的抗原-特异性细胞因子产生和血清抗体。然后如下所述用百日咳博德特氏菌的毒性菌株攻击剩余的小鼠,并且在感染后1、3、7和14天评价肺CFU。

[0245] 小鼠的呼吸道感染通过如下进行:使用PARI TurboBOY SX雾化器,将小鼠暴露于百日咳博德特氏菌气溶胶(BP338菌株; 1×10^9 CFU/ml) 10 min,随后休息10 min。百日咳博德特氏菌感染的过程之后,在攻击后以一定间隔对来自三至四只小鼠的组的肺进行CFU计数。无菌移取肺,并在含有1%酪蛋白的1 ml无菌生理盐水中均质化。将来自单个肺的未稀释和系列稀释的匀浆(100 μ l)一式两份铺板在Bordet-Gengou琼脂板上,并且在37°C下孵育6天后对细菌菌落进行计数。

[0246] 如先前(Misiak等人, 2017b)所述并如下通过ELISA测量抗体滴度。FHA-特异性抗体通过ELISA使用板结合的FHA (1 μ g/mL)、生物素-缀合的抗小鼠IgG1或IgG2a和过氧化物酶-缀合的链霉抗生物素蛋白(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)进行定量。抗体水平表示为平均终点滴度 \pm SEM,其通过将滴定曲线的线性部分外推至用非免疫血清获得的背景值之上2 SE来确定。

[0247] 用wP和三种不同的OMV剂量免疫小鼠导致百日咳博德特氏菌特异性抗体产生的诱导。wP促进最高的抗FHA总IgG滴度,其与所有三种OMV剂量相比显著更大(图7)。发现用wP接种疫苗促进最高的TH1应答,且因此促进最高的抗FHA IgG2c滴度(图7)。分别在4只OMV 2接种疫苗的小鼠中的1只的血清中和4只OMV 10接种疫苗的小鼠中的3只的血清中检测到抗FHA IgG2c。在用OMV 0.4免疫的小鼠中未检测到FHA-特异性IgG2c。当与wP相比时,FHA-特异性应答的差异表明OMV中低得多的FHA含量。

[0248] 高保护性抗体滴度以及TH1应答的诱导是针对百日咳博德特氏菌的保护的关键。

用wP、OMV 0.4、OMV 2和OMV 10的单剂量免疫赋予不同水平的针对用百日咳博德特氏菌的呼吸道攻击的保护(图8)。用wP疫苗免疫的小鼠具有最高水平的保护,并且它们中的大多数到攻击后第7天清除感染。此外,与接受所有三种测试浓度的OMV疫苗的小鼠相比,wP免疫的小鼠在感染后的所有时间点的CFU计数显著更低。由OMV疫苗诱导的保护与抗原剂量成正比。然而,OMV 10⁻诱导的保护不如由wP接种疫苗诱导的保护一样有效。清除曲线下面积证实,wP最好地针对百日咳博德特氏菌气溶胶攻击保护小鼠。发现10 μg的最高剂量的OMV在百日咳博德特氏菌攻击的小鼠模型中赋予最高水平的保护。然而,发现其效力仍然显著低于wP疫苗。还发现FHA-特异性IgG2c应答在接受wP疫苗的小鼠中最高,并且FHA-特异性血清IgG2c的确随着OMV疫苗剂量而增加。

[0249] 此处呈现的数据显示,由OMV疫苗赋予的保护水平与所使用的抗原剂量成正比。它还强调,甚至在选择的最高剂量下,OMV疫苗也没有像wP一样有保护性。

[0250] 为了比较OMV当组合添加至无细胞百日咳制剂中时可以具有的针对百日咳博德特氏菌攻击的保护效力,用以明矾或明矾+OMV配制的无细胞百日咳疫苗使用气溶胶攻击模型,以全细胞疫苗作为阳性对照。用wP、aP和aP+OMV免疫小鼠诱导高的总抗FHA IgG滴度(图9)。此外,在仅OMV组中检测到高的总IgG滴度。在四个疫苗组之间没有观察到显著差异。在所有疫苗组中都检测到高抗FHA IgG1滴度,其中在aP和aP+OMV接种疫苗的小鼠的血清中检测到最高IgG1滴度(图9)。然而,在所述组之间没有检测到显著差异。在4只wP接种疫苗的小鼠中的2只的血清中,在4只aP+OMV接种疫苗的小鼠中的4只的血清中,和在4只OMV接种疫苗的小鼠中的1只的血清中,检测到FHA-特异性IgG2c(图9c)。在aP组中没有检测到抗FHA IgG2c。通过添加OMV,对单独aP的IgG2c应答显著加强。

[0251] 发现用wP、aP、aP+OMV以及用单独的OMV的单剂量免疫小鼠赋予针对用百日咳博德特氏菌的呼吸道攻击的保护(图10)。用wP疫苗免疫的小鼠具有最高水平的保护,并且到攻击后第7天清除感染。aP和OMV接种疫苗赋予相似水平的保护。然而,这些疫苗的效力显著低于wP疫苗。相反,发现aP+OMV组合赋予与由wP疫苗诱导的保护水平相当的保护水平。在测试的任何时间点上,在这两种疫苗之间没有检测到显著差异。清除曲线下面积证实,wP和aP+OMV是测试疫苗中最有效的。

[0252] 因此,用1/5人剂量的所有测试的疫苗制剂的单次免疫在C57BL6小鼠中诱导针对百日咳博德特氏菌的保护性免疫。还发现用单独的OMV免疫赋予显著的保护,这与由aP疫苗诱导的保护相当。

[0253] 在wP、aP+OMV和单独的OMV中可检测到强Th1应答,但在aP接种疫苗的小鼠中则没有。与接受aP疫苗的小鼠相比,在aP+OMV接种疫苗的小鼠中的增强的Th1应答与高抗FHA IgG2c滴度相关,在aP免疫的小鼠中实际上不存在所述高抗FHA IgG2c滴度。此处呈现的数据显示,向aP疫苗中添加OMV强烈增强其保护效力,并在初次和加强接种疫苗期间均诱导转换为抗FHA IgG2c产生和TH1应答(图11)。

[0254] **加强接种疫苗**

[0255] 在先前实验中,将幼稚小鼠用于免疫。这对于初次接种疫苗(即小儿疫苗)也是如此。然而,在生命较晚也需要加强接种疫苗,并且发达国家中的大多数受试者将已经接受目前市售的诱导更多TH2-倾向的应答的疫苗。这种情况使用市售的小儿疫苗(Infanrix Hexa)(用于首次(初次)免疫)以及不同的市售或实验性加强制剂(包括TdaP+OMV)(用于二

次免疫)进行模拟。

[0256] 向Tdap疫苗中添加OMV显著增强TH1应答,而甚至在TH1-诱导佐剂(Alum-TLR7)存在的情况下,不同的Tdap疫苗也不改变TH平衡(图12)。

[0257] 结论

[0258] 关于研究的疫苗制剂的免疫原性,得到以下观察:

[0259] · 在用所有研究制剂免疫的小鼠中,OMV、白喉、破伤风和百日咳疫苗引发针对相应抗原的特异性抗体滴度。

[0260] · 在OMV和破伤风/白喉/百日咳疫苗组合之间没有观察到免疫干扰。

[0261] · 对用OMV/白喉/破伤风/百日咳抗原的组合接种疫苗的IgG和功能性抗体应答得到的滴度显著高于用单独的OMV或Tdap疫苗接种疫苗后观察到的滴度。

[0262] · 向aP疫苗中添加OMV诱导转变为抗FHA IgG2c产生,并且在wP、aP+OMV和单独的OMV中可检测到Th1应答,但在aP接种疫苗的小鼠中则没有。

[0263] 相对于当单独施用时的OMV或aP保护性应答,在组合疫苗中向aP疫苗中添加OMV强烈增强其保护效力。总之,没有证据证明任何研究的疫苗之间的强烈的干扰。发现用单独的OMV免疫在Kendricks功效测试和气溶胶攻击模型中赋予显著的保护。向无细胞百日咳疫苗中添加OMV导致比单独的aP或OMV疫苗更大的保护。不希望受理论的束缚,这可能是由于囊泡中含有的额外保护性抗原和/或由于在初次或加强接种疫苗时均诱导有利的TH1概况。

[0264] 应该理解的是,本发明已经仅借助实例进行描述,并且可以作出修改,而仍在本发明的范围和精神内。

[0265] 参考文献

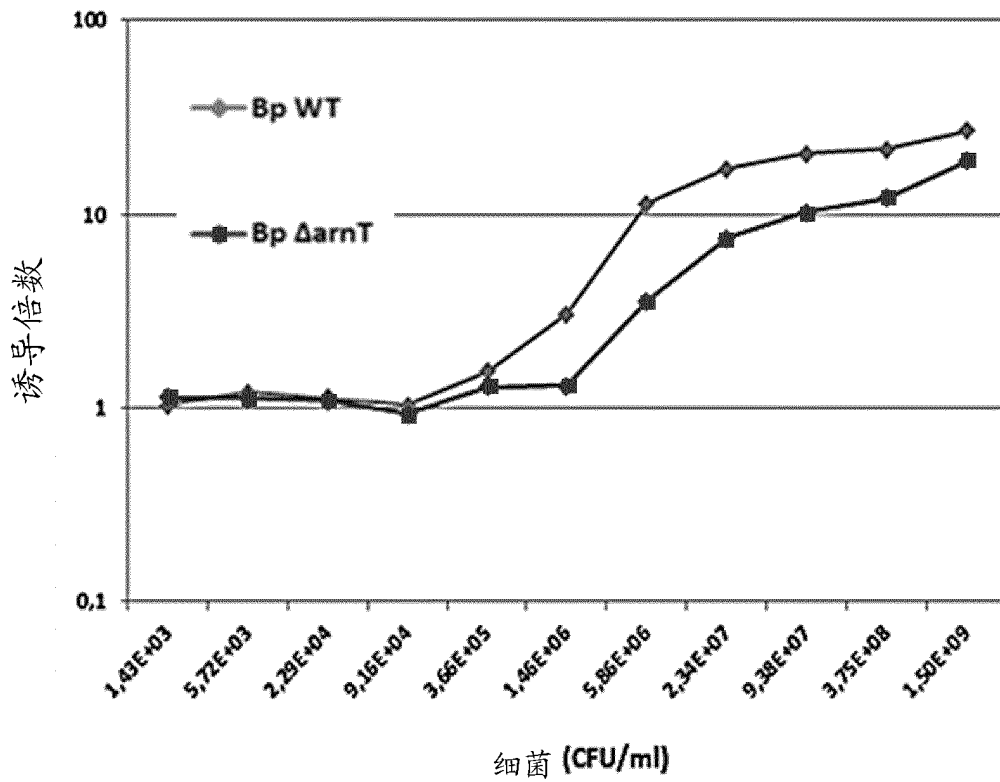
- [1] *Vaccines*. (编辑 Plotkin & Orenstein). 第 4 版, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Katial 等人 2002, *Infect Immun*, 70: 702-707
- [3] WO2004/019977.
- [4] 欧洲专利 0011243.
- [5] Fredriksen 等人 (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [6] WO01/91788.
- [7] WO2005/004908.
- [8] *Vaccines*. (编辑 Plotkin & Orenstein). 第 4 版, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [9] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk
- [10] Sesardic 等人 (2001) *Biologicals* 29:107-22.
- [11] NIBSC 代码: 98/560.
- [12] WHO 的 *The immunological basis for immunization series* 的模块 1 (Galazka).
- [13] NIBSC 代码: 69/017.
- [14] NIBSC 代码: DIFT.
- [15] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk
- [16] Sesardic 等人 (2002) *Biologicals* 30:49-68.
- [17] NIBSC 代码: 98/552.
- [18] WHO 的 *The immunological basis for immunization series* 的模块 1 (Galazka).
- [19] NIBSC 代码: TEFT.
- [20] Rappuoli 等人 (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [0266] [21] Paoletti 等人 (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [22] WO00/56365.
- [23] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 第 20 版, ISBN: 0683306472.
- [24] WO01/41800.
- [25] WO03/009869.
- [26] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [27] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [28] WO00/53221.
- [29] Jakobsen 等人 (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [30] Bergquist 等人 (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [31] Baudner 等人 (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [32] Ugozzoli 等人 (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [33] Nony 等人 (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [34] 美国专利 6355271.
- [35] WO00/23105.
- [36] *Vaccine Design...* (1995) 编辑 Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [37] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [38] Madoff 等人 (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [39] Paoletti 等人 (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.
- 40 Xing D, Markey K, Das RG, Feavers I. 2014. Whole-cell pertussis vaccine potency assays: the Kendrick test and alternative assays. *Expert Rev Vaccines*. 13(10):1175-82.

- Geurtsen J, Dzieciatkowska M, Steeghs L, Hamstra HJ, Boleij J, Broen K, Akkerman G, El Hassan H, Li J, Richards JC, Tommassen J, van der Ley P. 2009 Identification of a novel lipopolysaccharide core biosynthesis gene cluster in *Bordetella pertussis*, and influence of core structure and lipid A glucosamine substitution on endotoxic activity. *Infect Immun.* Jul;77(7):2602-11
- Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M. T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., 和 Bugnoli M. (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246, 497-500
- Gianmarco Gasperini, Massimiliano Biagini, Vanessa Arato, Claudia Gianfaldoni, Alessandro Vadi, Nathalie Norais, Giuliano Bensi, Isabel Delany, Mariagrazia Pizza, Beatrice Arico', 和 Rosanna Leuzzi. 2018. Outer Membrane Vesicles (OMV)-based and Proteomics-driven Antigen Selection Identifies Novel Factors Contributing to *Bordetella pertussis* Adhesion to Epithelial Cells.
- [0267] Misiak A., Wilk M.M., Raverdeau M., Mills K.H. 2017a. IL-17-Producing innate and pathogen-specific tissue resident memory $\gamma\delta$ T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*-infected mice. *J Immunol*, 198 pp. 363-374.
- Misiak A, Leuzzi R, Allen AC, Galletti B, Baudner BC, D'Oro U, O'Hagan DT, Pizza M, Seubert A, Mills KHG. 2017b. Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine.* 2017 Sep 18;35(39):5256-5263.
- Agnolon V, Bruno C, Leuzzi R., Galletti B., D'Oro U., Pizza M., Seubert A., O'Hagan D.T., Baudner B.C.. 2015. The potential of adjuvants to improve immune responses against Tdap vaccines: a preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int J Pharm*, 492, pp. 169-176
- Kendrick PL, Eldering G, Dixon MK, Misner J. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge. *Am J Public Health Nations Health* 1947;37(7):803-10

序列表

| | | |
|--------|--|----|
| | <110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A. | |
| | <120> 免疫原性组合物 | |
| | <130> VB66685 AR | |
| | <160> 4 | |
| | <170> PatentIn version 3.5 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 29 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 1 | |
| | atagaattca cgcggtgcgg cgccagcgc | 29 |
| [0001] | <210> 2 | |
| | <211> 28 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 2 | |
| | ataggatccg ccaggacctg gcctggcc | 28 |
| | <210> 3 | |
| | <211> 29 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 3 | |
| | ataggatccg gacgaagcct tcaaggggc | 29 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 28 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 4 | |
| | ataaagcttc gtccaggcgc gccagcgc | 28 |

(a) HEK293-hTLR4 细胞



(b) 人 PBMCs (IL-6)

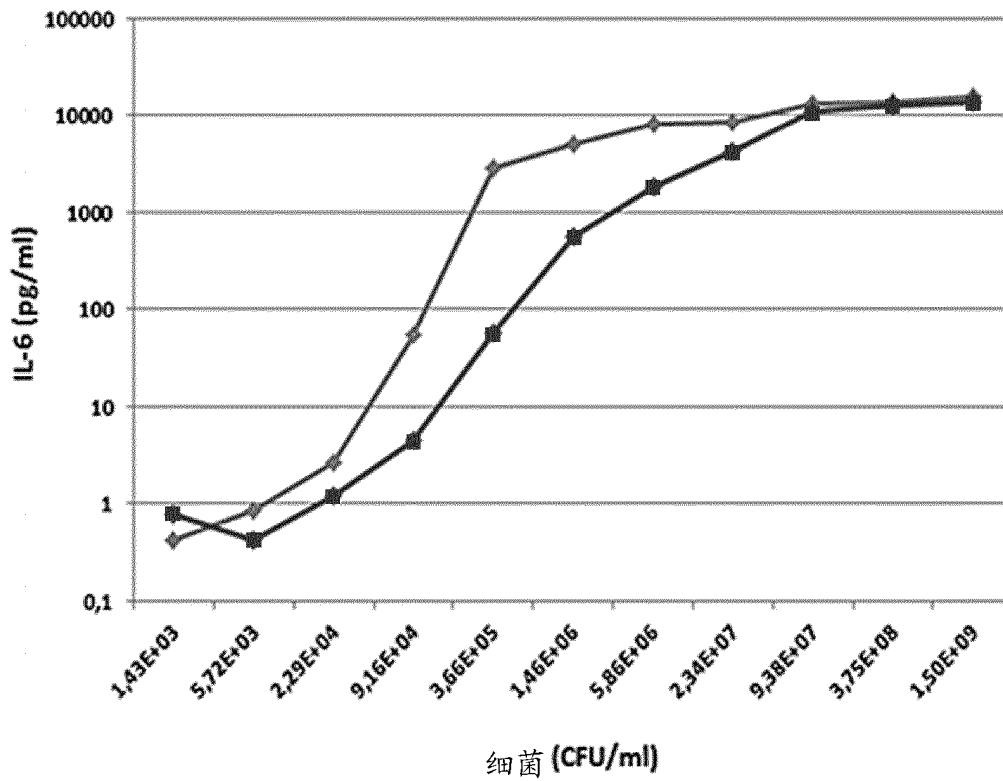


图 1

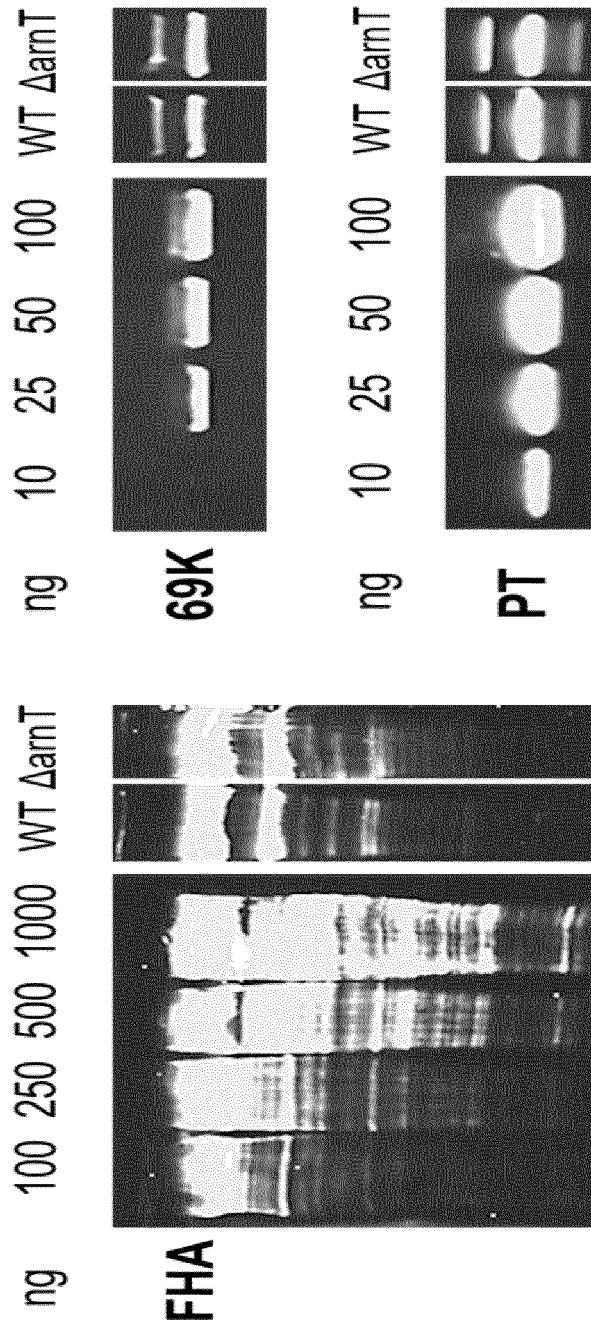


图 2

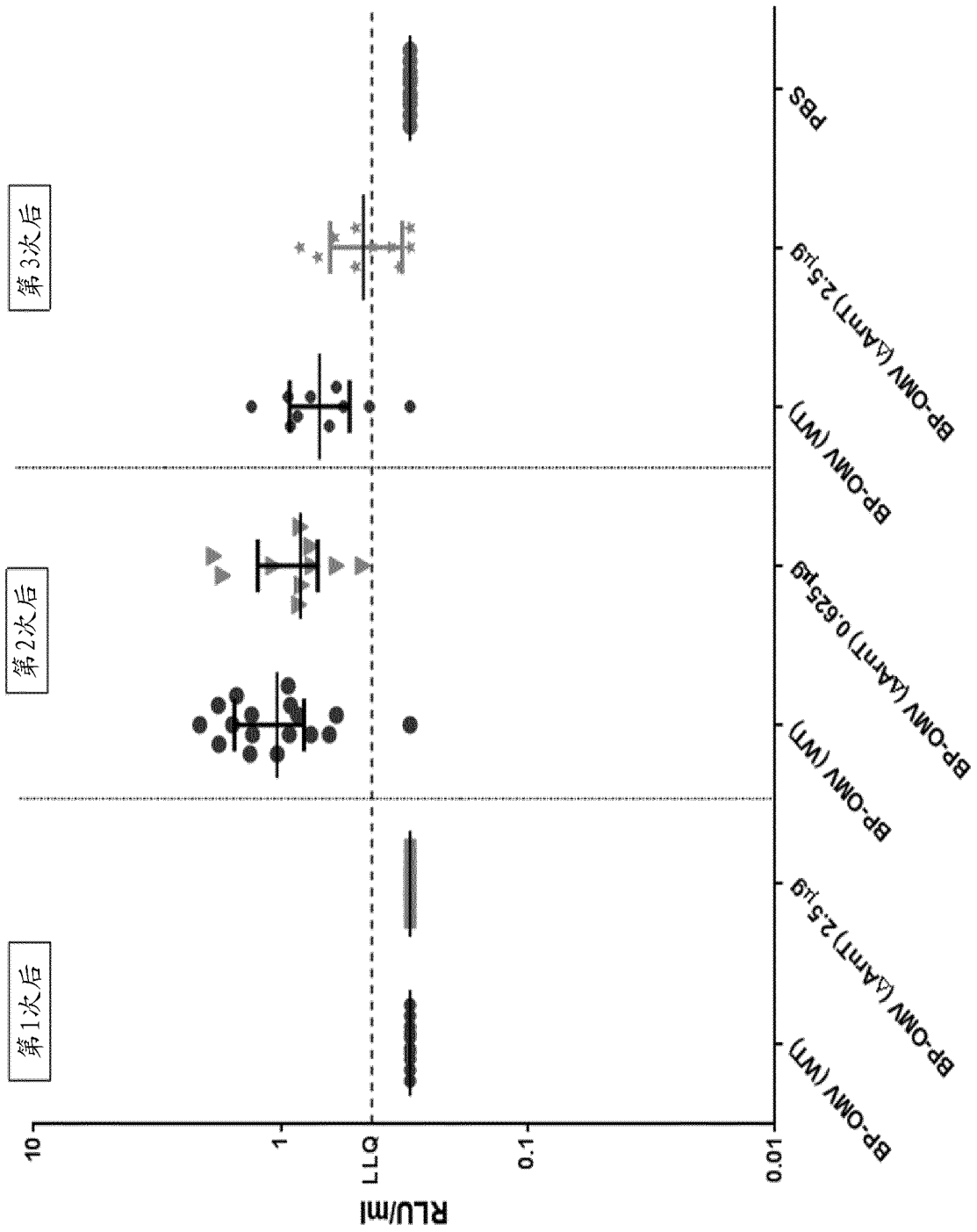


图 3(a)

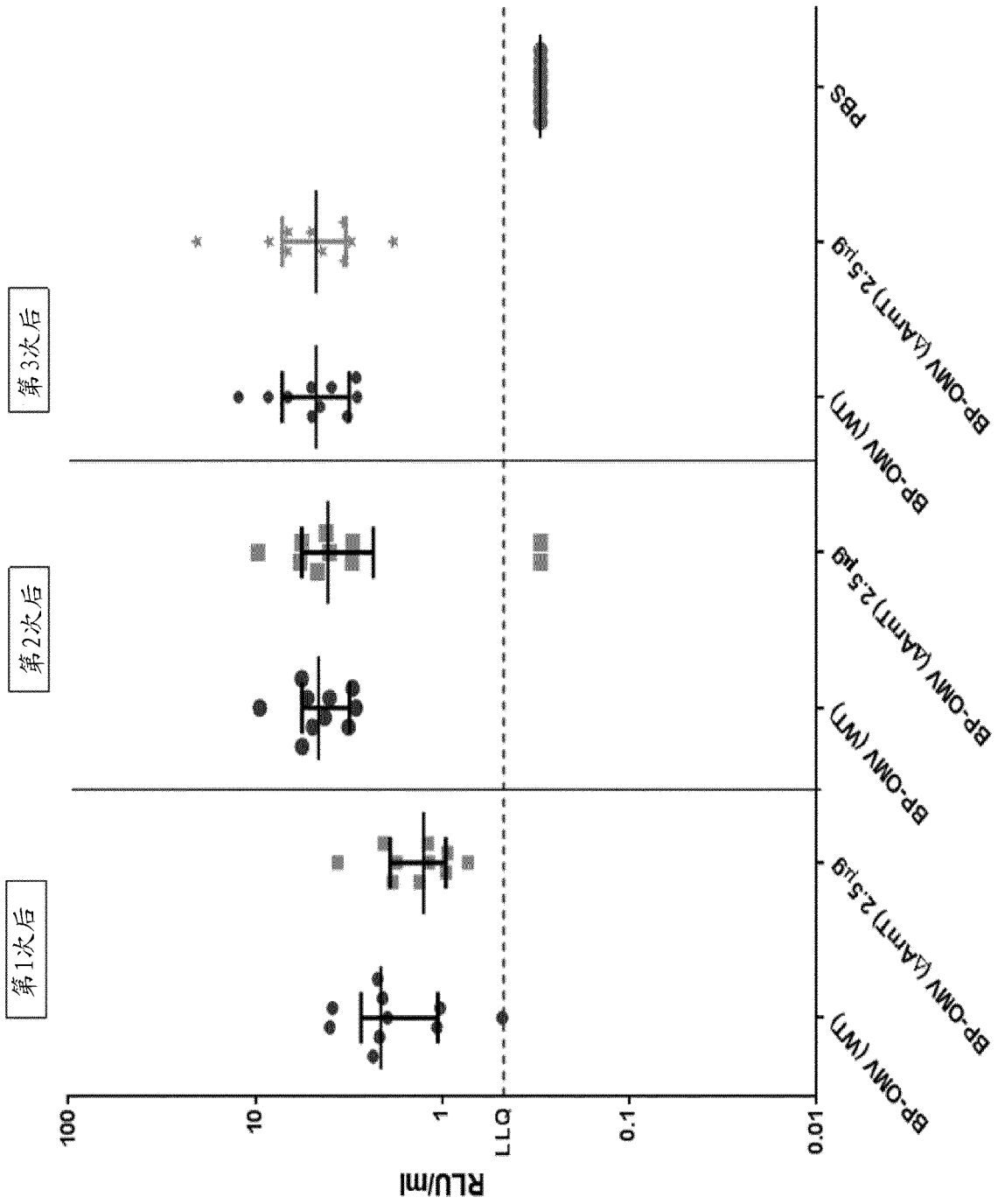


图 3(b)

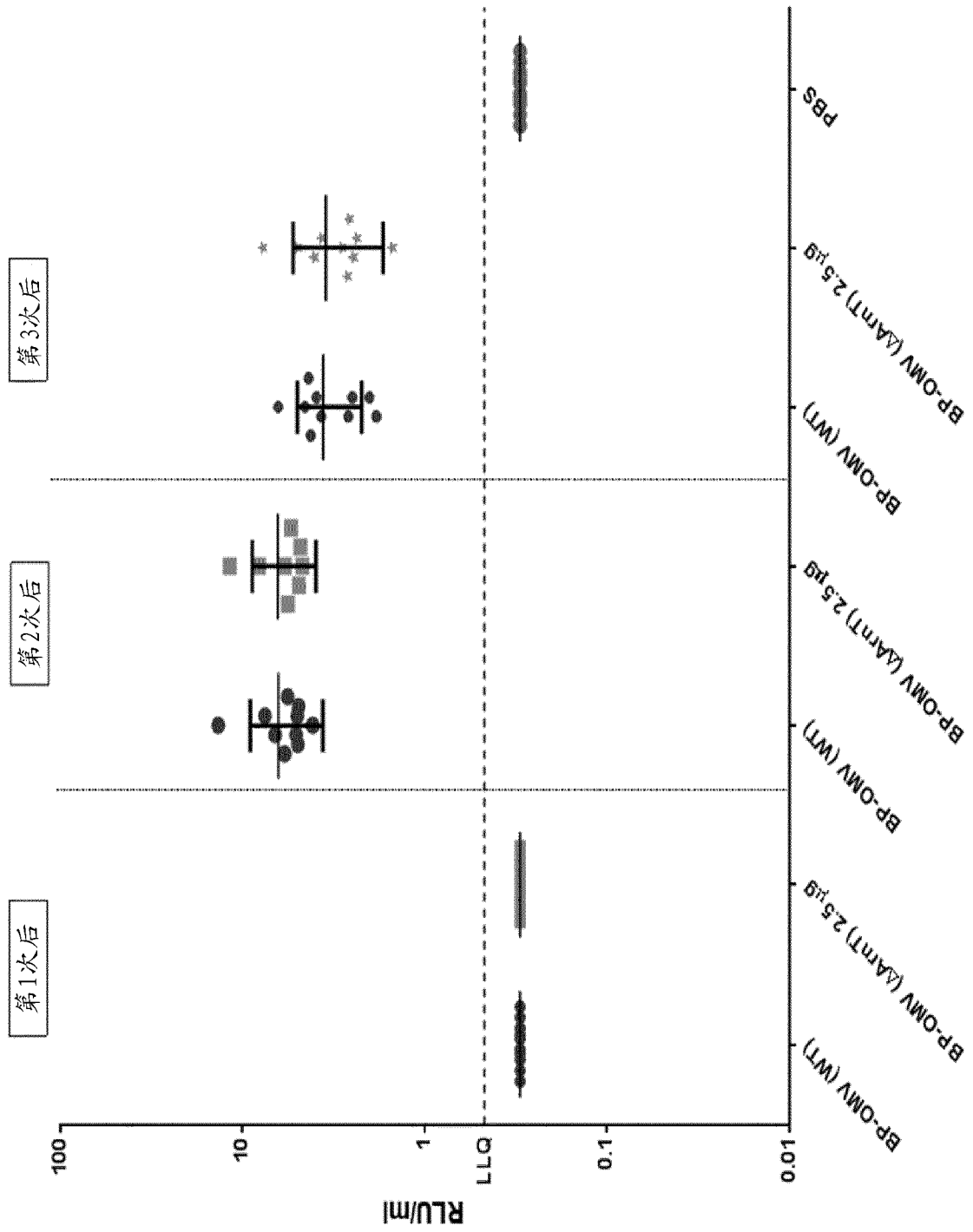


图 3(c)

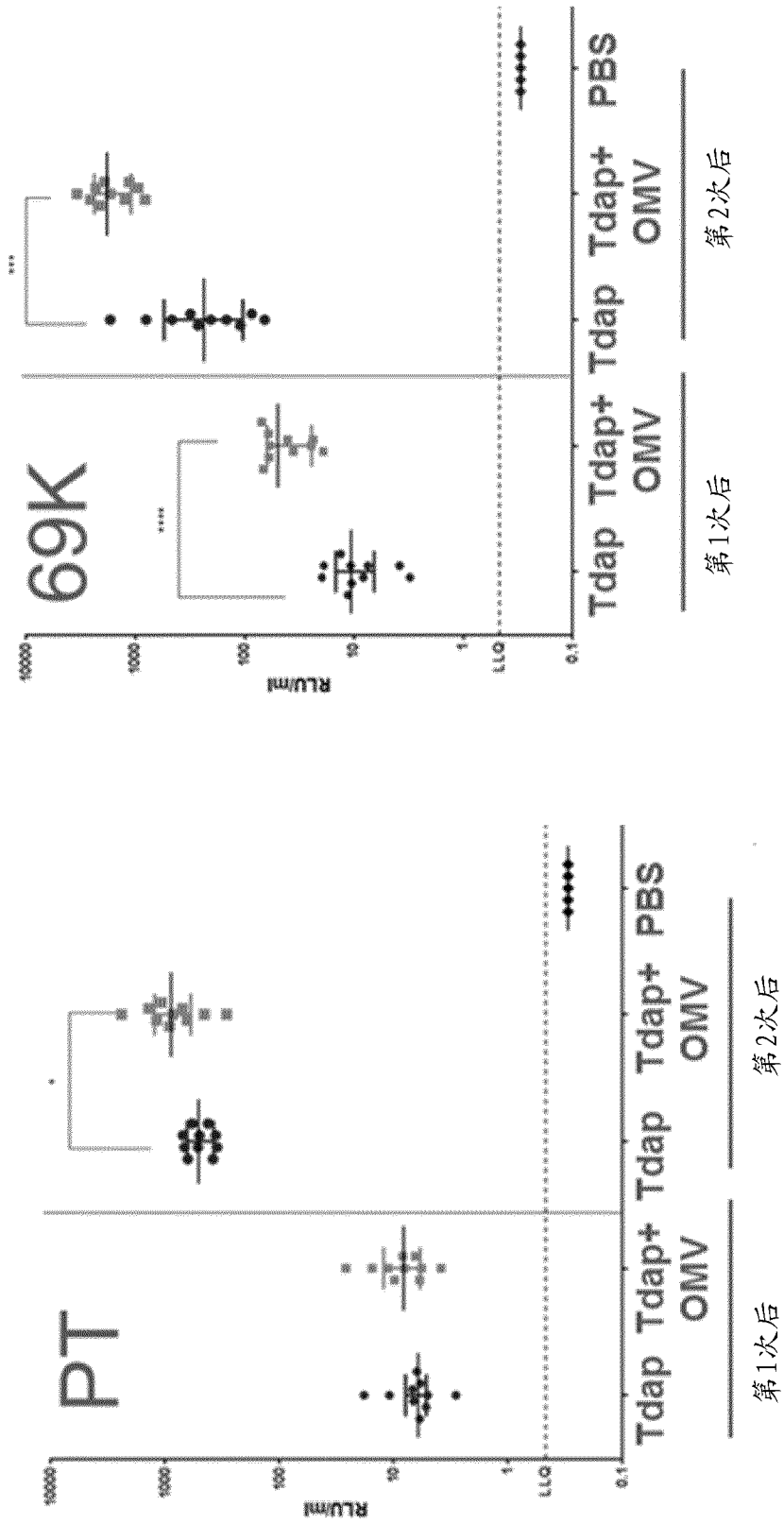


图 4

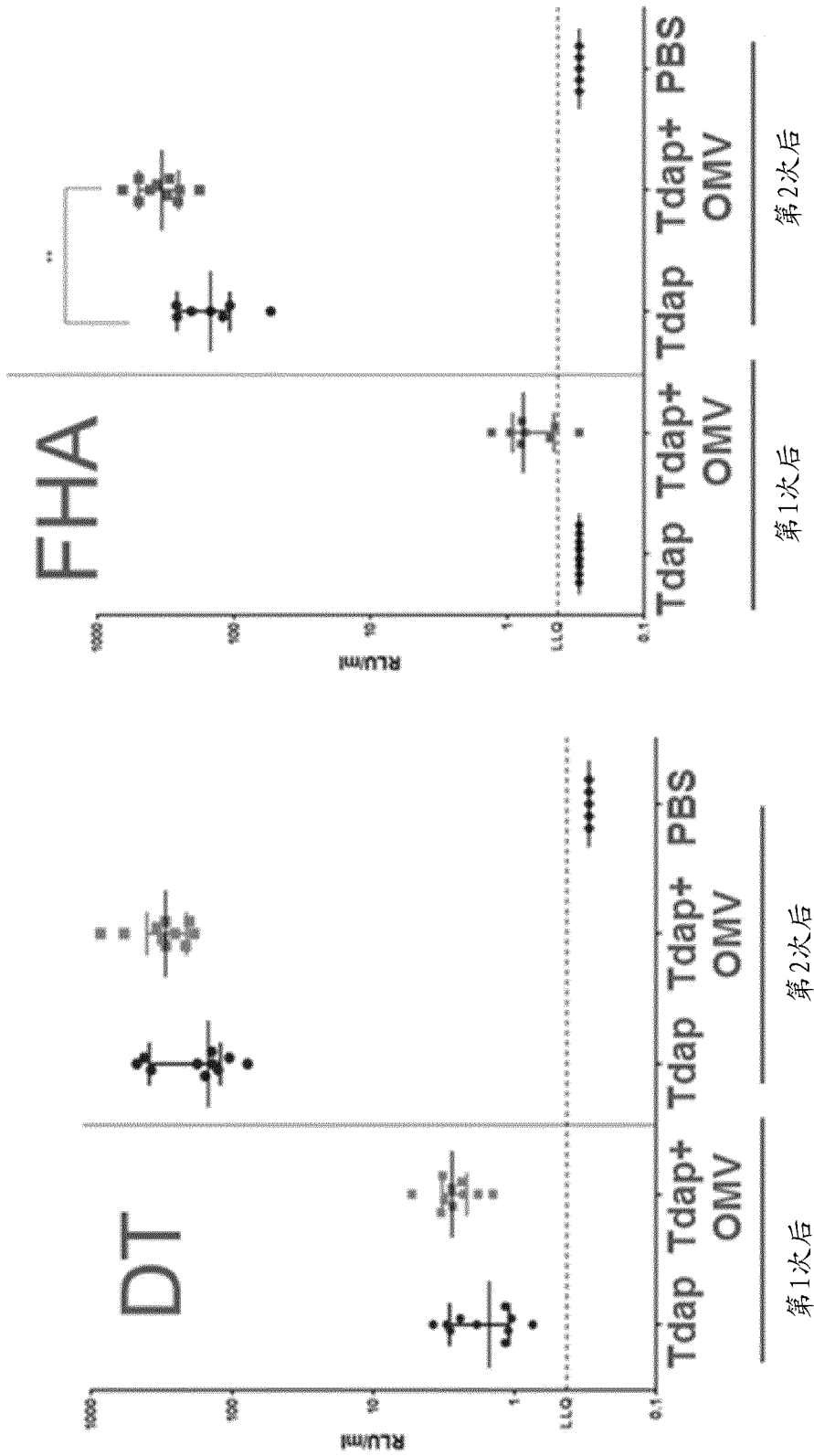


图 4(续)

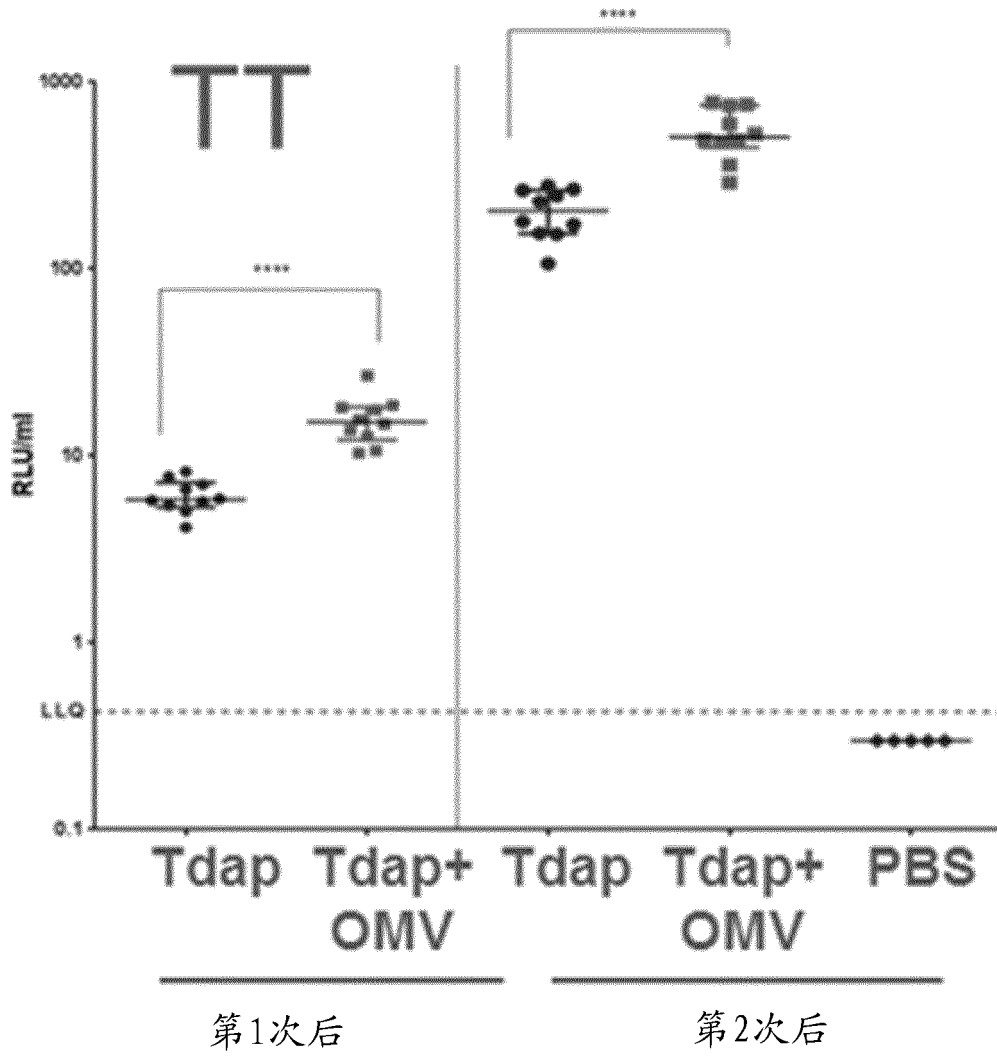


图 4(续)

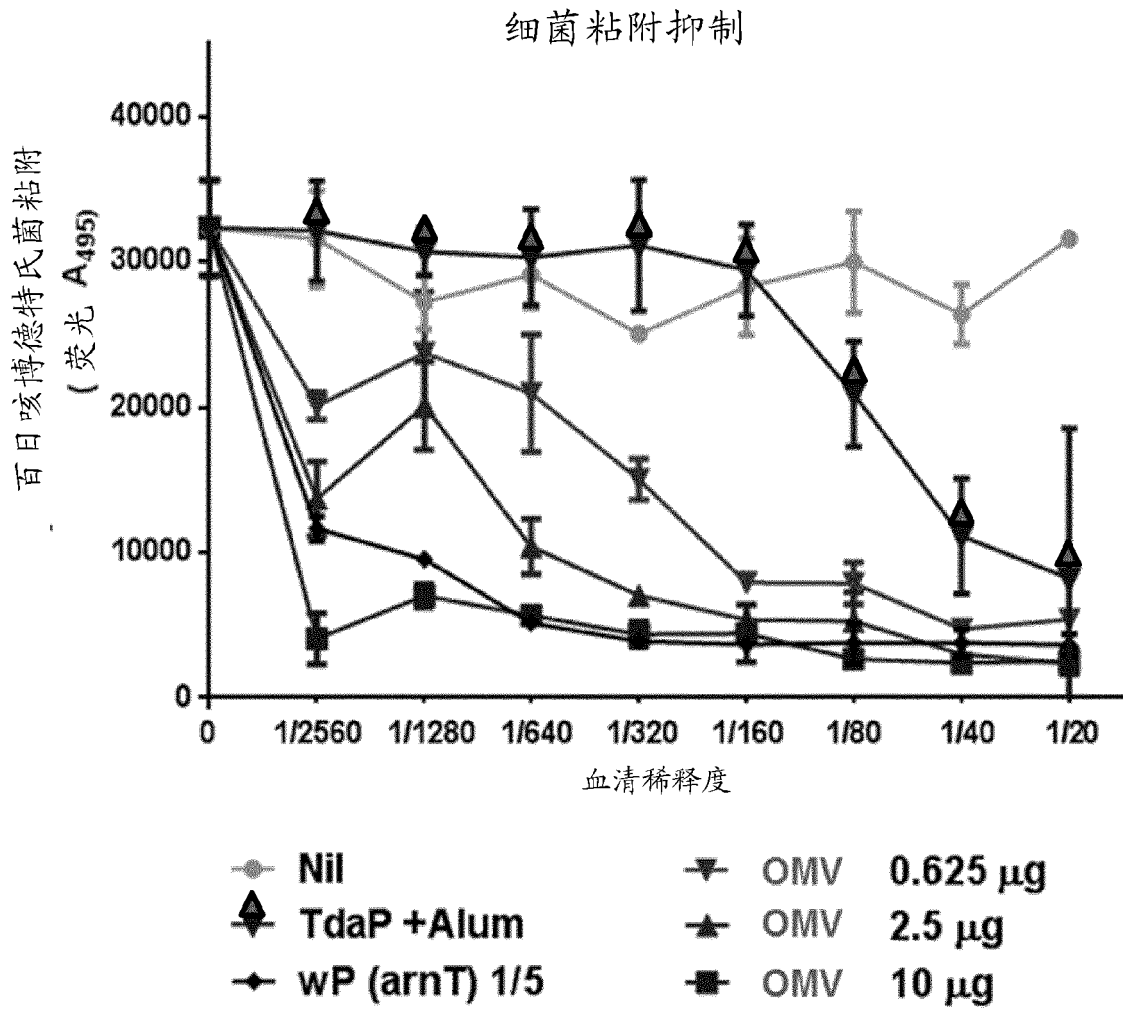


图 5

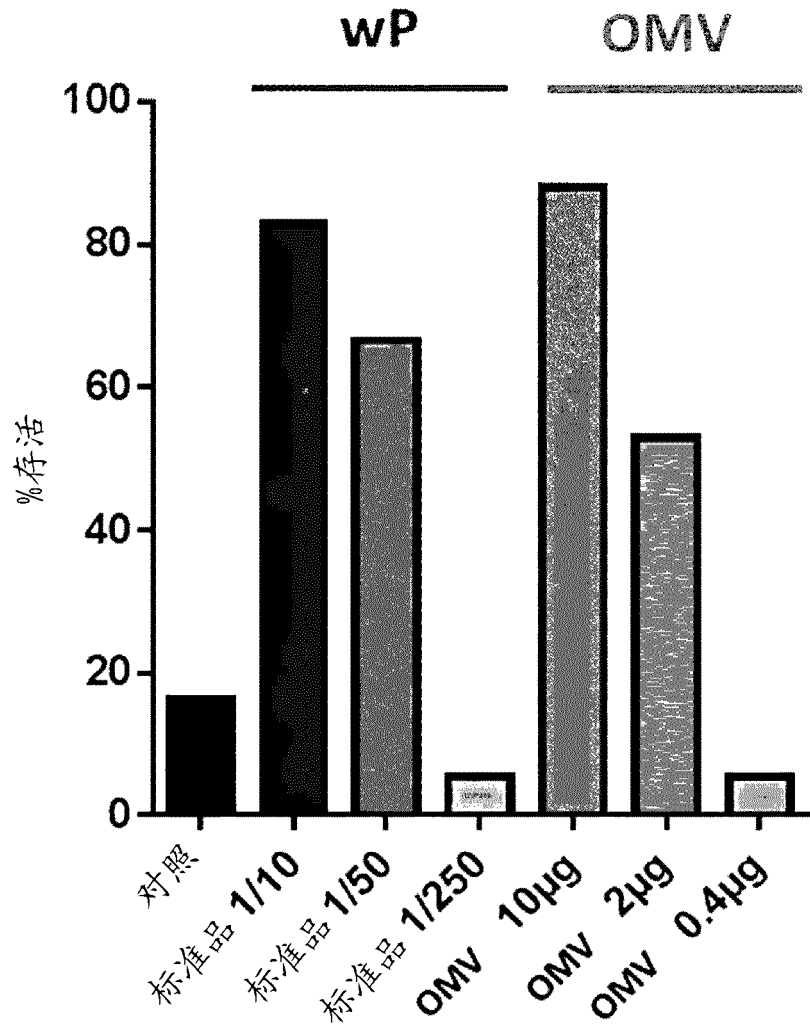


图 6

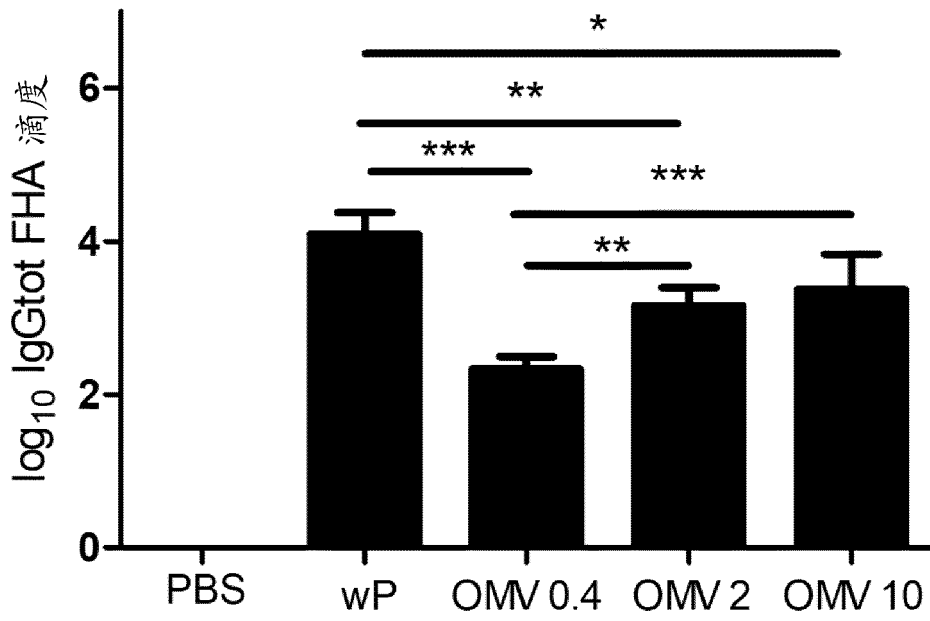


图 7(a)

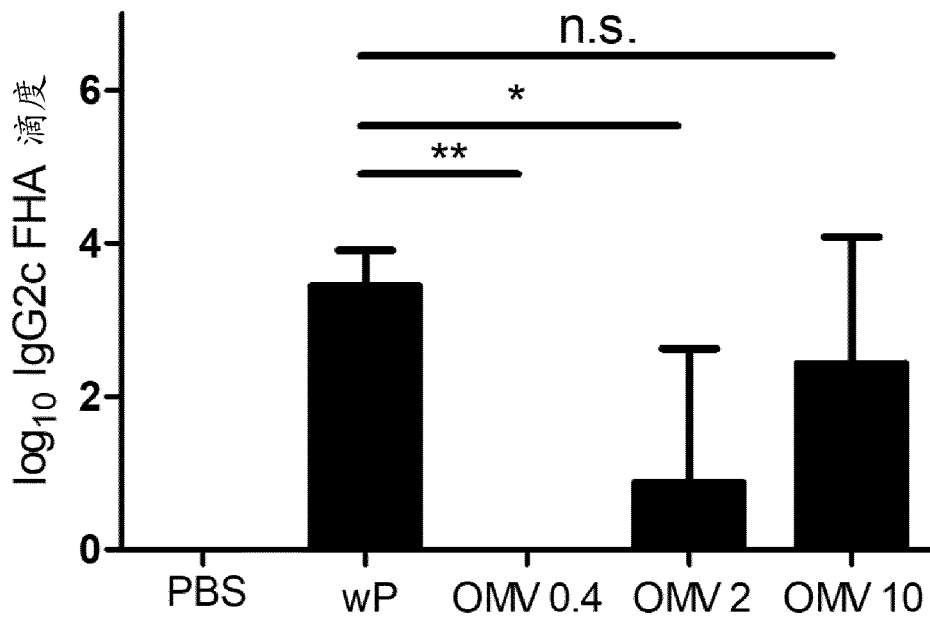


图 7(b)

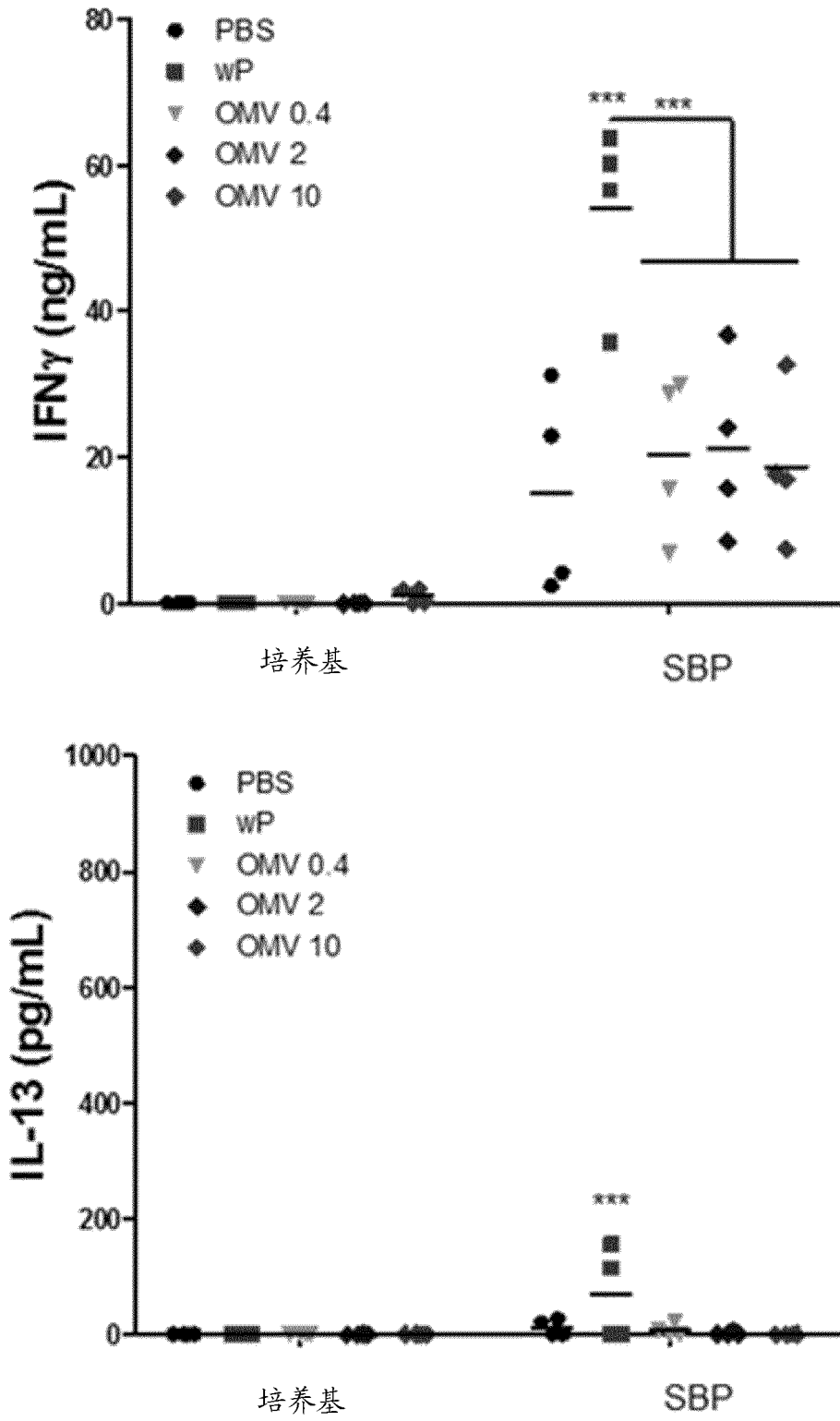


图 7(c)

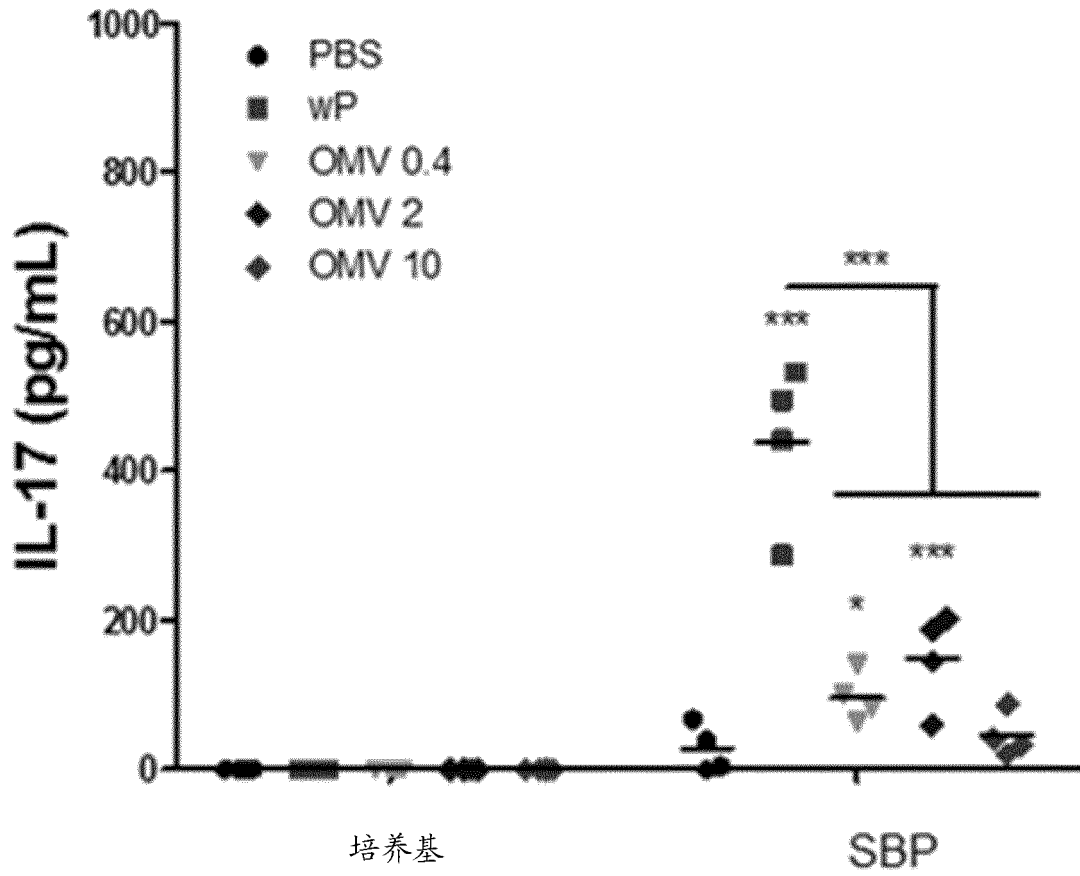
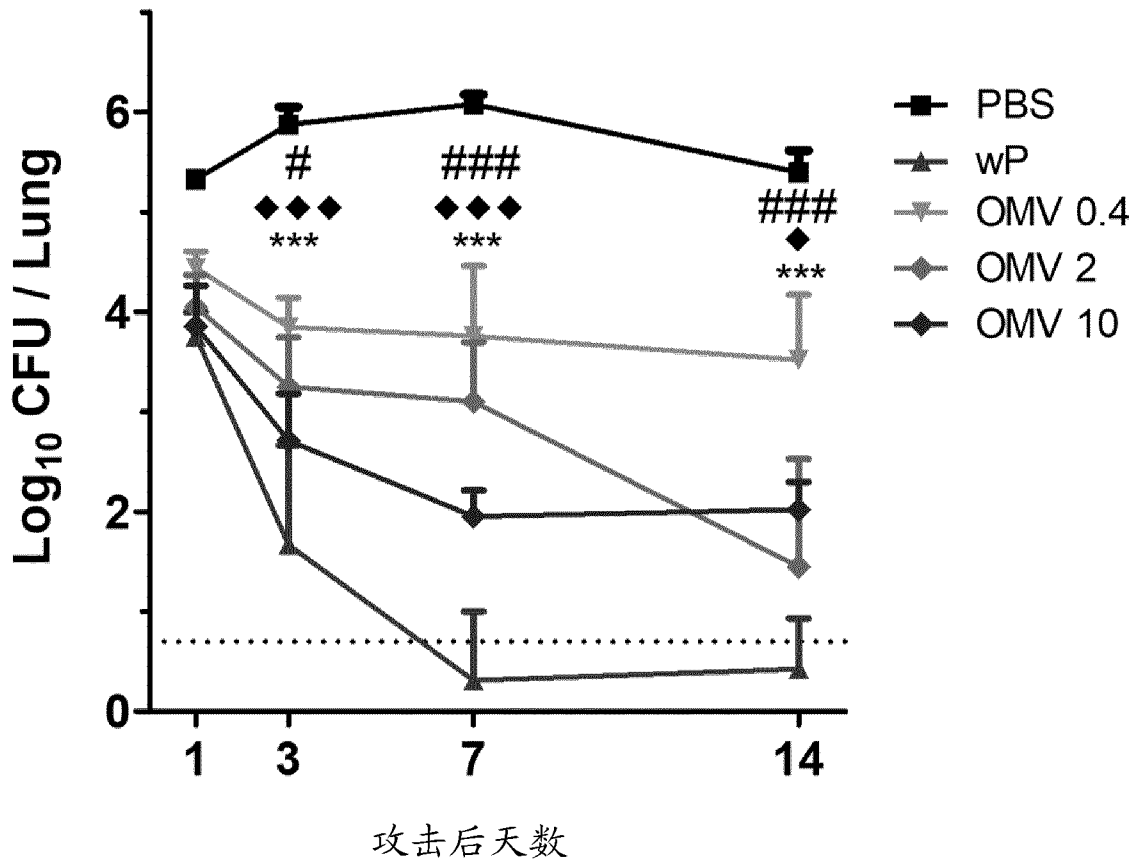


图 7(c) (续)



曲线下面积:

| PBS | wP | OMV 0.4 | OMV 2 | OMV 10 |
|-------|-------|---------|-------|--------|
| 75.25 | 11.94 | 48.93 | 35.89 | 29.77 |

图 8

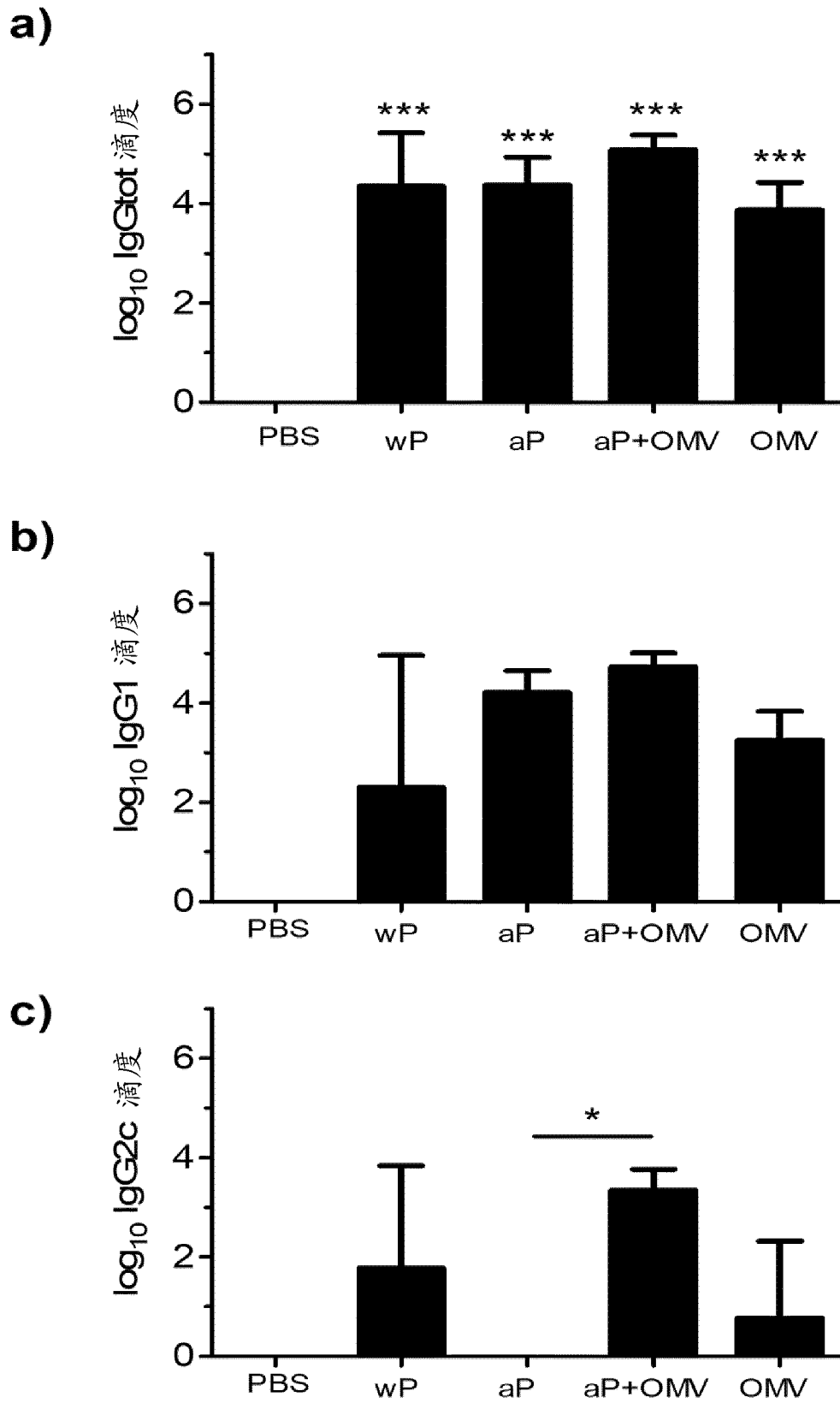
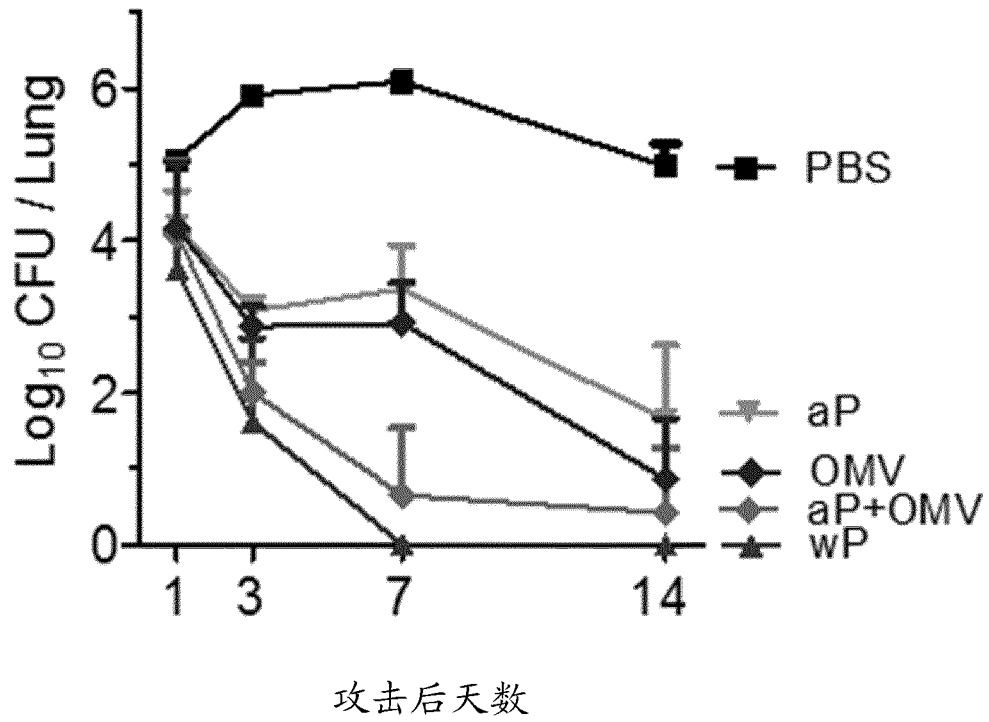


图 9



曲线下面积:

| PBS | wP | aP | aP+OMV | OMV |
|-------|-------|-------|--------|-------|
| 73.73 | 8.479 | 37.72 | 15.17 | 31.83 |

图 10

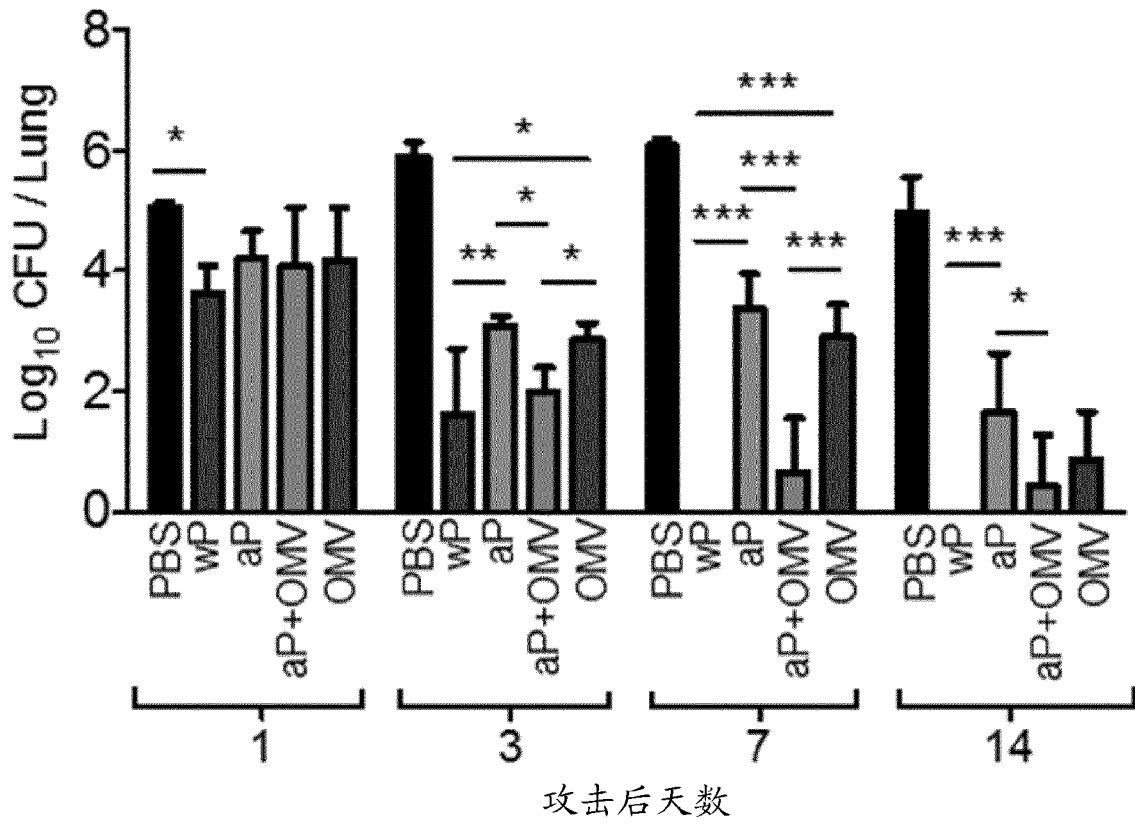


图 10(续)

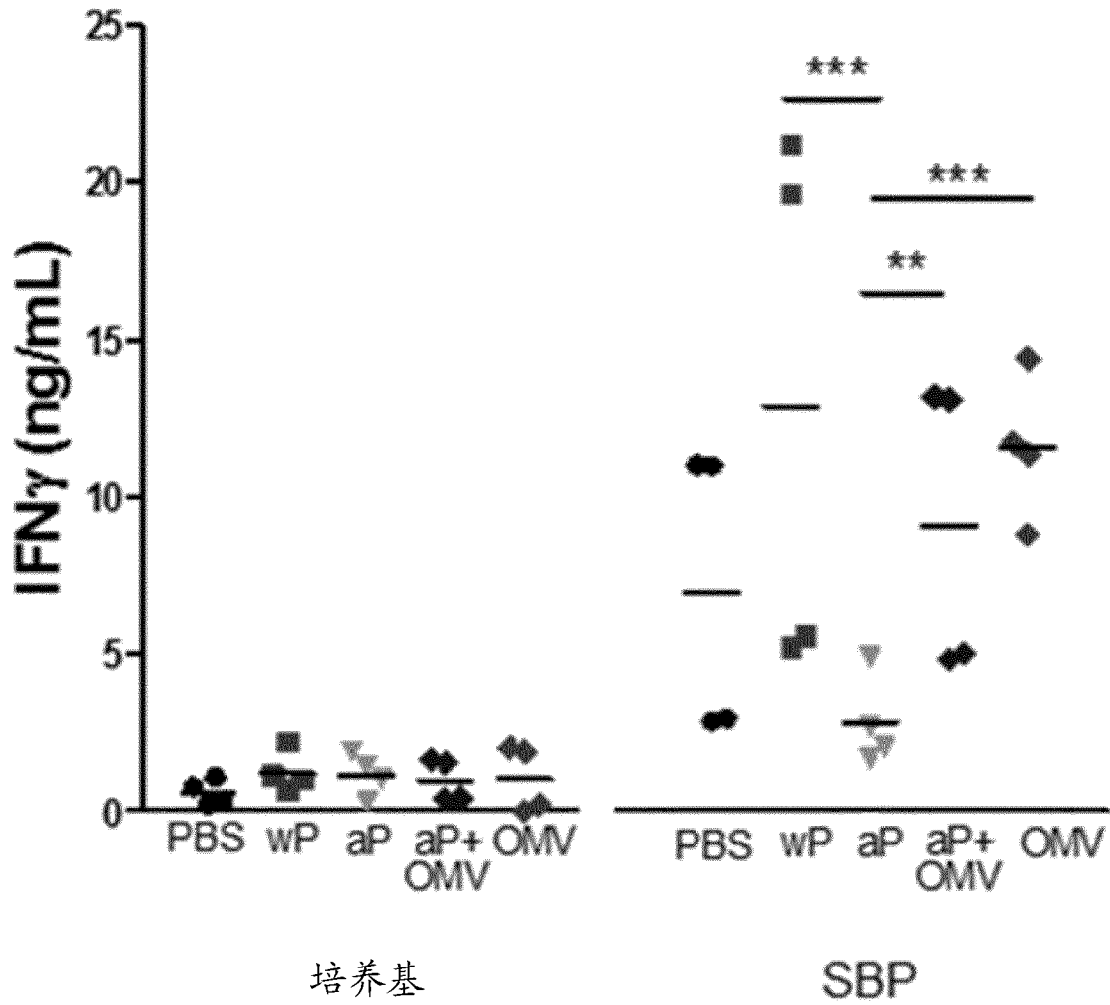


图 11

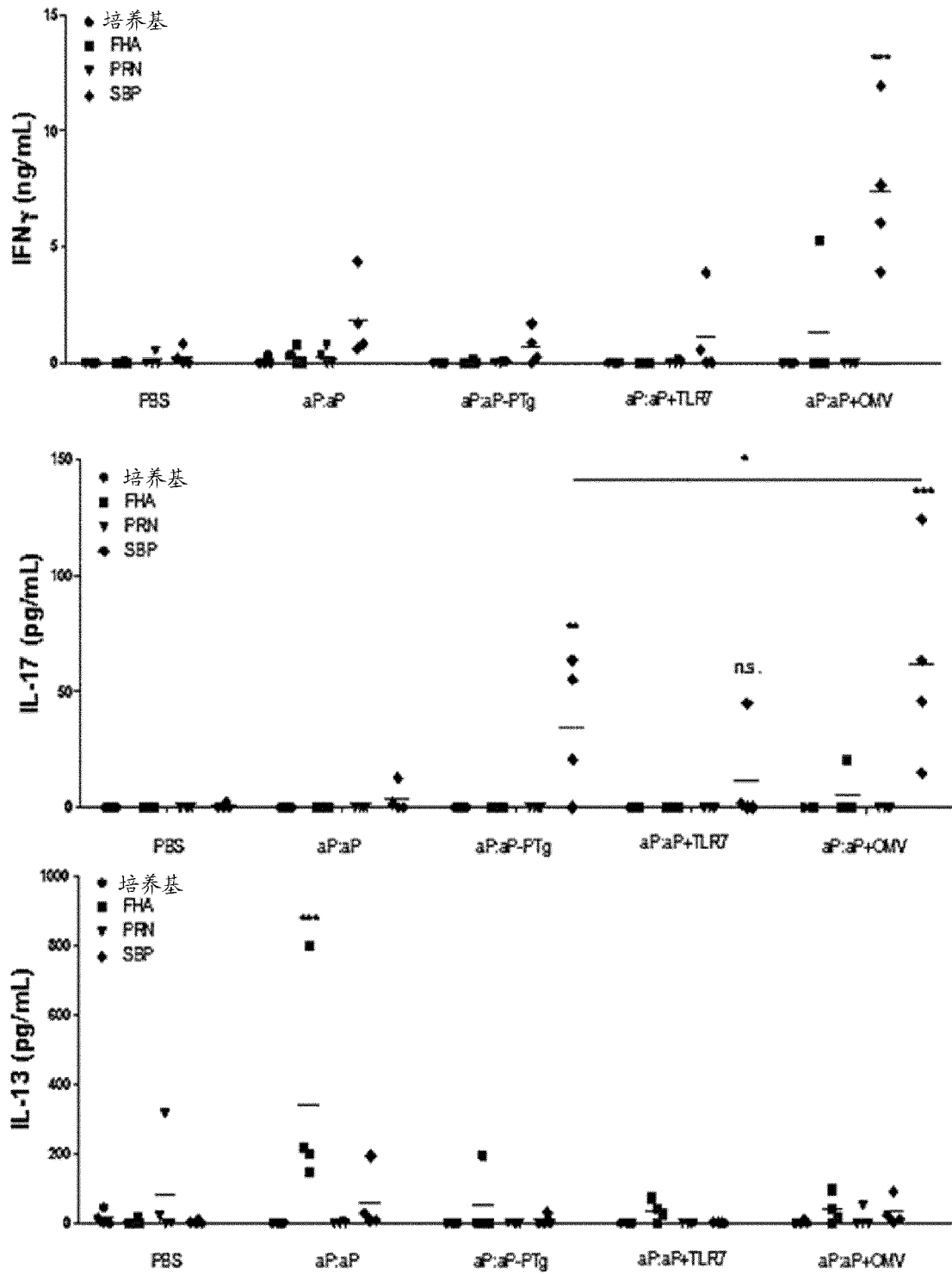


图 12