

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/39

A61K 39/02 A61K 39/015

//A61K39/09

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98813795.X

[43] 公开日 2001 年 2 月 21 日

[11] 公开号 CN 1284885A

[22] 申请日 1998.12.18 [21] 申请号 98813795.X

[30] 优先权

[32] 1997.12.24 [33] GB [31] 9727262.9

[86] 国际申请 PCT/EP98/08562 1998.12.18

[87] 国际公布 WO99/33488 英 1999.7.8

[85] 进入国家阶段日期 2000.8.24

[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 W·L·J·达勒曼斯

C·A·J·拉菲里雷

J·P·普里尔斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

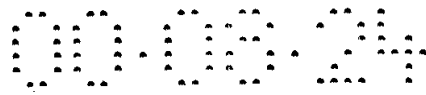
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 疫苗

[57] 摘要

本发明提供了含有免疫刺激物 CpG 寡聚核苷酸佐剂化的非 T 依赖性的或多糖缀合的疫苗制剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种含有 CpG 寡聚核苷酸和非 T 依赖性的 I 型或 II 型抗原或多糖缀合抗原的制剂。

2. 如权利要求 1 中所述的制剂，其中抗原选自非缀合的肺炎链球菌多糖、非缀合的脑膜炎球菌多糖、非缀合的沙门氏菌多糖、非缀合的 A 型或 B 型链状球菌多糖、分支杆菌多糖非缀合假单胞菌粘蛋白多糖或来自 HIV 的 TF-抗原，或来自沙门菌、霍乱菌、埃希杆菌、奈瑟菌、衣原体、志贺菌、百日咳菌、嗜血菌或假单胞菌的脂多糖或灭活的脂多糖，或疟原虫中的非 T 依赖性抗原。

3. 如权利要求 1 和 2 中所述的制剂，其中 CpG 脱氧核糖-或核糖-寡聚核苷酸具有核苷酸间连接，选自磷酸二酯键、二硫代磷酸酯键和硫代磷酸酯键。

4. 一种含有如权利要求 2 所述的一种 CpG 脱氧核糖-或核糖-寡聚核苷酸序列的制剂，权利要求 2 中含有两个被 7 个或更多的核苷碱基对隔开的 CpG 序列。

5. 如权利要求 4 中所述的一段脱氧核糖-或核糖-寡聚核苷酸，含有两个被 10 到 15 个核苷碱基对隔开的 CpG 序列。

6. 如本说明书所述的制剂，其中 CpG 寡聚核苷酸是选自如下组：

GCTACTGGTACG TACATTC AGACGGC TCTT

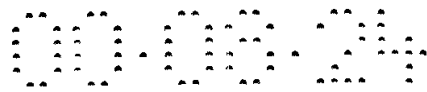
ACTATCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCT

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

TCT CCC AGC GTG CGC CAT

7. 如本权利要求书要求保护用于医药的疫苗组合物。

8. 一种诱导抗非 T 依赖性 I 型或 II 型抗原或多糖缀合抗原的方法，上述方法包括对患者施用如本权利要求书要求保护的安全有效剂量的制剂。



说明书

疫苗

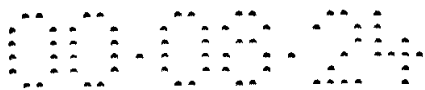
5 本发明涉及新的疫苗制剂，以及它们的生产方法和在医药中的应用。

含有没有甲基化的 CpG 二核苷酸 (“CpG”) 的免疫调控寡聚核苷酸是已知的 (WO 96/02555, Ep 468520)。CpG 是存在于 DNA 中的胞核嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸基序的缩写。在历史上，据观察 BCG DNA 片段可以发挥抗癌作用。进一步的研究显示，来源于 BCG 基因序列的合成寡聚核苷酸 (在体内及体外) 均可以诱导免疫刺激作用。这些研究的作者推断一些特定的回文序列，包括一个中心 CG 基序，具有这种活性 (Tokunaga, T. 等 微生物免疫学 Immunol. 36: 55 (1992))。后来 Krieg 对 CG 基序在免疫刺激中的重要作用进行了阐明 (自然 374 546 页 1995)。详细的分析显示 CG 基序所含有序列是微生物 DNA 中普遍存在的，但在脊椎动物 DNA 中却是罕见的。

最近认为，这种进化的区别使得脊椎动物的免疫系统可以检测到细菌 DNA 的存在 (如发生于感染时)，从而导致免疫系统的刺激。已经发现小到仅含 15 个核苷碱基的序列都具有免疫刺激活性 (Krieg, 等自然 374: 546 (1995))，而且 CpG 基序必须是没有甲基化的。据假定，寡聚物可能是六体形式的：嘌呤 嘌呤 C G 嘧啶 嘧啶，但这不是必须的。

肺炎链球菌是一种对人具病原性的革兰氏阳性细菌，它导致侵入性疾病，如肺炎、菌血症、髓膜炎，以及与建群有关的疾病，如急性中耳炎。人们对肺炎球菌传播到肺、脑脊液以及血液的机制知之甚少。细菌生长到达正常的肺泡是由肺泡的相对干燥以及肺泡巨噬细胞的噬菌活性所抑制的。这些协调防卫的任何解剖学或生理学的紊乱将增大肺感染的可能性。肺炎链球菌的细胞壁在肺泡产生炎症反应的过程中发挥着重要的作用 (Gillespie 等, I&I 65: 3936)。细胞壁成分的释放是在肺炎链球菌的生活周期的末期通过自身分解发生的，这是 N-乙酰基 muramoyl-L-丙氨酸酰胺酶 (lytA) 合成的结果。在肺炎球菌自身分解时，DNA 同时也释放到被感染的区域。

为了使有机体对入侵细菌具有有效的免疫应答，必须有一种机制可以对最可能停止感染的免疫应答类型进行协调。对于细胞内的病菌，这



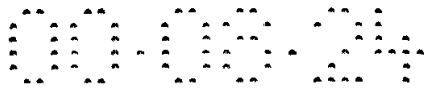
种协调发生于细胞介导的或体液的免疫应答之间，这些是受 Th1 和 Th2 型 T-细胞控制的。然而，细胞外的细菌通常使用一种以胶囊或脂多糖的形式存在的多聚糖来保护其自身不受血清补体的影响，血清补体可以溶解细菌，或者使其易受食菌细胞如巨嗜细胞或嗜中性粒细胞的影响。

5 在这种情形中，免疫应答遵循另一条途径，即非 T 依赖性免疫应答。非 T 依赖性免疫应答还可以进一步分为 I 型和 II 型。非 T 依赖性的 II 型抗原具有多糖类抗原的具体特征，包括分子量大，具有重复的抗原决定簇，能够激活补体级联，体内降解能力差，不能激活 MHCII 型依赖的辅助 T 细胞 (Mond 等免疫学年评 13: 655-92)。I 型抗原不同于多糖类，
10 它对 B 细胞的丝裂原促进作用，是由脂多糖 (LPS) 组成的。非 T 依赖性 II 型抗原不能刺激具有 X-连接的免疫 B 细胞缺陷的新生小鼠或 CBA/N 小鼠 (xid 小鼠) 的应答，而 I 型抗原却可以。

与 T 依赖性抗原 (如蛋白质) 相比，II 型抗原诱导较弱的抗体反应。蛋白质可以通过被加工成多肽及在 MHC II 型的存在下被呈递至 B 细胞
15 表面而激活 B-细胞并诱导抗体产生，使 B 细胞可以与 T 细胞相互作用并接受使 B 细胞达到最大增殖和成熟所需的附加信号。然而，在一些情况下寡聚糖与 MHC II 型结合 (Ishioka 等免疫学杂志 148: 2446-2451)，而脂质化的多聚糖显示出与淋巴细胞上的 CD1 结合，(Fairhurst, R.M. 等今日免疫学 19: 257 (1998))。对 II 型抗原呈递给 T 细胞的机制尚
20 未了解。

然而，多糖聚合体抗原的多重复的特性可以引起 B 细胞表面受体的交联，从而通过一种不需要 T 细胞的机制激活 B 细胞。因此多聚糖是不依赖于 T 的抗原，它们在动物和人的婴儿内的特征是产生 IgM 抗体，而且缺乏增强和免疫记忆。只有成人可以产生大量的针对大多数 (但不是
25 全部) 多聚糖抗原的 IgG 抗体。在婴儿或幼儿 (1.5 到 2 岁之间) 的 B 细胞中，转换抗体同型像为 IgG 的能力与补体受体 2 (CR2) 的出现同步，由此提供了 B 细胞活化和成熟所需要地方附加信号。

本发明一方面提供了一种可以增强对 T 非依赖性抗原的免疫应答的疫苗制剂。对于细菌的荚膜多糖，Ig G 的产生很重要，因为这种补体同
30 型像在对细菌防护的基本机制、补体调节的溶胞和调理性吞噬中最有效 (Maslanka 等 Clin Diag Lab Immunol 4: 156-67, 及 Romero-Steiner 等 Clin Diag Lab Immunol 4: 415-22)。



依据本发明，提供了一种含有一种有免疫刺激性的寡聚核苷酸佐剂化的多聚糖抗原的疫苗复合物。

多聚糖抗原可能未缀合或缀合有一种载体蛋白，从而提供了 T-辅助细胞的抗原决定簇。

5 该寡聚核苷酸可以为 DNA 或 RNA，但优选的为含有一个六聚体基序：嘌呤 嘌呤 CpG 嘧啶 嘧啶。更优选的是核苷酸间键经过修饰以提高寡聚核苷酸的稳定性。优选的修饰是硫代磷酸酯联接。参与肺炎球菌细胞壁的接触降解的 *lytA* 蛋白在自分解的时候产生，它属于感受态诱导的操纵子的一部分（分子微生物学 29: 1125（1998））。根据定义，编
10 码 *lytA* 的 mRNA 在 *lytA* 蛋白合成的过程中应大量存在。此外，*lytA* 含有磷酸胆碱的结合区域，该区域含重复的 DNA 序列（Yother 和 Brites 细菌学杂志 174: 601（1992）），该序列在链球菌的许多其他胆碱结合蛋白中都有发现。以下的 CpG 序列是从 *lytA* 的磷酸胆碱结合区域和胆碱结合蛋白 A 中鉴定的（Rosenow 等，分子微生物学 25: 819-829
15（1997））。

寡聚 1: GCTACTGGTACG TACATTC AGACGGC TCTT (*lytA*)

寡聚 2: ACTATCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCT (*cbpA*)

20 可以用于本发明中。

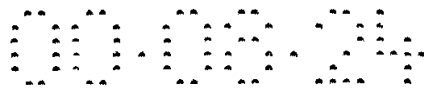
以下的寡聚核苷酸的免疫刺激序列也构成了本发明的优选形式。

寡聚 3: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

寡聚 4: TCT CCC AGC GTG CGC CAT

25 CpG 及其侧翼序列下已被划线，其中有保守的 ACGT、ACG 和 GCG 基序。从肺炎球菌蛋白的胆碱结合区域中得到的序列具有两个相隔 10 或 15 个重复核苷酸碱基的 CpG 基序，以这种在两个 CpG 之间的核苷酸碱基的距离为基础的基序在 *lytA* 和 *CbpA* 蛋白中分别出现 3 次和 5 次。然而，以发表的序列中的两个 CpG 基序相隔 7 或 2 个核苷酸碱基。

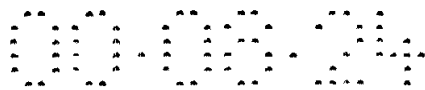
30 在一种实施方案中，当与商业上购得的 23 价的多糖疫苗（Pneumovax, Pasteur Merieux）结合时，CpG 佐剂在肌内施用时可明显增强免疫应答（IgG 抗体），尤其是对 19F 和 14 型多糖。



因此，有利的是，在本发明的一种实施方案中，增强商业上有用的肺炎球菌疫苗的效率是可能的。这对于高危人群特别重要，尤其是对多糖的抗体应答未达最佳的人群。这些人群可能包括，但不局限于，以下任何一种老年病人：脾切除、无脾、脾功能减退、镰状细胞病、循环的嗜中性白血球减少症、药物诱导的嗜中性白血球减少症、无形的贫血症、先天血中丙球蛋白贫乏、低丙种球蛋白血症、选择性 IgG 亚类不足、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血球过多症、淋巴瘤、人类免疫缺陷病毒感染、多因素病情如糖皮质激素治疗、营养不良、肝硬化、肾脏功能不全、糖尿病、酗酒、慢性病、住院、疲劳、压力、着凉、呼吸器官感染、流行性感冒、哮喘，可能也包括健康的成人如健康工人、军队新兵、囚犯，或其他包括学校人员或旅行者，这些需要确保足够疫苗量的人群。

在优选的应用下，当作为增强剂用于 6 到 24 个月之间的小孩（已经接受多价肺炎球菌多糖蛋白缀合物的初次免疫）时，CpG 佐剂用于增强对多糖疫苗的应答。当有 CpG 寡聚核苷酸作为佐剂时，这种疫苗用于初次免疫也是可能有效的。因此，在一种实施方案中，提供了一种免疫病人的方法，包括施用本发明中的有效剂量的疫苗。

在第二种实施方案中，本发明提供了一种增强以前对一种抗原易感的患者的免疫应答的方法，包括施用一种结合有 CpG 免疫刺激剂寡聚核苷酸的 T 依赖性抗原。依据本发明，CpG 佐剂可用于以其它多糖和 T 非依赖性抗原为基础的疫苗。这些包括，但不局限于，伤寒沙门菌属的 Vi 多聚糖疫苗、四价脑膜炎球菌多聚糖疫苗（包括 A、C、W135 和 Y 型）、B 组脑膜炎球菌的多糖和修饰过的多糖、金黄色葡萄球菌的多糖、无乳链球菌的多糖、分支杆菌如结核分支杆菌的多糖，如 mannophosphoinositides 海藻糖、霉菌酸、甘露糖戴帽的阿拉伯树胶酸甘露聚糖、其胶囊及阿拉伯半乳聚糖、新型隐球菌的多糖、未定型的流感嗜血菌的脂多糖、莫拉杆菌属（*Moraxella*）*catharralis* 的脂多糖、宋内志贺菌的脂多糖、克氏锥虫的脂肽磷多糖（LPPG）、与癌症相关的神经节苷酯 GD3、GD2、与肿瘤相关的黏液素，尤其是 T-F 抗原、和多涎 T-F 抗原、以及与人免疫缺陷病毒相关的结构上与 T-F 抗原相关的多糖。其它 T 非依赖性抗原可能来源于沙门氏菌、霍乱、埃希氏杆菌、衣原体，非 T 依赖性抗原来源于疟原虫。



疫苗制备的大致描述在药学生物技术, 第 6 卷中, 疫苗设计 - 亚单位和佐剂途径 (Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach), Powell 和 Newman 编著, Plenum Press, 1995. 如 Fullerton, 美国专利 4235877 号描述了包装在脂质体当中。如 Likhite, 美国专利 4372945 号和 Armor 等, 美国专利 4474757 号公布了将蛋白与大分子缀合。

选择每种疫苗剂量中蛋白的剂量, 使其可引起免疫防护应答, 同时没有典型疫苗明显不利的副作用。该剂量因所选择的特定免疫原和该免疫原的呈递方式而异。通常, 建议每份剂量含 0.1-1000 微克的多糖或多糖-蛋白缀合物, 优选的是 2-100 微克, 最优选的是 4-40 微克。对于一种特定疫苗的最佳剂量可以通过标准研究来确定, 包括观察患者体内适当的免疫应答。在初次接种疫苗之后, 患者可以以足够的时间间隔接受一种或几种增强免疫。

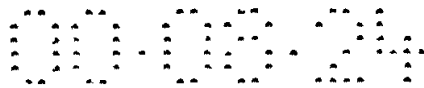
本发明中所使用的寡聚核苷酸典型的是脱氧核苷酸。在一种优选的实施方案中, 寡聚核苷酸中核苷酸间的连接是二硫代磷酸酯*, 或者更优选的是硫代磷酸酯键, 虽然磷酸二酯键仅也在本发明的范围内。也可使用其它可以稳定寡聚核苷酸的核苷酸间的连接。

本发明中所使用的 CpG 寡聚核苷酸可以通过任何本领域已知的方法 (如 EP468520) 来合成, 方便的是, 这种寡聚核苷酸可以通过使用一种自动化的合成仪来合成。生产硫代磷酸酯寡聚核苷酸或二硫代磷酸酯的方法在 US 5, 663, 153、US 5, 278, 302 和 WO 95/26204 中被描述。

实施例 1-小鼠中 23-价肺炎球菌多糖 CpG 佐剂化

防御肺炎球菌感染是通过针对荚膜多糖的 IgG 抗体来介导的, 同时伴随有补体沉积, 该补体使细菌易于被嗜中性粒细胞通过调理吞噬作用消灭。因此疫苗的防御效率可单独地以 IgG 抗体的诱导为基础来进行判断。给每组 10 只小鼠的群体用一种商业上的 23-价肺炎球菌多糖疫苗进行免疫, 剂量为人剂量的 1/10、1/50 或 1/250 (总多糖量分别为 57.7、11.5 和 2.3 微克), 同时有 CpG (50 微克的寡聚物 1)、CpG + 明矾作为佐剂。免疫之后, 通过酶联免疫吸附测定的方法测定血清中抗 4 种最重要的血清型多糖 (6B、14、19F 和 23F) 的 IgG 的浓度, 每 7 天测定一次, 持续 4 周。

材料与方法



以下组被免疫。（每组 10 只 balb/c 小鼠）：

23 价剂量为 2.3、11.5 和 57.5 微克（人剂量的 1/250、1/50 和 1/10）

23 价+ CpG（50 微克）在相同的剂量范围

23 价+ CpG + Al(OH)₃ 在相同的剂量范围

5

采用的组分

组分	批次	浓度 微克/毫升	缓冲液
来自 Pasteur Mérieux 的 23 价 (Pneumovax 23)	95K03-HC56630	1150	盐
CpG	寡聚物 3	5000	水
Al(OH) ₃	96A0089	10380	水

配制过程

将 Pneumovax 在水和 10 倍浓缩的 10 mM PO₄、150 mM NaCl pH6.8 中进行稀释，以获得每份剂量的抗原量为 2.3、11.5 或 57.7 毫克。CpG 加入持续 30 分钟，对于含有 Al(OH)₃ 的组，该制剂在任一 Al(OH)₃（50 微克）中吸附持续 30 分钟。硫柳汞（50 微克/毫升）作为防腐剂加入。

酶联免疫吸附测定

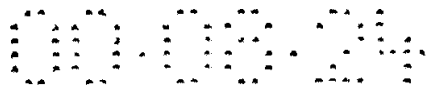
15 每组有 10 只动物，但由于采血是每隔一周进行一次，故每周仅有 5 只被采血。ELISA 和调理吞噬作用在汇聚血清中进行。

使用 ELISA 以测定鼠 IgG，采用世界卫生组织研讨会关于人血清中抗肺炎链球菌荚膜多糖的 IgG 抗体定量的 ELISA 过程的决议。大体上，纯化的荚膜多糖直接在微量滴度平板涂层。血清样品与细胞壁多糖一起预温育，该多糖为所有肺炎球菌所共有，它在依据 EP72513B1 所公布的方法纯化的肺炎球菌多糖中约占 0.5%。Jackson ImmunoLaboratories Inc. 的试剂被用于检测所吸附的鼠 IgG。将滴度曲线作为 logistic 对数方程建立的内部标准（单克隆抗体）的参考。通过 SoftMax Pro 软件进行计算。这些结果的最大绝对误差估计在因数 2 以内。其相对误差小于 30%。

25

结果

发现 IgG 同型抗体抗血清型 14 和 19G，但不抗 6B 和 23F，血清型



14 的结果示于图 1。应答为剂量依赖性，人剂量的 1/10 所给出的应答最强，这暗示着 IgG 应答对多糖具特异性。这是例外的，因为小鼠通常仅生成 IgM 以抗肺炎球菌多糖。应答高峰在免疫 14 天之后，这不是例外的，因为非 T 依赖性抗原不诱导记忆性。

5 进行附加的个体分析以确定变化和统计上的重要性（数据未列出）。当有 CpG 单独作为佐剂时，对人剂量 23-价的应答（统计学上）明显增加（对于 19 型，粒-巨噬细胞集落（GMC）0.8 比 3.7 微克/毫升 $p=0.07$ ；对于 14 型，粒-巨噬细胞集落 1.9 比 3.4 微克/毫升 $p=0.001$ ）。当用于测定抗 14 型时，这对于 1/50 和 1/250 的剂量也是正确的。另外，当
10 有 CpG+Alum 佐剂化时，对于 14 型的应答显著提高。

最高应答的诱导是当疫苗仅有 CpG 佐剂化时。

实施例 2-CpG 对幼年大鼠模型中四价肺炎球菌 PS-PD 缀合物免疫原性的佐剂化作用

15 选择幼年大鼠模型是因为已发表的数据显示在人婴儿中，其 4 种肺炎球菌多糖蛋白缀合物的相关免疫原性与大鼠更为相似（与小鼠相比）。对于幼年大鼠为 6B < 23F < 14 < 19F。选择幼年大鼠是因为它们的免疫系统发育不成熟，这与人婴儿中所发现的相似。

20 用临床等级的各种四价肺炎球菌多糖-PD^(a) 缀合物以 5 倍的剂量范围、同时有佐剂 CpG 和 AlPO₄+CpG 来免疫幼年大鼠。寡聚物 1 使用的剂量为 100 微克。当动物 7 天龄时进行第一次免疫，在 14 天和 28 天之后进行后继免疫。在第 42 天（第三次免疫后 14 天）和 56 天（第三次免疫后 28 天）对样本进行血清试验。

25 最佳的佐剂是单独的 CpG：它增加了 IgG 浓度的几何平均数*和 6B、23F 和 19F 的调理素滴度，然而对于血清型 14，其滴度量可以与其它佐剂化试剂相比。仅含 CpG 的制剂也可以明显增加向 6B-PD 血清型进行血清转化的速度。

材料和方法

疫苗组别

30 疫苗批号 DSP0401x 含有四价的 PS-PD 临床等级批号 D6BPJ208 + D14PDJ202 + D19PJ206 + D23PDJ212。ESPL001 含有四价的 PS-LPD 批号 E6BL040P + E14L66P + E19FL033P + E23FL21P。



组别	疫苗批号	佐剂	剂量 (微克每 PS)
1	无	CpG	
2	DSP0401x	无	0.1
3	DSP0401x	无	0.5
4	DSP0401x	AlPO4	0.1
5	DSP0401x	AlPO4	0.5
6	DSP0401x	AlPO4	2.5
7	ESPL001	AlPO4	0.1
8	ESPL001	AlPO4	0.5
9	ESPL001	AlPO4	1.25
10	DSP0401x	CpG	0.1
11	DSP0401x	CpG	0.5
12	DSP0401x	CpG/ AlPO4	0.1
13	DSP0401x	CpG/ AlPO4	0.5



使用组分

组分	批量	浓度 微克/毫升	缓冲液
缀合物 PD6B	D6BPDJ208	206	NaCl 0.2M pH 6.5
缀合物 PD14	D14PDJ202	186	NaCl 0.2M pH 6.5
缀合物 PD19	D19PDJ206	175	NaCl 0.2M pH 6.5
缀合物 PD23	D23PDJ212	158	NaCl 0.2M pH 6.5
单价 PD6B	D6BPDD208	100	NaCl 150mM pH 6.1
单价 PD14	D14PDD202	100	NaCl 150mM pH 6.1
单价 PD 19	D19PDD206	100	NaCl 150mM pH 6.1
单价 PD23	D23PDD212	96	NaCl 150mM pH 6.1
单价 LPD6B	E6BL040P	50	NaCl 150mM pH 6.1
单价 LPD14	E14FL66P	50	NaCl 150mM pH 6.1
单价 LPD 19	E19FL033P	50	NaCl 150mM pH 6.1
单价 LPD23	E23FL21P	50	NaCl 150mM pH 6.1
四价 LPD	ESPL001	5/原子价	NaCl 150mM pH 6.1
CpG	寡聚物 1, WD1001	5000	水
AlPO4	97D0045	5040	NaCl 150mM pH 6.1

配制过程

5

非吸附的四价物

这四种缀合物在水和 10 倍浓缩的 NaCl 150mM 中进行稀释。苯氧乙醇（500 微克/毫升）作为防腐剂加入。

如果需要 CpG，将该寡聚核苷酸加入非吸附的四价物中。当需要时，
10 等渗度和稀释由 NaCl 来确保。

吸附的四价物



在加入 AlPO₄ 补体之前，以水和 10 倍浓缩的 150mM NaCl 对这四种浓缩、吸附的单价物进行稀释。苯氧基乙醇（500μg/ml）作为防腐剂加入。

如果需要稀释，这些四价物在 AlPO₄ 中进行稀释，浓度为 1 毫克/毫升。这些稀释液在 NaCl 150 mM 中进行制备。

如果需要 CpG，将该寡聚核苷酸加入吸附的四价物中，等渗通过加入 NaCl 1500 mM 来确保，如果需要稀释，在 NaCl 中加入浓度为 1.3 或 1.8 毫克/毫升的 AlPO₄ 稀释液。

所有制剂均在非硅化的玻璃器皿中制备。

10 免疫方法

幼年大鼠随随机选自不同的母本，在 7 天龄时接受初次免疫。在 14 和 28 天之后接受后继的免疫。在第 42 天（第三次免疫后 14 天）和 56 天（第三次免疫后 28 天）时采血。所有疫苗均皮下注射，每个疫苗组中有 10 只大鼠。

15 酶联免疫吸附测定（ELISA）

使用 ELISA 以测定大鼠 IgG，采用的方法来源于世界卫生组织研讨会（WHO Workshop）关于“人血清中抗肺炎链球菌荚膜多糖的 IgG 抗体定量的 ELISA 过程”。大体上，纯化的荚膜多糖直接在微滴度平板上进行涂层。血清样品与细胞壁多糖一起预温育，该多糖为所有肺炎球菌所共有，它在纯化的肺炎球菌多糖中约占 0.5%。采用 Jackson Immunolaboratories Inc. 的试剂以检测所吸附的大鼠 IgG。将滴度曲线作为 logistic 对数方程建立的参考血清滴度曲线的参考。通过 SoftMax Pro 软件进行计算。通过系列应答的方法校准标准血清，这些值被证明与基于免疫沉淀（参考 21）所估计的 Ig 的浓度值一致。

25 调理吞噬作用

调理吞噬作用分析的进行是依据 CDC 方法（采用分化的 HL60 细胞进行肺炎链球菌调理吞噬作用，版本 1.1）。修饰包括使用内部的肺炎球菌的菌株，食菌细胞 HL60 被纯化的人多形核白细胞（PMN）取代。大鼠的多克隆血清作为阳性对照包括在内。

30 结果

图 2 显示了由在材料和方法中所描述的四价组合物所诱导的抗 6B 血清型的 IgG 浓度的几何平均数。为了清楚，将轴线以佐剂和剂量分开。



所获得的抗 19F 和 23F 血清型的结果与之类似，但 14 型对所有佐剂和剂量的应答较为一致。

5 通过调理吞噬作用测定从每种佐剂组别和剂量中获得的汇聚血清的生物活性。与 IgG 浓度相关的调理素的活性将给出抗血清功能活性的估计。如表 1 所示，数据显示所有佐剂诱导的抗体与 opsonise pneumococci* 具有类似功能。因此，CpG 佐剂化特异性抗体的产生，抗体浓度的提高与防御效率的提高相关。

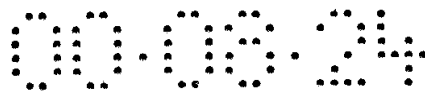
结论

10 · AlPO₄（与没有佐剂相比）明显提高血清转化速度、IgG 浓度的几何平均数、调理素的活性和对四价 PS-PD 的免疫记忆。

· 对于 AlPO₄ 中血清型 6B、19F 和 23F PS-PD 的缀合物，0.1 微克的剂量明显比 0.5 微克的剂量更具免疫原性。

15 · 与 AlPO₄ 相比，当偶联物疫苗有 CpG 佐剂化时，抗 6B、19F 和 23F 的 IgG 浓度明显增加。这是通过血清转化速度的提高和调理吞噬作用滴度的提高来确定的。

表 1. 通过血清型和佐剂进行比较的相关调理素活性（杀灭 50%肺炎球菌所需的 IgG 的浓度）

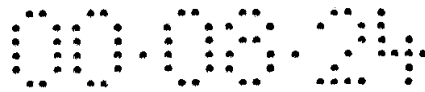


疫苗	佐剂	剂量	杀灭 50%所需的 IgG 浓度				按佐剂的平均值
			6B	14	19F	23F	
		微克					
DSP0401x	无	0, 1	0, 32	0, 30	0, 30	0, 37	0.26 ± 0.1 4
		0, 5	无值	0, 015	无值	无值	
DSP0401x	AlPO4	0, 1	0, 02	0, 31	0, 40	0, 09	0.20 ± 0.1 5
		0, 5	无值	0, 05	0, 22	无值	
		2, 5	无值	0, 32	#VAL	无值	
ESPL001	AlPO4	0, 1	0, 08	0, 46	无值	0, 22	0.35 ± 0.2 7
		0, 5	0, 11	0, 71	0, 75	0, 08	
		1, 25	0, 10	0, 55	0, 66	0, 20	
DSP0401x	CPG	0, 1	0, 42	0, 15	无值	0, 20	0.24 ± 0.1 0
		0, 5	0, 21	0, 30	无值	0, 17	
DSP0401x	CPG/ AlPO4	0, 1	0, 27	0, 10	无值	0, 21	0.20 ± 0.1 4
		0, 5	无值	0, 10	0, 44	0, 09	
平均			0.19 ± 0.1 4	0.29 ± 0.2 0	0.45 ± 0.2 0	0.18 ± 0.0 9	

实施例 3-在幼年大鼠模型中 CpG 对 11 价肺炎球菌 PS-PD 缀合物的佐剂化效应

5 实施例 2 显示与传统佐剂（含铝）相比，有 CpG 在缀合物疫苗中作为佐剂的效应级数提高 5 到 10 倍。为了确定这些效应是否依赖于寡聚序列、剂量或配制方法，进行了进一步的试验。

选择 CpG 寡聚物 2 并使用较低剂量，即 1 和 10 微克。它也被 Al(OH) 3 吸附，同时与缀合物疫苗结合。



另外，由于每种多糖的免疫特性不同，故测试了 11 种血清型。

材料和方法

表 2. 肺炎球菌 PS-PD 批量的选择

血清型	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F
批量编号	017	040	218	024	209	019	222	204	221	207	213

5

配制

为了检测不同的以上佐剂的作用，缀合物的剂量中含有每种多糖稳定的 0.1 微克，佐剂 $AlPO_4$ 、 $Al(OH)_3$ 和 CpG 以不同的剂量和结合配入其中。总共检测了 10 种不同的组合，包括完全没有佐剂。这些按编号列于表 3 中以供参考。

10

稀释液的制备

在 NaCl 150 mM/phenoxy 中制备两种稀释液

A: $AlPO_4$ 为 1 毫克/毫升

B: CpG 在 $Al(OH)_3$ 中分别为 200 和 1000 微克/毫升。质量比为 CpG/ $Al(OH)_3$ =1/5

15

吸附的十一价物的制备

将十一种浓缩的、吸附的 PS-PD 单价以正确的比例混合。加入补体 $AlPO_4$ 。如果需要，可加入 CpG (CpG 被 $Al(OH)_3$ 吸附) 或稀释液。

非吸附的十一价物的制备

将十一种 PS-PD 缀合物混合，并以正确的比例在 NaCl 150 mM pH 6.1, phenoxy 中稀释。如果需要，CpG 以溶液 (非吸附的) 或吸附在 $Al(OH)_3$ 中的形式加入。

20

所有注射液的制剂均是在初次施用的 18 天前配制。

表 3. 幼年大鼠中经 11-价肺炎球菌 PS-PD 检测的佐剂制剂简表



组别	A1P04	CpG	A1P04	描述
1				无
2	100			A1P04
3		1		CpG 低
4		10		CpG 高
5		1	4.5	吸附 CpG 低
6		10	50	吸附 CpG 高
7	100	1		CpG 低缓合吸附
8	100	10		CpG 高缓合吸附
9	95	1	4.5	CpG&缓合 吸附低
10	50	10	50	CpG&缓合 吸附高

免疫方法

幼年 OPA 大鼠随机选自不同的母本，在 7 天龄时接受初次免疫。在 14 天和 28 天之后对其进行两次附加的免疫。在 56 天时（第三次免疫后 28 天）采血。所有疫苗均皮下注射，每组疫苗 10 只大鼠。

酶联免疫吸附测定（ELISA）

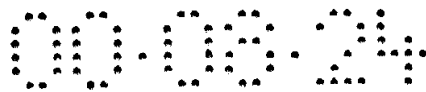
ELISA 的进行如实施例 2 中所述。

调理吞噬作用

调理吞噬作用分析是依据 CDC 方案（用分化的 HL60 细胞分析肺炎双球菌的调理吞噬作用，版本 1.1）进行的。修饰包括使用内部的肺炎球菌的菌株，食菌细胞 HL60 被纯化的人多形核白细胞（PMN）取代。另外，在微滴度池中加入 3 mm 的玻璃珠以促进混合，这允许了噬菌细胞：细菌比例的减少，其建议量为 400。

结果

以下表 4 到 7 显示在经过一种有不同 IgG 寡聚 2 制剂佐剂化的 11 价肺炎球菌 PS-蛋白 D 缓合物疫苗免疫之后，经对 4 种肺炎球菌血清型进行滴度确定所得到的 IgG 浓度几何平均数、血清转化速率和调理吞噬作用的算术平均数。与没有佐剂相比，对于所以血清型，10 微克的 CpG 可以诱导 IgG 浓度明显升高。对于血清型 1、6B、18C 和 19F，CpG 诱导的 IgG 浓度高于 A1P04。



为了比较，包括在表中的是从实施例 2 中使用寡聚 1 得到的结果。当寡聚 2 的使用量为 10 微克时，由这两种寡聚序列所诱导的 IgG 应答没有明显不同。然而，寡聚 2 为 1 毫克时没有显示免疫刺激作用，因为其诱导的 IgG 浓度与无 CpG 时没有显著不同。

5 寡聚 2 吸附于 Al(OH)₃ 上免疫刺激作用降低，抗体的诱导量与 AlPO₄ 作为佐剂没有明显不同。

表 4

10 在第三次用使用不同佐剂的 11 价 PS-PD 免疫大鼠之后第 28 天，血清型 6B 的 IgG 浓度几何平均数、血清转化和平均调理素滴度（与四价物免疫相比，实施例 2）

组别	AlPO ₄	寡聚 1 μg	寡聚 2 μg	6B GMC IgG μg/ml	6B 血清 转化	6B 调理素 滴度	6B GMC IgG μg/ml	6B 血清 转化	6B 调理素 滴度
				实施例 2			实施例 3		
1				0.047	2/10	12.5	0.004	1/10	<6.25
2	100			0.048	4/10	65	0.019	4/10	<6.25
3			1				0.003	1/10	<6.25
4			10				1.682	10/10	157
		100		0.63	8/10	48			
5			1μg, 于 Al (OH) ₃ 上				0.015	6/10	<6.25
6			10μg, 于 Al (OH) ₃ 上				0.007	3/10	<6.25
7	100		1				0.029	7/10	<6.25
8	100		10				0.469	9/10	77
	100	100		0.46	7/10	75			
9	95		1μg, 于 Al (OH) ₃ 上				0.040	5/10	38
10	50		10μg, 于 Al (OH) ₃ 上				0.022	7/10	<6.25

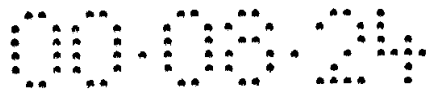


表 5.

在第三次用使用不同佐剂的 11 价 PS-PD 免疫大鼠之后第 28 天，血清型 14 的 IgG 浓度几何平均数、血清转化和平均调理素滴度（与四价物免疫相比，实施例 2）

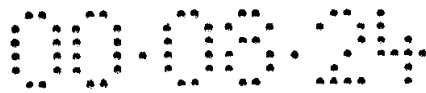
5

组别	AlPO4	寡聚 1 μg	寡聚 2 μg	14 GMC IgG μg/ml	14 血清 转化	14 调理素 滴度	14 GMC IgG μg/ml	14 血清 转化	14 调理素 滴度
				实施例 2			实施例 3		
1				0.046	3/10	64	0.022	3/10	<6.25
2	100			0.99	10/10	88	0.237	8/10	27
3			1				0.035	4/10	<6.25
4			10				0.361	10/10	88
		100		0.66	9/10	295			
5			1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.093	9/10	<6.25
6			10μg, 于 Al (OH) 3 上				0.155	9/10	27
7	100		1				0.134	7/10	<6.25
8	100		10				2.028	10/10	188
	100	100		2.3	10/10	888			
9	95		1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.140	6/10	138
10	50		10μg, 于 Al (OH) 3 上				0.196	10/10	<6.25

表 6

在第三次用使用不同佐剂的 11 价 PS-PD 免疫大鼠之后第 28 天，血清型 19F 的 IgG 浓度几何平均数、血清转化和平均调理素滴度（与四价免疫物相比，实施例 2）

10

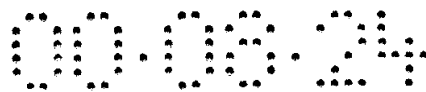


组别	AlPO4	寡聚 1 μg	寡聚 2 μg	19F GMC IgG μg/ml	19F 血清 转化	19F 调理素 滴度	19F GMC IgG μg/ml	19F 血清 转化	19F 调理素 滴度
				实施例 2			实施例 3		
1				0.04	2/10	64	0.021	2/10	<6.25
2	100			1.07	9/10	367	0.222	7/10	79
3			1				0.015	3/10	<6.25
4			10				4.287	10/10	415
		100		12.	10/1 0	>1600			
5			1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.417	9/10	32
6			10μg, 于 Al (OH) 3 上				1.612	9/10	94
7	100		1				0.441	10/10	135
8	100		10				9.475	10/10	>1600
	100	100		11.0	10/1 0	>1600			
9	95		1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.438	9/10	377
10	50		10μg, 于 Al (OH) 3 上				0.258	7/10	165

22

表 7

5 在第三次用使用不同佐剂的 11 价 PS-PD 免疫大鼠之后第 28 天, 血清型 23F 的 IgG 浓度几何平均数、血清转化和平均调理素滴度 (与四价免疫物相比, 实施例 2)



组别	AlPO4	寡聚 1 μg	寡聚 2 μg	23F GMC IgG μg/ml	23F 血清 转化	23F 调理素 滴度*	23F GMC IgG μg/ml	23F 血清 转化	23F 调理素 滴度*
				实施例 2			实施例 3		
1				0.06	2/10	<6.25	0.152	3/10	<6.25
2	100			0.29	10/10	70	0.56	8/10	<6.25
3			1				0.114	4/10	<6.25
4			10				1.305	9/10	192
		100		2.0	10/10	454			
5			1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.28	7/10	<6.25
6			10μg, 于 Al (OH) 3 上				0.107	2/10	<6.25
7	100		1				0.243	4/10	<6.25
8	100		10				1.545	9/10	862
	100	100		1.1	10/10	265			
9	95		1μg, 于 Al (OH) 3 上				0.255	3/10	44
10	50		10μg, 于 Al (OH) 3 上				0.331	6/10	<6.25

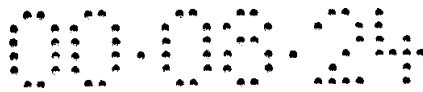
实施例 5 CpG 对经多糖-缀合物疫苗致敏之后用多糖加强和用多糖致敏的影响。

5 以上实施例已经证明了 CpG 佐剂化对非 T 依赖性抗原和伴随有蛋白载体的非 T 依赖性抗原的免疫应答的能力。剩下需考虑的是在经 T 依赖性抗原致敏之后, CpG 是否可佐剂化促进经一种非 T 依赖抗原增强的记忆应答。进一步的兴趣是确定 CpG 是否可在一种非 T 依赖性抗原的激发发挥作用。

10 为了确定这些作用, 使小鼠对肺炎球菌多糖、或 CpG 佐剂化的肺炎球菌多糖、或蛋白 D 的肺炎球菌多糖易感。

免疫方法

用以下所描述的疫苗制剂皮下免疫 6 到 8 周的成年 bala/c 小鼠。



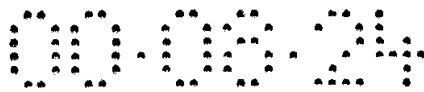
对于缓合和非缓合制剂每种多糖的剂量均为 1 微克。14 天以后进行血液测试以测定 IgG 的浓度。56 天以后，进行另一项血液测试，然后施用增强疫苗，最后的血液测试在 14 天以后进行，即在初次免疫的 70 天以后。

组别	致敏	加强
1	盐	缓合物
2	PS	PS
3	PS/CpG	PS
4	PS	缓合物
5	PS/CpG	缓合物
6	缓合物	PS
7	缓合物	PS/CpG
8	缓合物	缓合物

5

使用组分

组分	批量	浓度 μg/ml	缓冲液	吸附	吸附后 PS 浓度 μg/ml	吸附后 缓冲液
PS6b	6b/24	2000	NaCl 150mM			
PS14	14/19	2000	NaCl 150mM			
PS19	19f/26b	2000	NaCl 150mM			
PS23	23f/29	2000	NaCl 150mM			
缓合物 PDPS6B	D6BPDJ 209			MBSP 9801	100	NaCl 150mM pH6.1/phenoxy
缓合物 PDPS14	D14PDJ 204			MBSP 9801	100	NaCl 150mM pH6.1/phenoxy
缓合物 PDPS19	D19PDJ 204			MBSP 9801	100	NaCl 150mM pH6.1/phenoxy
缓合物 PDPS23	D23PDJ 204			MBSP 9801	100	NaCl 150mM pH6.1/phenoxy
CpG	寡聚 1	5000	水			
St Ph AlPO4 稀释液	97D0045				1000	NaCl 150mM pH6.1/phenoxy



配制过程

配制 4 种浓缩、吸附的单价物 (PS-PD 缀合物)

依据以上实施例 2 中所描述的过程制备浓缩、吸附的单价物。

5 制备四价物 (PS-PD 缀合物)

以正确的比例 (每价 1 微克/剂量) 混合四种浓缩、吸附的单价物, 并在 NaCl

10 pH6.1 中进行稀释。补体 $AlPO_4$ (10 微克/剂量) 以 1 毫克/毫升作为稀释剂加入 pH6.1、150mM、含有 5 毫克/毫升的苯氧乙醇的 NaCl 中。

制备非连接、非吸附、有或没有 CpG 的四价物 (游离 PS)

以正确的比例 (每价 1 微克/剂量) 混合四种游离 PS, 并在 NaCl

pH6.1 中进行稀释。如果需要, 可加入 CpG (100 微克/剂量)。作为防腐剂的苯氧乙醇的加入量为 5 毫克/毫升。

15 两种注射液的制剂均在初次施用的前 6 天、在非硅化的玻璃器皿中制备。

配制过程

制备 4 种浓缩、吸附的单价物 (PS-PD 缀合物)

依据以上所描述的过程制备这些浓缩、吸附的单价物。

20 制备四价物 (PS-PD 缀合物)

以正确的比例 (每价 1 微克/剂量) 混合四种浓缩、吸附的单价物。补体 $AlPO_4$ (10 微克/剂量) 以 1 毫克/毫升作为稀释剂加入 pH6.1、150mM、含有 5 毫克/毫升的苯氧乙醇的 NaCl 中。

制备非连接、非吸附、有或没有 CpG 的四价物 (游离 PS)

25 以正确的比例 (每价 1 微克/剂量) 混合四种游离 PS, 并在 NaCl

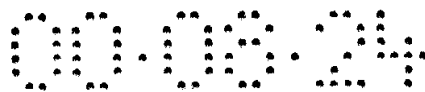
pH6.1 中进行稀释。如果需要, 可加入 CpG。作为防腐剂的苯氧乙醇的加入量为 5 毫克/毫升。

两种注射液的制剂均在初次施用的前 6 天、在非硅化的玻璃器皿中制备。

30 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

ELISA 的进行如实施例 1 中所述。

结果



本试验的结果是使致敏和加强。致敏的结果与前面的研究（实施例 1）中一致，即与简单的多聚糖相比，经有 CpG 佐剂化的多糖免疫的小鼠体内血清转化提高以及 IgG 浓度较高。如实施例 1 中所发现的，有 CpG 佐剂化的 14 型 IgG 浓度在统计学上明显高于单独的 PS，19F 型的增加接近明显。然而，有 CpG 佐剂化的 IgG 浓度没有如实施例 1 中那样高。解释这种不同，在这些试验中仅有两处不同，疫苗的效价（23 价比 4 价）和免疫途径（肌肉内比皮下）。由于效价的降低并不认为会降低免疫原性，该证据暗示着免疫途径对于最理想的有 CpG 佐剂化的抗原很重要。这与最近的一项公布一致，其公布了尝试使用 CpG 佐剂化一种简单的多糖疫苗的失败。其采用的免疫途径是腹膜间（Thredgill 等疫苗 1998 卷 16（1）第 76 页）。

	血清转化	GMC
PS 14	2/20*	0.07
PS14/CpG	12/20* δ	0.15
缓合物	24/30 δ	1.04
PS19F	1/20 ξ	0.08
PS19F CpG	4/20 $\xi\varpi$	0.10
缓合物	22/30 ϖ	0.35

*p = 0.001 Fisher's exact test

15 δ p = 0.11 Fisher's exact test

ξ p = 0.17 Fisher's exact test

ϖ p < 0.001 Fisher's exact test

在本试验的第二部分，用 PS、PS/CpG 或缓合物疫苗中的一种使动物致敏，用 PS、或用 PS/CpG 或用缓合物使动物加强。为使数据规范化以进行比较，在增强剂施用 14 天后确定 IgG 的增加级数，将呈现抗体浓度增加的动物作为应答者，计算其数目。

20



致敏	加强	几何学级数增加	阳性应答
PS	PS	1.7*	5/10
PS/CpG	PS	2.8*	6/10
缀合物	PS	0.78 ξ	1/10 δ
缀合物	PS/CpG	1.7 ξ	6/10 δ
缀合物	缀合物	4.2	7/10

* P= 0.09 Student's t-test

δ p = 0.12 Student's t-test

5 ξ p = 0.03 Fisher's exact test

讨论

本实施例确定了实施 1 中所提出的结果，但揭示了免疫模式对于最理想的免疫可能很重要。作为增强和记忆试验的扩展，本实施例证实了 CpG 佐剂的两个有趣的特性。第一个是用有 CpG 佐剂化的 PS 激发导致了
10 在多糖增强的基础上较高的级数增加，有达到统计学意义的趋势。这将暗示着 CpG 能够诱导较好的记忆。第二个特性是在经缀合物疫苗致敏的动物中，CpG 可以佐剂化由多糖诱导的记忆应答。

结论

15 CpG 能够小鼠中抗非缀合物多糖的抗体同型转换。有 CpG 的 IgG 应答数目较高。

说明书附图

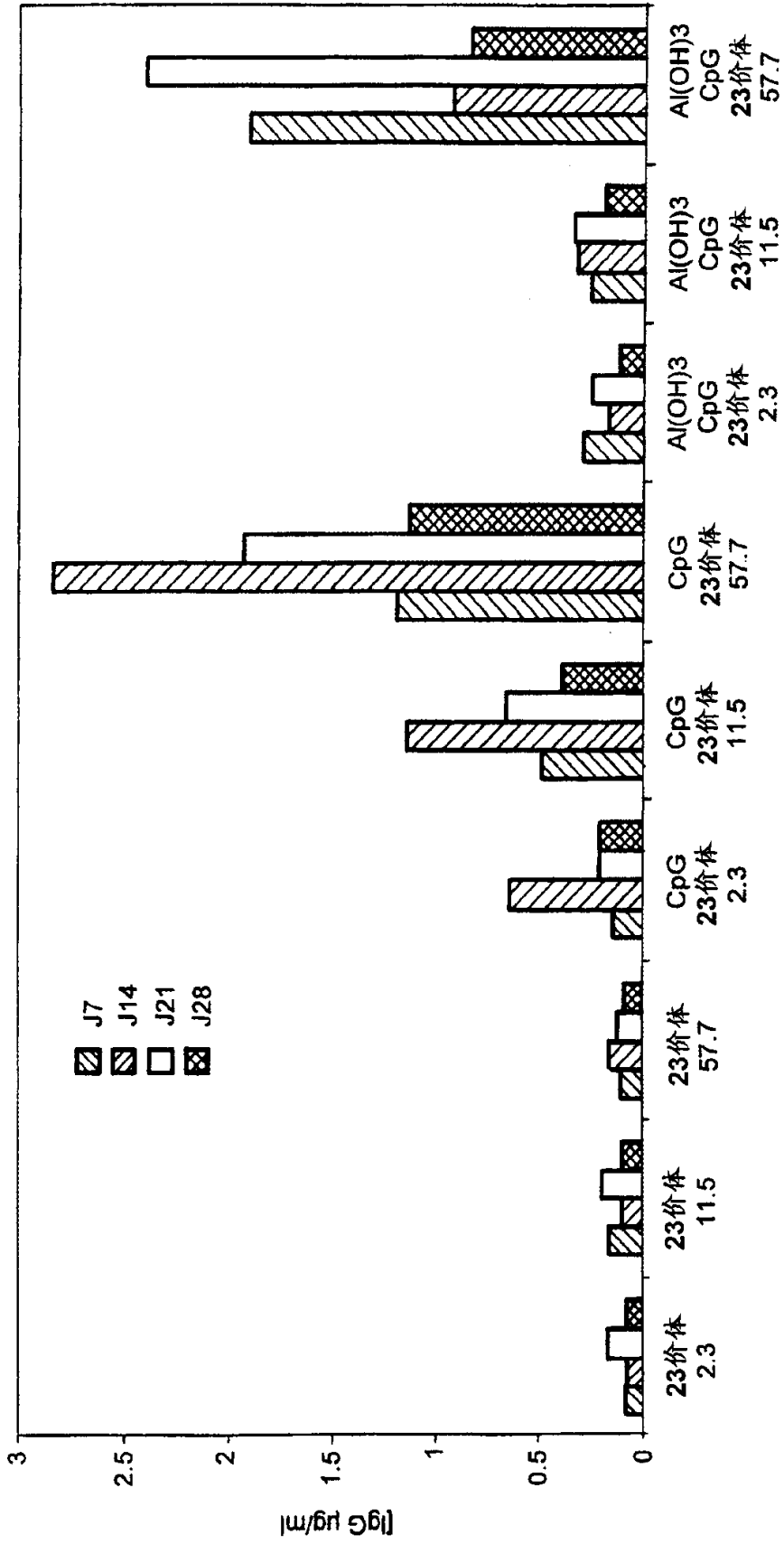


图 1 在血清中抗 PS14 IgG 水平 (7-28天) B45124a

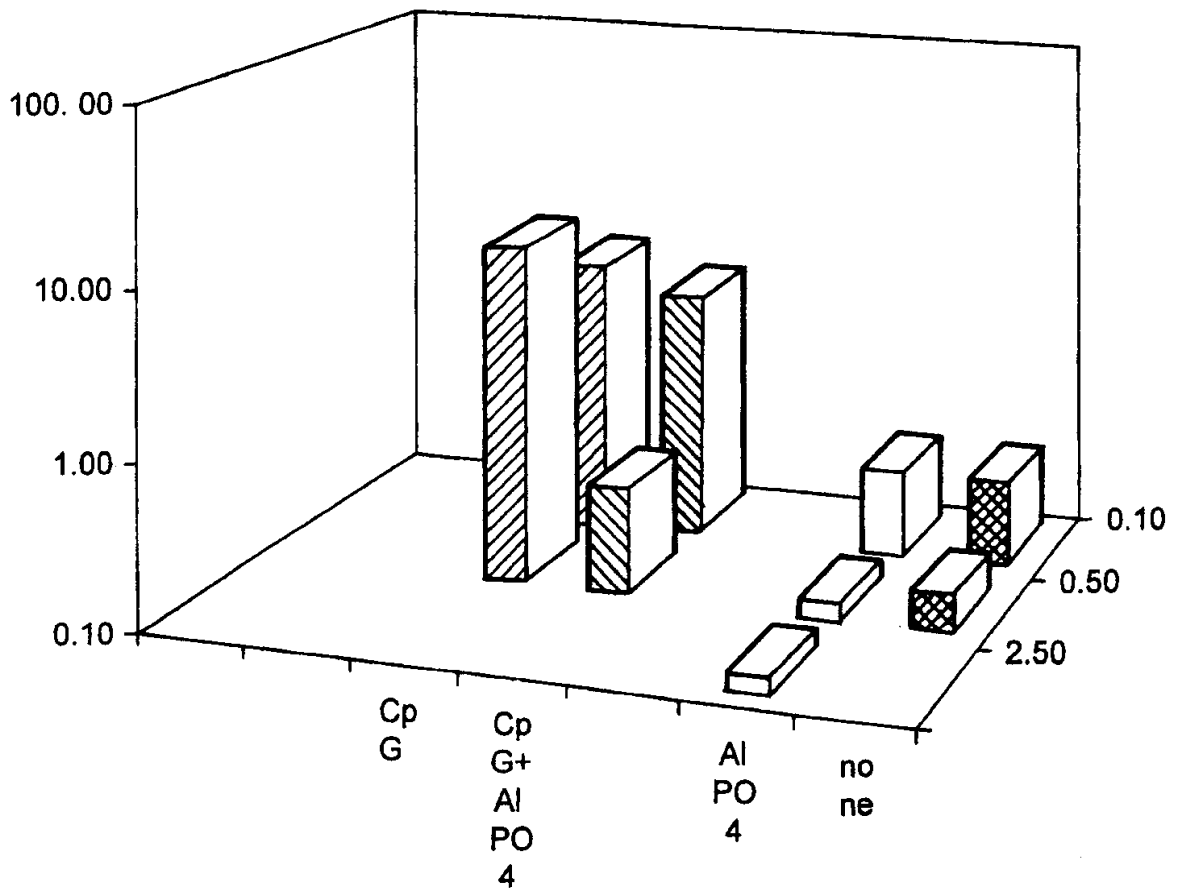


图 2 B45124a