

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/10

A61K 39/05 A61K 39/08

A61P 43/00

//A61K39/10, A61K39/05,

A61K39/08



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97199491.9

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1130226C

[22] 申请日 1997. 11. 4 [21] 申请号 97199491.9

[30] 优先权

[32] 1996. 11. 7 [33] GB [31] 9623233.5

[86] 国际申请 PCT/EP97/06180 1997. 11. 4

[87] 国际公布 WO98/19702 英 1998. 5. 14

[85] 进入国家阶段日期 1999. 5. 6

[71] 专利权人 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 P·弗罗伦特 J·斯特芬尼

C·范德卡瑟里

审查员 王 宏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 齐曾度

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 10 页

[54] 发明名称 带有白喉类毒素和破伤风类毒素的
无细胞百日咳疫苗

[57] 摘要

本发明提供了一种白喉、破伤风和百日咳疫苗，该疫苗含有各自为低剂量的白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)、百日咳类毒素(PT)、丝状血细胞凝集素(FHA)和 pertactin(69K)。该疫苗可维持一种预防百日咳的能力、同时又表现出罕见的低反应原性。本发明还提供了含有附加抗原的疫苗组合物。

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

1. 一种疫苗组合物, 包括白喉、破伤风和无细胞百日咳抗原和一种佐剂, 其中: 每 0.5 ml 剂量的批疫苗的白喉抗原浓度为 1 - 4 Lf; 每 0.5 ml 剂量的批疫苗的破伤风抗原浓度为 2.5 - 7.5 Lf; 且无细胞百日咳成分包括百日咳类毒素、丝状血细胞凝集素和百日咳杆菌黏附素; 其中每 0.5 ml 剂量的批疫苗的百日咳类毒素浓度为 2 - 10 μg ; 每 0.5 ml 剂量的批疫苗的丝状血细胞凝集素浓度为 2 - 10 μg ; 且百日咳杆菌黏附素的浓度在每 0.5 ml 剂量的批疫苗中 0.5 μg - 3 μg 的范围。

2. 一种根据权利要求 1 的疫苗组合物, 具有下列组成: 每 0.5 ml 剂量的批疫苗中有百日咳类毒素 8 μg 、丝状血细胞凝集素 8 μg 、百日咳杆菌黏附素 2.5 μg 、白喉抗原 2 Lf 和破伤风抗原 5 Lf。

3. 一种根据权利要求 1 或 2 中任意一项的疫苗组合物, 另外含有一种或多种附加的抗原。

4. 一种根据权利要求 3 的疫苗组合物, 其中附加的抗原是乙型肝炎表面抗原。

5. 一种根据权利要求 4 的疫苗组合物, 其中乙型肝炎表面抗原是 HBsAg 的 S-抗原。

6. 一种根据权利要求 3 的疫苗组合物, 其中存在的附加抗原可对 Hib、脊髓灰质炎或甲型肝炎感染中的一种或多种提供免疫性。

7. 一种根据权利要求 3 的疫苗组合物, 其中用于制品中的佐剂包括氢氧化铝。

8. 一种根据权利要求 3 的疫苗组合物, 其中用于制品中的佐剂包括磷酸铝。

9. 一种根据权利要求 1 中的一种疫苗组合物在制备用于预防儿童或青少年或成人受试者免受百日咳杆菌感染的药剂中的应用。

带有白喉类毒素和破伤风类毒素的无细胞百日咳疫苗

发明领域

5 本发明涉及新型疫苗制品，它包括低剂量的百日咳博德特氏杆菌的 69 kda 外膜蛋白质（下文称作‘69K’或‘69K 抗原’或百日咳杆菌黏附素(pertactin)，它公开在欧洲专利 0 162 639 中；重组 69K (P69) 已经由 N F Fairweather 等在 1990 年 9 月 26-28 日的“百日咳专题讨论会” (Bethesda) 上进行了描述)。本发明特别涉及一
10 种含有一种以上抗原的疫苗、尤其是一种多价疫苗，即：本发明特别涉及用于改善或治疗一种以上疾病情况的疫苗、其中存在低剂量的 69K。本发明还涉及这类疫苗的生产和在药物中的应用。

背景技术

15 公知 69K 是一种用于有效预防百日咳的无细胞百日咳疫苗 (Pa 疫苗) 的重要成分。

Keitel, W. 等于 1996 年 5 月在美国国家健康研究院 (NIH) 公布了在健康成人中进行的 5 种无细胞百日咳疫苗的剂量反应研究结果。

含有 69K 的疫苗包括“三价”疫苗，该疫苗包括抗白喉 (D)、破伤风 (T) 和百日咳 (Pa) 的抗原，该疫苗已经记载在意大利和瑞典进行的临床试验中并且该疫苗已经进行了销售 [例如商标名为 INFANRIX-DTPa (SmithKline Beecham Biologicals)]。一般来说，
20 这类疫苗的百日咳成分包括百日咳类毒素 (PT)、丝状血细胞凝集素 (FHA) 和 69K。在 INFANRIX-DTPa (商标名) 中，D : T : PT : FHA : 69K 的量一般为每 0.5 ml 剂量的批疫苗 25 Lf : 10 Lf : 25 μ g : 25 μ g :
25 8 μ g。

其它包括 69K 的多价疫苗也是公知的，例如 WO 93/24148 中记载了含有抗肝炎 B 的抗原和抗白喉、破伤风和百日咳的抗原 (Hep B、DTPa) 的疫苗。在这类制品中，每 0.5 ml 剂量的批疫苗中给出的 D :
30 T : PT : FHA : 69K 的量为 25 Lf : 10 Lf : 25 μ g : 25 μ g : 8 μ g。

发明描述

目前已经发现：一种含有各自为低剂量的白喉类毒素 (D)、破伤风类毒素 (T)、PT、FHA 和 69K 的白喉、破伤风和百日咳疫苗 (本文将这类低剂量的制品缩写为 dtpa 疫苗) 可维持一种预防百日咳的能力 (并且在这方面非常有效)、同时具有表现出罕见的低反应原性

的优点。在本文所述的限定范围内，当将这类疫苗给予人体受试体时是安全的，并且这类疫苗可诱发快速保护作用而免受感染。在含有 dtpa 和其它抗原的疫苗组合物中，已经发现没有干扰，即这类疫苗没有表现出免疫原性的损失、且当将它们给予人体时是有效的。

5 具体实施方式

本发明的疫苗特别适合于在预先给予一种或多种（一般最高约为 3）剂量的疫苗后作为加强剂量给予儿童，所述的预先给予的疫苗含有较高剂量的 D、T、和 Pa 抗原，诸如上述的 INFANRIX-DTPa 疫苗（每 10 0.5 ml 剂量的批疫苗中 D : T : PT : FHA : 69K = 25 Lf : 10 Lf : 25 μ g : 25 μ g : 8 μ g）。对于对成人和青少年进行给药来说，本发明的疫苗也具有很高的价值。

因此，本发明提供了一种包括各自为低剂量的抗原 D、T、PT、FHA 和 69K 的疫苗组合物（即 dtpa 疫苗组合物）。可以理解的是用一种合适的载体或佐剂来配制本发明的疫苗组合物。

15 所谓 dtpa 疫苗或 dtpa 疫苗组合物指的是：在一种剂量中每 0.5 ml 剂量的批疫苗的 D 浓度不超过 5 Lf 且优选 1 - 4 Lf、更优选约 2 Lf；每 0.5 ml 剂量的批疫苗的 T 浓度不超过 10 Lf 且优选 2.5 - 7.5 Lf、更优选约 5 Lf；每 0.5 ml 剂量的批疫苗的 PT 浓度不超过 10 μ g 且优选 2 - 10 μ g、更优选约 8 μ g；每 0.5 ml 剂量的批疫苗的 FHA 20 浓度不超过 10 μ g 且优选 2 - 10 μ g、更优选约 8 μ g；且 69K 的浓度为每 0.5 ml 剂量的批疫苗中不超过 4 微克且优选范围为每 0.5 ml 剂量的批疫苗 0.5 μ g - 3 μ g。在该疫苗中更优选的 69K 的浓度为每 0.5 ml 剂量的批疫苗 2 - 3 μ g、更优选约为 2.5 μ g pertactin。

25 在一个方面中，本发明的疫苗组合物可以在每 0.5 ml 剂量的批疫苗中（例如）包括（约）PT（2.5 μ g）、FHA（2.5 μ g）、69K（0.8 μ g）。

在一个优选的方面中，本发明的疫苗组合物在每 0.5 ml 剂量的批疫苗中包括（约）PT（8 μ g）、FHA（8 μ g）、69K（2.5 μ g）。

30 在一个特别优选的方面中，本发明的疫苗组合物在每 0.5 ml 剂量的批疫苗中包括（约）PT（8 μ g）、FHA（8 μ g）、69K（2.5 μ g）、D（2 Lf）和 T（5 Lf）。将这些内容用于下面报导的‘dtpa 005’研究中。

在另一个优选的方面中，本发明的疫苗组合物含有的 D 成分的量增加至 2.5 LF。

在一个进一步优选的方面中，dtpa 三成分疫苗组合物的组成如下：

- PT 8 μ g
- FHA 8 μ g
- 5 69K 2.5 μ g
- 白喉类毒素 \geq 2 IU
- 破伤风类毒素 \geq 20 IU
- Al 盐 0.3 mg
- 苯氧基乙醇 2.5 mg

10 将上述内容用于青少年中称作 ‘dtpa 003’ 的研究中，其结果列在下面。

可选择的是 PT 成分可以是重组的（例如欧洲专利申请 EP 0 306 318、EP 0 322 533、EP 0 396 964、EP 0 322 115 和 EP 0 275 689 中所述）或 PT 成分可以是类毒素样的、例如 EP 0515 415 中所述。
15 还参见 EP 0 427 462 和 WO 91/12020 中所述的百日咳抗原的制备的内容。

在一个进一步的方面中，本发明提供了一种包括 dtpa（如上文所定义）以及一种或多种附加抗原、特别是抗肝炎 B（Hep B）抗原的疫苗组合物（即一种 Hep B - dtpa 疫苗）。除将如上文所定义的各自为低剂量的 D、T、PT、FHA 和 69K 用于本制品中之外，这类多价疫苗
20 一般如 WO 93/24148 中所述。正如 WO 93/24148 中所述，优选的肝炎 B 抗原是乙型肝炎表面抗原。

乙型肝炎表面抗原的剂量一般在每 0.5 ml 剂量的批疫苗 5 - 20 μ g 的范围。

25 乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的制品已经充分公开。例如参见 Harford 等在《生物学标准研究进展》（Develop. Biol. Standard）54, 125 页（1983）、Gregg 等在《生物技术》（Biotechnology）5, 479 页（1987）、EP-A-0 226 846、EP-A-0 299 108 及其中的参考文献中所述。

30 本文中所用的表达的 ‘乙型肝炎表面抗原’ 或 ‘HBsAg’ 包括显示 HBV 表面抗原的抗原性的任意 HBsAg 抗原或其片段。可以理解的是：除 HBsAg 抗原的 226 个氨基酸序列外（参见 Tiollais 等，《自

然》(Nature), 317, 489 (1985) 及其中的参考文献), 如果需要, 本文所述的 HBsAg 还可以含有上述参考文献中和 EP-A- 0 278 940 中所述的全部或部分前-S 序列。本文所述的 HBsAg 还指的是变体, 例如 WO 91/14703 中所述的‘逃避突变体’。在另一个方面中, HBsAg 5 可以含有欧洲专利申请号 0 414 374 中所述的 L*蛋白质, 也就是说, 一种氨基酸序列由肝炎 B 病毒大(L)蛋白质(ad 或 ay 亚型)的部分氨基酸序列组成的蛋白质, 其特征在于蛋白质的氨基酸序列的组成如下:

(a) 所述 L 蛋白质的残基 12-52、随后是残基 133-145、随后 10 是残基 175-400; 或

(b) 所述 L 蛋白质的残基 12、随后是残基 14-52、随后是残基 133-145、随后是残基 175-400。

HBsAg 还指的是 EP 0198 474 或 EP 0 304 578 中所述的多肽。

HBsAg 一般是颗粒形式。它可以单独含有 S 蛋白质或可以作为复 15 合颗粒, 例如(L*, S), 其中 L*如上述所定义且 S 代表乙型肝炎表面抗原的 S 蛋白质。

优选如 W093/24148 中所述将 HBsAg 吸附在磷酸铝上。可以将其它抗原吸附在磷酸铝或氢氧化铝上, 而在某些情况下, 如果仅将其它抗原吸附在磷酸铝上也可以获得令人满意的结果。

20 正如 W093/24148 中所述, 在本发明的疫苗中可以包括其它抗原以提供其它多价疫苗而供儿童、青少年或成人使用。例如, 合适的所述其它抗原可以包括那些本领域公知的抗原以提供免受流感嗜血杆菌 b(Hib) 和/或脊髓灰质炎(IPV) 和/或甲型肝炎感染的保护作用。

用于这类疫苗中的合适成分已经是市售可得的且具体成分可以 25 从世界卫生组织中获得。例如, IPV 成分可以是索尔克灭活的脊髓灰质炎疫苗。可提供抗甲型肝炎的保护作用的成分优选是称作‘Havrix’ (SmithKline Beecham Biologicals) 的产品, 它是一种来源于 HAV 的 HM-175 菌株的杀死的减毒疫苗[参见: ‘用于甲型肝炎的灭活候选疫苗’, F. E. Andre, A Hepburn 和 E. D’ Hondt, 《病毒学药物研究进展》(Prog Med. Virol.) 第 37 卷第 72-95 页(1990) 30 和由 SmithKline Beecham Biologicals 公布的产品专论 ‘Havrix’]。便利的是, 肝炎 B 成分可以包括已经存在于商品疫苗 ‘Engerix-B’

(SmithKline Beecham Biologicals) 中的 'S' 抗原。

将每种疫苗剂量中抗原的量按照在典型疫苗中诱发非显著性免疫保护反应、不利的副作用的量进行选择。这类量随所用的特异性免疫原而改变。一般来说，预计每种剂量包括 15-50 μg 总免疫原。可以给予加强剂量的注射。在用含有完整细胞百日咳 (Pw) 的疫苗预处理的受试者中注射加强剂量的本发明疫苗与在用含有无细胞百日咳 (Pa) 的疫苗预处理的受试者中注射加强剂量的本发明疫苗同样有效。

一般来说，本发明任意方面的疫苗制品可以如下制备。将所需成分吸附在合适的佐剂上，最好是吸附在氢氧化铝或磷酸铝上。在使时间达到相应的成分全部且稳定吸附后，在适宜的条件下可以将不同的成分混合。

在制备本发明混合的含肝炎 B 的疫苗组合物的优选方面中，提供了一种方法，该方法包括将磷酸铝吸附的 HBsAg 与一种或多种氢氧化铝或磷酸铝吸附的抗原进行混合。

下面的实施例用于解释本发明：

实施例 1: dtpa 疫苗制品的制备和在成人中的研究

按照 WO 93/24148 中所述的用于配制较高剂量 DTPa 的工艺、通过标准方法来制备本发明的 dtpa 疫苗。

附图中列出了在编号为 'dtpa 005' 的成人临床研究中使用该疫苗获得的结果，其中 dtpa 用于表示本发明的疫苗且 PRN 是 pertactin (69K) 的缩略语。缩略语 dT 用于表示从含有较低剂量白喉类毒素和较高剂量破伤风类毒素的 Berhringwerke 中获得的标准白喉-破伤风疫苗。

在比利时，使用如上所述配制的 dtpa 对 60 位年龄为 18-45 岁的成人受试者进行开放式的、随机取样的单一剂量研究，并与使用 dT (Berhring) 的 60 位同年龄的受试者进行比较。

对 dtpa 组的 28 位女性 (平均年龄 33 岁) 和 32 位男性 (平均年龄 33 岁) 进行研究。对 dT 组的 32 位女性 (平均年龄 34 岁) 和 28 位男性 (平均年龄 35 岁) 进行研究。

排除在近 10 年内进行了白喉、破伤风或百日咳接种或在近 5 年

内患有百日咳病的那些受试者。

在 15 天后要求继续进行和 30 天后未要求继续进行的免疫接种之前和免疫接种后 1 个月获得血清。

在附图中列出了反应原性数据、抗体反应、抗 PT 结果、抗 FHA
5 结果和抗 PRN (pertactin) 结果。

在附图中，还列出了由 Keitel 等报导的 NIH (AAPT) 研究中所用的单价 pa 疫苗的结果。参照 SmithKline Beecham 的 (SB's) 高剂量、中剂量 (SB-Med) 和低剂量制品，其分别含有：PT (25 μg)、FHA (25 μg) 和 69K (8 μg) (高)；PT (8 μg)、FHA (8 μg)
10 和 69K (2.5 μg) (中)；PT (2.5 μg)、FHA (2.5 μg) 和 69K (0.8 μg) (低)。

缩略语 ' μg ' 代表微克。

可以看出本发明的 dtpa 疫苗在成人中是安全且致免疫的。此外，在成人中对本发明的候选疫苗的免疫反应看起来至少比预先给予美国、德国和意大利婴幼儿公知的较高剂量 DTPa 疫苗所观察到的免疫
15 反应高几倍。

实施例 2: 青少年中的研究 ('dtpa 003')

在芬兰，使用如上所述配制的 dtpa 对 120 位年龄为 10-12 岁的青少年受试者进行开放式的、随机取样的单一剂量研究，并与使用 dT (芬兰) 的 120 位同年龄的受试者进行比较。将同批本发明的 dtpa 疫苗既用于 dtpa 005 又用于 dtpa 003 研究。

市售可得 (芬兰) 的 dT 含有：白喉类毒素 ≥ 4 IU、破伤风类毒素 ≥ 40 IU

25 对 dtpa 组的 70 位女性 (平均年龄 10.9 岁) 和 49 位男性 (平均年龄 10.8 岁) 进行研究。对 dT 组的 62 位女性 (平均年龄 10.9 岁) 和 56 位男性 (平均年龄 11.0 岁) 进行研究。

本试验中包括的受试者在头两年内已经接受了达 4 个剂量的 DTPw。

30 从本研究中排除的受试者是那些在第二年后已经进行了 D、T 或 P 接种或有白喉、破伤风或百日咳病史的受试者。

在 15 天后要求继续进行和 30 天后未要求继续进行的免疫接种之

前和免疫接种后 1 个月获得血清。

在附图中列出了反应原性数据、抗体反应、抗 PT 结果、抗 FHA 结果和抗 PRN (pertactin) 结果。

从结果中可以看出本发明的 dtpa 疫苗在青少年中是安全且致免
5 疫的。

注意：在附图中，成人研究中 (dtpa 005) 和青少年研究中 (dtpa 003) 涉及抗体反应的结果表明了免疫接种前和免疫接种后免疫原性总体分析中所包括受试者的各个抗白喉和抗破伤风抗体滴度的分布 ($> - 0.1$ IU/ml 是为保护作用而测定的间隔滴度)。另外给出的是以 IU/ml 表示的抗白喉和抗破伤风抗体滴度几何均数。
10

说明抗 PT、抗 FHA 和抗 PRN 滴度的 dtpa 005 和 dtpa 003 研究的附图表明了免疫原性总体分析中所包括受试者的疫苗反应率 (用受试者-n-总数的 % 表示) 和疫苗成分 PT、FHA 和 PRN 抗体滴度几何均数 (GMT, 用 IU/ml 表示)。
15

实施例 3: Hep B - dtpa 疫苗的制备

除将如上文所定义的低剂量 D、T、PT、FHA 和 69K 用于制成 0.5 ml 剂量的批疫苗外，完全按照 WO 93/24148 的实施例 5 中所述来制备该制品。

20 在一种优选的组合物中，dtpa 的量约为下列数据：每 0.5 ml 剂量的批疫苗中 PT (8 μ g)、FHA (8 μ g)、69K (2.5 μ g)、D (2 Lf) 和 T (5 Lf)。

在另一种优选的组合物中，D 的量增加至 2.5 Lf。

25 疫苗组合物中乙型肝炎表面抗原的量可以在 5 - 20 μ g 之间改变且一般为每 0.5 ml 剂量的批疫苗中有 10 μ g。

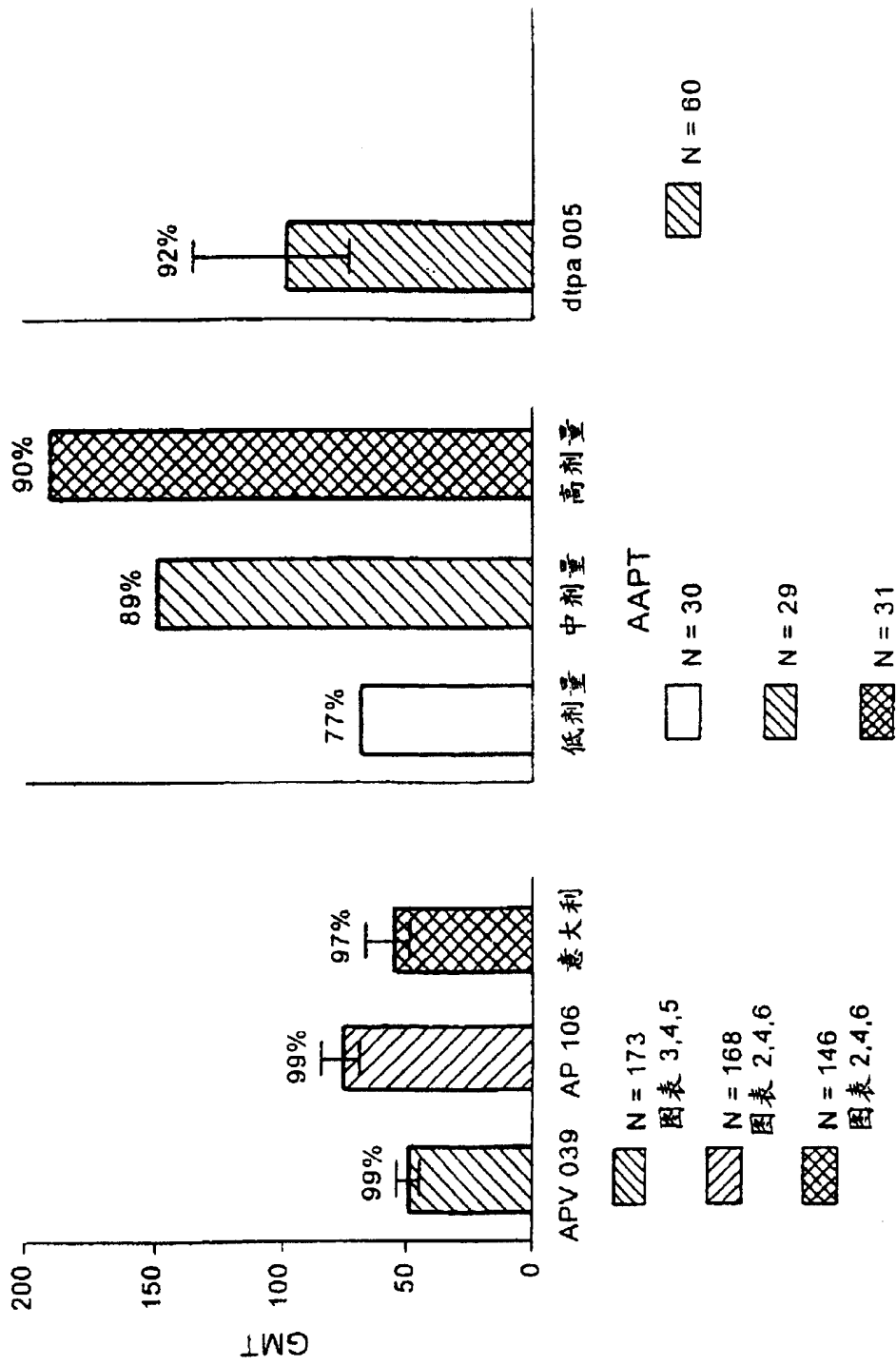


图 1 抗 PT 结果

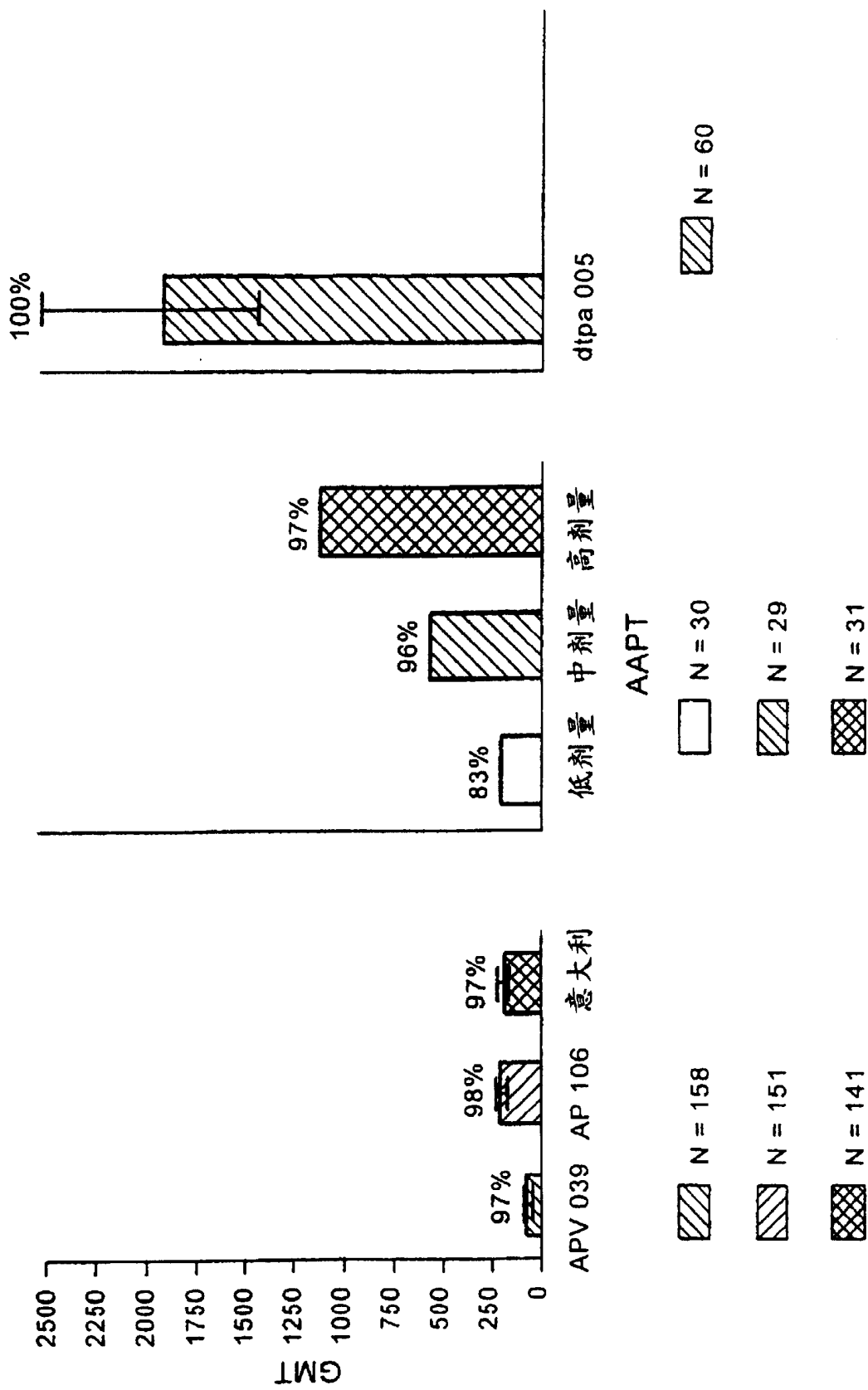


图 2 抗 FHA 结果

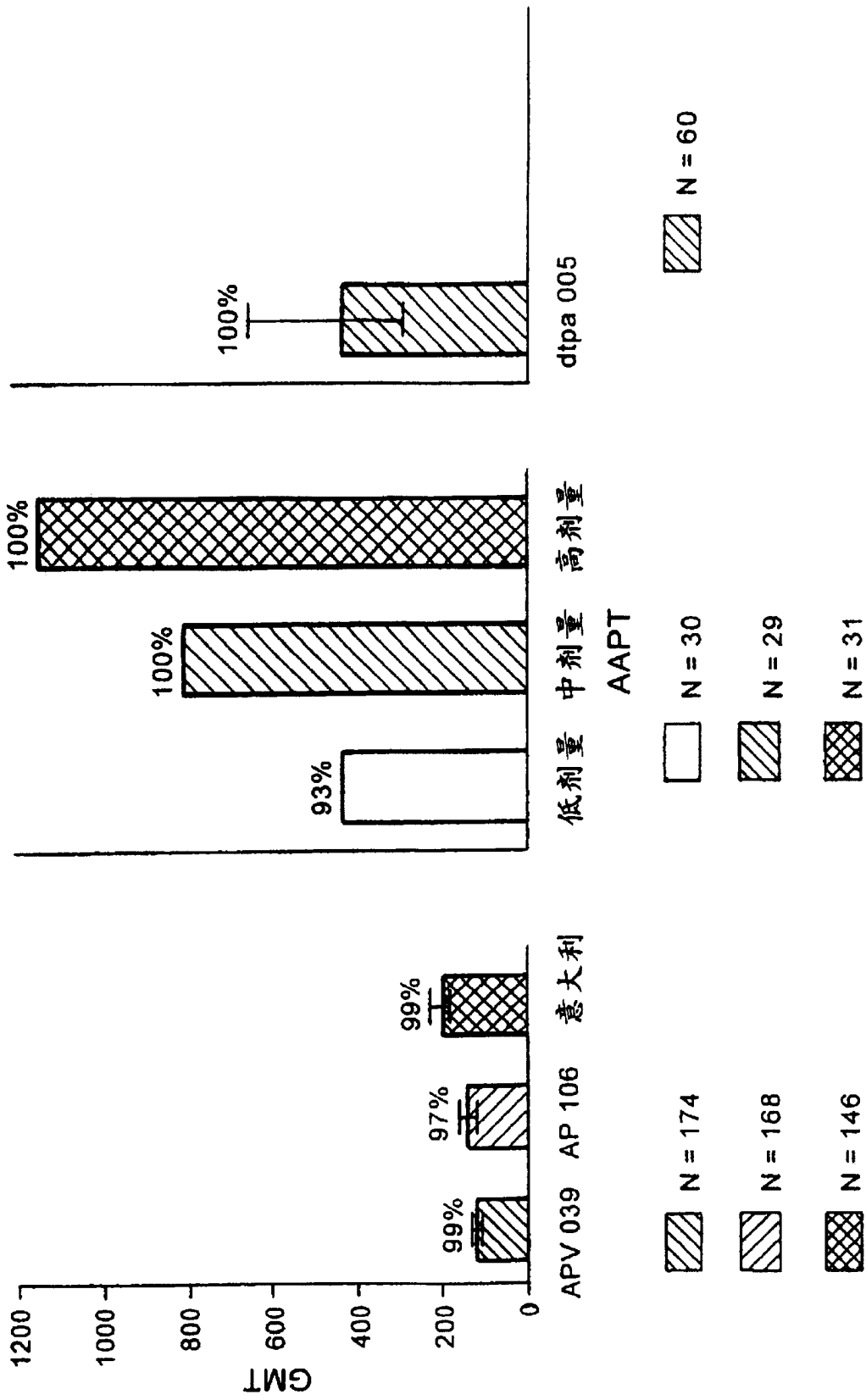


图 3 抗 PRN 结果

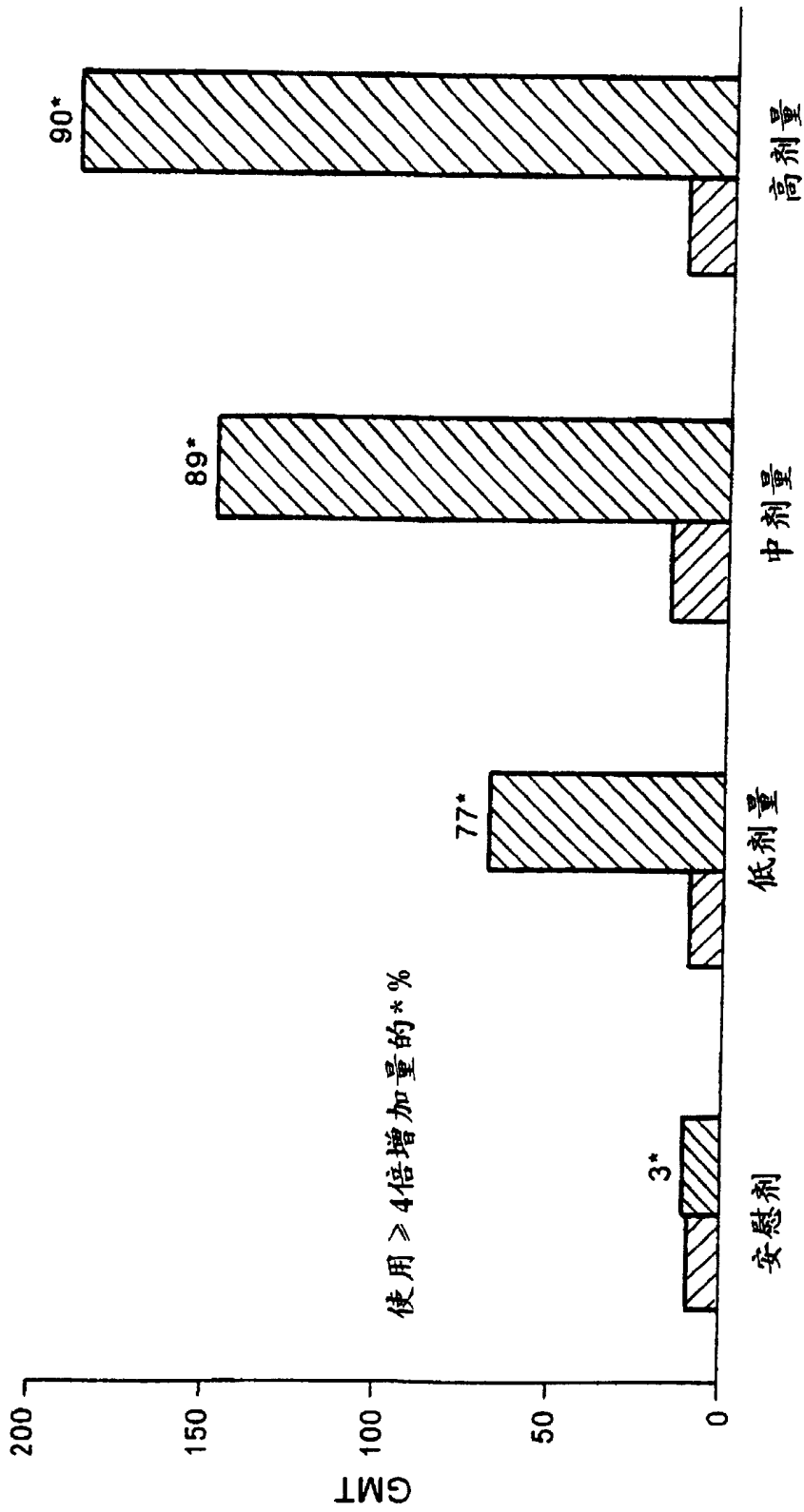


图4 抗PT结果
用SB“单价”Pa-AAPT免疫接种后血清前和后抗体反应, 1996

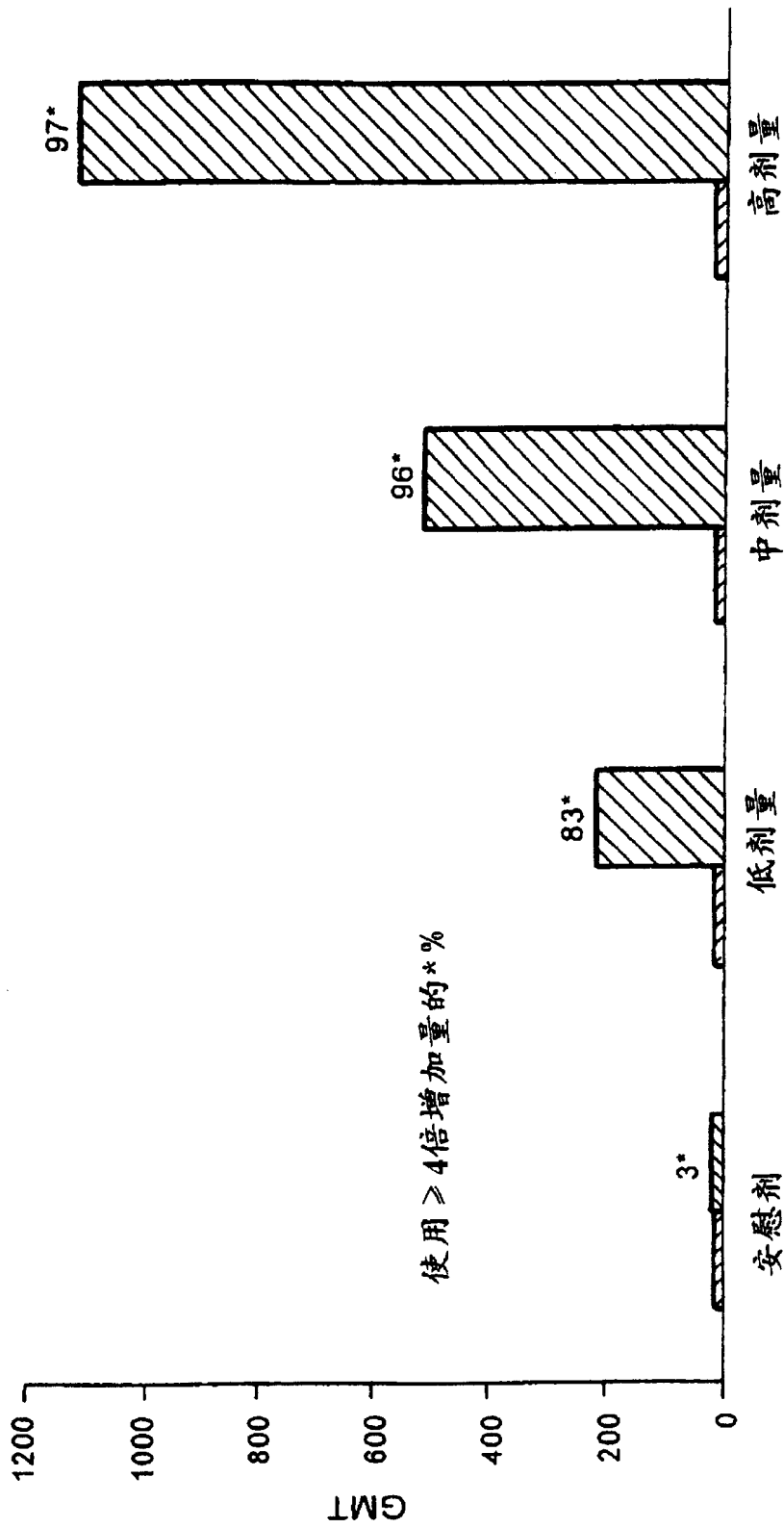


图 5 抗 FHA 结果
血清前和后抗体反应 (持续) AAPT, 1996

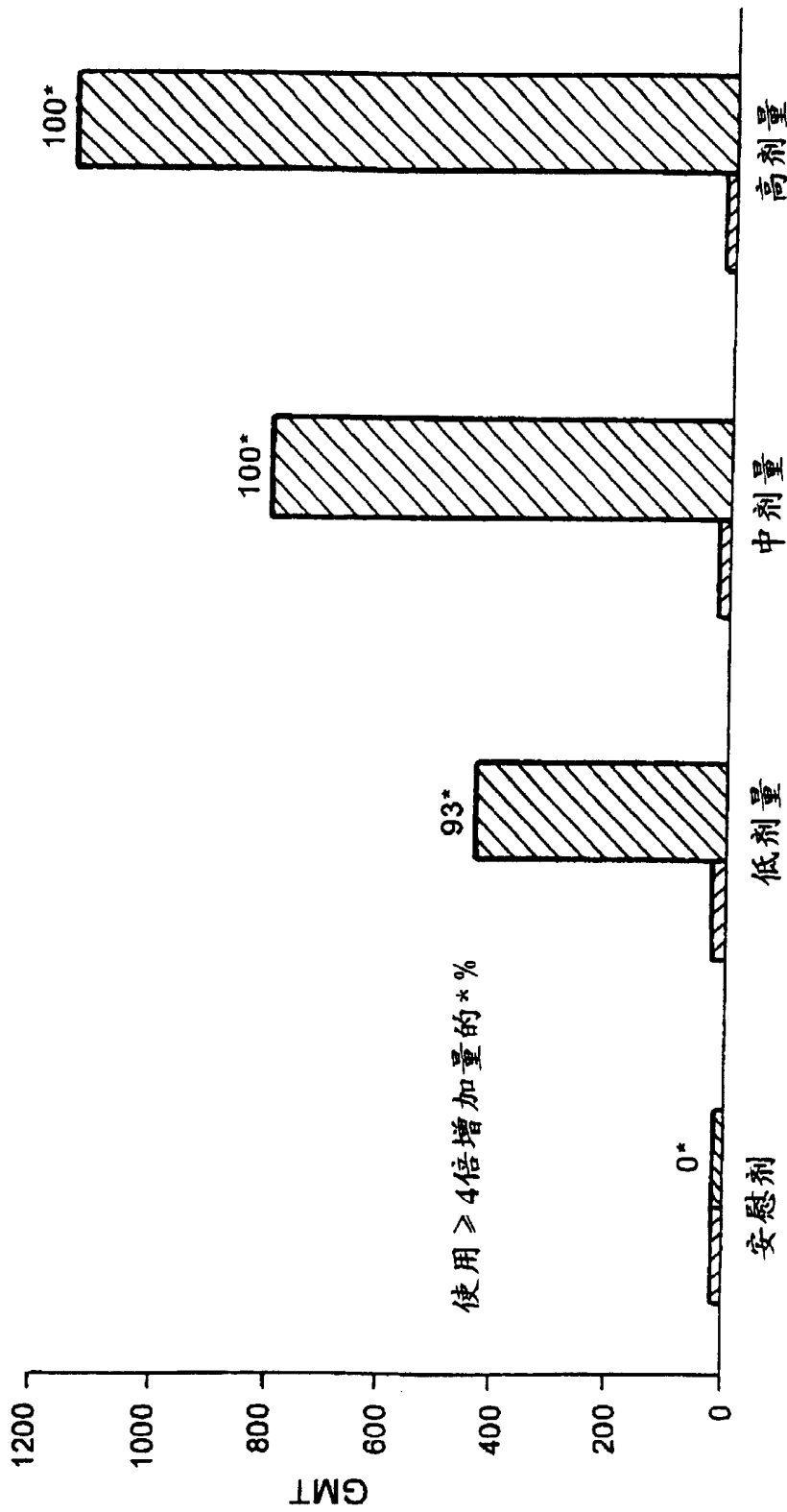


图6 抗 PRN 结果
血清前和后抗体反应 (持续) AAPT, 1996

疼痛	dtpa	dT
≤ 48 h	58	60
15 天	60	60
剧烈	0	0
发红		
≤ 48 h	30	37
15 天	30	37
> 20 MM	17	20
肿胀		
≤ 48 h	30	37
15 天	30	37
> 20MM	5	8.3
发烧		
≤ 48 h	7	7
15 天	8	8
> 39°C	0	0

图 7 报导的
dtpa 005 - 反应原性%

抗D	dtpa	dT
前		
≥ 0.1	44%	44%
后		
≥ 0.1	80%	78%
GMT	0.85	0.81
抗T		
前		
≥ 0.1	88%	88%
后		
≥ 0.1	97%	100%
GMT	7.37	13.6

图 8 dtpa 005

	疼痛1周	中度疼痛 1周	起红斑 1周	疼痛 2-4周	起红斑 2-4周
SB-中剂量 (N=31)	90	10	10	17	3
安慰剂 (N=31)	19	3	3	3	0

- 无严重的副作用
- 无剧烈疼痛
- 2位受试者患荨麻疹 (天数1-4; 天数18-22)

图 9 报导的
AAPT - 反应原性 %

疼痛	dtpa	dT
≤ 48 h	69	70
15 天	69	70
剧烈	0	1
发红		
≤ 48 h	12	20
15 天	12	20
> 30 MM	1	9
肿胀		
≤ 48 h	12	28
15 天	13	30
> 30MM	7	15
发烧		
≤ 48 h	5	6
15 天	13	15
> 39°C	0	1

图 10 报导的
dtpa 003 - 反应原性 %

抗D		dtpa	dT
前	≥ 0.1	72%	72%
后	≥ 0.1	100%	100%
	GMT	3.3	10.5

抗T		dtpa	dT
前	≥ 0.1	94%	99%
后	≥ 0.1	100%	100%
	GMT	22.9	54.5

图 11 抗体反应 dtpa 003

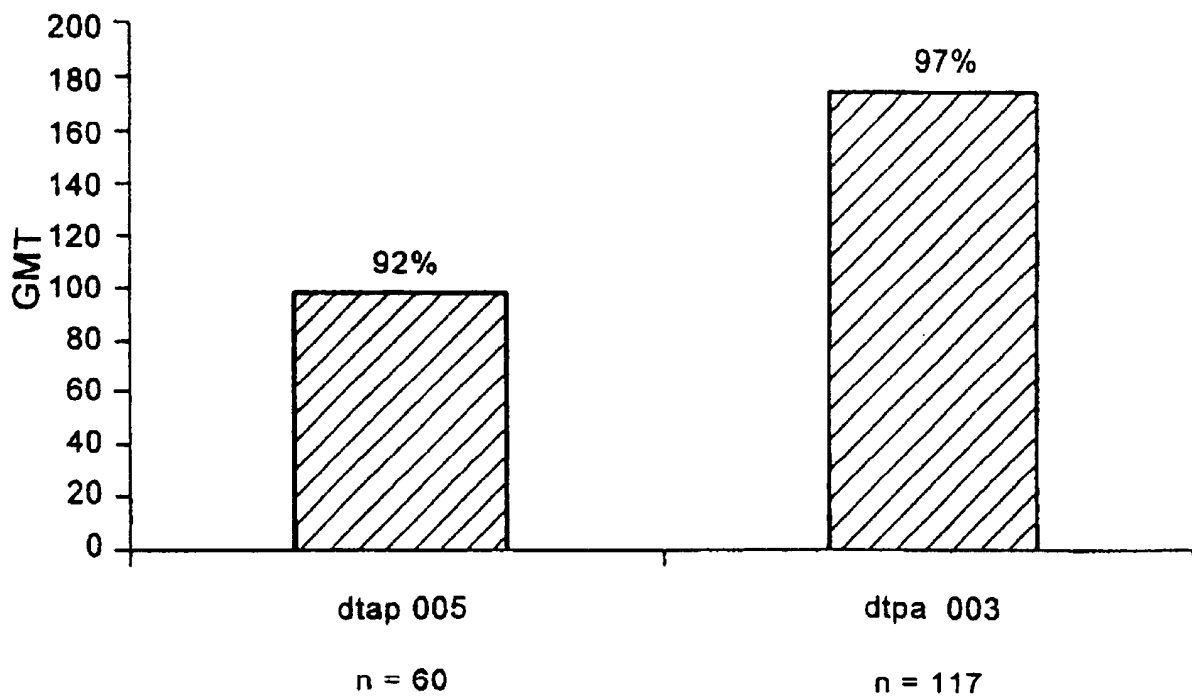


图 12 抗 PT 结果

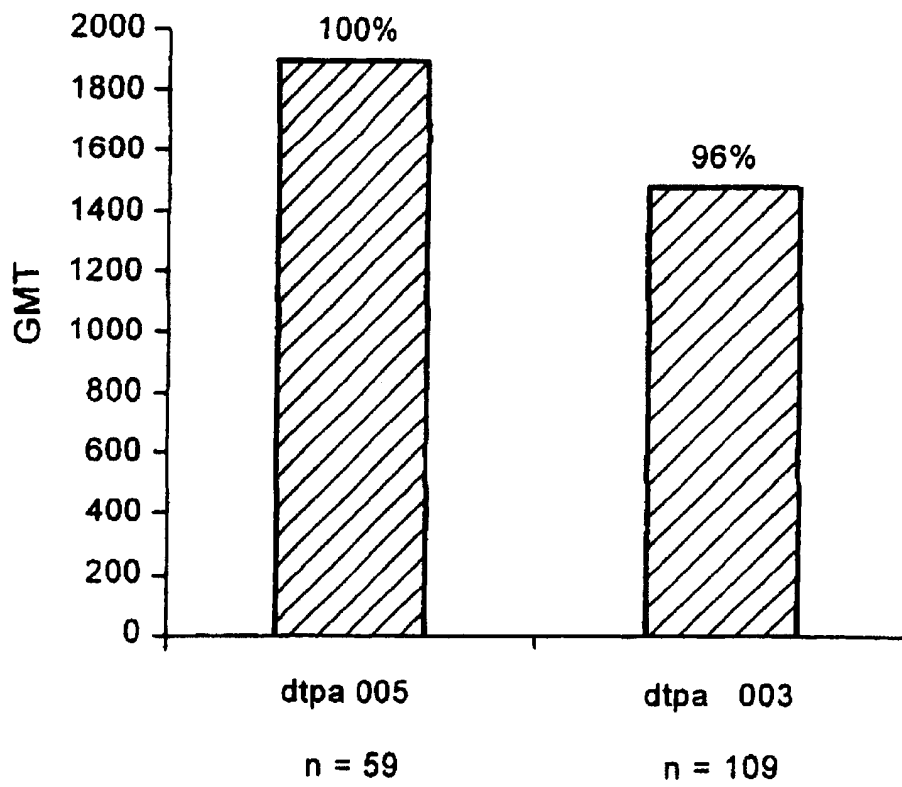


图 13 抗 FHA 结果

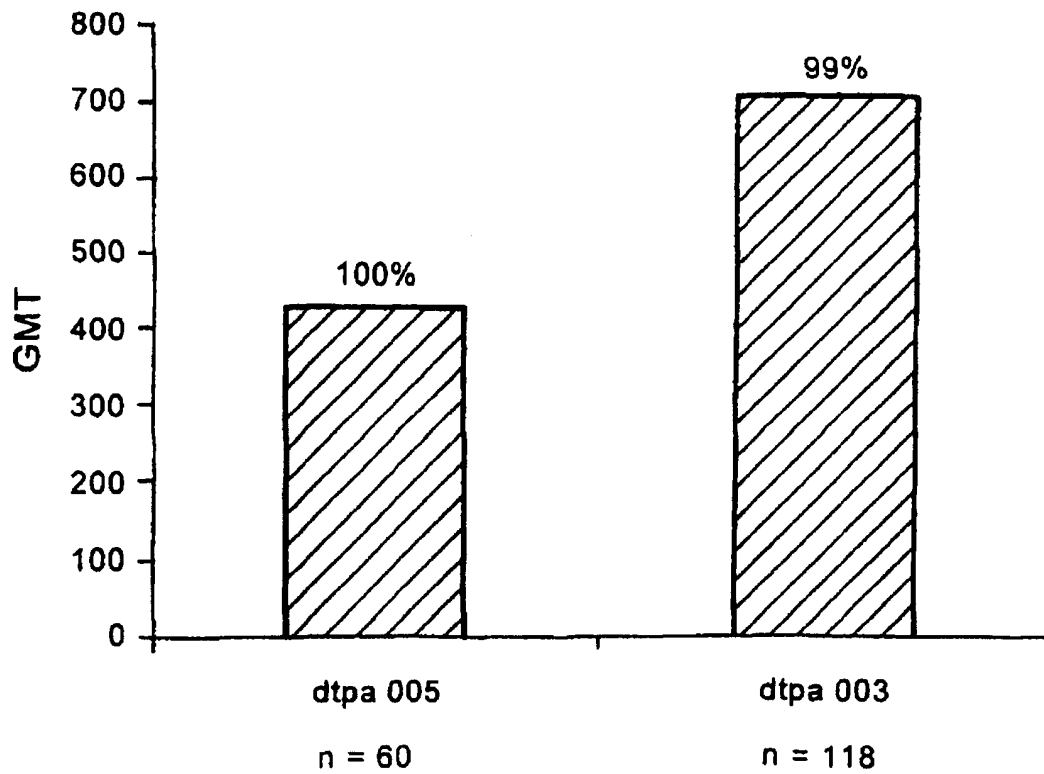


图 14 抗 PRN 结果