

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/70
A61K 31/715 A61K 38/00
C12N 9/10 C12N 9/20
D21C 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816071.1

[43] 公开日 2004 年 11 月 3 日

[11] 公开号 CN 1543350A

[22] 申请日 2002.8.5 [21] 申请号 02816071.1
[30] 优先权
[32] 2001. 8. 14 [33] US [31] 60/311,850
[86] 国际申请 PCT/US2002/024735 2002.8.5
[87] 国际公布 WO2003/015796 英 2003.2.27
[85] 进入国家阶段日期 2004.2.16
[71] 申请人 博奥米拉公司
地址 加拿大阿尔伯达
[72] 发明人 马克·J·克兰茨
迈克尔·B·朗格内克
拉奥·R·科根泰 希廷翁

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 程金山

权利要求书 5 页 说明书 36 页 附图 10 页

[54] 发明名称 糖半抗原和聚集的蛋白载体的免疫
原性结合物

[57] 摘要

提供一种多个糖半抗原和载体部分的单体单元的
聚合物(多聚体)的结合物。该结合物可用于引
发免疫应答。该结合物优选是糖取代的 KLH 单体
的聚合物,特别是聚集的二聚体、三聚体或四聚
体。聚集的 STn - KLH 结合物是特别令人感兴趣
的。

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

1. 一种非天然存在的免疫原性结合物，其包含多个可以相同或不同的糖
- 5 半抗原部分和多个包含赖氨酸的免疫原性蛋白载体部分的单体单元，所述半抗原部分直接或间接附着到所述载体部分的单体单元的赖氨酸上。
2. 权力要求1的结合物，其中所述载体部分是匙孔血蓝蛋白。
3. 权力要求1或2的结合物，其具有大于800kD的表观分子量。
4. 权力要求1或2的结合物，其具有大于1,200kD的表观分子量。
- 10 5. 权力要求1或2的结合物，其具有大于1,600kD的表观分子量。
6. 权力要求1或2的结合物，其具有至少1,000kD的表观分子量。
7. 权力要求1或2的结合物，其具有至少1,500kD的表观分子量。
8. 权力要求1或2的结合物，其具有至少2,000kD的表观分子量。
9. 权力要求1—8任一项的结合物，其具有不超过5,000kD的表观分子量。
- 15 10. 权力要求1—8任一项的结合物，其具有不超过2,500kD的表观分子量。
11. 权力要求1—10任一项的结合物，其免疫效力至少参照结合物的200%，所述参照结合物由所述半抗原部分和所述载体部分的单一单体单元所组成，并具有相同的预期的每个载体的单体单元上的半抗原部分数目。
12. 权力要求1—12的结合物，其中每个载体的单体单元的预期的半抗原
- 20 部分的数目至少为10。
13. 权力要求1—12的结合物，其中一个或多个所述糖半抗原部分提供唾液酸Tn表位。
14. 权力要求13的结合物，其中所述NANA含量超过3%，以唾液酸作为所述结合物的所述蛋白含量的百分比的量来测定（重量/重量）。
- 25 15. 权力要求13的结合物，其中所述NANA含量至少为4%。
16. 权力要求13的结合物，其中所述NANA含量至少为5%。
17. 权力要求13的结合物，其中所述NANA含量至少为6%。
18. 权力要求13的结合物，其中所述NANA含量至少为7%。
19. 权力要求1—18的结合物，其中每个糖半抗原部分通过一个连接物附
- 30 着到所述载体部分的单体单元上。

20. 权力要求19的结合物，其中所述连接物是由不多于12个不同于氢的原子组成的脂肪族基团。
21. 权力要求20的结合物，其中所述连接物是烷基基团。
22. 权力要求19-21的结合物，其中所述连接物将所述半抗原部分的氧连接到氨基氮上。
23. 权力要求19-22的结合物，其中连接物将单一的半抗原部分连接到所述单体单元的单一附着位点上。
24. 权力要求19-22的结合物，其中连接物将多个半抗原部分连接到所述单体单元的单一附着位点上。
25. 权力要求1-24任一项的结合物，其中至少一个所述糖半抗原部分与KLH不天然相关。
26. 一种包含权力要求1-25任一项的结合物分子的组合物，其中所述结合物分子在所述包含所述糖半抗原部分的组合物中是所有结合物分子的至少50%重量。
27. 一种包含权力要求1-25任一项的结合物分子的组合物，其中所述结合物分子在所述包含所述糖半抗原部分的组合物中是所有结合物的至少75%重量。
28. 一种包含权力要求1-25任一项的结合物分子的组合物，其中所述结合物分子在所述包含所述糖半抗原部分的组合物中是所有结合物分子的至少90%重量。
29. 一种包含权力要求1-25任一项的结合物分子的组合物，其中所述结合物分子在所述包含所述糖半抗原部分的组合物中是所有结合物分子的至少95%重量。
30. 一种制备权力要求1-25任一项的结合物的方法，其包含一个结合步骤，所述结合步骤包含将一个或多个试剂与所述单体单元，或与预聚集的包含多个所述单元的载体部分反应，以获得所述结合物，所述试剂每个包含至少一个所述糖半抗原部分。
31. 权力要求30的方法，其中所述试剂是所述糖半抗原的醛衍生物。
32. 权力要求31的方法，其中所述醛衍生物通过提供所述半抗原的巴豆基衍生物，臭氧化该巴豆基衍生物以获得臭氧化物，并还原该臭氧化物以

形成所述醛衍生物来获得。

33. 权力要求32的方法，其中乙醛作为产生所述半抗原醛的副产物而被提供。

34. 权力要求30-33的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度是39℃
5 —45℃，和反应时间是17小时—25小时。

35. 权力要求30-33的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度高于26℃。

36. 权力要求30-33的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度至少为30℃。

10 37. 权力要求30-33的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度至少为35℃。

38. 权力要求30-33的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度至少为39℃。

15 39. 权力要求30-38的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度不高于45℃。

40. 权力要求30-38的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应温度不高于43℃。

41. 权力要求30-40的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间多于6小时。

20 42. 权力要求30-40的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间至少为12小时。

43. 权力要求30-40的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间至少为17小时。

25 44. 权力要求30-43的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间不超过40小时。

45. 权力要求30-43的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间不超过30小时。

46. 权力要求30-43的方法，其中在所述连接步骤中，所述反应时间不超过25小时。

30 47. 权力要求30-43的方法，其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比

- 例至少为0.6: 1。
48. 权力要求30-43的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为1: 1。
49. 权力要求30-43的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为1.5: 1。
50. 权力要求30-43的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为1.75: 1。
51. 权力要求30-43的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为2: 1。
52. 权力要求30-51的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例不高于4: 1。
53. 权力要求30-51的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为3.25: 1。
54. 权力要求30-51的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例至少为2.75: 1。
55. 权力要求30-51的方法, 其中所述半抗原醛与所述载体单体的重量比例为约2.25: 1。
56. 权力要求30-51的方法, 其中所述结合步骤包含产生席夫碱中间体, 和用还原剂还原所述中间体。
57. 权力要求56的方法, 其中所述还原剂是氰基硼氢钠。
58. 权力要求57的方法, 其中所述还原剂以25-125mM的终浓度使用。
59. 权力要求57的方法, 其中所述还原剂以45-75mM的终浓度使用。
60. 一种在受试者中引发糖半抗原特异免疫应答的方法, 其包含对所述受试者给药免疫有效量的权力要求1-25任一项的结合物或权力要求26-29任一项的组合物。
61. 权力要求59的方法, 其中引发体液免疫应答。
62. 权力要求59的方法, 其中引发细胞免疫应答。
63. 权力要求59的方法, 其中所述糖半抗原是肿瘤相关的。
64. 权力要求60-63 58-61任一项的方法, 其中所述的结合物或组合物对抗疾病是保护性的。

65. 权力要求64的方法，其中所述疾病是癌症。
66. 权力要求1-25任一项的结合物或权力要求26-28任一项的组合物在制备使受试者免受疾病的组合物中的应用。
67. 权力要求64的应用，其中所述疾病是癌症。
- 5 68. 权力要求1或2的结合物，其中所述结合物包含至少3个所述载体部分的单体单元。
69. 权力要求1或2的结合物，其中所述结合物包含至少4个所述载体部分的单体单元。
70. 权力要求26的组合物，其包含至少一个权力要求68的结合物。
- 10 71. 权力要求26的组合物，其包含至少一个权力要求69的结合物。
72. 权力要求1的结合物，其中所述载体部分的单体单元是血蓝蛋白单体单元。
73. 权力要求72的结合物，其中所述血蓝蛋白是节肢动物的血蓝蛋白。
74. 权力要求72的结合物，其中所述血蓝蛋白是软体动物的血蓝蛋白。
- 15 75. 权力要求72的结合物，其中所述血蓝蛋白是腹足动物的血蓝蛋白。
76. 权力要求72的结合物，其中所述血蓝蛋白是*Fissurellidae*的血蓝蛋白。
77. 权力要求2的结合物，其中所述结合物的载体部分不是KLH单体单元的十聚体、双十聚体或多十聚体。
78. 权力要求2或77的结合物，其中所述结合物的载体部分不是KLH单体单元的二聚体。
- 20 79. 权力要求2的结合物，其中所述结合物的载体部分是KLH单体单元的二聚体、三聚体、四聚体或五聚体。
80. 权力要求1或2的结合物，其中至少一个糖半抗原部分包含TF二糖。
81. 权力要求1或2的结合物，其中至少一个糖半抗原部分包含Tn。
- 25 82. 权力要求1或2的结合物，其中至少一个糖半抗原部分是唾液酸化的糖。

糖半抗原和聚集的蛋白载体的免疫原性结合物

5

本申请是 2001 年 8 月 14 日提交的在先临时申请 60/311,850 的非临时申请，结合其全部内容作为参考。

发明背景

10 发明领域

本发明涉及免疫治疗，其中引发针对糖表位的免疫应答。它预示了糖半抗原和聚集的（多聚的）蛋白载体的免疫原性结合物（conjugate）的应用。STn 与匙孔血蓝蛋白（KLH）多聚体的结合物是特别令人感兴趣的。

15

背景描述

免疫系统

脊椎动物抗感染性微生物、毒素、病毒或其他外源大分子以保护它们自身的能力被定义为免疫。该领域可分为天然的和获得性或特异性免疫（Abbas 等, Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Company, 1991；Hood 等, Immunology, 2nd Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1984）。

天然免疫由防御机制组成，所述防御机制在暴露于微生物或外源大分子之前是活跃的，不被这种暴露加强，而且对于机体是外源的大部分物质不加以区分。天然免疫的效应器是物理屏障如皮肤或粘膜，吞噬细胞如巨噬细胞或嗜中性粒细胞，一类称为天然杀伤细胞的淋巴细胞，和补体系统。补体是一种血清蛋白复合物，它对由特异的补体固定的抗体致敏的某些细菌和其他细胞而言是破坏性的；其活性通过一系列导致蛋白裂解的相互作用来实现，并从事至少两种途径的一种或另一种

25

30 （Illustrated Stedman's Medical Dictionary, 第 24 版, Williams 和 Wilkins,

Baltimore/London, 1982)。

获得性或特异性免疫包含通过暴露给外源物质而被诱导或刺激的防御机制。

在脊椎动物中，天然免疫和特异性免疫机制在宿主防御系统，即免疫系统，协同作用来消除外源侵入者。除了微生物、癌细胞、寄生物和病毒感染的细胞，免疫系统也识别和消除从同种（同种异体移植）的遗传上不同的个体或不同种（异种移植）移植到受试者中的细胞或组织。

由特异性免疫机制所参与的抵制侵略的微生物癌细胞等的防御所产生的事件称为免疫应答。脊椎动物有两种基本的免疫应答：体液免疫和细胞免疫。体液免疫是由B淋巴细胞提供，B淋巴细胞在增殖和分化后产生在血液和淋巴液中循环的抗体。细胞免疫是由淋巴系统的T细胞所提供。细胞免疫应答对抵抗真菌、寄生物、细胞内病毒感染、癌细胞和外源物质特别有效，而体液应答主要抵抗细胞外状态的细菌和病毒感染。

“抗原”是一种由抗体或T细胞受体所识别（特异性结合）的外源物质，但不管它是否能诱导免疫应答。诱导特异性免疫的外源性物质称为“免疫性抗原”或“免疫原”。“半抗原”是指一种本身不能引发免疫应答（尽管几个分子半抗原的结合物，或半抗原与大分子载体的结合物可引发免疫应答）的抗原。因为本申请涉及引发免疫应答，除非特别说明，术语“抗原”将指免疫性抗原。

20

肿瘤相关的糖抗原决定簇。许多具有临床意义的抗原具有糖决定簇。这类抗原的一组包含肿瘤相关的粘蛋白（Roussel, 等, Biochimie 70, 1471, 1988）。

一般来说，粘蛋白是存在于唾液、胃液等中的糖蛋白，它形成粘性溶液，在机体外部和内部的表面作为润滑剂或保护剂来发挥作用。粘蛋白典型地具有高的分子量（通常 $> 1,000,000$ 道尔顿），而且是高度糖基化的。粘蛋白的多糖链是O-连接的（连接到丝氨酸或苏氨酸残基上），而且可以占糖蛋白分子质量的80%以上。粘蛋白由管状上皮细胞和相同来源的肿瘤产生，可以被分泌出来或作为整合膜蛋白结合到细胞上

30 （Burchell, 等, Cancer Res. 47, 5476, 1987; Jerome, 等, Cancer Res., 51,

2908, 1991)。

癌组织产生异常的粘蛋白，已知它比其正常配对物(counter parts)的糖基化相对少一些 (Hull, 等, Cancer Commun., 1, 261, 1989)。由于在癌细胞中蛋白糖基化机制发生功能改变，肿瘤相关的粘蛋白典型地包含短的不完整的多糖。因此，与人乳脂肪球相关的正常粘蛋白主要由四糖多糖，gal β -4 glcNAcp1-6 (gal β -3) gal NAc- α 及其唾液酸化的类似物 (sialylated analogs) 组成 (Hull, 等)，肿瘤相关的 Tn 半抗原仅由单糖残基， α -2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖基，和二糖 β -吡喃半乳糖基-(1-3) α -乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖基的 T-半抗原组成。其他肿瘤相关粘蛋白的半抗原，如唾液酸-Tn 和唾液酸-(2-6)T 半抗原，是由末端的唾液酸残基连接到短的 Tn 及 T 多糖上产生的 (Hanisch, 等, Biol. Chem. Hoppe-Sevler, 370, 21, 1989; Hakormori, Adv. Cancer Res., 52:257, 1989; Torben, 等, Int. J. Cancer, 45 666, 1980; Samuel, 等, Cancer Res., 50, 4801, 1990)。

已发现 T 和 Tn 抗原 (Springer, Science, 224, 1198, 1984) 在大多数原代癌细胞及其转移细胞 (大于所有人癌症的 90%) 的外表面膜上以免疫活性形式存在。作为癌症标志物，T 和 Tn 可对一些癌症的侵染力进行早期免疫组化检测和预测 (Springer)。唾液酸-Tn 半抗原在肿瘤组织上的存在已经被鉴定为一种不利的预示参数 (Itzkowitz, 等 Cancer, 66, 1960, 1990; Yonezawa, 等, Am. J. Clin. Pathol., 98, 167, 1992)。有几种类型的肿瘤相关糖抗原在普通人癌中是高表达的。Tn、T 和 STn 半抗原作为粘蛋白类型的 (O-连接的) 糖出现。另外，癌相关的鞘糖脂，如 GM2 和 GD3 在许多人癌中表达。

由癌相关的粘蛋白所呈现的改变的多糖决定簇被患者的免疫系统识别为非自我的或外源的 (Springer)。实际上，在大部分患者中观察到了对 T 半抗原强烈的自免疫应答。这些应答可以很容易地被测量，并允许以更高的灵敏度和特异性比先前可能地更早地来检测癌症。最后，T 和 Tn 的表达程度常常与癌的分化程度相关 (Springer)。

糖-蛋白结合物。因为肿瘤相关抗原在诊断和检测很多类型癌症中是

有用的, 并且在治疗中可能也是有用的, 许多工作人员已经合成了糖半抗原的糖苷及其唾液酸化类似物的糖苷, 并已使用这些糖苷将半抗原连接到蛋白或合成的肽载体上。这些糖苷一般都包括一个糖苷配基部分, 从那里可产生高应答功能而不改变各自半抗原糖苷的多糖部分。随后, 5 “活化的” 半抗原糖苷与蛋白或合成肽载体的氨基部分发生反应, 以形成席夫碱连接。席夫碱基团可通过用氢硼化物还原形成仲胺连接来稳定; 然后将整个偶联过程称为还原性胺化作用 (Gray, Arch. Biochem. Biophys., 163, 426, 1974)。

关于这些结合物的例子, 参见 Lemieux, 等, USP 4,866,045; Naicker 等, 10 USP 4,935,503; Kolar, USP 4,42_,284; Feizi, USP 4,563,445; Koganty, USP 5,055,562; Jennings, USP 4,356,170; Roy, USP 5,034,516。

Wong, USP 6,013,779 公开了一种形成糖半抗原与蛋白载体结合物的方法。首先, 通过烯醇, 如巴豆醇的 Fisher-型糖基化作用来制备 α -烯式糖苷。将 α -烯式糖苷进行臭氧分解, 产生半抗原醛 (第二种醛作为副产 15 物)。副产物优选是乙醛或更高的醛, 不是甲醛。

然后将半抗原醛连接到载体蛋白如 KLH 上。

STN-KLH 结合物

Biomira 开发的 Theratope®疫苗由合成的与 KLH 连接的 STn 半抗原 20 原组成, 用带有佐剂的乳剂形式进行递送。在 I 期和 II 期临床试验中所用的疫苗具有半抗原取代水平, 其导致唾液酸 (NANA) 含量大约为重量的 2.5-3%。而 II 期临床试验正在进行, 改善了连接方法, 使得 NANA 的含量可达到约 7%。在鼠中, 高的结合产物诱导产生相当更高滴度的抗-STn 抗体, 而在人的小型过渡研究中, 产生显著更高的抗-STn 的 IgG 25 滴度。因为在 II 期临床试验中, 较高的抗-STn IgG 滴度似乎与提高的存活率相关, 因此, 开始了大量的使用 NANA 含量约为 7% 的 STn-KLH 结合物的 III 期临床试验。

表位簇

30 糖表位簇已在文献中有所报道, 但是其重要性并没有很清楚地阐

明。参见 Reddish, 等, Glycoconjugate J., 14:549-60(1997) (成簇的 STn), Ragapathi, 等 Cancer Immunol. Immunother. 48:1-8(1999)。同样, O-糖基化位点簇也已有报道。参见 Gendler, 等, J.Biol.Chem., 263:12820(1988)。

我们用一种对簇具有特异性的 Mab 和与单体或簇反应的另一种对各种 STn-KLH 制剂的“STn 簇”含量进行调查。所有疫苗制品均有可检测到的簇含量, 但半抗原检测上限很低, 这可能是因为 Mabs 的空间位阻比半抗原的大得多。由于簇的密度太高不能被测量, 所以提高的效力并不能特定地归因于在更高的取代水平上空间排列(簇)的产生。在这些研究的过程中, 我们发现通过如下所述对过程变量(process variables)进行一定的改变, 可将疫苗中 NANA 含量提高到 7%, 而效力提高很少。这提示在以下所描述的系统中所观察到的效力提高并不仅仅归因于形成半抗原“簇”。

也参见 Sloan-Kettering, WO98/46246; Sloan-Kettering, WO97/34921; Sloan-Kettering, WO99/15201 (岩藻糖基 GM1-KLH 结合物; 所述 KLH MW 为 5×10^6); Kjeldsen, USP 5,660,834; Zhang, 等, Cancer Res. 55:3364-8(1995 年 8 月 1 日); Swiss Prot P04253; Swiss-Prot P80888; Swiss-Prot P02768; Kjeldsen, USP 5,747,048。

以下美国专利使用短语“成簇表位”:

6,376,463
6,258,937
6,180,371
5,929,220
5,888,974
5,859,204
5,744,446

以下美国专利引用“成簇”和“糖表位”:

6,365,124
6,287,574
6,013,779
5,965,544

5,268,364

4,837,306

发明概述

- 5 本发明涉及一种具有免疫原性的由多个糖半抗原与聚集的多聚蛋白载体组成的结合物。

聚集产生于蛋白载体的各个单体相互作用形成多聚的实体。相互作用可以通过结合和/或通过各个蛋白链缠结而成（在糖半抗原附着前、过程中或之后）。如果结合有助于寡聚化，则它可以是共价和/或非共价的。

- 10 优选地，聚集与糖半抗原附着到蛋白或多或少同时地发生。

认为这些制品的免疫效力归因于高的半抗原取代比及蛋白载体聚集形成多聚实体的结合。

多聚实体优选地是蛋白载体单体单元的二聚体、三聚体、四聚体和/或五聚体。

15

附图简述

图 1 所示的是 Lot PD020105-08 的尺寸排阻色谱(9,500 kDa, 6.8% NANA)。

图 2 所示的是 Lot 211299-01 的尺寸排阻色谱(590 kDa, 3.2% NANA)。

- 20 图 3 所示的是 Lot 040400-RT 的尺寸排阻色谱(460 kDa, 7.0% NANA)。

图 4 所示的是 Lot 260100RT 的尺寸排阻色谱(500 kDa, 7.2% NANA)。

图 5 所示的是 Lot 040400-RT 与 260100RT 的尺寸排阻色谱的重叠。

图 6 所示的是 Lot 201299-01 的尺寸排阻色谱(4000 kDa, 3% NANA)。

- 25 图 7 所示的是 Lot 011299-03 的尺寸排阻色谱(2600 kDa, 5.1% NANA)。

图 8 所示的是 Lot STNK0055 的尺寸排阻色谱(1200 kDa, 7.8% NANA)。

- 30 图 9 所示的是 Lot PD029910-03 的尺寸排阻色谱(1,500 kDa, 7.9% NANA)。

图 10 是分子量 (kDa) 相对于相对滞留时间%的回归曲线(甲状腺球蛋白=100)。

发明优选实施方案的详细描述

5 糖半抗原；表位

本发明的糖半抗原是包含（优选地相同于）糖表位的糖。

术语“糖”包括单糖、寡糖和多糖，及通过还原萆酮基（糖醇）、氧化一个或多个末端基团为羧酸、或由氢原子、氨基、巯基或类似的杂原子基团取代一个或多个羟基从单糖所衍生的物质。也包括上述物质的
10 衍生物。

正常情况下，糖半抗原不是一种多糖，因为多糖通常很大，本身就具有免疫原性。然而寡糖和多糖的界限并不固定，我们定义寡糖由 2-20 单糖（糖）单元组成。

半抗原可以是单糖（无糖苷连接到另一个这样的单元）或寡糖。如
15 果是寡糖，优选它不多于 10 个糖单元。

单糖是具有三个或多个碳原子的多羟基醛 ($\text{H}[\text{CHOH}]_n\text{-CHO}$) 或多羟基酮 ($\text{H}[\text{CHOH}]_n\text{-CO-}[\text{CHOH}]_m\text{-H}$)。

每个单糖单元可以是一个醛糖（具有一个醛式羰基或潜在的醛式羰基）或酮糖（具有一个酮式羰基或潜在的酮式羰基）。单糖单元进一步可以具有多于一个的羰基（或潜在羰基），因此可以是二醛糖、二酮糖或醛酮糖。术语“潜在的醛式羰基”是指由产生环合的半缩醛基团，和酮式配对物（半缩酮结构）。
20

单糖单元可以是环状半缩醛或半缩酮。具有三元环的环状形式是三
环糖 (oxiroses)；四个环是四环糖 (oxetoses)；五个环是 呋喃糖；六个
25 环是吡喃糖；七个环是 七环糖；八个环是 octaviruses 等等。闭合位置的位标可以改变。

单糖单元可进一步是脱氧糖（由氢原子取代的醇式羟基）、氨基糖（由氨基取代的醇式羟基）、巯基糖（由巯基取代醇式羟基、或由 $\text{C}=\text{S}$ 取代的 $\text{C}=\text{O}$ ）、或由硫取代的环状形式的环氧）、硒代糖(seleno sugar)、碲代糖(telluro sugar)、取代的单糖、不饱和单糖、氮杂糖（由氮取代的环
30

状碳)、氨基糖(由氮取代的环状氧)、糖醇(由CHOH基团取代的羰基)、醛糖酸(由羧基取代的醛基)、酮醛糖酸、糖醛酸、醛糖二酸(alдарic acid)等等。

唾液酸, 也已知为 N-乙酰基神经氨酸(NANA)是特别令人感兴趣的。
5 它是几种肿瘤相关的糖表位的末端糖。

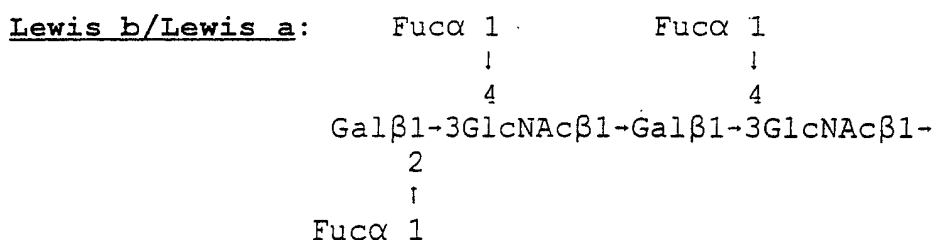
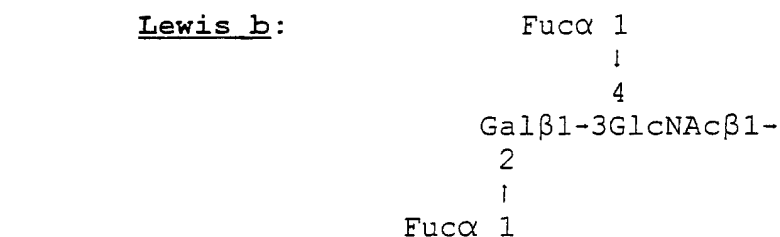
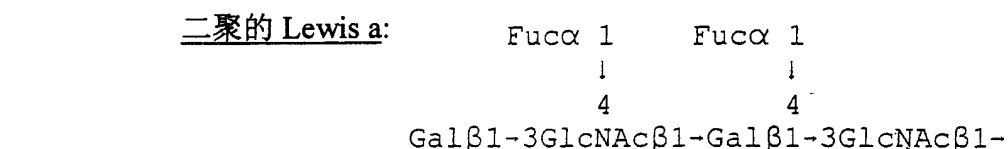
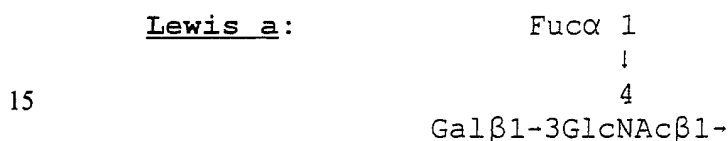
肿瘤相关的糖表位是特别令人感兴趣的。

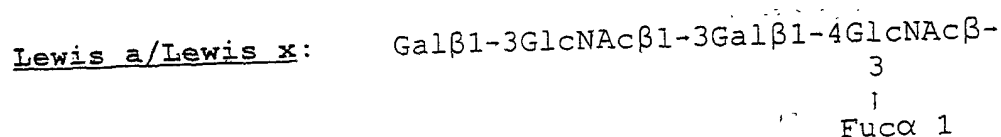
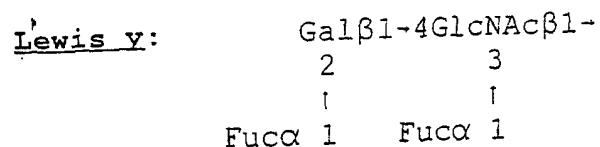
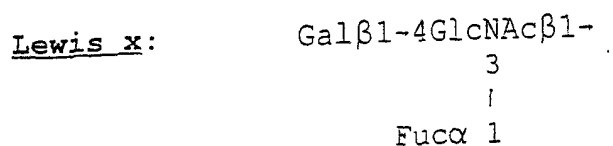
根据本发明, 可以连接多种糖, 以特别用于检测和治疗肿瘤。Tn、T、唾液酸 Tn 和唾液酸(2->6) T 半抗原是特别优选地。

特别地, 为了检测和治疗肿瘤, 将三类在一般人类肿瘤中高表达的
10 肿瘤相关糖表位连接到胺化的化合物上。这些特别包括乳糖系列 1 型和 2 型链, 癌相关的神经节链(ganglio chains)和中性糖鞘脂。

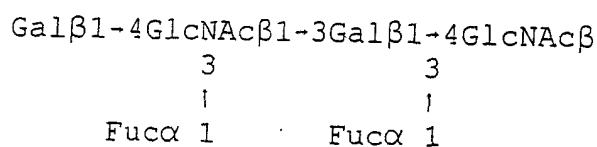
乳糖系列 1 型和 2 型链的例子如下:

乳糖系列 A 型和 2 型链

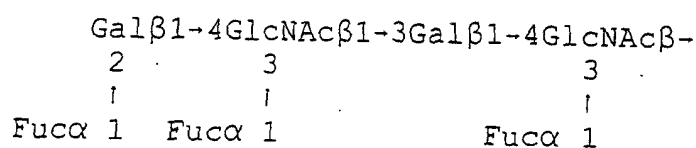




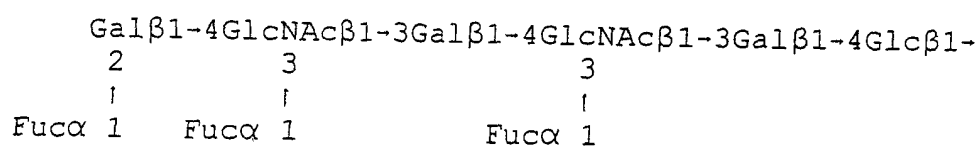
Lewis x/Lewis x (二聚的 Le^x):



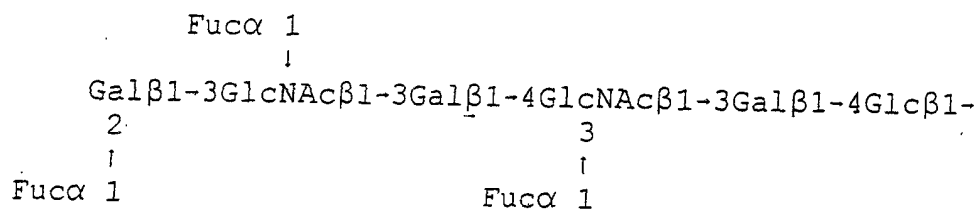
Lewis y/Lewis x:



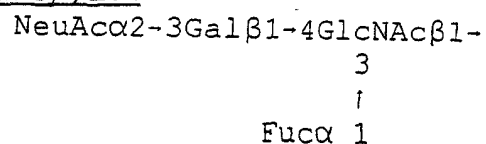
三岩藻糖基 Lewis y:

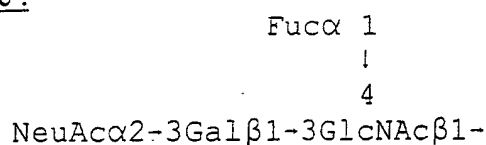
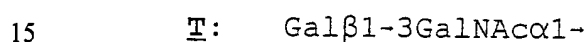
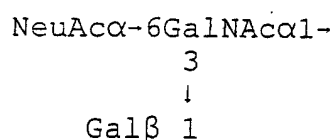
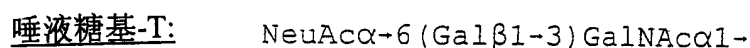
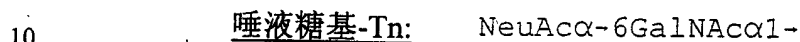
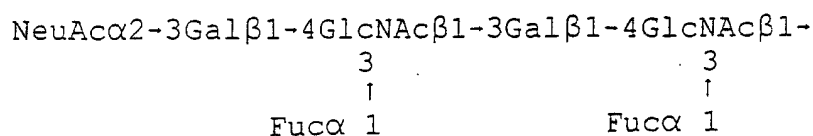


三岩藻糖基 Lewis b:

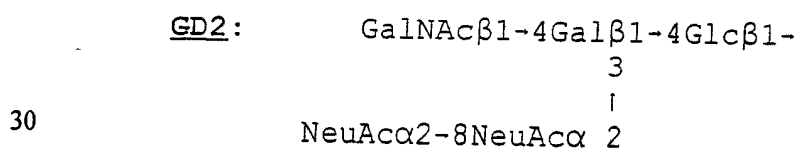
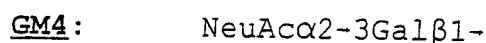
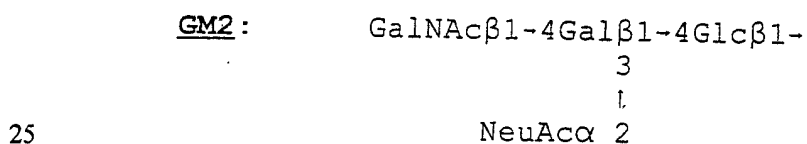
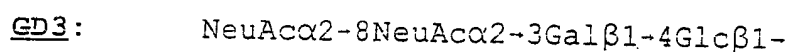
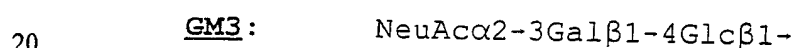


唾液糖基(sialosyl) Le^x:



唾液糖基 Le^a:5 唾液糖基二聚Le^x:

根据本发明可连接到胺化的化合物上的癌症相关的神经节链的例子如下:

癌症相关的神经节链

最优选地是腹足动物的，尤其是 Fissurellidae（匙孔）的血蓝蛋白，特别是匙孔（*Megathura crenulata*）血蓝蛋白。

血蓝蛋白是许多节肢动物和软体动物的氧运输蛋白。天然的匙孔血蓝蛋白是一个多聚体，总分子量大约为 8000kDa。单体约 400kDa。它包括两个免疫上和生理上不同的异构体，KLH1 和 KLH2。二者作为圆柱形双十聚体（didecamer）存在于血淋巴中。每个异构体单体包含 8 个功能单位（FUs），从 N-到 C-末端依次称为“a”到“h”。KLH1 的 FUs “b”到“g”共有 2141 个氨基酸，KLH2 的 FUs “b”到“h”共有 2473 个氨基酸。见 Altenheim 等“匙孔血蓝蛋白的序列”摘要，<http://www.sbroscoff.fr/IO2BiP/IO2B1PP.PDF>；Swerdlow, Comp. Biochem. Biophys. 113B:537- 48(1996)；Stoeva, Biochem.Biophys. Acta 1435:94-109(1999)；Harris 和 Markl, Micron., 30:597-623(1999)。Swerdlow 报道 KLH-A 是 449kDa，KLH-B 是 392 kDa。Sohnsen,等, Eur.J.Biochem.,248:602-14 91997) 报道 KLH1 是 400 kDa, KLH2 是 345 kDa。Ebert,USP 5, 855, 919 使用的数值是 400 kDa。

优选地，在本发明的结合物中，如果载体部分的单体单元是 KLH 单体，则结合物不是 KLH 单体的取代的十聚体，双十聚体或多十聚体。

天然 KLH 富含铜，但在还原性氨基化过程中铜丢失，KLH 是糖基化的，具有大约 4%分子质量的糖含量。见上文的 Harris。

优选地，如果使用 KLH 单体，至少有一个糖半抗原部分是本身与 KLH 不相关的。优选地，至少糖半抗原部分的一个糖组分是本身与 KLH 不相关的。

聚集的程度

本发明中优选的免疫原是一种聚集的糖半抗原取代的 KLH。每个单体单元可以是 KLH1、KLH2 或一些其他 KLH 单体。

此处所用的术语“取代的 KLH 单体”是指由多个糖半抗原，除了那些本身是相关的以外，取代的 KLH。它们可以是存在的天然糖链的复制品，但更通常包括本身与 KLH 不相关的半抗原。KLH 可以，但不必在半抗原取代前特异或非特异地去糖基化以除去一些或所有天然的糖。

取代的 KLH 单体分子量比非取代的 KLH 更大。如果后者是 400kDa (文献报道为 345-449kDa), 那么取代的 KLH 将具有更大的分子量。增量依赖于每个半抗原部分 (包括连接物) 的分子量和每个单体中半抗原部分的数量。

- 5 如果非取代的 KLH 单体是 400kDa, 那么取代的二聚体的分子量必须大于 800kDa。因此, 取代的聚合物优选地具有一个大于 800kDa, 更优选地大于 1,200kDa, 还更优选地大于 1,600kDa 的表观分子量。

在优选的糖半抗原取代的单体形式中的 KLH 的分子量大约为 500kD; 如果没有附加的糖 (和连接物), 则大约为 400kD。因此, 半抗原取代可以使分子量相对于非取代的 KLH 单体增加 25%或更多。由此
10 可见, 取代的聚合物也优选具有至少 1,000kDa, 更优选至少 1,500kDa, 甚至更优选至少 2,000kDa 的表观分子量。

可以理解, 制品可包含 n-聚体, 如单体、二聚体、三聚体、四聚体等的非均匀混合物, 使得表观分子量实际是每个大小类别的 n-聚体的表
15 观分子量的权重平均。

理论上制品可通过分子量进行分级, 以确定归属于每个大小类别的 n-聚体的级分。优选地, 单体少于制品的 50% (重量), 更优选地是少于 25%, 还更优选地是少于 10%, 最优选地是少于 5%。为了去除主要的单体级分从而富集多聚体, 也可将制品级分。

20 聚合程度的最大限度是聚合物不能太大, 以致于在溶液中沉淀出来。然而, 优选地表观分子量小于 5,000 kDa (相当于取代的十聚体), 更优选地小于 25,00 kDa (相当于取代的五聚体)。

表观分子量优选地通过激光散射来测定。见 Wyatt, Anal. Chim. Acta, 272:1-40(1993)。它通过尺寸排阻 (分子筛) 色谱进行推定, 见以下描述。
25 一般来说, RRT 值为 0.97 或更小是理想的。

图 12 所示的是在 Shodex 上进行尺寸排阻色谱所得到的分子量 (kDa) 相对于相对滞留时间 (RRT%) 的回归曲线。

回归线提供分子量和 RRT 的初步关系, 它可用于解释表 1 中的数据。回归线是 $MW(D)=30,455.378-(302.626 \cdot RRT\%)$, 所示的 RRT%表示相对于甲状腺球蛋白为 100。注意 MW 反比于 RRT。RRT%=100*RRT。
30

用于回归的 R^2 为 0.719。回归是基于 92÷100 的 RRT%值。

回归总结

MW(kDa)对RRT(%)

计数	12
5 丢失数目 (Num. Missing)	4
R	.848
R平方	.719
调整的R平方	.690
RMS残余	576.442

10

ANOVA表

MW(kDa)对RRT(%)

	DF	平方总和	均方	F-值	P-值
回归	1	8486638.969	8486638.969	25.540	.0005
残余	10	3322852.698	332285.270		
总量	11	11809491.667			

回归系数

15 MW(kDa)对RRT(%)

	系数	标准误差	标准系数	t-值	p-值
截距	30455.378	5731.094	30455.378	5.314	.003
RRT(%)	-302.626	59.882	-.848	-5.054	.005

置信区间

MW(kDa)对RRT(%)

	系数	95%以下	95%以上
截距	30455.378	17685.704	43225.052
RRT(%)	-302.626	-436.051	-169.201

20 优选地, RRT%不高于 99, 更优选地不高于 98, 还更优选地不高于 97,

甚至更优选地不高于 96，如 96、95、94、93、92、91、90、89、88 或 87（最接近于 1）。

对于在 RRT% 的上限，即高于 96（RRT=0.96）的批次，在治疗应用前检测批次的效力是理想的。

- 5 优选地，本发明的聚集的免疫原的效力至少是相同半抗原和载体以相同的半抗原载体单体取代比的结合物的 200%，其中载体是未聚集的。为了这个目的，通过免疫小鼠的抗体应答来检测效力。

连接

- 10 每分子的半抗原都连接到载体上。载体上的连接点通常是易接近的氨基，如载体的氨基末端，或更通常为赖氨酸的 ϵ 氨基。

- 半抗原或者直接或者通过连接物连接到这个附着点上。通常连接物不是糖或肽本身。即使需要连接物，连接物优选地是包括碳、氢，和任选地氧、氮和/或硫的小的脂肪族基团，除氢外不多于 12 个原子。更优选地，它是不多于 12 个碳原子的线性或支链的烷基。甚至更优选地，是 15 $-(CH_2)_n$ ，其中 $n=1-12$ 。最优选地是 $-CH_2CH_2-$ 。每个连接物将糖半抗原的氧与氨基氮相连接，如赖氨酸的 ϵ -氮或蛋白载体的氨基末端。

连接物可以是双官能的（只将一个半抗原联接到载体单体上）或官能的（即一个连接物可将多个半抗原连接到载体单体上）。

- 20 “连接试剂”与 A 和 B 反应，形成 A-连接物-B 的结构，“连接物”在结构上与最初的连接试剂有关。反应可以是同时的，或者连接试剂可首先与 A 反应，形成 A-连接臂的结构，然后后者与 B 反应，形成 A-连接物-B。

- 如果半抗原-连接臂是半抗原-巴豆基（如 STn-巴豆基），那么臭氧化作用产生具有反应活性的半抗原醛，它可用于载体的还原性氨基化以形成半抗原- CH_2CH_2 -载体，即，优选的二碳连接物。半抗原通常通过 O-连接连接到连接物上，但也可能是其他连接。

- 另一种感兴趣的连接试剂是 MMCCH 连接试剂，4-(4-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧基酰肼。见 Ragupathi, 等, Cancer Immunol. Immunother. 30 48:1-8(1999)。

一些基于巴豆基连接化学的多官能连接物在 Reddish, 等, Glycoconjugate J., 14:549-60(1997)的图 1 中进行了描述。

半抗原-取代比例

- 5 在本发明中, 糖半抗原连接到载体特别是 KLH 上。载体也是聚集的。

优选地, 半抗原相对于载体的比例是每个载体单体上至少连接有 10 个分子的半抗原。最大比例通过易于接近的附着点的数量来确定。通常比例的范围是 10-120。

10

NANA 含量

在唾液酸化的结合物如 STn/KLH 结合物中, NANA 的含量表现出半抗原取代比例(每个载体单体上唾液酸化的半抗原的数量)。NANA 含量可以通过以下阐述的方法进行检测。

- 15 在 STn/KLH 结合物中, 优选的 NANA 含量是超过 3%, 更优选是至少 4%, 还更优选是至少 5%, 甚至更优选是至少 6%, 最优选是至少 7%。优选的数值包括列于表 1 和表 2 中超过 3%的数值。

- NANA 的最大可能含量是 KLH 上可能的 STn 附着位点总数的函数。假设 STn 与 KLH 的每个赖氨酸侧链相连接, NANA 的含量将大约占结合物重量的 12%。这不包括连接物或 Tn 的分子量。如果相对于非取代的 KLH 的分子量进行计算, 这个数值将大约是 13%。相对于非取代的 KLH 的分子量, 整个半抗原-连接臂的含量大约是 19%。
- 20

更高的 NANA 含量主要是通过糖基化反应中提高半抗原对 KLH 比例来实现。

- 25 如果增加半抗原的数量来提高 NANA 的含量, 但不导致免疫原性的增加, 那么多余的半抗原实际上就被浪费掉了。因此, 从经济原因考虑限制 NANA 的含量不超过 10%重量是理想的。

因此, 最优选 NANA 的含量范围为 6-10%重量。

30 连接反应

为了实现连接反应，需要提供糖半抗原（如 STn）的醛衍生物。它与蛋白（如 KLH）载体进行孵育。缩合反应在半抗原醛和蛋白的赖氨酸侧链的 ϵ 氨基之间发生。反应产物是席夫碱中间体。它用合适的还原剂如氰基硼氢钠进行还原，以在半抗原和载体之间提供稳定的连接。

- 5 半抗原醛可通过提供半抗原的巴豆基衍生物并臭氧化该衍生物以形成臭氧化物来获得。该臭氧化物可被如二甲硫还原以形成醛衍生物。除去副产物乙醛，因此它不能与蛋白缩合。

影响聚集程度的主要过程参数是反应温度和时间。

- 10 影响半抗原取代比例的主要过程参数是半抗原/载体比例，残留的乙醛水平和氰基硼氢化物浓度。

反应温度和时间

连接反应温度优选地是 $39^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ ，反应时间优选地是 17 小时—25 小时。

- 15 反应温度必须足够高，并持续足够长时间，以获得所需的聚集程度。优选地，温度高于 26°C ，更优选地至少 30°C ，还更优选地至少 35°C ，最优选地至少 39°C 。

所用温度不能太高而使免疫原变性。优选地温度不高于 45°C 。更优选地不高于 43°C 。

- 20 反应时间必须足够长以得到所需的聚集程度，期望更高的温度需要更少的反应时间是合理的。然而，如果温度太低，无论温度是多少，聚集的程度都将不充分。同样，反应温度和时间必须足够长以得到所需的半抗原取代程度。反应温度越低则需要更长的反应时间来达到给定的半抗原取代水平。

- 25 反应时间优选地是大于 6 小时，更优选地是至少 12 小时，还更优选地是至少 17 小时。

对反应时间没有绝对的限制。但是因为反应位点被半抗原所占据，所以连接反应速率变慢。聚集速率也随着时间进程而变慢。

- 30 因此，通常反应持续时间不超过 40 小时，更优选地不超过 30 小时，还更优选地不超过 25 小时是理想的。

半抗原醛与载体单体的比例

半抗原醛与载体单体的重量比影响反应速率和得到的半抗原取代比例。

- 5 重量比优选地至少为 0.6:1, 更优选地至少为 1:1, 还更优选地至少为 1.5:1, 甚至更优选地至少为 1.75:1, 最优选地至少为 2:1。

优选地, 重量比不超过 4: 1, 更优选地不超过 3.25:1, 还更优选地不超过 2.75:1。

最优选地, 重量比大约为 2.25:1。

- 10 最终的 KLH 浓度优选地是 8mg/mL—11.5mg/mL。

氰基硼氢化物浓度

最终氰基硼氢化物浓度优选地是 25-125mM, 更优选地是 45-75mM。可选择的还原剂包括硼氢化钠和硼氢化物-吡啶复合物。

15

表征免疫应答

- 细胞介导的免疫应答可在体外或体内进行测定。传统的体外检测是 T 细胞增殖检测法。从患有目标疾病、与疾病相关的个体或接种疫苗的个体采取血样。该个体的 T 细胞通过增殖将因此被引发对新的暴露于该种抗原的应答。增殖需要胸苷, 因为它在 DNA 复制中起到作用。一般来说, T 细胞增殖比 B 细胞增殖更广泛, 甚至在未分离的细胞群中也有可能检测到强烈的 T 细胞应答。然而对 T 细胞进行纯化将会更容易地检测 T 细胞应答。可使用任何基本不不利地影响它们的抗原特异性增殖的 T 细胞纯化方法。在我们优选的程序中, 整个淋巴细胞群首先通过在特定的密度 10.7 下的等密度梯度, 即 Ficoll-Hypaque 或 Percoll 梯度收集(从血、脾或淋巴结中)而获得。然后该混合的细胞群通过多种方法进一步纯化成 T 细胞群。最简单的分离方法是基于 B 细胞和单核细胞/巨噬细胞群可结合到尼龙绒 (nylon wool) 柱上。T 细胞群通过尼龙绒, 大于 90% 的纯 T 细胞群在单一通道获得。其他的方法涉及使用对 B 细胞和或单核细胞的特异抗体, 并在补体蛋白存在下, 裂解非 T 细胞群 (负选择)。
- 20
- 25
- 30

另外有一种正选择技术，其中将抗 T 细胞抗体（CD3）结合到固相基质（如磁珠）上，从而附着 T 细胞，并使它们从非 T 细胞群中分离出来（如通过磁性）。这些细胞可以通过机械或化学分离而从基质中回收出来。

一旦获得纯化的 T 细胞群，将它们在存在被照射的提呈抗原的细胞（脾巨噬细胞、B 细胞、树突细胞）的条件下培养。（这些细胞被照射以防止它们应答和结合氘化的胸苷）。然后成活的 T 细胞（在 100 μ l 补充 20 单位 IL2 的培养基中每孔有 100,000-400,000 个）与检测的肽或其他抗原温育 3-7 天，检测抗原浓度为 1-100 μ g/mL。

在抗原刺激的最后阶段，可通过几种方法测定应答。首先收集无细胞上清，并检测特定的细胞因子的存在。 α -干扰素、IL2 或 IL12 的存在是 Th 辅助 1 型细胞群应答的提示。IL4, IL6 和 IL10 的共同存在是 T 辅助 2 型免疫应答的提示。因此该方法可鉴定辅助 T 细胞亚群。

第二种方法称为芽生法，其涉及在抗原刺激最后阶段将氘化的胸苷加到培养基中（如每孔 1 微居里），然后将细胞与放射性标记的代谢物结合 4-16 小时，随后在滤器上收获并进行闪烁计数。整合的放射性胸苷的水平是 T 细胞复制活动的一个测量标准。阴性抗原或无抗原的对照孔用于依据刺激指数计算芽生法应答。这是 CPM 检测/CPM 对照。优选地，达到的刺激指数至少为 2，更优选地至少为 3，还更优选地至少为 5，最优选地至少为 10。

CMI 也用于在标准实验动物，例如小鼠中进行体内测量。小鼠用引发抗原（priming antigen）进行免疫。当 T 细胞应答后，通过脚垫注射（footpad injection）检测抗原对小鼠免疫。将 DTH 应答（检测小鼠的肿胀程度）与注射如盐溶液的对照小鼠进行比较。

优选地，应答至少是 .10mm，更优选地至少是 .15mm，还更优选地至少是 .20mm，最优选地至少是 .30mm。

体内的体液免疫应答通过从免疫小鼠中采血，并测定血液中与感兴趣的抗原结合的抗体的存在来进行测量。例如，检测抗原进行固定并与样品进行温育，从而捕获同种抗体，然后被捕获的抗体通过与具有标记的抗异种抗体的固相进行温育而进行测量。

优选地，所需的体液免疫应答至少与抗体滴度至少为 1/100，更优

选地至少为 1/1000，还更优选地至少为 1/10,000 所代表的强度一样强。

受试者

本发明中疫苗的接受者可以是任何经过体液或细胞免疫应答能够获得特异性免疫的脊椎动物。

在哺乳类动物中，优选的接受者是灵长目（Orders Primata）的哺乳动物（包括人、猿和猴）、Arteriodactyla（包括马、山羊、牛、绵羊、猪）、啮齿目（Rodenta）（包括小鼠、大鼠、兔和仓鼠）和食肉目（包括猫和狗）。在鸟类中，优选的接受者是火鸡、小鸡和同目的其他成员。最优选的接受者是人。

本发明优选的动物受试者是灵长类哺乳动物。术语“哺乳动物”是指属于哺乳纲的个体，当然包括人。虽然本发明也可用于兽医，但本发明特别适用于人类受试者。术语“非人灵长类”是指除了人科外的任何类人猿亚目成员。这样的非人灵长类包括Ceboidea总科、捲尾猴科（family Cebidae）（新世界猴包括僧帽猴、吼猴（howlers）、蜘蛛猴和松鼠猴）和狨科（family Callithricidae）（包括狨猴）、獼猴总科（superfamily Cercopithecoidea）、猴科（family Cercopithecidae）（包括短尾猿、大狒狒、狒狒、长鼻猴、白腹长尾猴和印度圣猴（sacred hunaman monkeys））；和人总科（superfamily Hominoidae）、猿科（包括长臂猿、猩猩、大猩猩和黑猩猩）。獼猴是短尾猿的一个成员。

药物组分

本发明中的药物制剂包含至少一种有效引发保护性免疫应答的剂量的免疫原。应答可以是体液的、细胞的或其组合。组合物可以包含多种免疫原。

组合物进一步可以包含脂质体。优选的脂质体包括在2000年11月15日提交的Jiang,等, PCT/US00/31281（我们的记事表为JIANG3A-PCT）和1994年8月12日提交的Longenecker, 等, 08/229,606（我们的记事表为LONGENECKER5-USA）和1995年4月12日提交的PCT/US95/04540（我们的记事表为LONGENECKER5-PCT）中鉴定的那些。

组合物可以包含抗原提呈细胞,在这种情况下,为了更有效的提呈,将免疫原在给药前先脉冲到细胞上。

组合物可以包含本领域中已知的助剂或赋形剂。参见,例如, Berkow 等编辑, *The Merck Manual*, 第15版, Merck和Co., Rahway, N.J., 1987;

- 5 Goodman 等编辑, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第8版, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 第3版, ADIS Press, LTD., Williams和Wilkins, Baltimore, MD.(1987), Katzung编辑, *Basic and Clinical Pharmacology*, 第15版, 10 Appleton and Lange, Norwalk, Conn. (1992), 这些参考文献和其中所引用的参考文献全文结合于此作为参考。

- 组合物进一步可包含佐剂,用于非特异性增强免疫应答。一些佐剂对体液和细胞免疫应答都进行加强,其它是特异性地针对一种或其中的另一种。一些加强一种应答而抑制另一种应答。因此佐剂的选择依赖于 15 所需的免疫应答。

组合物可以包括免疫调节物,如促进或抑制细胞或体液免疫应答的细胞因子,或抗这些细胞因子的抑制抗体。

- 根据本发明的药物组合物可进一步包含至少一种癌症化学治疗的化合物,如选自抗代谢物、博来霉素肽抗生素、鬼臼素生物碱、长春花生 20 物碱、烷化剂、抗生素、顺一铂、或亚硝基脲的一种。根据本发明的药物组合物可进一步或附加地包含至少一种病毒化学治疗的化合物,其选自 γ -球蛋白、金刚胺、胍、羟基苯并咪唑、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、缩氨基硫脲(thiosemicarbazones)、甲红硫脲、利福平、ribvirin、嘧啶类似物、嘌呤类似物、磷卡奈、磷乙酸、羟乙氧鸟嘌呤、 25 二脱氧核苷,或甘环核苷。参见,例如, Katzung, 上文,和其中引用的参考文献第798-800页和680-681页,这些参考文献全文结合于此作为参考。

- 抗寄生虫的试剂包括适于抗节肢动物、寄生虫(包括蛔虫、蛲虫、线虫、钩虫、绦虫、鞭虫和血吸虫)和原生动物(包括变形虫、疟疾虫、 30 弓蛔虫(toxoplasmod)和毛滴虫生物)的试剂。例子包括噻苯咪唑

(thiabenazole)、各种除虫菊酯、吡啶酮、贝螺杀、甲苯咪唑、盐酸氯喹、咪唑尼达、双碘方、达拉匹林，盐酸甲氟喹和羟氯喹。

药物用途

5 本发明的目的是保护受试者抵抗疾病。此处所用的术语“保护”，即“保护免受染或疾病”，包含“预防”、“抑制”或“治疗”。“预防”涉及诱发疾病之前给药药物组合物。“抑制”涉及在疾病出现临床症状之前给药组合物。“治疗”涉及在疾病出现后给药保护性组合物。治疗可以是改善性或治愈性治疗。

10 可以理解，在人类和兽医医学中，由于最终诱导事件或一些事件可能是未知的、潜在的、或患者直到事件或一些事件发生后才确诊的，所以通常不可能区分“预防”和“抑制”。因此，通常使用区别于“治疗”的术语“防护”来同时包含“预防”和“抑制”。此处所用的术语“保护”意图包括“防护”。参见如Berker, 上文, Goodman, 上文, Avery, 上
15 文和Katzung, 上文，它们全文结合于此作为参考，包括其中引用的全部参考文献。

所提供的“保护”不必是绝对的，即疾病不必完全被预防或消除，而是假设相对于对照群体有统计学意义上的显著改善（ $p=0.05$ ）。保护可以限定为减轻疾病症状发作的严重性或速度。如果其他试剂对特定的
20 个体无效，如果它可与其他试剂联合使用以加强保护水平，或如果它比竞争性试剂更安全，那么比竞争性试剂提供的保护程度弱的试剂仍然是有价值的。

治疗效果可通过与未治疗对照组比较治疗后疾病的持续时间，严重程度等来确定，优选地，与疾病阶段相匹配。

25 防护效果通常通过比较治疗组的发病率和对照组的发病率来确定，其中治疗组和对照组被认为具有同等的风险，或已对风险的预期差异进行了校正。

一般来说，防护提供给那些由于家族史、个人以前病史或增加暴露于病原体中而处于较高发病危险的人。

给药

至少本发明的一种保护试剂可通过用前述的药物组合物实现意图目的的任何方式给药。

给药方式可以是口服或肠胃外给药，如果是肠胃外给药，则可以是局部或全身的方式。例如，这种组合物的给药可通过多种肠胃外途径，如皮下、静脉内、皮内、肌肉、腹膜内、鼻内、透皮或口腔途径。肠胃外给药可以是快速浓注（bolus injection）或随时间逐步灌注的方式。使用本发明的药物组合物的优选方式是皮下、肌肉或静脉内施用。参见，例如，Berker, 上文, Goodman, 上文, Avery, 上文 和 Katzung, 上文, 它们全文结合于此作为参考，包括其中引用的参考文献。

预防、抑制或治疗通过活性特异免疫治疗引起的免疫应答可减轻的疾病或病症的典型疗法包含在等于和包括1周一约24个月的一段时间，给药有效剂量的前述药物组合物，作为单一治疗给药，或作为增强或加强剂量重复给药。

可以理解，有效剂量依赖于受者的年龄、性别、健康状况和体重，若有的话，协同治疗的种类、治疗频率和所需效果本身。下面提供的有效剂量范围并不意图限制本发明和代表优选的剂量范围。然而，最优选的剂量将适合于个体受试者，如本领域的技术人员所理解和可确定的，在无不适当试验情况下进行检测。典型地涉及对标准剂量进行调整，例如，如果患者体重较轻则需降低剂量。参见，例如，Berkow 等编辑，*The Merck Manual*, 第15版, Merck和Co., Rahway, N.J., 1987; Goodman 等编辑，*Goodman和Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第8版, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 第3版, ADIS Press, LTD., Williams 和 Wilkins, Baltimore, MD.(1987), Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown和Co., Boston, (1985); Chabner等, 上文; De Vita等, 上文; Salmon, 上文; Schroeder等, 上文; Sartorelli 等, 上文和 Katzung, 上文, 其参考文献和此处引用的参考文献全文结合于此作为参考。

在应用于人之前，首先要在实验动物上评估药物的安全性和有效性。

在人的临床研究中，基于所述药物的临床前数据及类似药物（若有的话）的通常剂量，开始时要使用预期对人是安全的剂量。如果该剂量有效，如有需要，则可降低剂量以确定最小有效剂量。如果该剂量无效，则慎重地增加剂量，同时监测病人的副反应征兆。参见，例如，Berkow等编辑，The Merck Manual，第15版，Merck和Co., Rahway, N.J., 1987；Goodman等编辑，Goodman和Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics，第8版，Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990)；Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics，第3版，ADIS Press, LTD., Williams和Wilkins, Baltimore, MD. (1987)，Ebadi,
5 Pharmacology, Little, Brown和Co., Boston, (1985)，其参考文献和此处引用的参考文献全文结合于此作为参考。

根据可以预定或特定的免疫程序表，每个治疗所需的总剂量可以进行多剂量（其可以相同或不同）或单一剂量给药。选择的程序表是使免疫有效的，即，足以引发针对抗原的有效免疫应答，从而可能与其他试剂联合使用以提供保护。将适于达到这种效果的剂量定义为“治疗有效剂量”（注意，即使单独剂量如果单独给药无效，程序表可以是免疫有效的，最好在免疫进程的上下文中对“治疗有效剂量”的含义进行解释）。
15 该应用的有效剂量将依赖于，例如，肽组合物、给药方式、被治疗疾病的阶段和严重性、患者的体重和一般健康状况及处方医生的判断。

典型地，对一个70公斤的成年人来说，药物的活性成分的日剂量是10ng到10g。对于免疫原来说，对这样一个病人的更典型的剂量是10ng—10mg，更可能为1μg—10mg。然而，本发明不限定这些剂量范围。

必须紧记本发明的组合物可通常用于严重的疾病状态，即，危及生命或潜在地危及生命的情况。在这种情况下，考虑到对外来物质最小量和肽的相对无毒性质，治疗医生给药实质上过量的这些肽组合物是可能的而且是感觉是理想的。
25

可在任何有效的时间间隔进行给药。如果时间间隔太短，可能发生免疫麻痹或其他不利反应。如果时间间隔太长，免疫性可能受到损害。如果单独剂量较大，则最适时间间隔可以较长。典型的时间间隔是1周、2周、4周（或1个月）、6周、8周（或2个月）和1年。考虑到患者的免疫
30

能力（如对相关抗原的抗体水平），在连续基础上再评估给药附加剂量和增加或缩短时间间隔的适合程度。

有多种方法可以制备脂质体，例如在Szoka等，Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)，美国专利号4,235,871，4,501,728，4,837,028和5,019,369中的描述，它们结合于此作为参考。

合适的剂型依赖于疾病、免疫原和给药方式；可能包括片剂、胶囊、锭剂、牙膏（dental pastes）、栓剂、吸入剂、溶液、膏剂和parenteral depot。参见，例如，Berker, 上文, Goodman, 上文, Avery, 上文和Ebadi, 上文，通过全文结合于此作为参考，包括所有其中引用的参考文献。

10 抗原可以以一种增强方式被输送，例如，将抗原物质递送到细胞内间隔区以产生抗原提呈的“内源途径”。例如，抗原可以包裹在脂质体中（该脂质体可与细胞融合），或整合到病毒载体（其感染细胞）的衣壳蛋白中。

当抗原是多肽时，可应用的另一种方式是将编码该抗原的裸露DNA肌肉注射到宿主中。该编码DNA被内源化并被表达。

也可能用本发明的药物组合物预先制备自体PBLs，并确定该PBLs已表现出所需的应答反应，然后对受试者给药PBLs或其子集（subset）。

方法

20 结合物的合成

STn-KLH合成的一般过程描述

STn-KLH的制备需要两个化学过程，STn-巴豆基的臭氧化作用以产生STn醛，和随后的STn-醛与KLH的结合。

这些过程必须进行控制以确保产物形成和充分除去反应副产物。

25

臭氧化作用 STn-巴豆基(crotyl)（6-O- α 唾液酸, N-乙酰基 α D-氨基半乳糖基-1-O-2-丁烯）以粉末状获自Raylo Chemicals Inc., Edmonton, Alberta。STn-巴豆基溶解到水中，然后暴露到臭氧中以氧化碳-碳双键，形成臭氧化物结构。然后向溶液中通入氮气以除去过量的臭氧。通过加入甲硫醚（DMS）来除去残余的臭氧/氧气，并还原臭氧化物键以形成STn-醛

30

(STn-CHO)。等摩尔量产生的副产物乙醛最初用二乙醚萃取去除。目前主要在乙酸乙酯中萃取来去除，残余的乙醛和乙酸乙酯的水平通过旋转蒸发进一步降低。将最终的STn-醛溶液进行过滤，并贮存在 -20°C 直至需要所用。

5

STn-醛与KLH的连接

将STn-醛和KLH一起在磷酸盐缓冲液中温育。STn通过在STn-CHO的醛部分与KLH上的赖氨酸残基的末端氨基之间进行缩和反应而连接到KLH上。形成的席夫碱中间体通过氰基硼氢钠还原，从而在STn和KLH之间提供稳定的连接。通过透滤法除去残余的氰基硼氢钠和反应副产物STn-醇，以及臭氧化作用后存在的二甲亚砜和任何乙酰乙酯。产物的蛋白浓度通过稀释进行调节，通过过滤进行灭菌，并贮存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

10

阶段I/II过程的实施例

称量250mg氰基硼氢钠，溶解在7.8mL PBS中，过滤除菌，得到储液(40mg/mL)。称量出含有125mg的KLH溶液(14.1mL 浓度为8.85mg/mL的溶液)的等分试样。将含有150mg半抗原的STn-醛溶液的等分试样加入到KLH溶液中，在 $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下混合 2.5 ± 0.5 分钟(STn/KLH重量比为1.2: 1)。然后将含有125mg氰基硼氢钠的储液的等分试样加到KLH和STn醛混合物中，将反应混合物在 $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下温育 18 ± 0.5 小时，并进行温和摇动。反应副产物用具有YM30膜的Amicon超滤单元通过透滤法除去。产物通过Millipore Millex-GV 0.22微米滤器进行过滤灭菌。

15

20

导致产物的NANA含量%增加的过程改变

STn/KLH比例增加到3: 1(w/w)，并用0.05M磷酸钾缓冲液，pH7.5代替PBS。反应温度增加到 $39\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，在3.5小时中每隔15分钟加入14份等分试样的氰基硼氢钠溶液，至终浓度为125mM。温育时间是 21 ± 3 小时，然后通过透滤法除去反应副产物。

25

最终的过程改变来制备临床产物

30

STn/KLH比例降低为2.25: 1 (w/w), 氰基硼氢钠浓度降低为60mM。

对于商品化结合物的过程改变

反应参数总结于表1中。

5

动物效力测定

免疫

对第一组实验(结果见表3和4), 将结合了ENHANZYN™ 佐剂注射乳剂(Corixa)的0.25µg的剂量每批检测物质注射每组9或10只小鼠(8-12
10 周龄, 雌性, CaF1)。第14天进行第二次注射, 第26天收集血清。

对第二组实验(结果见表5), 每批检测物质以3水平剂量方案注射到45只小鼠(8-12周龄, 雌性, CaF1)中。三个剂量(0.25µg、0.05µg和0.01µg)的检测物质与ENHANZYN™ 佐剂注射乳剂(Corixa)混合, 每个剂量注射一组15只小鼠, 同时另一组小鼠用相同的3个剂量的STn-
15 KLH疫苗进行免疫, 作为内参照(批次STNK 0055)。第14天进行第二次注射, 第26天收集血清。

对第三组实验(结果见表6), 注射方案与第二组相同, 除了: 1) 适当选择检测批次的剂量(在0.0125µg—1.6µg之间), 以使至少两个剂量得到的滴度在由参照批次所确定的标准曲线的工作范围内。

20

检测方案

对STn应答的特异IgG抗体通过在包被有绵羊下颚粘蛋白(OSM)的平板上进行动力学ELISA来测定。免疫小鼠的血清进行3倍系列稀释(1/300-1/656,100), 然后加入到OSM包被的孔中, 室温反应1小时。通过洗涤步骤除去未结合的一级抗体后, 加入过氧化物酶标记的二级抗体,
25 然后加入显色底物ABTS。每个稀释度的Vmax值用带有SOFTmax® Pro软件的分子设备THERMOmax™微孔读数仪在典型的10分钟动力学读取中获得。虽然在这些研究中进行的是3倍稀释, 但为了可直接与已有的用2倍稀释得到的动物效力和人免疫应答数据相比较, 稀释数值表示为log₂
30 滴度。

每只小鼠的滴定终点根据连续V_{max}值的数值差(ΔV_{max})通过数学运算而获得。通过分析已有数据和当前数据,确定了统计上可区分于干扰的 ΔV_{max} 值,并如下定义确定终点的工作标准:终点滴度是log₂滴度,它相应于最后一滴的V_{max}值超过6mOD/min,而没有落下的前一滴的V_{max}值低于6mOD/min。

数据分析

对第一组实验,结果表示为各组小鼠抗体应答的平均滴度(表3)。统计学意义的分析见表4。对第二组实验,相对效力如表5所示进行计算。对第三组实验,相对效力如表6所示进行计算。

分析方法

NANA含量测定

连接到KLH上的唾液酸-Tn的量确定为酸解后从结合物释放的NANA的量。NANA含量通过HPLC在Dionex CarboPac PA1 阴离子交换柱上用脉冲电流检测(AE-HPLC-PAD)定量确定。通过NANA标准浓度对峰面积作图得到标准曲线,检测样品的NANA浓度从标准曲线中获得。

蛋白浓度的测定

通过在280nm的吸收测定蛋白浓度。KLH和STn-KLH的消光系数(1mg/mL)在50mM 磷酸钾缓冲液中测定为 $A_{280} = 1.37$ 。

分子大小的测定

分子大小用1000埃 TSKG5000PW_{XL}尺寸排阻柱,以50mM磷酸钾 pH7.5为流动相,在 0.5mL/分钟的流速下进行测定。柱子连接到由三个检测器:UV吸收、折射率(RI)和激光散射(LLS),监测的Waters 2690 Alliance HPLC系统上。精密检测器激光散射平台安装在Waters 2410 折射率检测器的温控室内部。在分子大小检测中,联合使用了差异折射率测定和静态光散射测定法。在数据获取和分析中使用了精密度获得32(PrecisionAcquire32)和精密度分析。

结果和讨论

发现影响取代水平的反应参数是乙醛的完全去除、半抗原/KLH比例、氰基硼氢化物浓度、反应时间和反应温度。当反应温度为39℃而不是室温时，发生亚单位的交联。在室温下反应速率较慢，但通过适当调整反应时间可获得高的NANA含量。

3个剂量水平检测的样品的反应条件、分子大小、NANA含量和相对效力显示在表5中。结果表明，NANA含量高于5%和三聚体的聚集状态（可能二聚体是足够的）合意地达到高的效力。更高的聚集状态至大约20聚体似乎没有提供任何优势。

批次PD020105-08首先作为疫苗安慰剂，也就是说，在没有任何半抗原存在下，它经历与疫苗相同的连接过程并变成聚合状态（在2,000kD的范围）。随后在23℃与半抗原再次经过该过程以产生6.8%NANA。通常在23℃的反应条件下不会导致聚集，但在这种情况下，确实发生进一步的聚合，并通过尺寸排阻色谱获得了复杂的分子大小模式。该样品的效力与其他“良好的”批次相当。

分子筛洗脱图谱和跨越(across)峰的水力半径计算的实施例显示在图1—9中。在图5中，批次040400-RT和260100RT的图谱重叠放置以进行详细比较。这2个批次在所有分析检测中几乎完全相同，但效力表现出一定的差异。注意，水力半径（大小的量度标准）跨越峰而改变，因此聚集和非聚集的样品大小并不重叠。加权平均MW并不能判别大小的范围，但可通过重新计算峰的“部分(slice)”来获得。

在最初研究中通过1水平剂量检测的样品的分子大小、NANA含量和相对效力显示在表3中。一些样品在两种研究中均进行了检测。表5和6包括表3中未报道的样品特性。

表2所报道的样品的数据分析显示在表3、4、5和6中。用含有约7% NANA的亚单位或聚集的疫苗免疫小鼠后，对OSM上的抗半抗原抗体滴度的比较结果显示在表3中。制备了每种类型的3个批次。数据经过整合后进行统计分析。含有约3% NANA的疫苗批次的类似的比较结果显示在表3中。

抗OSM滴度差异的统计意义显示在表14中。具有3%NANA的STn-KLH聚集没有显著效果。同样，增加NANA含量至7%而没有聚集也没有显著效力。当%NANA增加且产物聚集时，效力的提高很显著，与其他组比较，P值<.0001。

5

参数的范围和注释：

(a) 乙醛除去至<1%(mol/mol; acet-CHO/STn-CHO)的规格。这通过RP-HPLC限制试验来确定。未加工的反应产物有50%mol/mol。残余乙醛的数量效应是，对每摩尔acet-CHO/STnCHO而言，大约降低0.3%的NANA含量。此处所检测的所有样品都符合乙醛去除的规格。

10

(b) 半抗原/KLH的比例是重量/重量。

(c) 氰基硼氢化物的浓度是毫摩尔级的。所测值的范围是20到200mM。

(d) 温度主要影响大小和反应速度。增加温度不一定增加最终的%NANA。在39℃超过3%NANA的最短反应时间大约是6小时。在39℃，反应时间超过48小时产生更高的聚集。

15

(e) 我们估计在 24 小时内达到聚集需要温度>30℃。我们在 43℃进行反应没有任何问题，但更高的温度则使产物难以加工（可能因为聚合体太大，不容易处理）。

表 1. 反应条件的因素分析

根据起始重量比 (S.W.R) 进行分类

流动

STn-CH

5

顺序	S.W.R.	O	KLH	NaCNBH3	时间	温度	NANA	R.R.T*
	STn/KLH	mg/mL	mg/mL	mM	hr	°C	%/wt	Shodex
8	1.52	17.5	11.5	45	17	35	6.2	0.98
9	1.52	17.5	11.5	45	25	43	6.5	0.89
10	1.52	17.5	11.5	75	25	43	6.7	0.89
16	1.52	17.5	11.5	75	17	35	6.1	0.97
20	1.52	17.5	11.5	75	25	35	7.1	0.92
22	1.52	17.5	11.5	75	17	43	7.2	0.89
28	1.52	17.5	11.5	45	25	35	6.7	0.94
32	1.52	17.5	11.5	45	17	43	7.3	0.89
2	2.06	17.5	8.5	75	25	35	6.9	0.93
6	2.06	17.5	8.5	75	17	43	7.5	0.9
11	2.06	17.5	8.5	45	17	43	7.8	0.9
14	2.06	17.5	8.5	45	25	35	6.1	0.97
24	2.06	17.5	8.5	45	17	35	6.5	0.98
27	2.06	17.5	8.5	45	25	43	7.7	0.9
31	2.06	17.5	8.5	75	17	35	7.1	0.97
34	2.06	17.5	8.5	75	25	43	7.1	0.89
4	2.25	22.5	10	60	21	39	8.5	0.89
18	2.25	22.5	10	60	21	39	7.5	0.92
19	2.25	22.5	10	60	21	39	8.5	0.91
30	2.25	22.5	10	60	21	39	8.6	0.9
1	2.39	27.5	11.5	75	25	35	8.2	0.91
5	2.39	27.5	11.5	75	17	43	7.9	0.91
12	2.39	27.5	11.5	45	17	43	8.4	0.89
15	2.39	27.5	11.5	45	25	35	7.4	0.96
21	2.39	27.5	11.5	45	17	35	8.0	0.97
23	2.39	27.5	11.5	45	25	43	9.7	0.89
33	2.39	27.5	11.5	75	17	35	7.7	0.96
35	2.39	27.5	11.5	75	25	43	8.4	0.89
3	3.24	27.5	8.5	45	17	35	7.9	0.97
7	3.24	27.5	8.5	45	25	43	8.9	0.9
13	3.24	27.5	8.5	75	17	35	7.8	0.96
17	3.24	27.5	8.5	75	25	43	8.5	0.91
25	3.24	27.5	8.5	75	25	35	8.9	0.93
26	3.24	27.5	8.5	75	17	43	9.2	0.9
29	3.24	27.5	8.5	45	17	43	9.8	0.91
36	3.24	27.5	8.5	45	25	35	7.7	0.96

* R.R.T=在Shodex上进行尺寸排阻色谱的相对滞留时间。

所示数值相对于甲状腺球蛋白参照，反比于分子大小。

通过激光散射得到的相对分子量的关系显示在表2中。

5 %NANA含量是100*（作为自由糖的唾液酸除以由280nm的光吸收确定的蛋白含量）。它是重量/重量计算。

表2. 用于动物效力实验的STn-KLH批次的反应条件和物理性质

Lo	ID	温度	时间	S.W.R,	NaCNBH ₃	MW	R.R.T,	NANA,
t #		, °C	/小时	STn/KL	,	, kDa	Shode	%
		C		H	mM		x	
10	1 STNK0055	39	23	3.0	125	1200	0.97	7.8
	2 STNK0058	39	21	2.25	125	1500	0.96	8.1
	3 270100-39	39	18.5	2.25	60	1300	0.93	6.7
	4 050400-39	39	20	2.25	60	2100	0.93	8.2
	5 029910-03	39	21	2.25	60	1500	0.95	7.9
	6 BH01003	39	21	2.25	60	1900	0.94	7.4
	7 020105-08	39	21	0.0	60			
15	*							
	7	23	48	3.0	60	9500	---	6.8
	*							
	8 020202-09-3	39	20	1.3	50	2100	---	6.3
	9 020202-09-2	39	20	1.1	50	2100	---	5.8
	10 011299-03	39	20	0.8	50	2500	0.92	5.1
	11 020202-09-1	39	20	0.8	50	2500	---	4.8
20	12 201299-01	39	18.5	0.3	80	4000	0.92	3.0
	13 260100-RT	23	48	2.25	60	500	0.98	7.2
	14 040400-RT	23	48	2.25	60	460	0.99	7.0
	15 SR1328-36	23	48	2.25	60	500	0.99	7.4
	16 211299-01	23	6	1	35	590	1.00	3.2

25 *安慰剂疫苗通过无半抗原存在时，将KLH在39℃进行反应，然后在有半抗原时在23℃重新进行反应而制备。

30 MW和Shodex二者在任何可获得的时间均进行报告。Shodex工作范围很窄，但该点是“亚单位”MW通常相应于0.98—1.00的Shodex值。在这方面，请注意在表1中，0.98的Shodex值仅在反应时间（21小时）和温度（39℃）分别从特定的条件降低到17小时和35℃时才发生。所有其他反应条件导致0.97或更小的Shodex值，并且被认为是代表聚集的产物。运行#8（表1中第一项，Shodex值为0.98）估计含有约25%聚集的物质（通过TSK色谱/激光散射测定）。

表3. 通过平均log₂抗体滴度测定疫苗效力。检测了6个具有高NANA的批次（3个为聚集的，3个为亚单位），一组测定2次，共使用79只小鼠。检测了2个具有低NANA的批次（1个为聚合的，1个为亚单位），共使用18只小鼠。

5	组别类型	批次号	MW, kDa	NANA, %	平均log ₂ 滴度
	高NANA	2	1500	8.1	15.1
	聚集的	3	1300	6.7	15.9, 16.2
		4	2100	8.2	15.6
		组平均			15.6
10	高NANA	13	500	7.2	11.9, 13.3
	亚单位	14	460	7.0	12.4
		15	500	7.4	13.1
		组平均			12.4
	低NANA	12	4000	3.0	9.4
	聚集的				
15	低NANA	16	590	3.2	10.9
	亚单位				

表4. 组间log₂抗体滴度差异的统计意义

	组1	组2	p值
20	高NANA，聚集的	高NANA，亚单位	<0.0001
	高NANA，聚集的	低NANA，聚集的	<0.0001
	高NANA，聚集的	低NANA，聚集的	<0.0001
	高NANA，亚单位	低NANA，亚单位	0.35
25	高NANA，亚单位	低NANA，聚集的	0.05
	低NANA，聚集的	低NANA，亚单位	0.88

表5. 通过在3个剂量水平测定疫苗效力并评估适于剂量—应答曲线的平行线的取代。对于批次1，计算基于来自3个独立实验的3个剂量上log₂滴度的等级来计算等级相对药力。将同时适合所有点的最好的用于定义参照剂量—应答曲线（相对效力为1.00）。对检测批次在3个剂量上计算等级相对效力，并将从参照的剂量—应答曲线取代平行合适的剂量—应答曲线用于计算相对效力（实验/参照）。

	批次#	MW, kDa	NANA, %	相对效力	p-值
	1(Ref., 3运行)	1200	7.8	1.00	
	5	1500	7.9	0.70	0.32
	6	1900	7.4	1.55	0.23
	7	9500	6.8	1.22	0.58
10	10	2500	5.1	0.15	<0.0001
	12	4000	3.0	0.07	<0.0001
	13	500	7.2	0.33	0.0024
	14	460	7.0	0.18	<0.0001
	16	590	3.2	0.04	<0.0001

表6. 通过在中值滴度（median titer）的5点参照剂量—应答曲线上内插（interpolation）测定疫苗效力。检测批次以多剂量进行给药，以使至少2个中值log₂滴度落在标准曲线的工作范围内。相对效力表示为从标准曲线获得的平均值除以由蛋白含量确定的疫苗浓度。

	批次号	MW, kDa	NANA, %	相对效力
20	6(参照)	1900	7.4	1.00
	2	1500	8.1	0.94
	1	1200	7.8	0.89
	7	9500	6.8	1.09
	8	2100	6.3	1.45
	9	2100	5.8	0.57
	10	2500	5.1	0.15
25	11	2500	4.8	0.17
	12	4000	3.0	0.06
	13	500	7.2	0.41
	14	460	7.0	0.06
	15	500	7.4	0.32
	16	590	3.2	0.01

此处引用的文件并不意图承认任何此处引用的文件是相关的现有技术，或承认引用的文件是对本申请的任何权利要求的发明性而言的考虑过的材料。所有关于日期的陈述或关于这些文件内容的陈述是基于申请人可获得的信息，而不构成关于这些文件的日期或内容正确性的承诺。

5 后附的权利要求应作为优选实施方案的非限定叙述。

除了那些在别处所陈述的，以下参考文献因此随本申请提交的时间以其最新版本结合作为参考。Kay, Phage Display of Peptides and Proteins: A Navigator; Cells: A Laboratory Manual ; Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual; Discovering Neurons: The Experimental Basis of
10 Neuroscience; Genome Analysis: A Laboratory Manual Series; Laboratory DNA Science; Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual; Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual; PCR Primer: A Laboratory Manual; Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual; Manipulating the Mouse
15 Embryo: A Laboratory Manual; Molecular Probes of the Nervous System; Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual: A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria; DNA Science: A First Course in Recombinant DNA Technology; Methods in Yeast Genetics: A Laboratory
20 Course Manual; Molecular Biology of Plants: A Laboratory Course Manual.

所有此处引用的参考文献，包括期刊文章或摘要、公布的、通讯的、先前或其他相关美国或外国专利申请、发行的美国或外国专利、或任何其他参考文献，全文结合在此作为参考，包括所有数据、表格、图和引用的参考文献中描述的正文。另外，此处引用的参考文献中引用的参
25 考文件的全部内容也全文结合于此作为参考。

对已知方法步骤、常规方法步骤的参考，已知方法或常规方法不能以任何方式作为本发明任何方面、描述或实施方案在相关技术中被公开、教导或暗示的承诺。

特定实施方案的先前描述将完全揭示本发明的一般本质，以至于通
30 过应用本领域技术的知识（包括此处引用的参考文献的内容），在无不

适当实验和未偏离本发明的一般概念的情况下，可使其他人为各种应用可容易地修改和/或调整这些特定的实施方案。因此，根据此处提供的教导和指导，这样的调整和修改是意图在已公开的实施方案的等同的含义和范围内。可以理解，此处的短语或术语是为了描述而不是限制，使得
5 熟练的技术人员根据此处的教导和指导，并结合本领域普通技术人员的知识来解释本说明书的术语或短语。

本发明实践中有用的或优选的任何种类或范围的描述可看作此处包含的任何亚类（例如，具有一个或多个省略的公开成员的公开种类）或亚范围的描述，以及在所述种类或范围中每个个体成员的单独描述。

10 优选实施方案的描述单独可看作这些优选实施方案的任何可能组合的描述，除了这种组合是不可能的（例如，对于本发明的元素而言互相排斥选择）或被本说明书表达排除在外的。

如果本发明的实施方案在现有技术中已被公开，则本发明的描述可看作包括这类实施方案被删除的如此处所公开的本发明。

15 如申请人所预期的，本发明包括但不限于在后附的权力要求和目前为要求的它们的组合中阐述的主题。它进一步包括这类主题，它们被进一步限制在，如果未已经这样，克服一种或多种现有技术中公开的缺陷的主题。直至以下程度，所有权力要求占用现有技术所公开或暗示的主题，申请人期望本发明对应于删除了占用的(encroaching)主题的这类权力要求。
20

和任何被所述参考文献所引用的参考文献一样，所有在本说明书中任何地方引用的参考文献，包括专利、专利申请、书籍、文章和在线资源均因此结合于此作为参考。

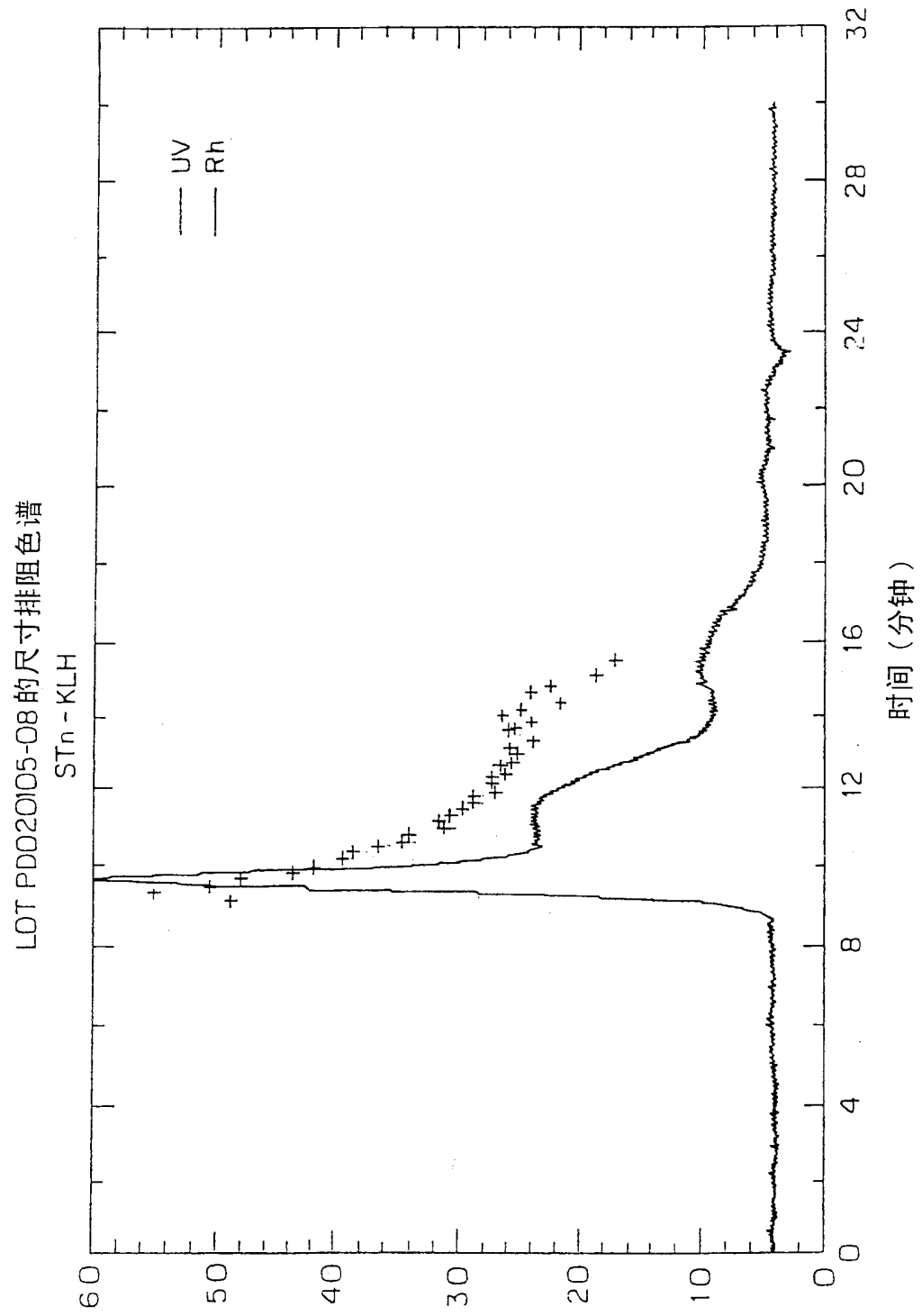


图 1

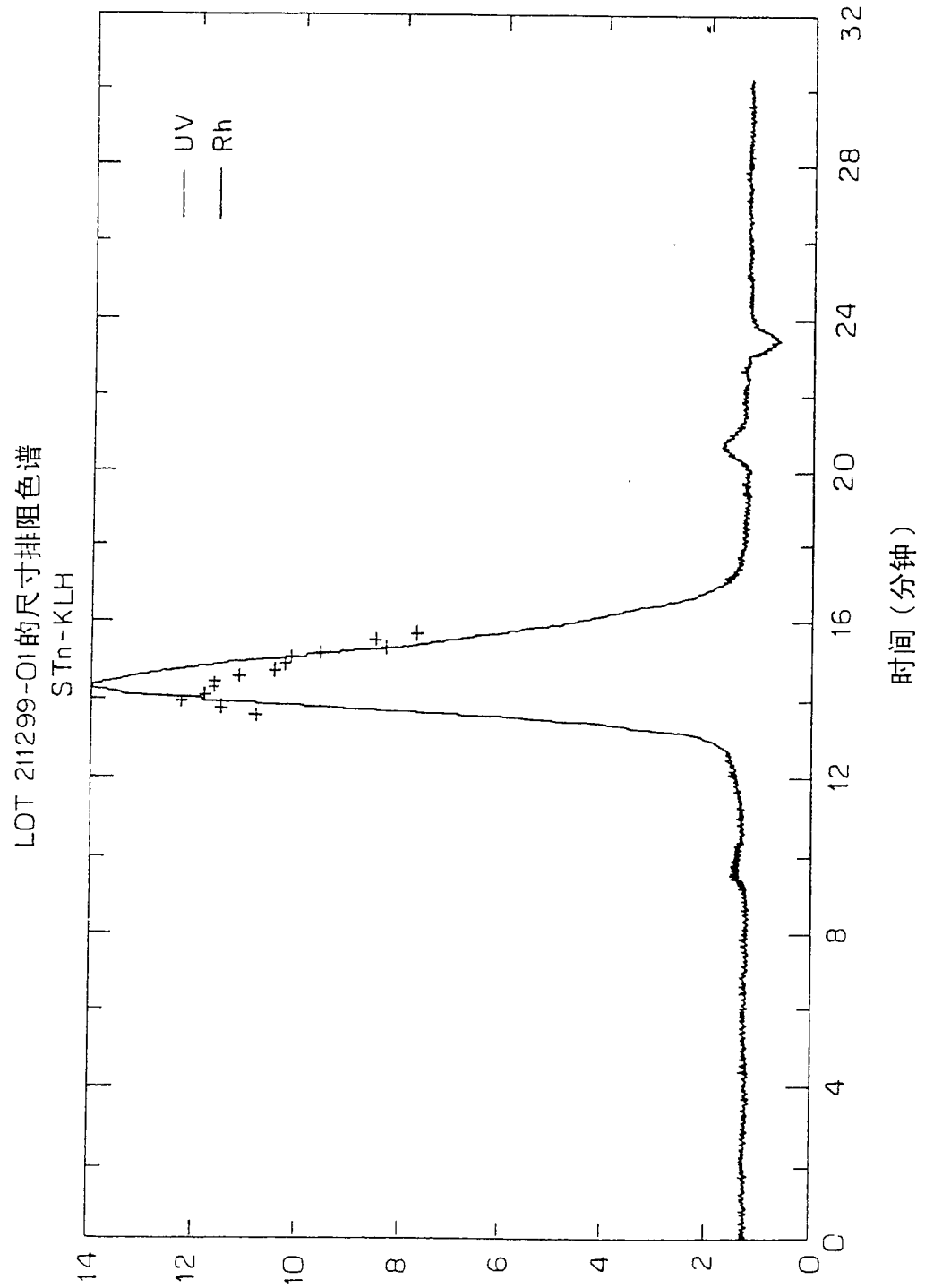


图 2

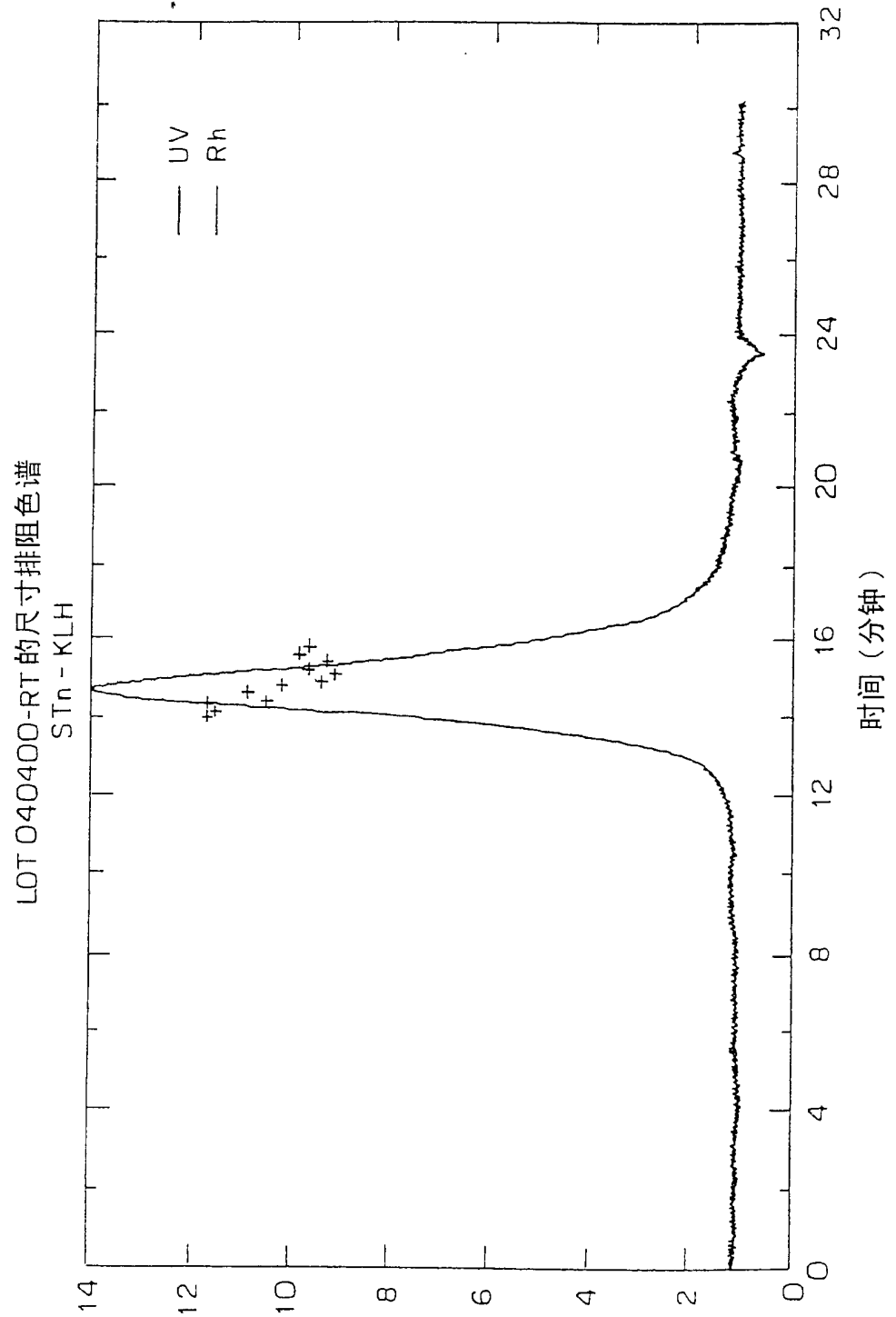


图 3

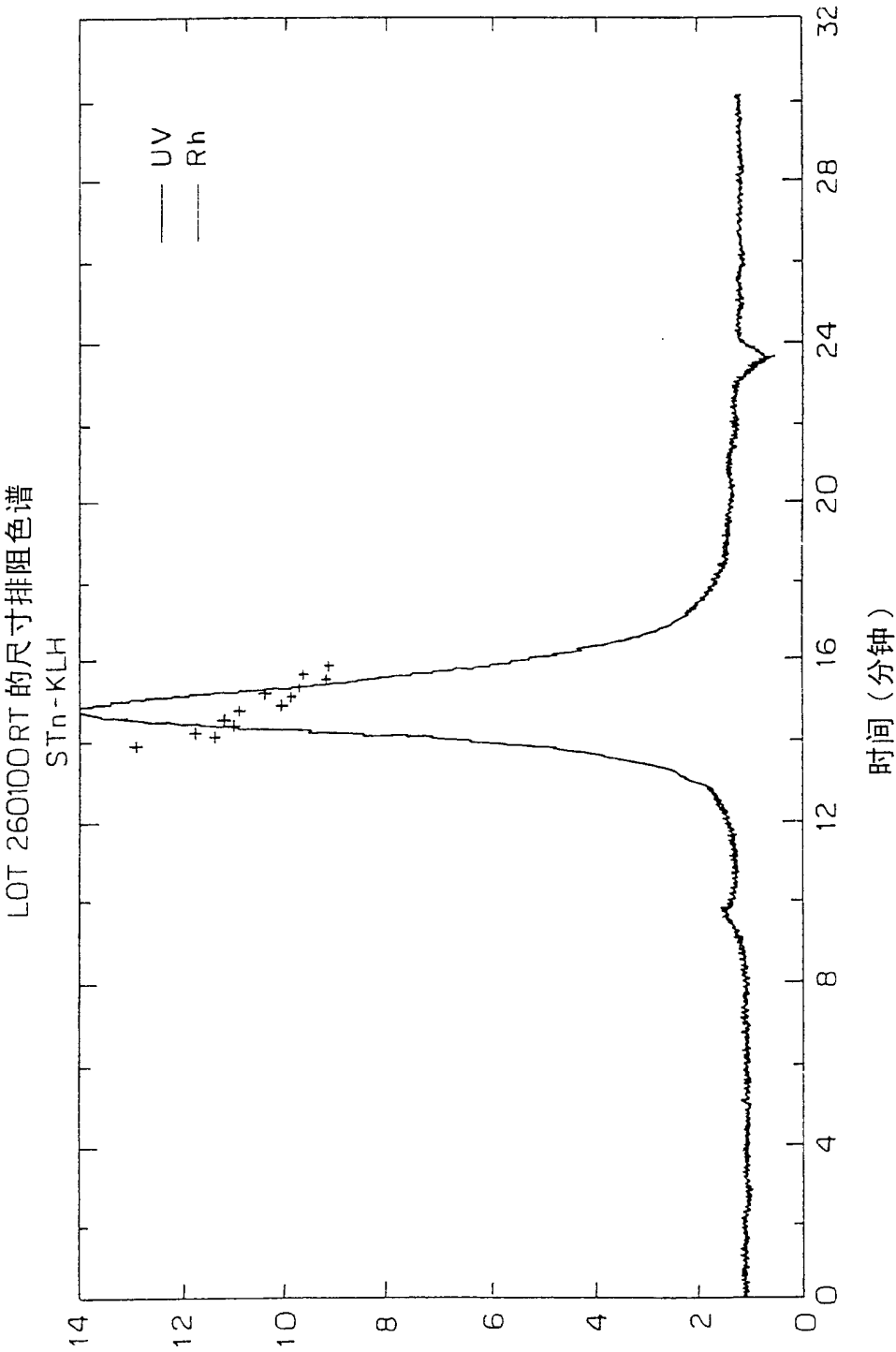


图 4

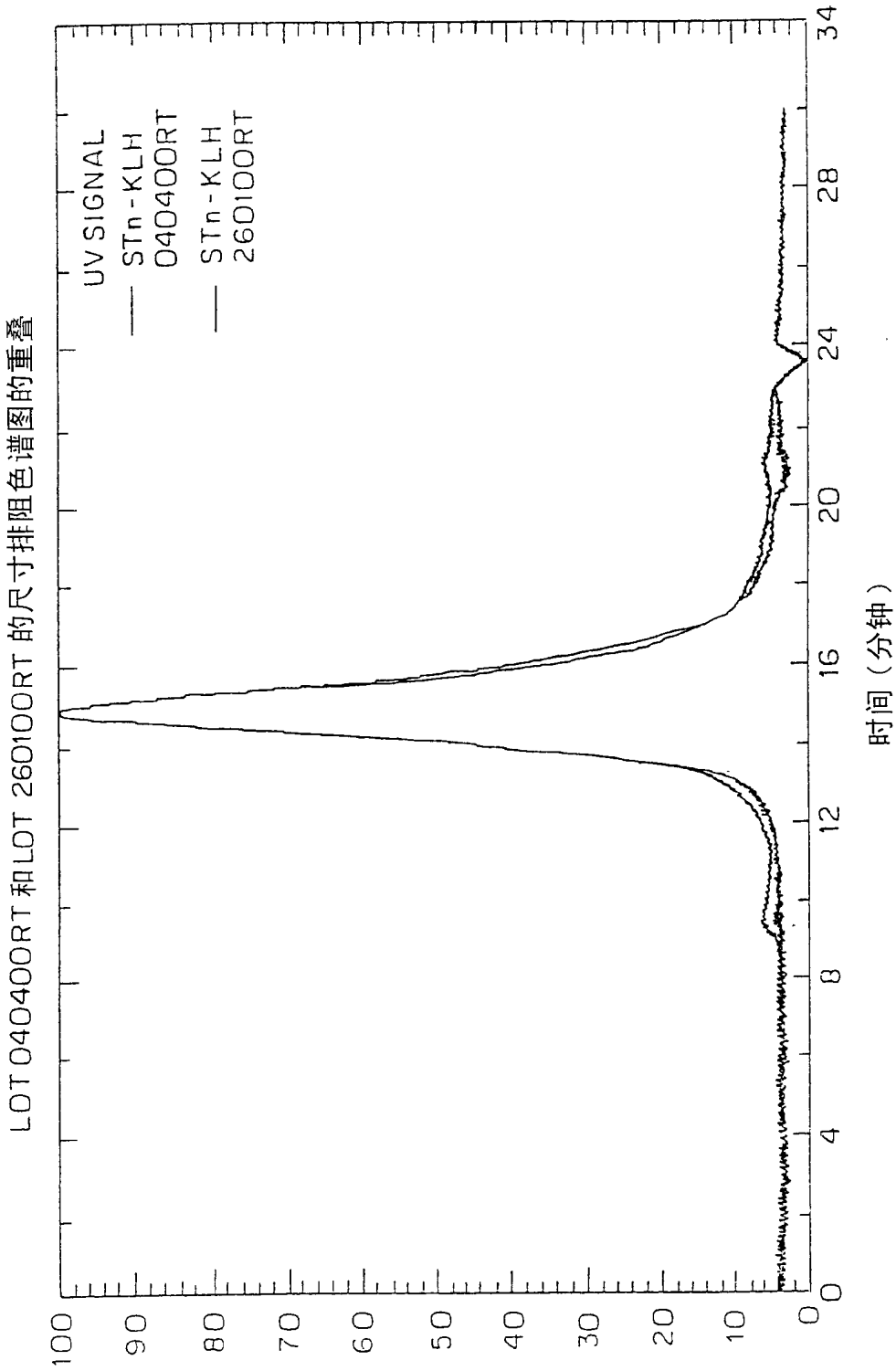


图 5

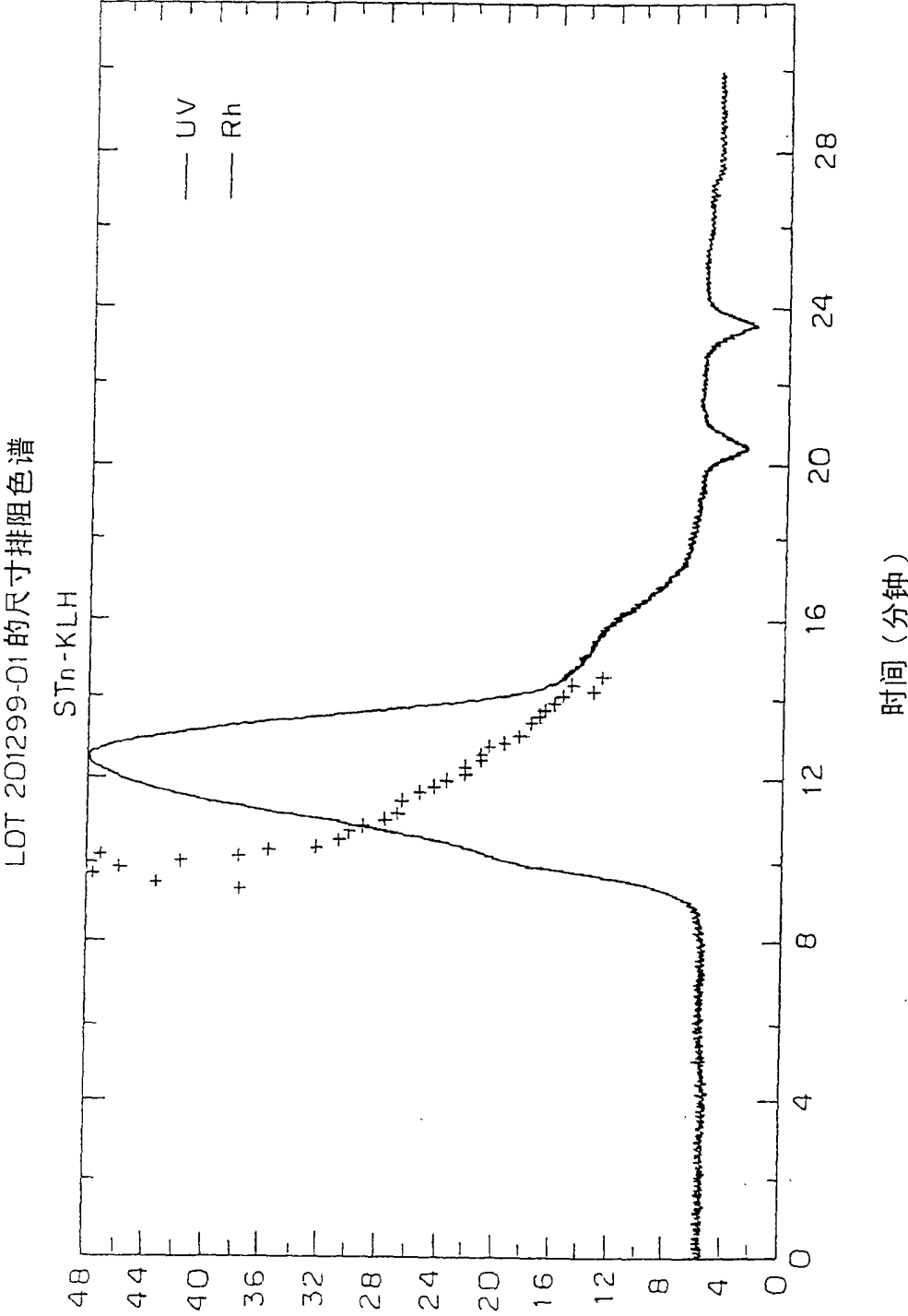


图 6

LOT 011299-03 的尺寸排阻色谱

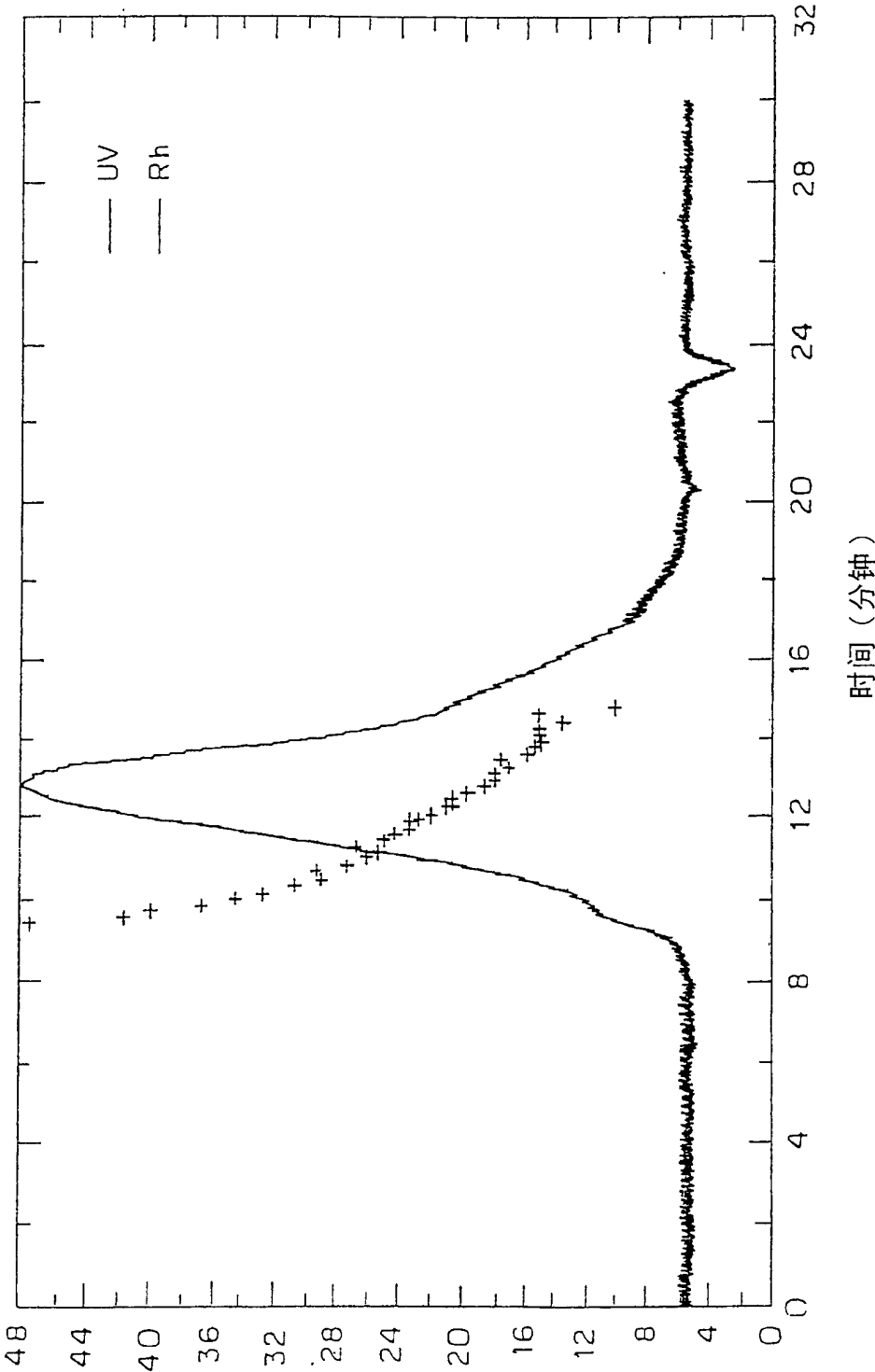


图 7

LOT STNK0055的尺寸排阻色谱

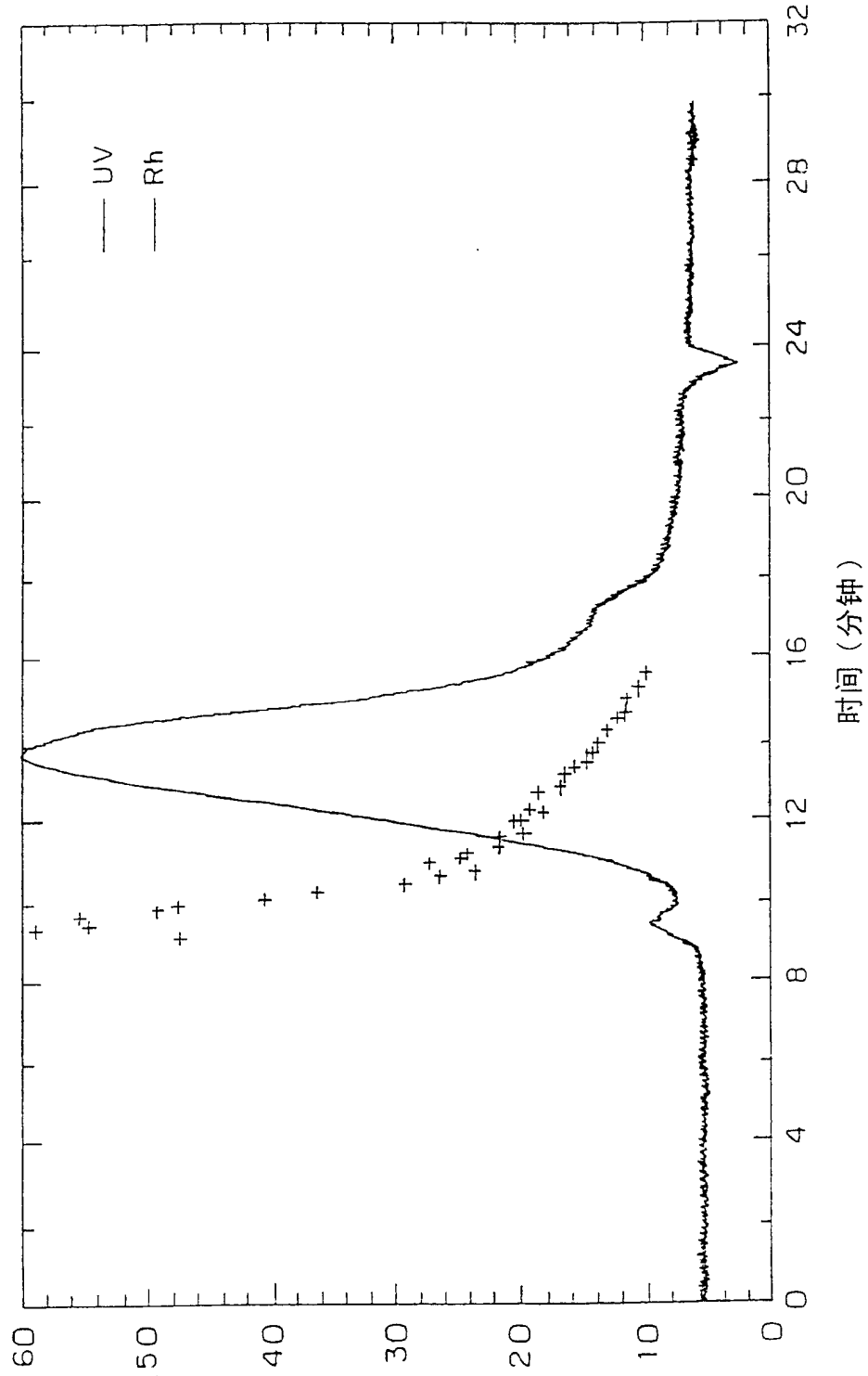
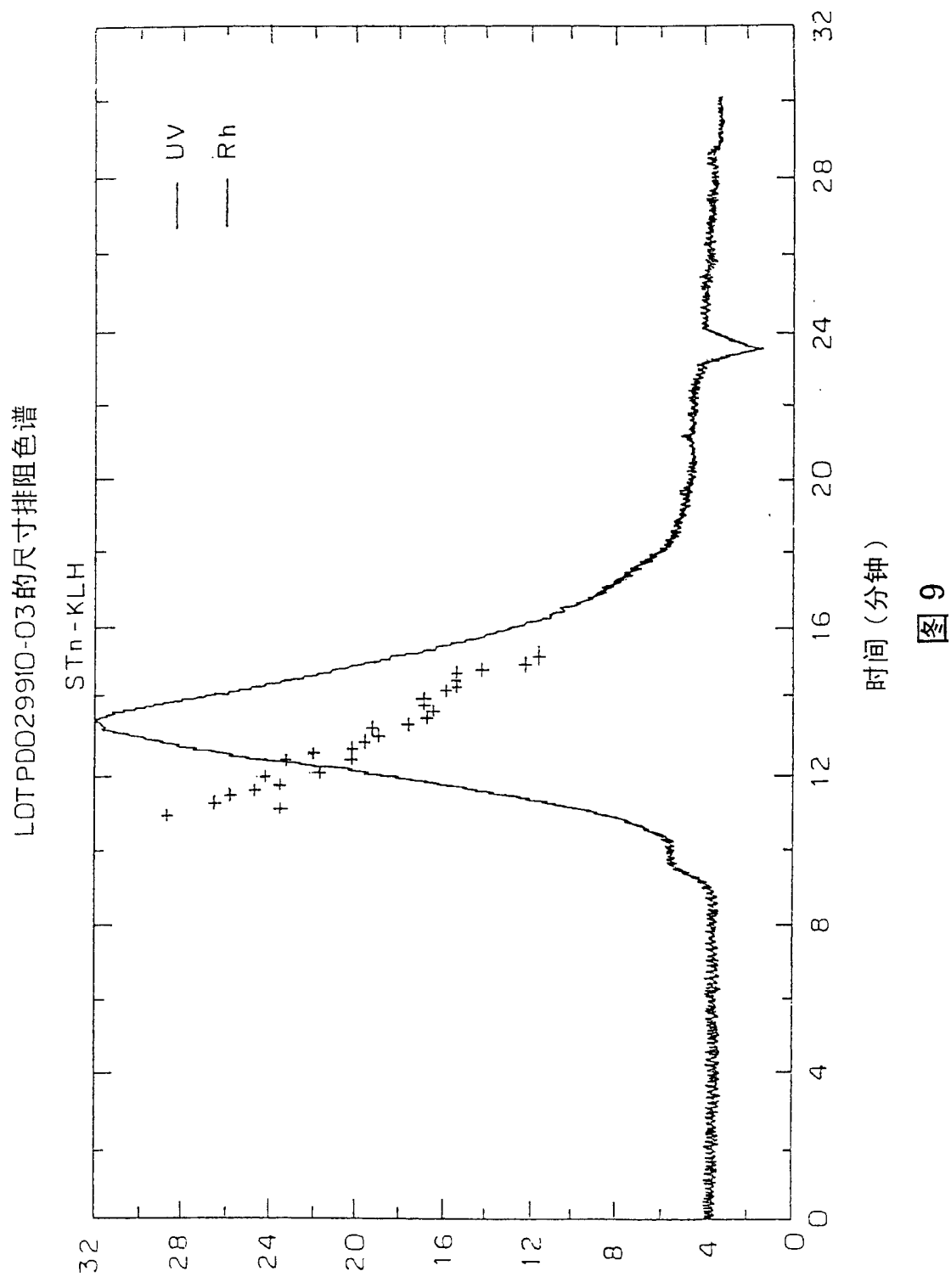


图 8



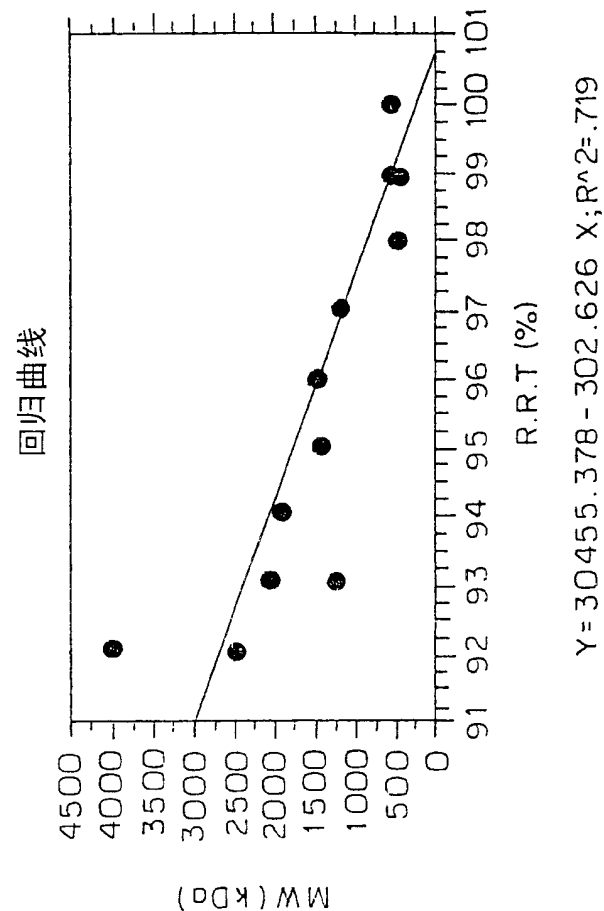


图 10