



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102633893 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号	201110359118. X	<i>A61K 39/10</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2004. 10. 04	<i>A61K 39/05</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61K 39/08</i> (2006. 01)
	0323103. 2 2003. 10. 02 GB	<i>A61P 31/04</i> (2006. 01)
		<i>A61P 31/14</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		<i>A61P 31/20</i> (2006. 01)
	200480034525. 1 2004. 10. 04	<i>C07K 14/33</i> (2006. 01)
(71) 申请人	诺华疫苗和诊断有限公司	<i>C07K 14/34</i> (2006. 01)
地址	意大利锡耶纳	<i>C07K 14/285</i> (2006. 01)
(72) 发明人	P • 科斯坦蒂诺 F • 贝蒂	<i>C07K 1/113</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构	上海专利商标事务所有限公司	
	司 31100	
代理人	陶家蓉	
(51) Int. Cl.		
	<i>C08B 37/00</i> (2006. 01)	
	<i>C08L 5/00</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 31/715</i> (2006. 01)	
	<i>A61P 7/00</i> (2006. 01)	
	<i>C07H 13/06</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 39/095</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 39/385</i> (2006. 01)	
	<i>A61K 39/295</i> (2006. 01)	

权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 3 页

(54) 发明名称

乙酰化过低和过高的脑膜炎球菌荚膜糖

(57) 摘要

乙酰化过低和过高的脑膜炎球菌荚膜糖。来自脑膜炎奈瑟球菌的血清群 W135 和 Y 的荚膜糖改变了它们的唾液酸残基的 7 和 9 位的 O- 乙酰化水平, 并且可用于产生免疫原性组合物。相对于未修饰的天然糖, 本发明的衍生物在与载体蛋白偶联期间择优选择, 并且与天然多糖相比, 这些衍生物的偶联物显示提高了免疫原性。

1. 一种修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖, 其中 : (a) 所述糖中 $\leq 29\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的 ; 和 / 或 (b) 所述糖中 $\geq 26\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的。

2. 一种修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖, 其中 : (a) 所述糖中 $\leq 9\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的 ; 和 / 或 (b) 所述糖中 $\geq 29\%$ 或 $\leq 27\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的修饰的脑膜炎球菌荚膜糖, 其特征在于, 所述糖中 $> 0\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的修饰的脑膜炎球菌荚膜糖, 其特征在于, 所述糖中 $> 0\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的。

5. 一种任选偶联于载体蛋白的修饰的脑膜炎球菌荚膜糖, 其中所述糖含有 n 个或更多个二糖重复单元 :

{[唾液酸]-[己糖]},

其中的己糖是半乳糖或葡萄糖, n 是 1-100 的整数, 并且其中 :

(a) 在所述 n 个或更多个重复单元中 $\leq x\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的 ; 和 / 或

(b) 当己糖是半乳糖时, 在所述 n 个或更多个重复单元中 $\geq y\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的, 并且当己糖是葡萄糖时, 在所述 n 个或更多个重复单元中 $\geq y\%$ 或 $\leq z\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的,

其中当己糖是半乳糖时, x 是 29 且 y 是 26 ; 当己糖是葡萄糖时, x 是 9、y 是 29 且 z 是 27。

6. 如权利要求 5 所述的糖, 其特征在于, 所述己糖是半乳糖, 在所述 n 个或更多个重复单元中约 6% 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的, 并且在所述 n 个或更多个重复单元中约 43% 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的。

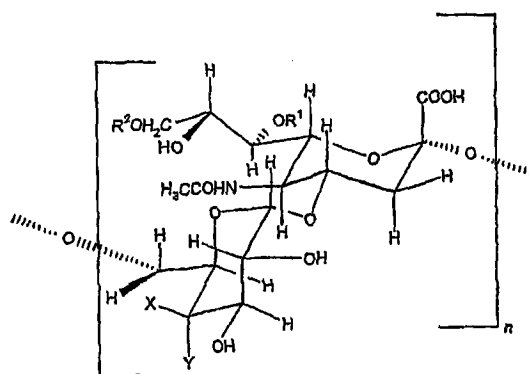
7. 如权利要求 5 所述的糖, 其特征在于, 所述己糖是葡萄糖, 在所述 n 个或更多个重复单元中约 6% 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的, 并且在 所述 n 个或更多个重复单元中约 45% 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的。

8. 一种含有血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖分子的组合物, 其中每个荚膜糖分子的唾液酸残基平均数目是 b, 并且其中 : (a) 组合物中 $\leq 29\%$ 的 a · b 个血清群 W135 唾液酸残基在 7 位 0- 乙酰化 ; 和 / 或 (b) 组合物中 $\geq 26\%$ 的 a · b 个血清群 W135 唾液酸残基在 9 位 0- 乙酰化。

9. 一种含有血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖分子的组合物, 其中每个荚膜糖分子的唾液酸残基平均数目是 b, 并且其中 : (a) 组合物中 $\leq 9\%$ 的 a · b 个血清群 Y 唾液酸残基在 7 位 0- 乙酰化 ; 和 / 或 (b) 组合物中 $\geq 29\%$ 或 $\leq 27\%$ 的 a · b 个血清群 Y 唾液酸残基在 9 位 0- 乙酰化。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的组合物, 其特征在于, 所述荚膜糖偶联于蛋白质运载体。

11. 一种含有 n 个或更多个以下二糖重复单元 of 的糖 :



其中：

-n 是 1-100 的整数，

-X 和 Y 是选自 -H 和 -OH 的不同基团，

-R₁ 是独立选自 -H 和 -COCH₃ 并且在每个二糖单元中可相同或不同，

-R₂ 是独立选自 -H 和 -COCH₃ 并且在每个二糖单元中可相同或不同，并且

-当 X 是 -OH 和 Y 是 -H 时，(a) ≤ 29% 的 R¹ 是 -COCH₃ 和 / 或 (b) ≥ 26% 的 R² 是 -COCH₃。

-当 X 是 -H 和 Y 是 -OH 时，(a) ≤ 9% 的 R¹ 是 -COCH₃ 和 / 或 (b) ≥ 29% 或 ≤ 27% 的 R² 是 -COCH₃。

12. 如以上任一项权利要求所述的糖，其特征在于，所述糖具有低于 30 的平均聚合度。

13. (i) 以上任一项权利要求所述的糖和 (ii) 选自白喉类毒素、破伤风类毒素、流感嗜血菌蛋白 D 和 CRM₁₉₇ 的载体蛋白的偶联产物。

14. 一种免疫原性组合物，所述组合物含有 (a) 以上任一项权利要求所述的修饰的荚膜糖或偶联物，和 (b) 药学上可接受的运载体。

15. 如权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述组合物呈含水形式。

16. 如权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述组合物呈冻干形式。

17. 如权利要求 14-16 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有来自血清群 C 脑膜炎奈瑟球菌的荚膜糖抗原。

18. 如权利要求 14-17 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有来自血清群 A 脑膜炎奈瑟球菌的荚膜糖抗原。

19. 如权利要求 18 所述的组合物，其特征在于，所述血清群 A 抗原。

20. 如权利要求 14-19 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有来自血清群 B 脑膜炎奈瑟球菌的抗原。

21. 如权利要求 14-20 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有来自 B 型流感嗜血菌的糖抗原。

22. 如权利要求 14-21 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有来自肺炎链球菌的抗原。

23. 如权利要求 14-22 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有一种或多种以下抗原：甲肝病毒的抗原；乙肝病毒的抗原；百日咳博德特菌的抗原；白喉类毒素；破伤风类毒素和 / 或脊髓灰质炎病毒抗原。

24. 如权利要求 14-23 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物用作药物。

25. 一种用于产生哺乳动物的抗体应答的方法，所述方法包括将权利要求 14-23 中任

一项所述的组合物给予哺乳动物。

26. 如权利要求 1-13 中任一项所述的修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖和 / 或修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖在生产抗脑膜炎球菌性脑膜炎的药物中的应用。

27. 一种制备免疫原性偶联物的方法,所述方法包括以下步骤:(1) 提供起始血清群 W135 或血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖和载体蛋白,其中一个或两个均是任选修饰的以赋予它 / 它们与另一个的反应性;(2) 在糖和载体蛋白之间形成共价键;和(3) 纯化得到的糖偶联物,其中,在步骤(1)和(3)之间,起始糖中唾液酸残基 9 位的 O-乙酰化程度增加。

乙酰化过低和过高的脑膜炎球菌荚膜糖

[0001] 本申请是 2004 年 10 月 4 日提交的 CN 200480034525.1, 题为“乙酰化过低和过高的脑膜炎球菌荚膜糖”的分案申请。本文引用的所有文献全文纳入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及脑膜炎球菌荚膜糖及其偶联衍生物领域。

背景技术

[0003] 多糖是重要的生物分子, 它们广泛地应用于预防和治疗疾病的制药工业。例如, 荚膜多糖在抗带荚膜的细菌, 如脑膜炎球菌 (脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*))、肺炎球菌 (肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)) 和 Hib (B 型流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)) 的疫苗中使用多年。

[0004] 为增强荚膜多糖, 特别是在儿童中的免疫原性, 开发了偶联疫苗。这些疫苗含有与载体蛋白偶联的荚膜糖 [例如, 参考文献 1-3]。偶联将不依赖于 T 的抗原转变为依赖于 T 的抗原。

[0005] 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 (“MenW135”) 的荚膜糖含有唾液酸 - 半乳糖二糖单位的聚合物 :

[0006] $\rightarrow 4) -D -Neup5Ac (7/90Ac) - \alpha - (2 \rightarrow 6) -D -Gal - \alpha - (1 \rightarrow$

[0007] 其中 “Neu” 指通常称为唾液酸的神经氨酸。

[0008] 类似地, 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y (MenY) 的荚膜糖含有唾液酸 - 葡萄糖二糖单位的聚合物 :

[0009] $\rightarrow 4) -D -Neup5Ac (7/90Ac) - \alpha - (2 \rightarrow 6) -D -Glc - \alpha - (1 \rightarrow$

[0010] 实质上, 这些荚膜糖在一些唾液酸残基的一些 7 和 9 位发现是 O- 乙酰化的。W135 糖的 O- 乙酰化在参考文献 4 中 “首次报道”, 该文献报道了在 O-7 和 O-9 位的 O- 乙酰化。虽然作者注意到以前的工作表明 O- 乙酰化在 O-7、O' -3 或 O' -4 位发生, 但血清群 Y 糖的 O-7 和 O-9 位也观察到乙酰化。参考文献 5 报道了糖的 O- 乙酰基含量的进一步研究。

[0011] 参考文献 5 报道就血清群 W135 而言, “有越来越多的证据显示 O- 乙酰化在引发保护性抗体应答中不重要”。相反, 参考文献 6 报道 “有证据表明 O- 乙酰化影响多糖疫苗的免疫原性”。假定 “CPS [荚膜多糖] 的 O- 乙酰化在引发保护性免疫力中不重要”, 然而参考文献 5 的作者研究了血清群 W135 和 Y 的乙酰化。他们的研究表明这两种血清群于室温在碱性条件下保存 9 天后 O- 乙酰化无变化。

[0012] 参考文献 7 报道于四价多糖疫苗中的 “W135 和 Y 菌株的 O- 乙酰化状态” 以前 “未报道”。作者在参考文献 8 中继续报道 “关于血清群 W135 和 Y 的 O- 乙酰化状态知之甚少”, 并且他们说进一步的工作 “可增进对最优化疫苗制剂的了解”, 然而这种进一步工作的本质和可能的了解并未详细描述。参考文献 9 报道血清群 W135 的 “O- 乙酰化与疫苗开发的关联性尚未确定”。参考文献 6 同意 “O- 乙酰化对血清群 W-135 或 Y 多糖的免疫原性的影响尚未获得” 的论据 (2004 年 1 月)。

[0013] 对血清群 W135 和 Y 的这种误解和信息的缺乏与当前用作糖疫苗的两种其它血清群完全不同。脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 荚膜多糖的 O-乙酰化差异已广泛报道 [10、11]，但似乎对免疫原性无任何负面影响，因为 Menjugate™ 和 NeisVac-C™ 产品均是有效的。相反，血清群 A 多糖的脱-O-乙酰化与“免疫原性的显著降低”有关 [12]。

[0014] 本发明的目标是提供用于生产免疫原性组合物，特别是当偶联于载体蛋白和脑膜炎血清群 W135 和 Y 时的荚膜糖衍生物。

发明内容

[0015] 尽管 O-乙酰化在脑膜炎球菌血清群 W135 和 Y 疫苗中的作用不确定，本发明人发现 O-乙酰化实际上是有关的，特别是在制备偶联疫苗期间。本发明是基于以下发现：来源于 MenW135 和 MenY 并改变唾液酸残基 7 和 9 位的 O-乙酰化水平的修饰荚膜糖可用于制造免疫原性组合物。相对于未修饰的天然糖，本发明的衍生物在与载体蛋白偶联期间择优选。此外，与天然多糖相比，这些衍生物的偶联物显示提高了免疫原性。

[0016] 修饰的糖

[0017] 因此，本发明提供修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖，其中：(a) 糖中 $\leq x\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 O-乙酰化的；和 / 或 (b) 糖中 $\geq y\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 O-乙酰化的。

[0018] 类似地，本发明提供修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖，其中：(a) 糖中 $\leq x\%$ 的唾液酸残基在 7-位是 O-乙酰化的；和 / 或 (b) 糖中 $\geq y\%$ 或 $\leq z\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 O-乙酰化的。

[0019] x 的值取决于血清群：就血清群 W135 而言，x 是 29 或更少（例如，28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）；就血清群 Y 而言，x 是 9 或更少（例如，8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）。

[0020] y 的值也取决于血清群：就血清群 W135 而言，y 是 26 或更多（例如，27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100）；就血清群 Y 而言，y 是 29 或更多（例如，30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100）。

[0021] z 值是 27 或更少（例如，26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）。

[0022] 优选 $x > m$ ，其中选自：0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

[0023] 优选 $z > p$ ，其中 p 选自：0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

[0024] 本发明的糖

[0025] 更具体地说，本发明提供任选与载体蛋白偶联的修饰的脑膜炎球菌荚膜糖，其中该糖含有 n 个或更多个二糖重复单元 { [唾液酸]-[己糖] }，其中己糖是半乳糖或葡萄糖，n 是 1-100 的整数，并且其中 (a) 在所述 n 个或更多个重复单元中 $\leq x\%$ 的唾液酸残基在 7

位是 0-乙酰化的 ;和 / 或 (b) 当己糖是半乳糖时,在所述 n 个或更多个重复单元中 $\geq y\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0-乙酰化的,并且当己糖是葡萄糖时,在所述 n 个或更多个重复单元中 $\geq y\%$ 或 $\leq z\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0-乙酰化的。

[0026] x 值取决于己糖 :当己糖是半乳糖时, x 是 29 或更少 (例如, 28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0) ;当己糖是葡萄糖时, x 是 9 或更少 (例如, 8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0)。

[0027] y 的值取决于己糖 :当己糖是半乳糖时, y 是 26 或更多 (例如, 27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100) ;当己糖是葡萄糖时, y 是 29 或更多 (例如, 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100)。

[0028] z 值是 27 或更少 (例如, 26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0)。

[0029] 如上定义的,优选 $x > m$ 。如上定义的,优选 $z > p$ 。

[0030] 唾液酸残基优选是 N-乙酰神经氨酸。

[0031] 当己糖是半乳糖时, {[唾液酸]-[己糖]} 二糖单元优选是 :

[0032] $\rightarrow 4)\text{-D-Neup5Ac (7/90Ac)-}\alpha\text{-(2}\rightarrow\text{6)-D-Gal-}\alpha\text{-(1}\rightarrow$

[0033] 当己糖是葡萄糖时, {[唾液酸]-[己糖]} 二糖单元优选是 :

[0034] $\rightarrow 4)\text{-D-Neup5Ac (7/90Ac)-}\alpha\text{-(2}\rightarrow\text{6)-D-Glc-}\alpha\text{-(1}\rightarrow$

[0035] 修饰的脑膜炎球菌荚膜糖优选与载体蛋白偶联。在这种偶联物中 : (i) 优选 2-9% 之间、更优选 4-8% 之间、还要优选 5-7% 之间、再优选约 6% 的唾液酸残基在 7 位 0-乙酰化 ; (ii) 优选 35-55% 之间、更优选 40-50% 之间、还要优选 42-46% 之间、再优选约 43% (当己糖是 Gal) 或约 45% (当己糖是 Glc) 的唾液酸残基在 9 位 0-乙酰化。

[0036] 本发明也提供包含 a 分子个血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖的组合物, 其中每个荚膜糖分子的唾液酸残基的平均数目是 b, 并且其中 : (a) 组合物中 $\leq x\%$ 的 a • b 个血清群 W135 唾液酸残基在 7 位 0-乙酰化 ; 和 / 或 (b) 组合物中 $\geq y\%$ 的 a • b 个血清群 W135 唾液酸残基在 9 位 0-乙酰化, 并且其中 x、y 和 z 如上定义。

[0037] 本发明也提供包含 a 分子个血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖的组合物, 其中每个荚膜糖分子的唾液酸残基的平均数目是 b, 并且其中 : (a) 组合物中 $\leq x\%$ 的 a • b 个血清群 Y 唾液酸残基在 7 位 0-乙酰化 ; 和 / 或 (b) 组合物中 $\geq y\%$ 或 $\leq z\%$ 的 a • b 个血清群 Y 唾液酸残基在 9 位 0-乙酰化, 并且其中 x、y 和 z 如上定义。

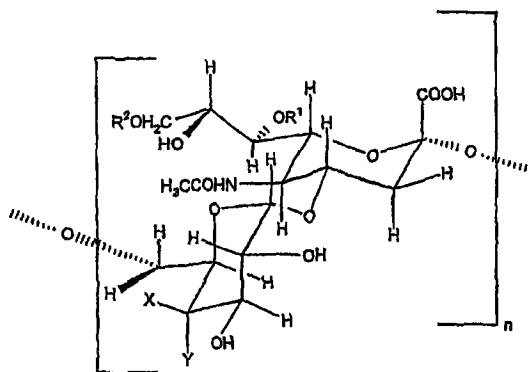
[0038] 所述种群中的糖可偶联于蛋白质运载体和 / 或游离于溶液中。

[0039] 本发明的糖或偶联物优选是纯化的形式, 例如基本上在没有天然多糖的情况下。

[0040] 结构表示

[0041] 本发明提供一种任选偶联于载体蛋白的糖, 该糖含有 n 个或更多个以下二糖重复单元 :

[0042]



[0043] 其中：

[0044] $-n$ 是 1-100 的整数，[0045] $-X$ 和 Y 是选自 $-H$ 和 $-OH$ 的不同基团，[0046] $-R^1$ 独立地选自 $-H$ 和 $-COCH_3$ ，并且在每个二糖单元中可相同或不同，[0047] $-R^2$ 独立地选自 $-H$ 和 $-COCH_3$ ，并且在每个二糖单元中可相同或不同，并且当[0048] $-X$ 是 $-OH$ 并且 Y 是 $-H$ 时，(a) $\leq x\%$ 的 R^1 是 $-COCH_3$ 和 / 或 (b) $\geq y\%$ 的 R^2 是 $-COCH_3$ 。[0049] $-X$ 是 $-H$ 并且 Y 是 $-OH$ 时，(a) $\leq x\%$ 的 R^1 是 $-COCH_3$ 和 / 或 (b) $\geq y\%$ 或 $\leq z\%$ 的 R^2 是 $-COCH_3$ 。[0050] 当 X 是 $-OH$ 并且 Y 是 $-H$ 时， x 是 29 或更少（例如，28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）并且 y 是 26 或更多（例如，27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100）。[0051] 当 X 是 $-H$ 并且 Y 是 $-OH$ 时， x 是 9 或更少（例如，8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）， y 是 29 或更多（例如，30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100）并且 z 值是 27 或更少低（例如，26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5 或 0）。[0052] 优选 $x > m$ ，其中 m 如上定义。优选 $z > p$ ，其中 p 如上定义。

[0053] 糖优选偶联于载体蛋白。

[0054] 当糖偶联于载体蛋白并且 X 是 $-OH$ 和 Y 是 $-H$ 时：(a) 优选约 2-10%、更优选约 4-8%、还要优选约 5-7%、再优选约 6% 的 R^1 是 $-COCH_3$ ；和 / 或 (b) 优选约 35-55%、更优选约 40-50%、还要优选约 42-44%、再优选约 43% 的 R^2 是 $-COCH_3$ 。[0055] 当糖偶联于载体蛋白并且 X 是 $-H$ 和 Y 是 $-OH$ 时：(a) 优选约 2-9%、更优选约 4-8%、还要优选约 5-7%、再优选约 6% 的 R^1 是 $-COCH_3$ ；和 / 或 (b) 优选约 35-55%、更优选约 40-50%、还要优选约 42-46%、再优选约 45% 的 R^2 是 $-COCH_3$ 。

[0056] 本发明的糖和偶联物中唾液酸在 7 和 9 位的乙酰化状态可使用下述的 1D 和 2D 质子 NMR 检测。HPAEC 可用于检测总的 O-乙酰化，但它不能区别不同的位置 [234]。离子喷

雾 MS 用于分析 MenA 中的 O- 乙酰化 [235]。

[0057] 制备修饰的糖的方法

[0058] 本发明也提供制备免疫原性偶联物的方法,包括以下步骤:(1) 提供起始脑膜炎球菌荚膜糖和载体蛋白,其中一个或二两个均是任选修饰的以赋予它/它们与另一个的反应性;(2) 在糖和载体蛋白之间形成共价键;和(3) 纯化得到的糖偶联物,其中在步骤(1)和(3)之间(例如,在反应步骤(2)期间),起始糖中唾液酸残基的 9 位 O- 乙酰化程度增加。

[0059] 脑膜炎球菌荚膜糖优选来自血清群 W135 或 Y。

[0060] 荚膜糖起始物质

[0061] 本发明的修饰的荚膜糖可得自在脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 或 Y 的荚膜中发现的糖。因此,本发明的糖优选是修饰的脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 糖和修饰的脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 糖。

[0062] 脑膜炎球菌荚膜多糖一般通过包括以下步骤的方法制备:多糖沉淀(例如,使用阳离子洗涤剂)、乙醇分级、冷苯酚萃取(以除去蛋白质)和超离心(以除去 LPS)[例如,参考文献 13]。

[0063] 更优选的方法 [14] 包括多糖沉淀,然后使用低级醇进行沉淀多糖的增溶。可使用阳离子洗涤剂,例如四丁基铵和十六烷基三甲基铵盐(如,溴化物盐)或溴化己二甲胺和十四烷基三甲基铵盐实现沉淀。溴化十六烷基三甲基铵(“CTAB”)尤其优选 [15]。可使用低级醇实现沉淀的物质的增溶,所述低级醇例如是甲醇、丙-1-醇、丙-2-醇、丁-1-醇、丁-2-醇、2-甲基-丙-1-醇、2-甲基-丙-2-醇、二元醇等,但乙醇是尤其适合于增溶 CTAB- 多糖复合物。乙醇优选加入沉淀的多糖以得到 50% 和 95% 之间的最终浓度(以乙醇和水的总含量为基准)。

[0064] 再次增溶后,还可处理多糖以除去污染物。这在即使最少的污染也是不可接受的场合(例如,用于人疫苗生产)尤其重要。这通常包括一步或多步过滤,例如可使用深部过滤、经活性炭过滤、体积过滤(size filtration)和/或超滤。一旦过滤除去污染物,可沉淀多糖用于进一步处理和/或加工。这可通过阳离子交换容易地实现(例如,通过加入钙盐或钠盐)。

[0065] 本发明的糖可是多糖或寡糖。寡糖的聚合化程度低于在细菌的天然荚膜多糖中发现的。

[0066] 本发明优选使用寡糖。这些寡糖优选具有低于 30,例如 15 和 25 之间,优选约 15-20 的聚合程度。聚合程度可通过离子交换色谱或通过比色分析容易地检测 [16]。

[0067] 寡糖通过纯化的荚膜多糖的断裂(例如,通过水解、弱酸处理、加热等)容易地形成,然后通常纯化所需体积的片段。如果进行水解,水解产物通常要按大小分级以除去长度短的寡糖。这可通过各种方式获得,例如超滤然后进行离子交换色谱。就血清群 W135 和 Y 而言,优选除去聚合程度低于约 4 的寡糖。

[0068] 作为从天然来源纯化的替代方案,荚膜糖(特别是寡糖)可由完全或部分合成获得,例如参考文献 17 公开的 Hib 合成,参考文献 18 公开的 MenA 合成。

[0069] 共价偶联

[0070] 本发明的修饰的糖可经应用于糖的任何常规下游加工(例如,衍生化、偶联、断裂

等)。为提高免疫原性,本发明修饰的糖优选偶联于载体蛋白。与载体蛋白偶联在儿科疫苗中特别有用 [19] 并且是熟知的技术 [例如,参考文献 20-28 等综述的]。

[0071] 因此,本发明提供载体蛋白和本发明的糖的偶联物。

[0072] 优选的载体蛋白是细菌毒素或类毒素,例如白喉类毒素或破伤风类毒素。特别优选白喉毒素的 CRM₁₉₇ 衍生物 [29-31]。其它合适的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [32]、合成肽 [33,34]、热休克蛋白质 [35,36]、百日咳蛋白 [37,38]、细胞因子 [39]、淋巴因子 [39]、激素 [39]、生长因子 [39]、含有各种病原体衍生抗原的多种人 CD4⁺T 细胞表位的人工蛋白 [40] (例如, N19 蛋白 [41]、流感嗜血菌的蛋白 D [42,43]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [44]、肺炎球菌溶菌素 [45]、离子摄取蛋白 [46]、艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B [47])、突变细菌毒素 (例如,霍乱毒素“CT”或大肠杆菌热不稳定毒素“LT”),如在 Glu-29 处有取代的 CT [48] 等。优选的运载体是白喉类毒素、破伤风类毒素、流感嗜血菌蛋白 D 和 CRM₁₉₇。

[0073] 本发明的组合物中可使用多种载体蛋白,例如来降低运载体抑制的风险。因此,不同的血清群可使用不同的载体蛋白,例如血清群 W135 糖可偶联于 CRM₁₉₇,而血清群 Y 糖可偶联于破伤风类毒素。一种特定的糖抗原也可使用多种载体蛋白,例如血清群 Y 糖可分为两组,一些偶联于 CRM₁₉₇,其它偶联于破伤风类毒素。然而,所有血清群一般优选使用同一载体蛋白,其中优选 CRM₁₉₇。

[0074] 单独一种载体蛋白可携带多种糖抗原 [49]。例如,单独一种载体蛋白可偶联血清群 W135 和 Y 的糖。然而,一般优选每种血清群具有独立的偶联物。

[0075] 优选具有糖:运载体比例 (w/w) 在 1 : 5 (即,过量的蛋白) 和 5 : 1 (即,过量的糖) 之间的偶联物。优选 1 : 2 和 5 : 1 之间的比例,最优选 1 : 1.25 和 1 : 2.5 之间的比例。MenW135 偶联物的比例可为约 1.1, MenY 偶联物可为 0.7。以 10 μg 量的 MenW135 或 MenY 糖为基准,优选的偶联物含有 6.6-10 μg CRM₁₉₇ 运载体。

[0076] 偶联物可与游离的载体蛋白联用 [50]。当给定的载体蛋白以游离和偶联形式存在于本发明的组合物中时,未偶联形式优选不超过组合物中载体蛋白总量的 5%,更优选低于 2 重量%。

[0077] 可使用任何合适的偶联反应,需要时可使用任何合适的接头。

[0078] 偶联之前,糖通常可活化或功能化。活化可包括,例如 (使用) 氰化试剂,如 CDAP (如,四氟硼酸 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓 [51,52 等])。其它合适的技术使用碳二亚胺、酰肼、活化酯、降硼烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU;也参见参考文献 26 的介绍。

[0079] 可使用任何已知的方法经接头基团连接,例如参考文献 3 和 53 所述的方法。一种类型的连接包括多糖的还原性胺化,得到的氨基与己二酸接头基团的一端偶联,然后将蛋白质偶联于该己二酸接头基团的另一端 [24,54,55]。优选的连接类型是羰基接头,该类型可通过修饰的糖的游离羟基与 CDI 反应 [56,57],然后与蛋白反应形成氨基甲酸酯连接。另一优选的连接类型是通过己二酸接头,该类型可通过修饰的糖的游离 -NH₂ 基团与己二酸偶联 (例如,用二酰亚胺激活),然后与蛋白偶联以形成糖-己二酸中间体 [24,54,58]。另一优选的连接类型可通过糖的游离羟基与氰化试剂 (例如,对-硝基苯基氰酸酯,四氟硼酸

1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓 (CDAP), 四氟硼酸 N-氰基三乙基铵 (CTEA) 或) 反应, 然后与蛋白的胺基团反应 (任选经间隔臂, 例如肟) [59, 60]。其它接头包括 B-丙酰氨基 [61]、硝基苯基-乙胺 [62]、卤酰基卤化物 [63]、糖苷键 [2, 64]、6-氨基己酸 [65]、ADH [66]、C₄-C₁₂ 部分 [67] 等。可使用直接连接来代替使用接头。如参考文献 2 和 68 中所述, 与蛋白的直接连接可包括氧化多糖, 然后与蛋白还原性胺化。

[0080] 偶联可包括: 还原伯羟基的端基异构末端, 伯羟基的任选保护 / 脱保护; 伯羟基与 CDI 反应以形成 CDI 氨基甲酸酯中间体; CDI 氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基偶联。

[0081] 优选的方法包括将氨基引入糖 (例如, 通过用 -NH₂ 取代末端的 =O 基团), 然后用己二酸二酯 (例如, 己二酸 N-羟基琥珀酰亚胺二酯) 衍生和与载体蛋白反应。另一优选的反应使用 CDAP 激活与蛋白 D 运载体。

[0082] 偶联后可分离游离和偶联的糖。包括疏水层析、切向超滤、渗滤等的许多合适的方法。[也参见参考文献 69 和 70 等]。

[0083] 当本发明的组合物含有偶联的寡糖时, 寡糖优选在偶联之前制备。

[0084] 药物组合物

[0085] 本发明提供含有以下组分的免疫原性组合物 (例如, 疫苗): (a) 本发明的修饰的荚膜糖和 / 或本发明的偶联物, 和 (b) 一种药学上可接受的运载体。基于糖或糖-蛋白偶联物的疫苗是本领域熟知的, 包括基于脱-O-乙酰化糖的偶联物 (NeisVac-C™)。本发明的疫苗可是预防性 (即, 防止感染) 或治疗性的 (即, 治疗感染), 但一般是预防性的。

[0086] “药学上可接受的运载体” 包括其本身不诱导对接受药物组合物的个体产生有害抗体的任何运载体。合适的运载体一般是大的、代谢缓慢的大分子, 例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物、海藻糖 [71]、脂质聚集体 (如油液滴或脂质体) 和灭活的病毒颗粒。这种运载体是本领域的普通技术人员熟知的。疫苗也可含有稀释剂, 例如水、盐水、甘油等。此外, 可存在辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。对药学上可接受的赋形剂的详细讨论见参考文献 72。

[0087] 药物组合物通常制备为液体溶液或悬浮液的可注射形式; 也可制备成适合于在注射前溶解或悬浮于液体载体中的固体形式。制剂也可乳化或包囊在用于增强佐剂作用的脂质体中。药物组合物的直接递送通常是胃肠外 (例如, 通过注射, 皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内, 或递送至组织的间隙区)。药物组合物也可施用入伤口。其它给予方式包括口服和肺部给药、直肠 (栓剂)、和透皮或经皮涂布 [例如, 参考文献 73]、针孔喷注和皮下喷注。

[0088] 组合物的 pH 优选在 6-8 之间, 优选约 7。可使用缓冲液维持稳定的 pH。当组合物含有氢氧化铝盐时, 优选使用组氨酸缓冲液 [74]。组合物可是无菌和 / 或无热源的。本发明的组合物可是对人等渗的。

[0089] 本发明的组合物可是水性形式 (即, 溶液或悬浮液) 或干燥形式 (例如, 冻干粉)。液体制剂使得组合物可直接从它们的包装形式给予, 而无需在水性介质中重建, 因此适合于注射。这种组合物可存在于小瓶中, 或者它们可存在于预充填的注射器中。这些注射器可有或没有针头。注射器含有单剂量的组合物, 而小瓶可含有单剂量或多剂量。

[0090] 本发明的液体组合物也适合于从冻干形式重建其它疫苗, 例如重建冻干的 Hib 或 DTP 抗原。当本发明的组合物要用于这种临时重建时, 本发明提供一种含有两个小瓶或者一个预充填的注射器和一个小瓶的试剂盒, 其中注射器中的内含物用于在注射前再活化小瓶

中的内含物。

[0091] 本发明的干燥组合物具有保存稳定性,但必须在给药前重建为液体形式。本发明提供包含第一容器和第二容器的试剂盒,其中第一容器含有干燥的本发明组合物,第二容器含有用于重建第一容器中内含物的水性组合物。第二容器中的水性组合物可含有抗原(例如,非脑膜炎球菌)或者可仅含有赋形剂。第一容器通常可是小瓶;第二容器也可可是小瓶或是预充填的注射器。

[0092] 为制备干燥的组合物,可使用稳定剂,例如二糖,如海藻糖和蔗糖,或者糖醇,如甘露醇。这些组分可在冻干前加入并且存在于重建的组合物中。

[0093] 组合物的其它成分包括:氯化钠(用于渗透性),例如约 9mg/ml;洗涤剂,例如吐温(聚山梨酸酯),如吐温 80,通常是低水平,如< 0.01%;和缓冲盐,例如,磷酸缓冲液。组合物可含有抗生素试剂。

[0094] 本发明的组合物可包装为单位剂量形式或多剂量形式。就液体多剂量形式而言,预充填注射器优选小瓶。可常规确定有效剂量,但用于注射的典型的人剂量具有 0.5ml 的体积。

[0095] 用作疫苗的免疫原性组合物含有免疫有效量的抗原以及任何其它成分(如需要)。“免疫有效量”指以单剂量或一系列剂量的一部分给予个体的量对治疗或预防有效。该量依待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类组(例如,非人灵长类、灵长类等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需保护的程、疫苗的制剂、主治医生对医学状况的评价和其它相关因素而变。预计该量属于由常规试验确定的相对宽的范围。

[0096] 每剂量中每种脑膜炎球菌糖抗原的典型量是在 1 μ g 和 20 μ g 之间,例如约 1 μ g、约 2.5 μ g、约 4 μ g、约 5 μ g 或约 10 μ g(表示为糖)。

[0097] 每剂量中每种糖的量可基本相同。然而,优选 MenY 糖过量,例如 MenY : MenW135 的比例(w/w)是 1.5 : 1 或更高。

[0098] 当存在偶联物时,组合物也可含有游离的载体蛋白[50]。存在的游离载体蛋白优选低于组合物重量 5%;更优选低于 2 重量%。

[0099] 本发明的组合物通常含有一种或多种佐剂。这种佐剂包括,但不限于:

[0100] A. 含有矿物质的组合物

[0101] 本发明中合适用作佐剂的含有矿物质的本发明组合物包括天然盐,例如铝盐和钙盐。本发明包含天然盐,例如氢氧化物(例如,羟基氧化物)、磷酸盐(例如,羟基磷酸盐、正磷酸盐)、硫酸盐等[例如,参见参考文献 75 的第 8 和 9 章],或不同无机化合物的混合物,化合物可采用任何合适的形式(例如凝胶、晶体、无定形等),优选具有吸附性。含有矿物质的组合物也可配制为金属盐的颗粒[76]。

[0102] B. 油乳剂

[0103] 在本发明中适合用作佐剂的油乳剂组合物包括角鲨烯-水乳剂,例如 MF59[参考文献 75 的第 10 章;也参见参考文献 77](5%角鲨烯、0.5%吐温 80 和 0.5%司盘 85,使用微流化器配制成亚微米颗粒)。也可使用完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0104] C. 皂苷制剂[参考文献 75 的第 22 章]

[0105] 皂苷制剂也可在本发明中用作佐剂。皂苷是在大量的植物种类的树皮、叶、茎、根和甚至花中发现的异源种类的固醇糖苷和三萜糖苷。皂树(*Quillaia saponaria*

Molina) 树皮的皂苷作为佐剂已广泛研究。皂苷也可购自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、锥花丝石竹 (*Gypsophilla paniculata*) (婚纱花) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根)。皂苷佐剂制剂包含纯化的试剂, 例如 QS21, 以及液体试剂, 例如 ISCOM。QS21 的商品名为 Stimulon™。

[0106] 使用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化皂苷组合物。使用这些技术鉴定了特定的纯化部分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。优选皂苷是 QS21。生产 QS21 的方法公开于参考文献 78。皂苷制剂也可含有固醇, 例如胆固醇 [79]。

[0107] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒 [参考文献 75 的第 23 章]。ISCOM 通常也含有磷脂, 例如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷可用于 ISCOM 中。ISCOM 优选含有一种或多种 QuilA、QHA 和 QHC。对 ISCOM 的进一步描述见参考文献 79-81。ISCOM 任选没有额外的洗涤剂 [82]。

[0108] 基于皂苷的佐剂的开发综述可见参考文献 83 和 84。

[0109] D. 病毒体和病毒样颗粒

[0110] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 在本发明中也可用作佐剂。这些结构通常含有任选与磷脂组合或配制的病毒的一种或多种蛋白质。它们通常是非致病性、非复制的并且通常不含任何天然的病毒基因组。病毒蛋白可重组产生或从完整的病毒分离。适合用于病毒体或 VLP 中的这些病毒蛋白包括以下来源的蛋白: 流感病毒 (例如, HA 或 NA)、乙肝病毒 (例如, 核心或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒、HIV、RNA- 噬菌体、Q β - 噬菌体 (例如外被蛋白)、GA- 噬菌体、fr- 噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty (例如反转录转座子 Ty 蛋白 p1)。参考文献 85-90 进一步讨论了 VLP。病毒体在, 例如参考文献 91 中进一步讨论。

[0111] E. 细菌或微生物衍生物

[0112] 适合用于本发明中的佐剂包括细菌或微生物衍生物, 例如肠细菌的脂多糖 (LPS) 的非毒性衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激寡核苷酸和 ADP- 核糖基化毒素以及它们的解毒衍生物。

[0113] LPS 的非毒性衍生物包括单磷酰基脂质 A (MPL) 和 3-O- 脱酰化的 MPL (3dMPL)。3dMPL 是具有 4、5 或 6 条酰化链的 3 脱 -O- 酰化单磷酰基脂质 A 的混合物。优选的“小颗粒”形式的 3 脱 -O- 酰化单磷酰基脂质 A 公开于参考文献 92。这种 3dMPL 的“小颗粒”要小到足以经 0.22 μ m 膜的无菌过滤 [92]。其它 LPS 非毒性衍生物包括单磷酰基脂质 A 模拟物, 例如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物, 例如 RC-529 [93, 94]。

[0114] 脂质 A 衍生物包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的脂质 A 的衍生物, 例如 OM-174。OM-174 描述于参考文献 95 和 96 的实施例 1 中。

[0115] 适合用作本发明佐剂的免疫刺激寡核苷酸包括含有 CpG 基序的核苷酸序列 (含有通过磷酸键与鸟嘌呤相连的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)。含有回文或聚 (dG) 序列的双链 RNA 和寡核苷酸也显示免疫刺激性。

[0116] CpG 可包括核苷酸修饰物 / 类似物, 例如硫代磷酸酯修饰物并且可是双链或单链的。参考文献 97、98 和 99 公开了可能的类似物取代, 例如用 2' - 脱氧 -7- 脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献 100-105 进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂效应。

[0117] CpG 序列可定向于 TLR9, 例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT [106]。CpG 序列可特异地用

于诱导 Th1 免疫应答,例如 CpG-A ODN,或者可更特异地用于诱导 B 细胞应答,例如 CpG-B ODN。参考文献 107-109 讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。CpG 优选是 CpG-A ODN。

[0118] CpG 寡核苷酸优选构建使得 5' 端易于受体识别。可任选连接两条 CpG 寡核苷酸序列的 3' 端以形成“免疫聚体”(immunomer)。参见,例如参考文献 106 和 110-112。

[0119] 细菌 ADP- 核糖基化毒素和它们的解毒衍生物在本发明中可用作佐剂。蛋白质优选来源于大肠杆菌(大肠杆菌热不稳定毒素“LT”)、霍乱(“CT”)或百日咳(“PT”)。参考文献 113 和 114 描述了解毒 ADP- 核糖基化毒素作为粘膜佐剂和胃肠外佐剂的应用。毒素或类毒素优选含有 A 和 B 亚基的全毒素形式。A 亚基优选含有解毒突变;B 亚基优选未突变的。佐剂优选是解毒的 LT 突变体,例如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。ADP- 核糖基化毒素及它们的解毒衍生物,特别是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂的应用见参考文献 115-122。氨基酸取代的数值参考优选基于参考文献 123 所示的 ADP- 核糖基化毒素的 A 和 B 亚基比对,该文献特别地全文纳入本文作为参考。

[0120] F. 人免疫调节剂

[0121] 适合用作本发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子,例如白介素(如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 等)[124]、干扰素(例如,干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0122] G. 生物粘合剂和粘膜粘合剂

[0123] 生物粘合剂和粘膜粘合剂在本发明中也可用作佐剂。合适的生物粘合剂包括酯化的透明质酸微球[125]或者粘膜粘合剂,例如聚(丙烯酸)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。脱乙酰壳多糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂[126]。

[0124] H. 微粒

[0125] 微粒也可用作本发明的佐剂。微粒(即,直径约 100nm-150 μ m 的颗粒,更优选直径约 200nm-30 μ m,最优选直径约 500nm-10 μ m)由生物可降解且非毒性的材料(例如,聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酸酐、聚己内酯等)形成,其中优选聚(丙交酯-共-乙交酯),微粒可任选处理使之具有带负电荷的表面(例如,用 SDS 处理)或带正电荷的表面(例如,用阳离子洗涤剂,如 CTAB 处理)。

[0126] I. 脂质体(参考文献 75 的第 13 和 14 章)

[0127] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子描述于参考文献 127-129。

[0128] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0129] 适合用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯[130]。这种制剂还含有组合辛苯黄醇(octoxynol)的聚氧乙烯山梨糖醇酯表面活性剂[131]以及组合至少一种额外的非离子表面活性剂,例如辛苯黄醇的聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂[132]。优选的聚氧乙烯醚选自:聚氧乙烯-9-月桂基醚(laureth 9)、聚氧乙烯-9-硬脂酰基醚、聚氧乙烯-8-硬脂酰基醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚和聚氧乙烯-23-月桂基醚。

[0130] K. 聚磷腈(PCPP)

[0131] PCPP 制剂描述于,例如参考文献 133 和 134 中。

[0132] L. 胞壁酰基肽

[0133] 适合用作本发明的佐剂的胞壁酰基肽包括 N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨

酰基-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP) 和 N-乙酰基-胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 MTP-PE)。

[0134] M. 咪唑并喹诺酮 (Imidazoquinolone) 化合物

[0135] 适合用作本发明佐剂的咪唑并喹诺酮化合物的例子包括描述于参考文献 135 和 136 的咪喹莫特 (Imiquimod) 及其类似物 (例如,“雷西喹莫特 (Resiquimod) 3M”)。

[0136] 本发明也可包括一种或多种以上鉴定的佐剂的组合。例如,以下佐剂组合物可用于本发明:(1) 皂苷和水包油乳剂 [137];(2) 皂苷 (例如, QS21)+非毒性 LPS 衍生物 (例如, 3dMPL) [138];(3) 皂苷 (例如, QS21)+非毒性 LPS 衍生物 (例如 3dMPL)+胆固醇;(4) 皂苷 (例如 QS21)+3dMPL+IL-12 (任选+固醇) [139];(5) 3dMPL 与, 例如 QS21 和 / 或水包油乳剂的组合 [140];(6) 含有 10% 角鲨烯、0.4% 吐温 80TM、5% 普朗尼克嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP 的 SAF, 微流化为亚微米乳剂或涡流产生较大颗粒的乳剂;(7) RibiTM 佐剂系统 (RAS), 含有 2% 角鲨烯、0.2% 吐温 80 和一种或多种细菌细胞壁成分的 (Ribi Immunochem), 所述细胞壁成分由单磷酸基脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 组成, 优选 MPL+CWS (DetoxTM); 和 (8) 一种或多种天然盐 (例如铝盐)+LPS 的非毒性衍生物 (例如 3dMPL)。

[0137] 参考文献 75 的第 7 章公开了其它作为免疫刺激剂的物质。

[0138] 铝盐和磷酸钙是优选的胃肠外佐剂。突变型毒素是优选的粘膜佐剂。

[0139] 优选含有磷酸铝佐剂的本发明组合物。优选不含有氢氧化铝。磷酸铝佐剂的含量可为每毫升约 0.6 毫克 Al³⁺。

[0140] 免疫原的组合

[0141] 本发明的组合物可含有本发明修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖和本发明修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖。

[0142] 其它抗原也可包含于本发明组合物中。因此, 本发明提供的组合物含有本发明修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖和 / 或本发明修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖, 还含有一种或多种选自下列的抗原:

[0143] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的荚膜糖抗原。

[0144] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖抗原。

[0145] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 的蛋白质抗原, 例如参考文献 141-150 中的。

[0146] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 微泡的制剂 [151], “天然 OMV” [152], 气泡或外膜小泡 [例如, 参考文献 153-158 等]。这些可从遗传操作的细菌 [159-162] 制备来, 例如增加免疫原性 (例如, 过度表达免疫原)、降低毒性、抑制荚膜多糖合成、下调 PorA 表达等。它们可从气泡过多 (hyperblebbing) 的菌株制备 [163-166]。可包括非致病性奈瑟球菌属的小泡 [167]。无需使用洗涤剂可制备 OMV [168, 169]。它们可在其表面表达非奈瑟球菌蛋白 [170]。它们可是 LPS- 消除的。它们可与重组抗原混合 [153, 171]。可用具有不同的 I 型外膜蛋白亚型的细菌的小泡, 例如使用 2 种不同遗传改造小泡种群的 6 种不同的亚型 [172, 173], 每个种群显示 3 种亚型, 或者使用 3 种不同遗传改造小泡种群的 9 种不同的亚型, 每个种群显示 3 种亚型等。有用的亚型包括: P1. 7, 16; P1. 5-1, 2-2; P1. 19, 15-1; P1. 5-2, 10; P1. 12-1, 13; P1. 7-2, 4; P1. 22, 14; P1. 7-1, 1; P1. 18-1, 3, 6。

- [0147] - 流感嗜血菌 B 的糖抗原 [例如 174]。
- [0148] - 肺炎链球菌的抗原 [例如 208, 209, 210]。
- [0149] - 甲肝病毒的抗原, 例如灭活病毒 [例如 175, 176]。
- [0150] - 乙肝病毒的抗原, 例如表面和 / 或核心抗原 [例如 176, 177]。
- [0151] - 百日咳博德特菌的抗原, 例如百日咳博德特菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA), 也任选与百日咳杆菌粘附素和 / 或凝集原 2 和 3 的组合 [例如, 参考文献 178 和 179]。可使用细胞百日咳抗原。
- [0152] - 白喉抗原, 例如白喉毒素 [如, 参考文献 180 的第 3 章], 如 CRM₁₉₇ 突变体 [如, 181]。
- [0153] - 破伤风抗原, 例如破伤风类毒素 [例如, 参考文献 180 的第 4 章]
- [0154] - 脊髓灰质炎病毒抗原 [例如, 182, 183], 如 IPV。
- [0155] 如需要, 毒性蛋白抗原可解毒 (例如, 通过化学和 / 或遗传学方法解毒百日咳毒素 [179])。
- [0156] 当药物组合物中含有白喉抗原时, 也优选含有破伤风抗原和百日咳抗原。类似地, 当含有破伤风抗原时, 也优选含有白喉和百日咳抗原。类似地, 当含有百日咳抗原时, 也优选含有白喉和破伤风抗原。
- [0157] 药物组合物中抗原的浓度通常是至少 1 μ g/ml。任何给定抗原的浓度一般足够引发抗该抗原的免疫应答。
- [0158] 抗原优选吸附于铝盐佐剂上。
- [0159] 编码抗原的核酸可用作本发明的药物组合物中蛋白质抗原的替代品 [例如, 参考文献 184-192]。因此, 本发明药物组合物中的蛋白质组分可为编码该蛋白质的核酸 (优选 DNA, 例如以质粒的形式) 所代替。类似地, 本发明的组合物可含有模拟糖抗原的蛋白质, 例如模拟表位 [193] 或抗独特型抗体。这些可替代单个的糖组分或是对它们的补充。例如, 疫苗可含有 MenC[194] 或 MenA[195] 荚膜多糖的肽模拟物来替代糖本身。
- [0160] 组合的脑膜炎球菌疫苗
- [0161] 优选的本发明组合物含有本发明修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖、本发明修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖和血清群 C 荚膜糖, 其中荚膜糖偶联于载体蛋白。组合物也可含有优选偶联于载体蛋白的血清群 A 荚膜糖。这些组合物中的糖优选寡糖。寡糖偶联物可按照参考文献 14 公开的方法制备。
- [0162] 血清群 A 糖可是 0- 乙酰化或脱 -0- 乙酰化的。血清群 C 糖可是 0- 乙酰化或脱 -0- 乙酰化的。
- [0163] 以 10 μ g 糖为基准, 优选的 MenC 偶联物含有 12.5-25 μ g CRM₁₉₇ 运载体。以 10 μ g 糖为基准, 优选的 MenA 偶联物含有 12.5-33 μ g CRM₁₉₇ 运载体。
- [0164] MenC 和 MenA 偶联物的典型剂量与 MenW135 和 MenY 的相同, 即在 1 μ g-20 μ g 之间, 例如约 1 μ g、约 2.5 μ g、约 4 μ g、约 5 μ g 或约 10 μ g。
- [0165] 血清群 C、W135 和 Y 的糖的优选比例 (w/w) 是 :1 : 1 : 1; 1 : 1 : 2; 1 : 1 : 1; 2 : 1 : 1; 4 : 2 : 1; 2 : 1 : 2; 4 : 1 : 2; 2 : 2 : 1 和 2 : 1 : 1。血清群 A、C、W135 和 Y 的糖的优选比例 (w/w) 是 :1 : 1 : 1 : 1; 1 : 1 : 1 : 2; 2 : 1 : 1 : 1; 4 : 2 : 1 : 1; 8 : 4 : 2 : 1; 4 : 2 : 1 : 2; 8 : 4 : 1 : 2; 4 : 2 : 2 : 1; 2 : 2 : 1 : 1;

4 : 4 : 2 : 1 ; 2 : 2 : 1 : 2 ; 4 : 4 : 1 : 2 和 2 : 2 : 2 : 1。每剂量中优选使用基本上等量的每种糖。

[0166] 当组合物含有血清群 A 糖时,可通过使用含有一种或多种血清群 A、W135 和 / 或 Y 糖的水性组合物从冻干形式重建血清群 A 糖来制备。

[0167] 当组合物含有血清群 A 糖时,它可以是其中天然糖的一个或多个羟基被阻断基团取代的修饰的糖 [196]。这种修饰提高了耐水解性。优选所有或基本上所有的单糖单元具有阻断基团取代。

[0168] 除了含有血清群 Y、W135 和 C (和任选的 A) 的糖抗原之外,本发明的组合物可含有一种或多种血清群 B 的抗原。与血清群 A、C、W135 和 Y 不同,血清群 B 的荚膜糖由于类似于自身抗原,故不适合于在人中用作免疫原。如果要使用 MenB 的糖抗原,需要使用修饰的糖,例如其中糖的唾液酸残基中的 N-乙酰基被 N-酰基取代。合适的 N-酰基是 C₁-C₈ 酰基,例如丙酰基 [197]。然而除了使用糖抗原外,优选使用多肽抗原。

[0169] 因此,组合物可含有一种或多种诱导抗 MenB 感染的免疫应答的多肽抗原。更一般地说,给予对象后,组合物可在对象中产生抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 的超毒力谱系 A4、ET-5 和谱系 3 的两种或多种 (例如 2 或 3) 的杀细菌抗体应答。

[0170] 已公布了血清群 B 脑膜炎奈瑟球菌的基因组序列 [148] 并且可从编码的多肽中选择合适的抗原 [150]。参考文献 141-150 公开了抗原的例子。优选的组合物含有以下 5 种抗原 [198] 的一种或多种:(1) “NadA”蛋白质,优选寡聚形式 (例如,三聚形式);(2) “741”蛋白质;(3) “936”蛋白质;(4) “953”蛋白质;和 (5) “287”蛋白质。

[0171] 这 5 种蛋白质的原型序列见以下参考文献 143:

[0172]

蛋白质	NadA	741	936	953	287
SEQ ID NO ^s	2934 和 2944	2535 和 2536	2883 和 2884	2917 和 2918	3103 和 3104

[0173] 当血清群 B 蛋白质用于本发明的组合物时,它可含有这些原型序列之一的氨基酸序列,或者它可含有符合以下条件的氨基酸序列:(a) 具有与原型序列 50% 或更高的同一性 (例如,60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更高);和 / 或 (b) 含有原型序列的至少 n 个连续氨基酸的片段,其中 n 是 7 或更大 (例如,8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更大)。优选的 (b) 的片段缺少原型序列的 C 末端和 / 或 N 末端的一个或多个氨基酸 (例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多)。其它优选的片段含有这些序列的表位。

[0174] 这 5 种 MenB 抗原可以 5 种独立的蛋白质存在于组合物中,但优选这些抗原中的至少两种以单一的多肽链表达 (“杂种”蛋白 [参考文献 145-147]),即使得这 5 种抗原形成少于 5 种多肽。杂种蛋白具有两种主要的优点:第一,自身不稳定或表达不佳的蛋白可通过加入能克服这些问题的合适杂种配偶体来协助;第二,由于仅需采用一种表达和纯化 (方法) 来产生两种分别有用的蛋白质,简化了商业化生产。本发明组合物中包含的杂种蛋白可含有 5 种基本抗原的两种或多种 (即,1、2、3、4 或 5)。优选由 5 种抗原中的两种构成的杂种,例如含有以下组合的杂种:NadA 和 741;NadA 和 936;NadA 和 953;NadA 和 287;741 和

936 ;741 和 953 ;741 和 287 ;936 和 953 ;936 和 287 ;953 和 287。

[0175] 组合包含于本发明组合物中的 3 种优选 MenB 抗原是：

[0176] 具有 C 末端缺失和加工的前导肽的菌株 2996 的 NadA

[0177] ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTN
LTKTVNENKQNVDAK

[0178] VKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIVKIDEKLEAVADTV
KHAEAFNDIADSLDE

[0179] TNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIA
TNKDNIAKKANSADV

[0180] YTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLF
QPYNVG

[0181] 287-953 杂种

[0182] MASPDVKSADTLSPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGGGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNNGAAATDKP
KNEDEGAQNDMPQNA

[0183] ADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGGDPSAGGENAGNTAAQGTNQ
AENNQTAGSQNPASS

[0184] TNPSATNSGGDFGRITNVGNSVVIDGPSQINITLTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADKISNYK
KDGKNDGKNDKFVGL

[0185] VADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRFRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIF
APEGNRYRLTYGAEK

[0186] LPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSRGRFAAKVDFGSKSVDGIIIDSGDGLH
MGTQKFKAIDGNF

[0187] KGTWTENGGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHANAR
FAIDHFNTSTNVGGF

[0188] YGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSV
DGNLTMHGKTAPVKL

[0189] KAEKFNCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ *

[0190] 936-741 杂种

[0191] MSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLG
QVATEGEKQFVGQIA

[0192] RSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEE
QAQITQKVSTTVGVQ

[0193] KVITLYQNYVQRGSGGGVAAIDIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKV

[0194] SRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFD
KLPEGGRATYRGTA

[0195] GSDDAGGKLTYTIDFAAQKGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGI
FGGKAQEVAGSAEVK

[0196] TVNGIRHIGLAAKQ *

[0197] 如上所述,含有 MenB 抗原的本发明组合物可更适宜地诱导有效抗超毒力谱系 A4、ET-5 和谱系 3 的两种或三种血清杀细菌抗体应答。它们还可诱导抗超毒力谱系亚群 I、亚群 III、亚群 IV-1 或 ET-37 复合物的一种或多种,抗其它谱系,例如超侵入性谱系的杀细菌抗体应答。这些抗体应答易于在小鼠中检测并且是疫苗效力的标准指标 [例如,参见参考文献 150 的尾注]。组合物无需诱导这些抗超毒力谱系中每种 MenB 菌株的杀细菌抗体;而是就特定超毒力谱系中血清群 B 脑膜炎球菌的 4 种或更多种菌株的任何给定组而言,组合物诱导的抗体对该组的至少 50% (例如,60%、70%、80%、90%或更高) 是杀细菌的。菌株的优选组包括分离自以下至少 4 个国家的菌株:GB、AU、CA、NO、IT、US、NZ、NL、BR 和 CU。如参考文献 150 所述,血清优选具有至少 1024 的杀菌滴度 (例如,2¹⁰、2¹¹、2¹²、2¹³、2¹⁴、2¹⁵、2¹⁶、2¹⁷、2¹⁸ 或更高,优选至少 2¹⁴),即当血清稀释 1/1024 时,能杀死至少 50% 特定菌株的测试细菌。优选的组合物可诱导抗血清群 B 脑膜炎球菌的以下菌株的杀细菌应答:(i) 来自簇 A4,菌株 961-5945 (B:2b:P1. 21,16) 和 / 或菌株 G2136 (B:-);(ii) 来自 ET-5 复合物,菌株 MC58 (B:15:P1. 7,16b) 和 / 或菌株 44/76 (B:15:P1. 7,16);(iii) 来自谱系 3,菌株 394/98 (B:4:P1. 4) 和 / 或菌株 BZ198 (B:NT:-)。更优选的组合物可诱导抗菌株 961-5945、44/76 和 394/98 的杀细菌应答。菌株 961-5945 和 G2136 均是奈瑟球菌 MLST 参考菌株 [同前参考文献 199 中的 638 和 1002]。菌株 MC58 被广泛使用 (例如,ATCC BAA-335) 并且是参考文献 148 中测序的菌株。菌株 44/76 被广泛使用并鉴定 (例如,参考文献 200) 并且是奈瑟球菌 MLST 参考菌株之一 [同前参考文献 237 中的 237;参考文献 201 中的表 2 的第 32 行]。菌株 394/98 于 1998 年在新西兰首次分离,并且已公布了使用该菌株的几项研究 (例如,参考文献 202 和 203)。菌株 BZ198 是另一个 MLST 参考菌株 [同前参考文献 199 的 409;参考文献 201 中表 2 的第 41 行]。组合物还可诱导抗来自 ET-37 复合物的血清群 W135 菌株 LNP17592 (W135:2a:P1. 5,2) 的杀细菌应答。这是 2000 年在法国分离的 Haji 菌株。

[0198] 其它可包含于本发明组合物中的 MenB 多肽抗原包括含有以下一种或多种氨基酸序列的多肽:参考文献 141 的 SEQ ID NO:650;参考文献 141 的 SEQ ID NO:878;参考文献 141 的 SEQ ID NO:884;参考文献 142 的 SEQ ID NO:4;参考文献 143 的 SEQ ID NO:598;参考文献 143 的 SEQ ID NO:818;参考文献 143 的 SEQ ID NO:864;参考文献 143 的 SEQ ID NO:866;参考文献 143 的 SEQ ID NO:1196;参考文献 143 的 SEQ ID NO:1272;参考文献 143 的 SEQ ID NO:1274;参考文献 143 的 SEQ ID NO:1640;参考文献 143 的 SEQ ID NO:1788;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2288;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2466;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2554;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2576;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2606;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2608;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2616;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2668;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2780;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2932;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2958;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2970;参考文献 143 的 SEQ ID NO:2988、或含有符合以下条件的氨基酸序列的多肽:(a) 与所述序列具有 50% 或更高同一性 (例如,60%、70%、80%、90%、95%、99% 和更高);和 / 或 (b) 含有所述序列的至少 n 个连续氨基酸的片段,其中 n 是 7 或更大 (例如,8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 或更大)。优选的 (b) 的片段含有相关序列的表位。可含有多于一种 (例如,2、3、4、5、6) 的这些多肽。

[0199] 与 Hib 糖组合

[0200] 当组合物含有 B 型流感嗜血菌抗原时,它一般是 Hib 荚膜糖抗原。流感嗜血菌 b 的糖抗原是熟知的。

[0201] 为增强其,特别是在儿童中的免疫原性,Hib 糖与载体蛋白共价偶联是有利的。总体上,制备多肽偶联物,特别是 Hib 荚膜多糖是很好描述的。本发明可使用任何合适的 Hib 偶联物。合适的载体蛋白见上述,优选的 Hib 糖的运载体是 CRM₁₉₇(“HbOC”)、破伤风类毒素(“PRP-T”)和脑膜炎奈瑟球菌的外膜复合物(“PRP-OMP”)。

[0202] 偶联物的糖部分可是多糖(例如,全长的聚核糖基核糖醇磷酸酯(PRP)),但优选水解多糖形成寡糖(例如,分子量为约 1-5kDa)。

[0203] 优选的偶联物含有经己二酸接头与 CRM₁₉₇ 共价连接的 Hib 寡糖 [16,204]。破伤风类毒素也是优选的运载体。

[0204] Hib 抗原的给药优选导致 $\geq 0.15 \mu\text{g/ml}$ 和更优选 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ 浓度的抗 PRP 抗体。

[0205] 当组合物含有 Hib 糖抗原时,优选它不含氢氧化铝佐剂。如果组合物含有磷酸铝佐剂,则 Hib 抗原可吸附至佐剂 [205] 或者它可为非吸附的 [206]。可通过选择抗原/佐剂混合期间正确的 pH、具有合适的零荷电点的佐剂和组合物中各种不同抗原的合适混合顺序来防止吸附 [207]。

[0206] 本发明的组合物可含有多于一种 Hib 抗原。Hib 抗原可是冻干的,例如通过本发明的脑膜炎球菌组合物重建。

[0207] 与肺炎球菌抗原组合

[0208] 当组合物含有肺炎链球菌抗原时,它通常是优选偶联于载体蛋白的荚膜糖 [例如,参考文献 208-210]。优选含有多于一种肺炎链球菌的血清型的糖。例如,广泛使用 23 种不同的血清型的多糖的混合物,这些混合物是具有 5-11 种之间不同血清型的多糖的偶联疫苗 [211]。例如,PrevNar™ [212] 含有来自 7 种血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F) 的抗原,其中每种糖通过还原性胺化分别偶联于 CRM₁₉₇,每 0.5ml 剂量具有 0.2 μg 各种糖 (4 μg 的血清型 6B),偶联物吸附于磷酸铝佐剂。本发明的组合物优选包括至少血清型 6B、14、19F 和 23F。偶联物可吸附到磷酸铝上。

[0209] 组合物可含有一种或多种多肽抗原作为使用肺炎球菌的糖抗原的替代品。肺炎球菌的几种菌株的基因组序列可用 [213,214] 并且可经反向疫苗学 [215-218] 来鉴定合适的多肽抗原 [219,220]。例如,如参考文献 221 所定义的,组合物可含有一种或多种以下抗原: PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、SpsA、LytB、LytC、LytA、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130 和 Sp130。组合物可含有多于一种(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14) 的这些抗原。

[0210] 在一些实施方案中,组合物可含有肺炎球菌的糖和多肽抗原。这些抗原可简单混合使用,或者肺炎球菌糖抗原可偶联于肺炎球菌蛋白。适合于这些实施方案的运载体包括上段所列的抗原 [221]。

[0211] 肺炎球菌抗原可是冻干的,例如与 Hib 抗原一起冻干。

[0212] 治疗方法

[0213] 本发明也提供用于产生哺乳动物抗体应答的方法,该方法包括将本发明的药物组合物给予哺乳动物。

[0214] 本发明提供用于产生哺乳动物抗体应答的方法,该方法包括有效量的本发明组合物的给药步骤。免疫应答优选是保护性的并且优选涉及抗体。该方法可产生加强应答。

[0215] 哺乳动物优选是人。当疫苗是预防性用途时,人优选是儿童(例如,幼童或婴儿)或青少年;当疫苗是治疗用途时,人优选是成年人。用于儿童的疫苗也可给予成年人,例如为评价安全性、剂量、免疫原性等。

[0216] 本发明也提供用作药物的本发明组合物。所述药物优选能产生哺乳动物的免疫应答(即,它是免疫原性组合物)并且更优选是疫苗。

[0217] 本发明也提供本发明修饰的血清群 W135 脑膜炎球菌荚膜糖和/或本发明修饰的血清群 Y 脑膜炎球菌荚膜糖在生产用于产生哺乳动物免疫应答的药物中的应用。糖优选是偶联的。药物优选是疫苗。

[0218] 这些应用和方法优选用于预防和/或治疗奈瑟球菌引起的疾病(例如,脑膜炎、败血症、菌血症、淋病等)。优选预防和/或治疗细菌性和/或脑膜炎球菌性脑膜炎。

[0219] 给予本发明的组合物后,检查治疗性治疗效果的一种方法包括监测奈瑟球菌感染。给予本发明的组合物后,检查预防性治疗效果的一种方法包括监测抗 5 种基本抗原的免疫应答。本发明组合物的免疫原性可通过将它们给予测试对象(例如,12-16 个月大的儿童,或动物模型 [222]),然后检测包括血清杀细菌活性(SBA)和总的与高亲和性抗荚膜 IgG 的 ELISA 滴度(GMT)的标准参数。这些免疫应答通常在给予组合物 4 周后检测,并且与给予组合物之前的数值比较。SBA 测量由补体介导的细菌杀死并且可使用人或年幼家兔补体测定。WHO 标准要求疫苗在多于 90% 的受者中诱导 SBA 至少上产生 4 倍。优选 SBA 增加至少 4 倍或 8 倍。当给予多次剂量时,需要进行多次给药后测定。

[0220] 本发明的优选组合物赋予患者的抗体滴度应是人患者可接受百分比的高于每种抗原性组分的血清保护标准。具有相关抗体滴度的抗原是熟知的,在该滴度之上宿主可认为被血清转化为抗该抗原,这种滴度由,诸如 WHO 的组织公布。优选大于 80% 的对象的统计学显著样本是血清转化的,更优选大于 90%,还要优选大于 93%,最优选 96-100%。

[0221] 本发明的组合物一般可直接给予患者。直接递送可通过胃肠外注射(例如,皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或递送至组织的间隙区),或通过直肠、口服、阴道、局部、经皮、鼻内、眼、耳、肺或其它粘膜给药来实现。优选大腿或上臂的肌肉内给药。注射可经针(例如,皮下注射针),但也可选择无针注射。典型的肌肉内剂量是 0.5ml。

[0222] 本发明可用于引发全身性和/或粘膜免疫力。

[0223] 剂量治疗可是单剂量方案或多剂量方案。多剂量可用于初次免疫方案和/或加强免疫方案。初次剂量方案之后可进行加强剂量方案。引发剂量之间与引发和加强之间合适的计时(例如,4-16 周之间)可惯常确定。

[0224] 奈瑟球菌感染身体的各种地方,所以本发明的组合物可以各种形式制备。例如,组合物可制备为液体溶液或悬浮液的可注射形式。也可制备为适合于在注射前溶解或悬浮于液体载体中的固体形式(例如,冻干组合物)。组合物可制备为局部给药形式,例如作为软膏、乳膏或粉末。组合物可制备为口服给药形式,例如作为片剂或胶囊,或作为糖浆(任选加入香料)。组合物可制备为使用细粉或喷雾的肺部给药形式,例如作为吸入剂。组合物可制备为栓剂或子宫托。组合物可制备为鼻、耳或眼给药形式,例如,作为喷雾、滴剂、凝胶或粉末[例如,参考文献 223 和 224]。已有报道成功地经鼻给予肺炎球菌糖 [225, 226]、肺炎球菌多肽 [227]、Hib 糖 [228]、MenC 糖 [229] 与 Hib 和 MenC 糖偶联物的混合物 [230]。

[0225] 概要

[0226] 术语“含有”表示“包含”以及“组成”，例如“含有”X 的组合物可由除 X 以外的物质构成或可包含其它物质，例如 X+Y。

[0227] “基本上”不排除“完全”，例如“基本上无”Y 的组合物可完全无 Y。“基本上”可视需要从本发明定义中省去。

[0228] 与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x \pm 10\%$ 。

[0229] 例如，“ $\leq x\%$ 的唾液酸残基在 7 位是 0- 乙酰化的”的表述不表示组合物中每个糖分子必需在 7 位具有相同程度的 0- 乙酰化。该表述不表示组合物中每个糖分子必需在 7 位具有 $\leq x\%$ 的 0- 乙酰化。相反，一些可具有 $\geq x\%$ ，而其它具有 $\leq x\%$ ，但在全部种类的糖中所有唾液酸残基的 7 位的平均乙酰化程度 $\leq x\%$ 。该情况同样适用于像“ $\geq y\%$ 的唾液酸残基在 9 位是 0- 乙酰化的”和类似的表述。

[0230] 应该理解的是糖环可以打开和封闭的形式存在，并且当本文的结构式显示是封闭形式时，本发明也包括打开的形式。

[0231] 唾液酸也称为神经氨酸。

[0232] 附图简述

[0233] 图 1 和 2 分别显示了水解的 MenW135 和 MenY 的注释的 NMR 图谱。

[0234] 图 3 和 4 分别显示了在制备 MenW135-CRM₁₉₇ 和 MenY-CRM₁₉₇ 偶联物期间，唾液酸残基在 7 和 9 位的 0- 乙酰化状态。

[0235] 图 5 和 6 分别显示了使用 MenW135 和 MenY 在小鼠中获得的抗寡糖抗原的 IgG 滴度。

[0236] 本发明的实施方式

[0237] A. 脑膜炎球菌多糖的产生和纯化

[0238] 如参考文献 14 所述从 MenW135 和 MenY 中纯化荚膜多糖。

[0239] B. 制备修饰的血清群 W135 和 Y 多糖偶联物

[0240] 纯化的多糖于 80°C 在乙酸的 50mM 乙酸钠缓冲液，pH4.7 中水解约 3 小时。唾液酸 (SA) 和还原的末端 SA 之比确定水解产生平均 DP 约 15-20 的寡糖。

[0241] 水解产物经 30kDa 截断膜超滤 (12-20 渗滤体积的 5mM 乙酸盐缓冲液 /15-30mM NaCl pH6.5)。含有高分子量种类的渗余物弃去，渗透物上样在 5mM 乙酸盐缓冲液 /15mM NaCl pH6.5 中平衡的 Q- 琼脂糖快速流动柱。然后为除去 DP $\leq 3-4$ 的寡糖，用 10CV 平衡缓冲液洗涤柱，并用 3CV 5mM 乙酸盐缓冲液 /500mM NaCl pH 6.5 洗脱。

[0242] 向分级的寡糖溶液中加入氯化铵或乙酸铵至终浓度 300g/L，然后加入氰基硼氢化钠至终浓度 49g/L 或 73g/L。混合物于 50°C 孵育 3 天以产生氨基寡糖，然后使用 13 渗滤体积的 0.5M NaCl 和 7 渗滤体积的 20mM NaCl 通过具有 1kDa 或 3kDa 截断膜的切向流动超滤来纯化氨基寡糖。纯化的寡糖然后用旋转蒸发器干燥以除水。

[0243] 干燥的氨基寡糖以 40mM 氨基的浓度溶解于蒸馏水，然后加入 9 体积的 DMSO，再加入三乙胺至终浓度 200mM。向得到的溶液加入己二酸 N- 羟基琥珀酰亚胺二酯至终浓度 480mM。反应于室温搅拌 2 小时，然后用丙酮 (80% v/v 终浓度) 沉淀激活的寡糖。离心收集沉淀物并用丙酮洗涤数次以除去未反应的己二酸 N- 羟基琥珀酰亚胺二酯和副产物。最后，真空干燥激活的寡糖。引入寡糖结构的活性酯基团的量通过参考文献 231 所述的比色方法测定。

[0244] 干燥的激活的寡糖以活性酯 / 蛋白质 (摩尔 / 摩尔) 比例为 12 : 1 加入用 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH7.2 配制的 45mg/ml 的 CRM₁₉₇ 溶液中。反应于室温搅拌过夜。然后用 30kDa 膜经渗滤纯化偶联物 (50 渗滤体积的 10mM 磷酸盐缓冲液, pH7.2)。无菌过滤纯化的偶联物并保存于 -20℃ 或 -60℃ 直至疫苗配制。

[0245] C. 偶联期间多糖的 O- 乙酰化状态

[0246] 通过 NMR 分析检测来源于 MenW135 和 Men Y 的修饰的糖种类中唾液酸残基的 C7 和 C9 位的 O- 乙酰化状态。

[0247] 使用 1D 和 2D 质子 NMR 实验鉴定偶联过程的中间体多糖和寡糖 (水解后、胺化前、激活后和偶联后的天然多糖)。通过将冻干的寡糖溶解于 0.75ml 99.9% 的氘化的 ²H₂O (Aldrich™) 得到 10-15mM 浓溶液来制备 ¹H NMR 样品。所有实验使用 5mm Wilmad NMR 管。

[0248] ¹H NMR 图谱以 298K 记录在装有 BGU 单元并使用标准 Bruker 脉冲程序的 Bruker nMR Spectrometer Avance DRX 600MHz 上。使用具有自屏蔽 z- 梯度的 5mm TBI 三共振探针。使用 Bruker XWINMR 3.0 软件处理数据。

[0249] 质子标准波谱获取条件是在 6000Hz 的波谱窗上通过 4 次扫描收集 32k 数据点。应用 0.1Hz 线扩展功能并且参考 4.72ppm 处的单 - 氘化水 (HDO) 后, ¹H NMR 图谱是傅立叶转换。

[0250] 基于参考文献的数据 [232, 4] 进行共振子的分配进而确定分子结构。

[0251] 为显示峰的分配, 图 1 和二分别显示了水解的 MenW135 和水解的 MenY 的注释 NMR 图谱。

[0252] 下表给出了所有唾液酸 (N- 乙酰基 - 神经氨酸) C7 和 C9 位置在偶联制备期间发现 O- 乙酰化的来自 MenW135 的糖种类中的比例 :

[0253]

制备步骤	在 7 位的 O- 乙酰化 %	在 9 位的 O- 乙酰化 %
天然多糖	30.1	25.0
水解后	16.9	26.4
胺化前	15.0	26.2
激活后	5.1	26.3
偶联后	6.3	43.1

[0254] 因此, 偶联物制备期间 7 位的唾液酸 O- 乙酰化的总百分比降低, 从约 30% 降至约 6%。同时, 9 位的唾液酸 O- 乙酰化的百分比从约 25% 升至约 43% (图 3)。最后步骤中 9 位的显著变化显示偶联择优选择在 9 位 O- 乙酰化的糖。

[0255] 类似地, 下表给出了偶联过程的每一步后唾液酸残基在来自 MenY 的修饰的糖种类中的 O- 乙酰化状态 :

[0256]

制备步骤	在 7 位的 O- 乙酰化%	在 9 位的 O- 乙酰化%
天然多糖	10.3	28.0
水解后	3.3	24.1
胺化前	5.1	25.1
激活后	2.4	20.9
偶联后	6.1	45.1

[0257] 因此,在本发明的偶联物制备期间,7 位的唾液酸 O- 乙酰化的百分比在偶联反应期间最后升至约 6%之前从约 10%降至约 2%。同时,9 位 O- 乙酰化的百分比在偶联反应期间最后升至 45%之前从约 28%降至约 21% (图 4)。最后步骤中 9 位的显著变化显示偶联择优选择在 9 位 O- 乙酰化的糖。

[0258] D. 偶联物的免疫原性

[0259] 融化冷冻的散装偶联物。每种在搅拌下稀释至终浓度为 20 μ g 糖/ml, 5mM 磷酸盐, 9mg/ml NaCl, 磷酸铝 (得到 Al^{3+} 浓度为 0.6mg/ml), pH 7.2。然后不搅拌混合物, 于 2-8°C 维持过夜并用盐水进一步稀释至 4 μ g 糖/ml 用于小鼠免疫。

[0260] 以相同的方法制备两种血清群的第二组疫苗, 但加入相同体积的水替换磷酸铝。

[0261] 每个免疫组 (每组 10 只 Balb/c 小鼠) 于 0 周和第 4 周皮下. 注射 0.5ml 疫苗两次。免疫前、第 2 次给药前一天和第 2 次给药 2 周后放血。用 (a) 含或不含铝的偶联物, (b) 盐水对照和 (c) 未偶联的多糖对照进行免疫。

[0262] 基本上按照参考文献 233 所述在免疫小鼠的血清中检测特定的抗多糖 IgG 抗体。每只小鼠血清通过滴定曲线分析两次并计算每个免疫组的 GMT。使用“Titerun”软件 (FDA) 计算小鼠酶联免疫吸附测定单位 (MEU) 的滴度。通过以相关多糖作为竞争物的竞争性 ELISA 测定抗多糖滴度的特异性。

[0263] 如图 5 所示, MenW135 偶联物在动物中诱导了高抗体滴度。如预期的一样, 未偶联的多糖无免疫原性。与单用偶联物获得的滴度相比, 含磷酸铝作为佐剂的偶联物制剂诱导了较高的抗体水平。MenY 也发现了类似的结果 (图 6)。

[0264] 使用体外测定测试了 II 期后血清的杀细菌活性来检测补体介导的细菌裂解。II 期后血清在用于测定前于 56°C 灭活 30 分钟, 并使用 25% 幼年家兔补体作为补体来源。杀细菌滴度表达为产生抗以下菌株的 50% 细菌杀死的血清稀释度倒数: MenW135, 5554 (OAc+); MenY, 242975 (OAc+)。

[0265] 来自 MenW135 的荚膜多糖不产生 GMT 值并且得到的杀细菌活性仅为 4。相反, 本发明的脱 O- 乙酰化偶联物得到 14 和 565 之间的 GMT 值, 杀细菌滴度为 64 和 2048 之间。

[0266] 来自 MenY 的荚膜多糖不产生 GMT 值并且得到的杀细菌活性仅为 256。相反, 本发明的脱 O- 乙酰化偶联物得到 253 和 1618 之间的 GMT 值, 杀细菌滴度为 256 和 16384 之间。

[0267] 应该理解的是, 本发明仅通过实施例进行了描述, 在不脱离本发明范围和构思的前提下可作出改进。特别是, 不影响本发明修饰的荚膜糖的免疫原性的微小改进也包括在

本发明范围内。

[0268] 参考文献(这些内容纳入本文作为参考)

[0269] [1] 美国专利 4,711,779

[0270] [2] 美国专利 4,761,283

[0271] [3] 美国专利 4,882,317

[0272] [4] Lemercinier 等, (1996) Carbohydr Res 296 :83-96。

[0273] [5] Jones 和 Lemercinier, (2002) J Pharm Biomed Anal 30 :1233-47。

[0274] [6] Claus 等, (2004) Molecular Microbiology 51 :227-39。

[0275] [7] Longworth 等, (2002) “第 13 届国际致病性奈瑟球菌大会”摘要 (13th International Pathogenic Neisseria Conference. Abstract), 272 页

[0276] [8] Longworth 等, (2002) FEMS Immunol Med Microbiol 32 :119-23。

[0277] [9] Pollard 等, (2003) Emerging Infectious Diseases 9 :1503-4。

[0278] [10] Glode M.P.; 等, (1979) J Infect Dis 139 :52-56。

[0279] [11] W094/05325 ; 美国专利 5,425,946。

[0280] [12] Berry 等, (2002) Infect Immun 70 :3707-13。

[0281] [13] Frash, (1990), 《生物技术方法进展》(Advances in Biotechnological Processes), 第 13 卷, 第 123-145 页, (Mizrahi 和 Van Wezel 编)。

[0282] [14] W003/007985。

[0283] [15] Inzana, (1987), Infect. Immun. 55 :1573-1579。

[0284] [16] Ravenscroft 等, (1999) Vaccine 17 :2802-2816。

[0285] [17] Kandil 等, (1997) Glycoconj J 14 :13-17。

[0286] [18] Berkin 等, (2002) Chemistry 8 :4424-4433。

[0287] [19] Ramsay 等, (2001), Lancet 357 (9251) :195-6。

[0288] [20] Lindberg, (1999), Vaccine 17 增刊 2 :S28-36。

[0289] [21] Buttery 和 Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34 :163-8。

[0290] [22] Ahmad 和 Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13 :113-33, vii

[0291] [23] Goldblatt, (1998) J. Med Microbiol. 47 :563-567。

[0292] [24] EP-B-0477508

[0293] [25] 美国专利 5,306,492

[0294] [26] W098/42721

[0295] [27] Dick 等, 《偶联物疫苗》(Conjugate Vaccines) (Cruse 等编), Karger, Basel, 1989, 第 10 卷, 48-114。

[0296] [28] 《Hermanson 生物偶联技术》(Hermanson Bioconjugate Techniques), Academic Press, San Diego CA (1996)

[0297] [29] 匿名 (Jan 2002) Research Disclosure, 453077。

[0298] [30] Anderson, (1983) Infect Immun 39(1) :233-238。

[0299] [31] Anderson 等, (1985) J Clin Invest 76(1) :52-59。

[0300] [32] EP-A-0372501

[0301] [33] EP-A-0378881

- [0302] [34]EP-A-0427347
- [0303] [35]W093/17712
- [0304] [36]W094/03208
- [0305] [37]W098/58668
- [0306] [38]EP-A-0471177
- [0307] [39]W091/01146
- [0308] [40]Falugi 等, (2001), Eur Immunol 31 :3816-3824。
- [0309] [41]Baraldo 等, (2004) Infect Immun. 72 :4884-7。
- [0310] [42]EP-A-0594610
- [0311] [43]W000/56360
- [0312] [44]W002/091998
- [0313] [45]Kuo 等, (1995) Infect Immun63 :2706-13。
- [0314] [46]W001/72337
- [0315] [47]W000/61761
- [0316] [48]W02004/083251
- [0317] [49]W099/42130
- [0318] [50]W096/40242
- [0319] [51]Lees 等, (1996) Vaccine 14 :190-198。
- [0320] [52]W095/08348
- [0321] [53] 美国专利 4,695,624
- [0322] [54]Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [0323] [55]EP-A-0208375
- [0324] [56]Bethell G. S. 等, J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4。
- [0325] [57]Hearn M. T. W., J Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [0326] [58]EP-A-0208375
- [0327] [59]EP0720485
- [0328] [60]EP0814833
- [0329] [61]W000/10599
- [0330] [62]Gever 等, (1979) Med. Microbiol. Immunol 165 :171-288。
- [0331] [63] 美国专利 4,057,685
- [0332] [64] 美国专利 4,673,574 和 4,808,700
- [0333] [65] 美国专利 4,459,286
- [0334] [66] 美国专利 4,965,338
- [0335] [67] 美国专利 4,663,160
- [0336] [68] 美国专利 4,356,170
- [0337] [69]Lei 等 (2000) Dev Biol (Basel) 103 :259-264。
- [0338] [70]W000/38711 ;美国专利 6,146,902。
- [0339] [71]W000/56365
- [0340] [72]Gennaro (2000) 《雷明顿 :药学的科学与实践》(Remington :The Science and

Practice of Pharmacy),第20版,ISBN:0683306472。

- [0341] [73]W098/20734
- [0342] [74]W003/009869
- [0343] [75]《疫苗设计:亚单位和佐剂方法》(Vaccine design:the subunit andadjuvant approach),(1995)Powell & Newman. ISBN 0-306-44867-X。
- [0344] [76]W000/23105
- [0345] [77]W090/14837
- [0346] [78] 美国专利 5, 057, 540
- [0347] [79]W096/33739
- [0348] [80]EP-A-0109942
- [0349] [81]W096/11711
- [0350] [82]W000/07621
- [0351] [83]Barr 等,(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271。
- [0352] [84]Sjolanderet 等,(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338。
- [0353] [85]Niikura 等,(2002)Virology 293:273-280。
- [0354] [86]Lenz 等,(2001)J Immunol 166:5346-5355。
- [0355] [87]Pinto 等,(2003)J Infect Dis 188:327-338。
- [0356] [88]Gerber 等,(2001)Virology 75:4752-4760。
- [0357] [89]W003/024480
- [0358] [90]W003/024481
- [0359] [91]Gluck 等,(2002)Vaccine 20:B10-B16。
- [0360] [92]EP-A-0689454
- [0361] [93]Johnson 等,(1999)Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278。
- [0362] [94]Evans 等,(2003)Expert Rev Vaccines 2:219-229。
- [0363] [95]Meraldi 等,(2003)Vaccine 21:2485-2491。
- [0364] [96]Pajak 等,(2003)Vaccine2 1:836-842。
- [0365] [97]Kandimalla 等,(2003)Nucleic Acids Research 31:2393-2400。
- [0366] [98]W002/26757
- [0367] [99]W099/62923
- [0368] [100]Krieg(2003)Nature Medicine 9:831-835。
- [0369] [101]McCluskie 等,(2002)FEMS Immunology and Medical Microbiology32:179-185。
- [0370] [102]W098/40100
- [0371] [103] 美国专利 6, 207, 646
- [0372] [104] 美国专利 6, 239, 116
- [0373] [105] 美国专利 6, 429, 199
- [0374] [106]Kandimalla 等,(2003)Biochemical Society Transactions 31(第3部分):654-658。
- [0375] [107]Blackwell 等,(2003)J Immunol 170:4061-4068。

- [0376] [108]Krieg(2002)Trends Immunol23 :64-65。
- [0377] [109]W001/95935
- [0378] [110]Kandimalla 等, (2003)BBRC 306 :948-953。
- [0379] [111]Bhagat 等, (2003)BBRC 300 :853-861。
- [0380] [112]W003/035836
- [0381] [113]W095/17211
- [0382] [114]W098/42375
- [0383] [115]Beignon 等, (2002)Infect Immun 70 :3012-3019。
- [0384] [116]Pizza 等, (2001)Vaccine 19 :2534-2541。
- [0385] [117]Pizza 等, (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461。
- [0386] [118]Scharton-Kersten 等, (2000)Infect Immun 68 :5306-5313。
- [0387] [119]Ryan 等, (1999)Infect Immun 67 :6270-6280。
- [0388] [120]Partidos 等, (1999)Immunol Lett 67 :209-216。
- [0389] [121]Peppoloni 等, (2003)Expert Rev Vaccines 2 :285-293。
- [0390] [122]Pine 等, (2002)J Control Release 85 :263-270。
- [0391] [123]Domenighini 等, (1995)Mol Microbiol 15 :1165-1167。
- [0392] [124]W099/44636
- [0393] [125]Singh 等, (2001)J Cont Release 70 :267-276。
- [0394] [126]W099/27960
- [0395] [127] 美国专利 6, 090, 406
- [0396] [128] 美国专利 5, 916, 588
- [0397] [129]EP-A-0626169
- [0398] [130]W099/52549
- [0399] [131]W001/21207
- [0400] [132]W001/21152
- [0401] [133]Andrianov 等, (1998)Biomaterials 19 :109-115。
- [0402] [134]Payne 等, (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196。
- [0403] [135]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27 :571-577。
- [0404] [136]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4 :214-218。
- [0405] [137]W099/11241
- [0406] [138]W094/00153
- [0407] [139]W098/57659
- [0408] [140] 欧洲专利申请 0835318、0735898 和 0761231。
- [0409] [141]W099/24578
- [0410] [142]W099/36544
- [0411] [143]W099/57280
- [0412] [144]W000/22430
- [0413] [145]W001/64920
- [0414] [146]W001/64922

- [0415] [147]W003/020756
- [0416] [148]Tettelin 等, (2000)Science 287 :1809-1815。
- [0417] [149]W096/29412
- [0418] [150]Pizza 等, (2000)Science 287 :1816-1820。
- [0419] [151]W002/09643
- [0420] [152]Katial 等, (2002)Infect Immun 70 :702-707。
- [0421] [153]W001/52885
- [0422] [154] 欧洲专利 0301992
- [0423] [155]Bjune 等, (1991)Lancet 338(8775) :1093-1096。
- [0424] [156]Fukasawa 等, (1999)Vaccine 17 :2951-2958。
- [0425] [157]W002/09746
- [0426] [158]Rosenqvist 等, (1998)Dev. Biol. Stand. 92 :323-333。
- [0427] [159]W001/09350
- [0428] [160] 欧洲专利 0449958
- [0429] [161]EP-A-0996712
- [0430] [162]EP-A-0680512
- [0431] [163]W002/062378
- [0432] [164]W099/59625
- [0433] [165] 美国专利 6, 180, 111
- [0434] [166]W001/34642
- [0435] [167]W003/051379
- [0436] [168] 美国专利 6, 558, 677
- [0437] [169]W02004/019977
- [0438] [170]W002/062380
- [0439] [171]W000/25811
- [0440] [172]Peeters 等, (1996)Vaccine 14 :1008-1015。
- [0441] [173]Vermont 等, (2003)Infect Immno 71 :1650-1655。
- [0442] [174]Costantino 等, (1999)Vaccine 17 :1251-1263。
- [0443] [175]Bell (2000)Pediatr Infect Dis J 19 :1187-1188。
- [0444] [176]Iwarson (1995)APMIS 103 :321-326。
- [0445] [177]Gerlich 等, (1990)Vaccine 8 增刊 :S63-68 和 79-80。
- [0446] [178]Gustafsson 等, (1996)N. Engl. J. Med. 334 :349-355。
- [0447] [179]Rappuoli 等, (1991)TIBTECH 9 :232-238。
- [0448] [180]《疫苗》(Vaccines), (1988)Plotkin 和 Mortimer 编, ISBN0-7216-1946-0。
- [0449] [181]Del Giudice 等, (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70。
- [0450] [182]Sutter 等, (2000)Pediatr Clin North Am 477 :287-308。
- [0451] [183]Zimmerman 和 Spann, (1999)Am Fam Physician 59 :113-118, 125-126。
- [0452] [184]Robinson 和 Torres, (1997)Seminars in Immunology 9 :271-283。
- [0453] [185]Donnelly 等, (1997)Annu Rev Immunol 15 :617-648。

- [0454] [186]Scott-Taylor 和 Dalglish, (2000)Expert Opin Investig Drugs 9 : 471-480。
- [0455] [187]Apostolopoulos 和 Plebanski, (2000), Curr Opin Mol Ther2 :441-447。
- [0456] [188]Ilan(1999)Curr Opin Mol Ther 1 :116-120。
- [0457] [189]Dubensky 等, (2000)Mol Med 6 :723-732。
- [0458] [190]Robinson 和 Pertmer(2000)Adv Virus Res 55 :1-74。
- [0459] [191]Donnelly 等, (2000)Am J Respir Crit Care Med 162(第 2 部分第 4 章) : S190-193。
- [0460] [192]Davis(1999)Mt. Sinai J. Med. 66 :84-90。
- [0461] [193]Charalambous 和 Feavers, (2001)J Med Microbiol 50 :937-939。
- [0462] [194]Westerink(2001)Int Rev Immunol 20 :251-261。
- [0463] [195]Grothaus 等, (2000)Vaccine 18 :1253-1263。
- [0464] [196]W003/080678
- [0465] [197]W098/08543
- [0466] [198]W02004/032958, 和英国专利申请 0223741. 0, 0305831. 0 和 0309115. 4。
- [0467] [199]<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [0468] [200]Pettersson 等, (1994)Microb Pathog 17(6) :395-408。
- [0469] [201]Maiden 等, (1998)PNAS USA 95 :3140-3145。
- [0470] [202]Welsch 等, (2002)“第 13 届国际致病性奈瑟球菌大会”(13th International Pathogenic Neisseria Conference), Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway ;9 月, 1-6 日, 2002 年。“基因组来源的抗原 (GNA) 2132 引发针对 B 和 C 群脑膜炎奈瑟球菌菌株的保护性血清抗体”(Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains)。
- [0471] [203]Santos 等, (2002)“第 13 届国际致病性奈瑟球菌大会”(13th International Pathogenic Neisseria Conference), Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway ;9 月, 1-6 日, 2002 年。“用含有来源于脑膜炎奈瑟球菌基因组的重组蛋白的新颖疫苗免疫恒河猴的血清杀细菌应答”(Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis)。
- [0472] [204]Kanra 等, (1999)The Turkish Journal of Paediatrics 42 :421-427。
- [0473] [205]W097/00697
- [0474] [206]W002/00249
- [0475] [207]W096/37222 ;美国专利 6, 333, 036。
- [0476] [208]Watson(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :331-332。
- [0477] [209]Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v。
- [0478] [210]Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207。
- [0479] [211]Zielen 等, (2000)Infect. Immun. 68 :1435-1440。
- [0480] [212]Darkes 和 Plosker, (2002)Paediatr Drugs 4 :609-630。
- [0481] [213]Tettelin 等, (2001)Science 293 :498-506。

- [0482] [214]Hoskins 等, (2001)J Bacteriol 183 :5709-5717。
- [0483] [215]Rappuoli(2000)Curr Opin Microbiol 3 :445-450。
- [0484] [216]Rappuoli(2001)Vaccine 19 :2688-2691。
- [0485] [217]Masignani 等, (2002)Expert Opin Biol Ther 2 :895-905。
- [0486] [218]Mora 等, (2003)Drug Discov Today 8 :459-464。
- [0487] [219]Wizemann 等, (2001)Infect Immun 69 :1593-1598。
- [0488] [220]Rigden 等, (2003)Crit Rev Biochem Mol Biol 38 :143-168。
- [0489] [221]W002/22167
- [0490] [222]W001/30390
- [0491] [223]Almeida 和 Alpar(1996)J Drug Targeting 3 :455-467。
- [0492] [224]Agarwal 和 Mishra(1999)Indian J Exp Biol 37 :6-16。
- [0493] [225]W000/53221
- [0494] [226]Jakobsen 等, (2002)Infect Immun 70 :1443-1452。
- [0495] [227]Wu 等, (1997)J Infect Dis 175 :839-846。
- [0496] [228]Bergquist 等, (1998)APMIS 106 :800-806。
- [0497] [229]Baudner 等, (2002)Infect Immun 70 :4785-4790。
- [0498] [230]Ugozzoli 等, (2002)J Infect Dis 186 :1358-1361。
- [0499] [231]Miron 和 Wilchek, (1982)Anal. Biochem. 126 :433-435。
- [0500] [232]Ravenscroft 等, (1999)Vaccine 17 :2802-2816。
- [0501] [233]Carlone 等, (1992)J Clin. Microbiol. 30 :154-159。
- [0502] [234]Kao 和 Tsai, (2004)Vaccine 22 :335-44。
- [0503] [235]Cescutti 等, (1996)Biochem Biophys Res Commun 224 :444-50。

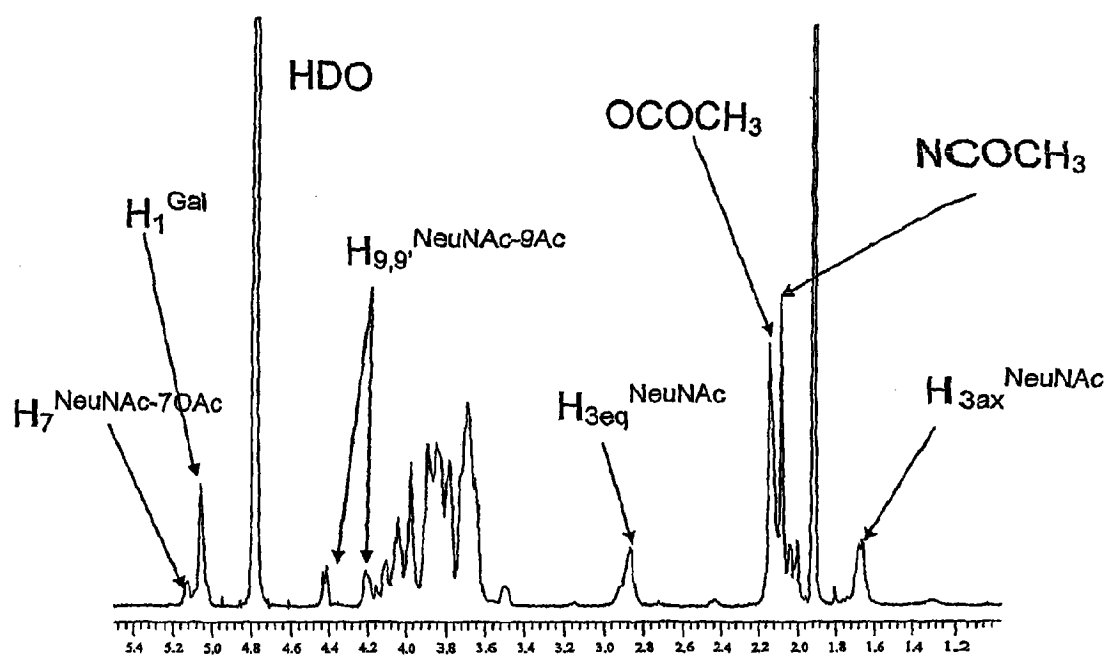


图 1

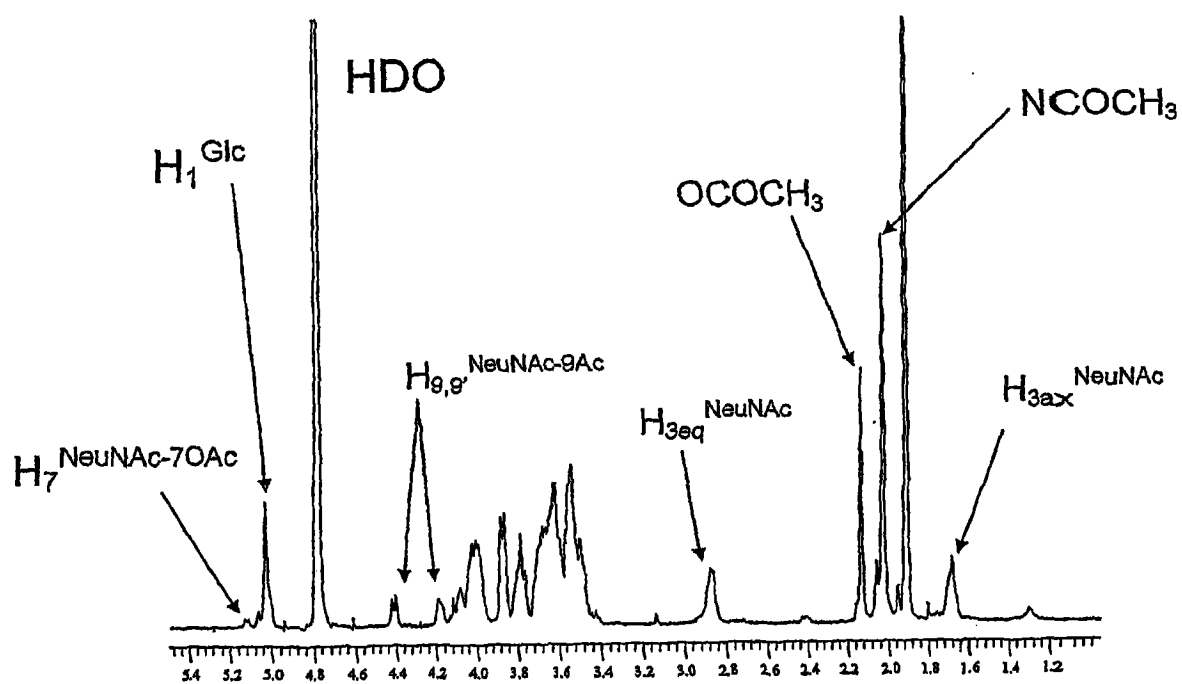


图 2

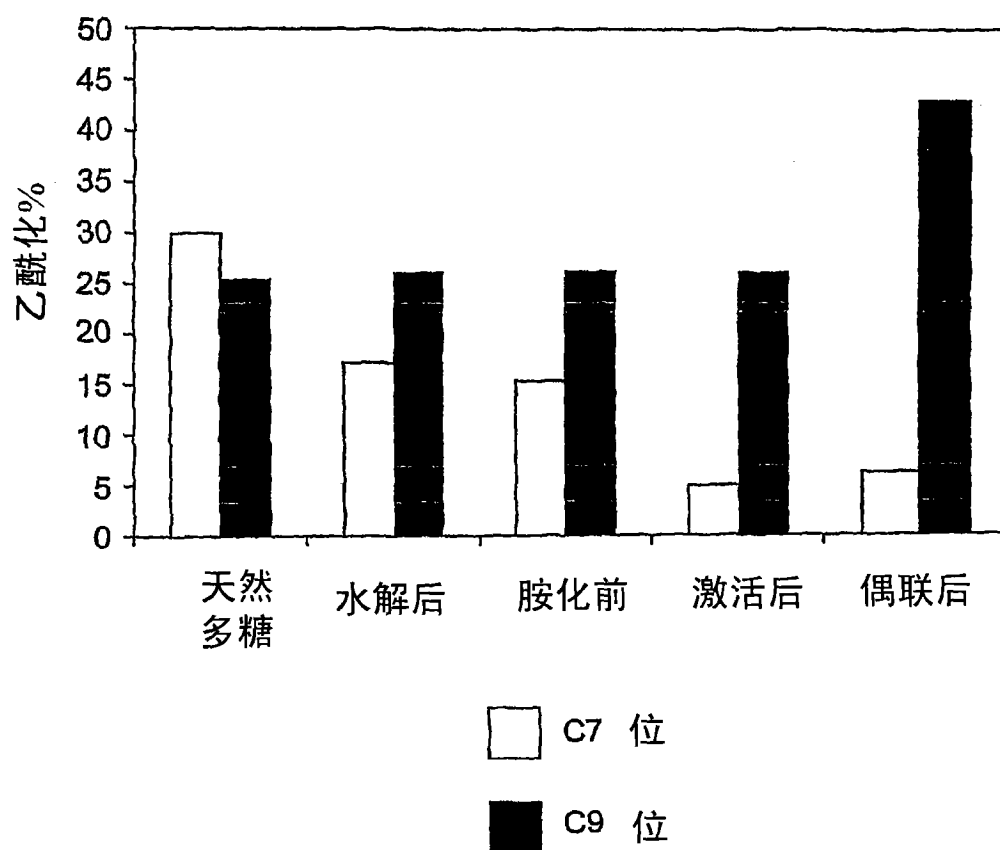


图 3

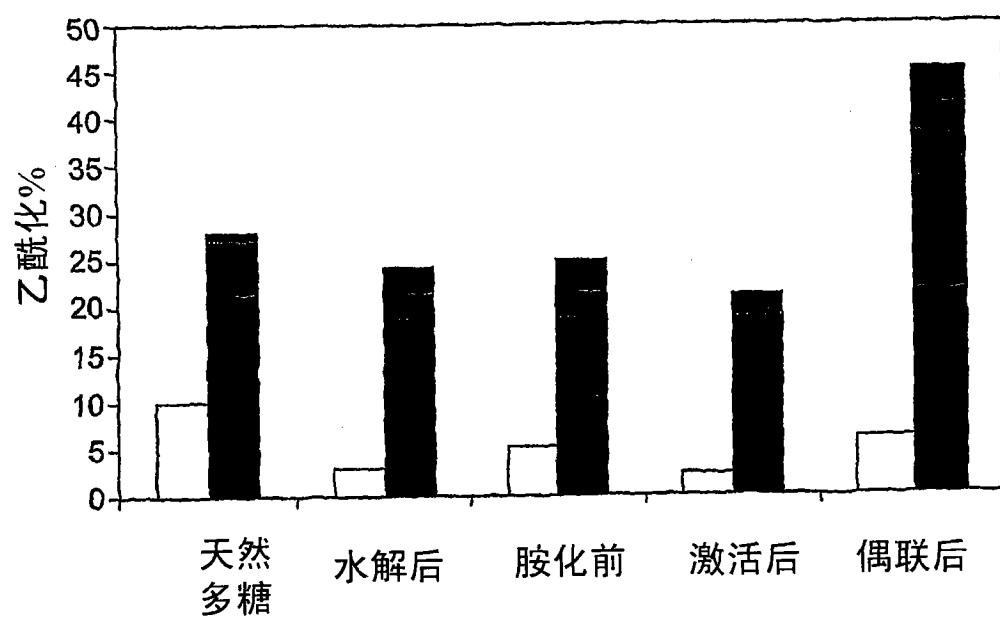


图 4

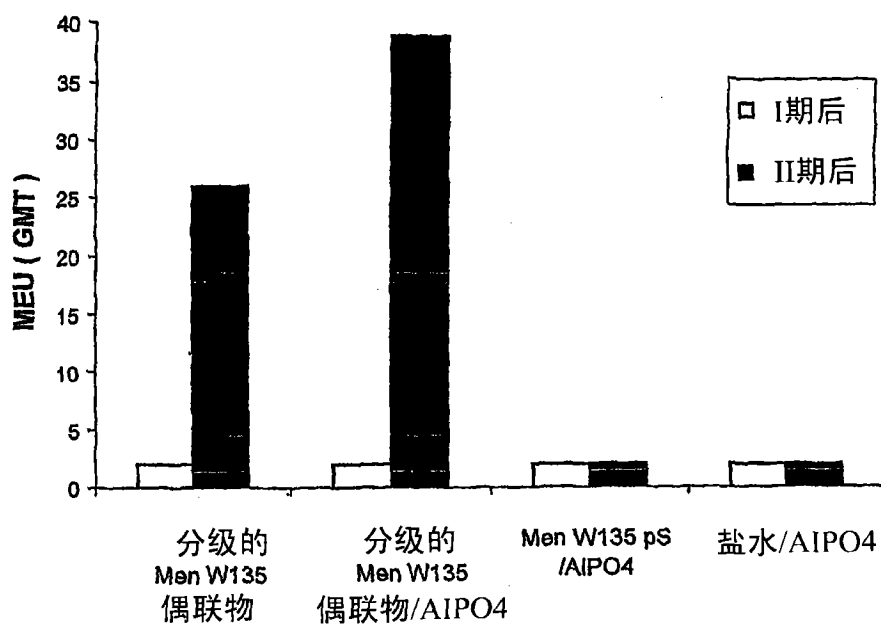


图 5

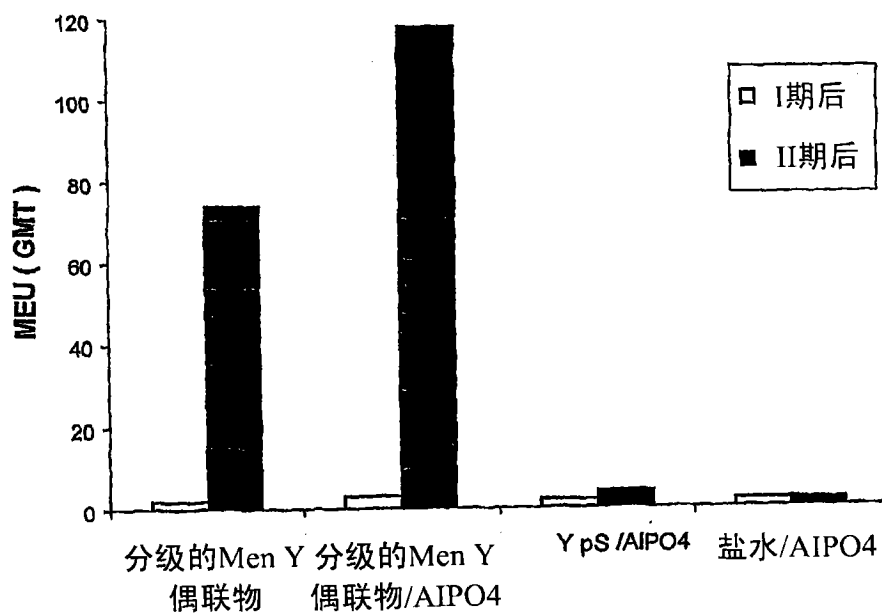


图 6