



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108064174 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201580053997.X

(22)申请日 2015.08.05

(30)优先权数据

14179945.2 2014.08.05 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/068012 2015.08.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/020413 EN 2016.02.11

(71)申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72)发明人 F.伯蒂 R.科齐 G.格兰迪

D.迈奥内 I.马加里特伊罗斯

C.D.里瑙多

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李唐 周齐宏

(51)Int.Cl.

A61K 47/64(2017.01)

A61K 39/09(2006.01)

A61K 39/116(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书60页
序列表(电子公布) 附图14页

(54)发明名称

抗原的载体分子

(57)摘要

本发明提供了包含抗原和载体分子的缀合物,其中所述载体分子包含BP-2a抗原和spb1抗原。BP-2a和spb1是无乳链球菌抗原。所述缀合物可以用于产生哺乳动物中的免疫应答的方法,所述方法包括向哺乳动物施用所述缀合物。还提供了包含所述缀合物的药物组合物,特别是疫苗。

1. 包含抗原和载体分子的缀合物,其中所述载体分子包含无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) BP-2a多肽和无乳链球菌spb1多肽。
2. 根据权利要求1的缀合物,其中所述spb1多肽包含:
 - (a) SEQ ID NO:206的氨基酸序列;或
 - (b) 由(a)的氨基酸185至468组成的片段;或
 - (c) 与(a)或(b)具有至少70%同一性的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或权利要求2的缀合物,其中所述BP-2a多肽包含:
 - (a) 选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列;或
 - (b) 选自SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或
 - (c) (a)的少于200个连续氨基酸的片段;或
 - (d) 与(a)、(b)或(c)具有至少70%同一性的氨基酸序列。
4. 根据权利要求1、2或3的缀合物,其中所述载体分子包含作为单个多肽链的衍生自不同的无乳链球菌菌株的2个或更多个BP-2a多肽。
5. 根据权利要求4的缀合物,其中所述载体分子包含作为单个多肽链的:
 - (i) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:36具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;
 - (ii) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列或与SEQ ID NO:38具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;
 - (iii) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列或与SEQ ID NO:40具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;
 - (iv) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列或与SEQ ID NO:42具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;
 - (v) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或与SEQ ID NO:44具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;和
 - (vi) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46具有至少70%同一性的氨基酸序列的BP-2a多肽;和
 - (vii) 包含SEQ ID NO:206的氨基酸185至468的spb1多肽。
6. 根据权利要求4至5中任一项的缀合物,其中所述多肽链是式 $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$,其中:A是任选的N-末端氨基酸序列;B是任选的C-末端氨基酸序列; n 是2或更大的整数(例如,2、3、4、5、6等);各X是BP-2a多肽或spb1多肽的氨基酸序列,其中至少一个X是BP-2a多肽且至少一个X是spb1多肽;且L是任选的接头氨基酸序列。
7. 根据权利要求4至6中任一项的缀合物,其中所述多肽链包含与SEQ ID NO:276具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:276的氨基酸序列。
8. 根据任一前述权利要求的缀合物,其中所述抗原是糖。
9. 根据权利要求8的缀合物,其中所述糖是来自无乳链球菌的荚膜糖。
10. 根据权利要求9的缀合物,其中所述糖是来自无乳链球菌血清型II或V的荚膜糖。

11. 根据前述权利要求中任一项的缀合物,其用于药物中。
12. 药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项的缀合物与药学上可接受的载体的组合。
13. 根据权利要求12的药物组合物,其包含缀合物的混合物,所述缀合物包含来自选自Ia型、Ib型、II型、III型和V型的至少两种无乳链球菌血清型的糖。
14. 根据权利要求13的药物组合物,其包含 (i) 与CRM197缀合的来自无乳链球菌血清型Ia、Ib和III的糖和 (ii) 与GBS80缀合的来自无乳链球菌血清型II或V的糖。
15. 用于产生哺乳动物中的免疫应答的方法,其包括向哺乳动物施用免疫有效量的根据权利要求1-11中任一项的缀合物或根据权利要求12-14中任一项的药物组合物。

抗原的载体分子

技术领域

[0001] 本发明涉及抗原和载体分子的缀合物,以及包含这些缀合物的疫苗。所述抗原通常是糖类。

[0002] 背景

使用与载体蛋白缀合以增强糖抗原的免疫原性是众所周知的[例如综述于参考文献1-9等],并且特别用于儿科疫苗[10]。目前疫苗中的3种广泛使用的载体蛋白是破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)和白喉类毒素变体CRM₁₉₇。这些蛋白已被用作各种糖类的载体,包括链球菌和脑膜炎球菌荚膜糖(参见,例如,使用TT作为参考文献11中的衍生自无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)血清型II和III的糖和参考文献12中的衍生自脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)血清群A、C、W135和Y的糖的载体;以及使用DT和CRM₁₉₇作为参考文献13和14中相同的脑膜炎奈瑟氏菌糖和参考文献15中衍生自无乳链球菌血清型Ia、Ib和III的糖的载体)。这些载体蛋白在疫苗中的过度使用已经产生了问题[参见,例如,参考文献16],提出了各种替代性载体(例如,参考文献17中来自流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的蛋白D)。然而,许多替代性载体蛋白没有TT、DT和/或CRM₁₉₇那样有效。因此,仍然需要寻找替代性和/或更好的载体蛋白。

[0003] 因此,本发明的目标是提供其他且更好的载体蛋白,尤其是荚膜糖的载体蛋白。所述载体蛋白可用于缀合物以诱导针对感染或药物的保护性和/或治疗性免疫应答。

[0004] 发明概述

本发明人已经发现包含两种特定无乳链球菌(GBS)多肽BP-2a多肽和spb1多肽的载体是特别有效的。这些载体是各种各样的并且可以与各种抗原(尤其是例如来自病原生物体的糖类)缀合。所得缀合物可能比基于目前使用的载体蛋白(例如CRM₁₉₇)的缀合物更有免疫原性。此外,当用作GBS糖类的载体时,它们可以提供针对GBS的较高水平的保护性免疫。

[0005] 本发明因此提供包含抗原和载体分子的缀合物,其中所述载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽。所述载体分子通常包含BP-2a多肽和spb1多肽作为单多肽链(“杂合”多肽)。通常,所述抗原是糖。所述糖可以是任何糖,尤其是来自病原生物体的糖。例如,所述糖可以是来自无乳链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌或肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的荚膜糖或葡聚糖。当所述糖是来自无乳链球菌的荚膜糖时,其通常来自以下血清型之一:Ia、Ib、II、III和V,尤其是来自血清型II或V。使用本发明的多肽载体作为来自无乳链球菌的不同菌株的糖的载体,可能有利于提供改善的免疫应答或提供针对多种菌株的保护,从而延展疫苗覆盖范围。

[0006] 当所述糖是来自脑膜炎奈瑟氏菌的荚膜糖时,其通常来自以下脑膜炎球菌血清群之一:A、C、W135和Y。当所述糖是葡聚糖时,其通常是昆布多糖。当所述糖是来自肺炎链球菌的荚膜糖时,其通常来自以下肺炎球菌血清型之一:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F。

[0007] 使用本发明的多肽载体作为异源糖(即例如无乳链球菌中非天然存在的糖)的载体,可能有利于提供针对两种或更多种不同微生物的保护,从而延展疫苗覆盖范围。

[0008] 本发明也涉及包含与药学上可接受的载体组合的本发明的缀合物的药物组合物。具体地,本发明涉及药物组合物,其包含(i)根据本发明的缀合物,(ii)与CRM197缀合的来自无乳链球菌血清型Ia、Ib和III的糖和(iii)与GBS80缀合的来自无乳链球菌血清型II或V的糖。更具体地,本发明涉及药物组合物,其包含(i)与GBS59 (6XD3) -GBS1523载体缀合的来自无乳链球菌血清型V的糖,(ii)与CRM197缀合的来自无乳链球菌血清型Ia、Ib和III的糖和(iii)与GBS80缀合的来自无乳链球菌血清型II的糖。又更具体地,本发明涉及药物组合物,其包含(i)与GBS59 (6XD3) -GBS1523载体缀合的来自无乳链球菌血清型II的糖,(ii)与CRM197缀合的来自无乳链球菌血清型Ia、Ib和III的糖和(iii)与GBS80缀合的来自无乳链球菌血清型V的糖。

[0009] 本发明进一步涉及在合适哺乳动物中引起免疫应答的方法,其包括将本发明的缀合物或药物组合物施用于所述哺乳动物。

[0010] 附图简述

图1比较了在两项研究中通过用包含血清型II糖、CRM₁₉₇和BP-2a/spb1载体的缀合物免疫引发的保护(表的下行)和抗血清型II糖抗体滴度(图表和表的上行)。组合物以1μg蛋白的剂量施用。

[0011] 图2显示了在两项研究中通过GBS59 (6XD3) -GBS1523-II缀合物组合物引发的对GBS59和GBS1523特异性的抗体的滴度。注意:在本实例中,BP-2a/spb1载体被称为GBS59 (6XD3) -GBS1523。

[0012] 图3比较了通过用包含血清型II糖和CRM197、GBS80和BP-2a/spb1载体的缀合物免疫引发的抗血清型II糖抗体滴度。

[0013] 图4比较了通过用包含血清型V糖和CRM197、GBS80和BP-2a/spb1载体的缀合物免疫引发的抗V型糖抗体滴度。

[0014] 图5比较了通过用包含血清型V糖和CRM₁₉₇以及BP-2a/spb1载体的缀合物免疫引发的保护(表的下行)和抗V型糖抗体滴度(图表和表的上行)。组合物以1μg蛋白的剂量施用。

[0015] 图6显示了在两项研究中通过GBS59 (6XD3) -GBS1523-V缀合物组合物引发的对GBS59和GBS1523特异性的抗体的滴度。注意:在本实例中,BP-2a/spb1载体被称为GBS59 (6XD3) -GBS1523。

[0016] 图7显示了使用昆布多糖的模型系统中由不同载体蛋白缀合物产生的IgG应答,并且表明不是所有蛋白抗原都适合用作载体(A= CRM197;B=GBS01132;C=GBS01157;D=GBS52;E=GBS150;F=SAN1516)。

[0017] 图8比较了通过用各种缀合物混合物免疫引发的抗II型糖抗体滴度。

[0018] 图9比较了通过用各种缀合物混合物免疫引发的抗V型糖抗体滴度。

[0019] 图10呈现了图8的一些数据,并且指出抗体滴度的某些统计学显著性差异。

[0020] 图11呈现了图9的一些数据,并且指出抗体滴度的某些统计学显著性差异。

[0021] 图12提供了载体蛋白GBS59 (6XD3) -GBS1523 (SEQ ID NO:276)的序列,并且突出显示其组成部分。将接头序列加框,而不同的BP-2a和spb1序列用交替的单和双下划线标记。

[0022] 图13提供了用于本发明缀合物中的代表性细菌糖的重复单元。

[0023] 图14呈现了用来自人类患者的血清的western印迹,所述血清强烈识别全长spb1

(GBS1523) 和 spb1_{D2+D3} (GBS1523_{D2+D3}), 但不识别 spb1_{D1} (GBS1523_{D1})。

[0024] 发明详述

本发明涉及包含抗原和载体分子的缀合物, 其中所述载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽。该缀合物的特征在下文中详述。

[0025] 关于B群链球菌, 仅基于荚膜多糖的疫苗将不能有效地引发最佳保护以免于不可分型的 (NT) GBS感染, 因为NT分离株产生非常低水平的荚膜或具有修饰的荚膜结构, 所述修饰的荚膜结构不与获得自9种已知血清型中的任一种的抗血清反应。使用GBS蛋白抗原、特别是作为多糖的载体是有利的, 因为与非GBS载体 (诸如CRM197) 不同, GBS蛋白抗原引发针对GBS的保护性免疫应答。因此, 使用本发明的GBS载体分子作为疫苗组合物中的GBS多糖的蛋白载体增加疫苗覆盖范围。在称为“血清型替代”的过程中, 在针对当前主要定殖血清型的多价疫苗接种的群体中可能出现定殖GBS的非流行血清型 (例如IV型和VII型)。对于GBS疫苗, 使用本发明的缀合物也可以解决此类围绕血清型替代的问题。

[0026] 载体分子

所述载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽。优选地, 所述载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽作为单多肽链 (“杂合”多肽)。

[0027] BP-2a

无乳链球菌 (B群链球菌, GBS) 具有三种纤毛变体, 各自由不同致病性岛PI-1、PI-2a和PI-2b 编码 [18, 19]。每个致病性岛由编码以下的5个基因组成: 纤毛骨架蛋白 (BP); 2种辅助蛋白 (AP1和AP2); 和参与纤毛的组装的2种分选酶蛋白。所有GBS菌株都携带这3种致病性岛中的至少一种, 并且由这些致病性岛编码的纤毛结构蛋白 (BP、AP1和AP2) 的序列通常是非常保守的。然而, 由致病性岛2a编码的骨架蛋白的序列在GBS菌株之间变化。BP-2a纤毛亚单位具有至少七个进化枝, 且这些进化枝之间的序列同一性低至48%。BP-2a多肽也可以称为GBS59或SAL1486。

[0028] 七个BP-2a进化枝的参考氨基酸序列是本文的SEQ ID NO: 1 (衍生自GBS菌株2603)、SEQ ID NO: 2 (衍生自GBS菌株515)、SEQ ID NO: 3 (衍生自GBS菌株CJB111)、SEQ ID NO: 4 (衍生自GBS菌株H36B)、SEQ ID NO: 5 (衍生自GBS菌株CJB110)、SEQ ID NO: 6 (衍生自GBS菌株DK21) 和SEQ ID NO: 7 (衍生自GBS菌株NEM316)。本发明人已经确定当与spb1多肽组合时, BP-2a多肽可用作载体分子。

[0029] 用于本发明的优选BP-2a多肽包含: 选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列; 选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的至少20个连续氨基酸 (例如至少25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、2500个) 的片段; 或与选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列具有至少70%同一性 (例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%) 或与所述选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的片段具有所述同一性的氨基酸序列; 或选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的20至250个连续氨基酸、25至250个连续氨基酸、30至250个连续氨基酸、40至250个连续氨基酸、50至170个连续氨基酸、50至165个连续氨基酸的片段。本发明的BP-2a多肽优选包含至少一个CD4⁺ T细胞表位。优选片段缺乏选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的C末端的一个或多个 (例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个) 氨基酸和/或选自SEQ ID NO: 1-7的氨基酸序列的N末端的一个或多个 (例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个) 氨基酸, 同时保留选自SEQ ID NO: 1-7的氨基

酸序列的至少一个表位。其他片段省略一个或多个蛋白结构域。

[0030] 本发明的BP-2a多肽包含至少一个CD4⁺ T细胞表位。CD4⁺ T细胞辅助B淋巴细胞产生针对抗原的抗体[20]。T细胞表位可以经验性地鉴定(例如,使用PEPSCAN [21,22]或类似方法),或者可以预测它们(例如使用Jameson-Wolf抗原指数[23],基于矩阵的方法[24],TEPITOPE [25],神经网络[26],OptiMer & EpiMer[27,28],ADEPT [29],Tsites [30],亲水性[31],抗原指数[32]或参考文献33中公开的方法等)。

[0031] 用于本发明的优选BP-2a多肽包含可包含重要CD4⁺ T细胞表位的免疫原性结构域或由其组成。以下提供存在于不同BP-2a进化枝中的示例性结构域。

[0032] BP-2a蛋白可以分成其前导肽的末端和其LPXTG锚的起始之间的四个结构域(D1至D4)。这四个结构域在SEQ ID NO:1至7中如下,并且对应于这些残基的另外BP-2a序列中的位置可以容易地通过比对来鉴定:

表1

	D1	D2	D3	D4
SEQ ID NO:1 (2603)	30-175 (SEQ ID NO:8)	169-369 (SEQ ID NO:9)	363-509 (SEQ ID NO:10)	503-670 (SEQ ID NO:11)
SEQ ID NO:2 (515)	30-162 (SEQ ID NO:12)	156-338 (SEQ ID NO:13)	332-499 (SEQ ID NO:14)	472-640 (SEQ ID NO:15)
SEQ ID NO:3 (cjb111)	30-162 (SEQ ID NO:16)	155-337 (SEQ ID NO:17)	331-474 (SEQ ID NO:18)	468-639 (SEQ ID NO:19)
SEQ ID NO:4 (b36b)	30-158 (SEQ ID NO:20)	152-350 (SEQ ID NO:21)	343-493 (SEQ ID NO:22)	487-658 (SEQ ID NO:23)
SEQ ID NO:5 (CJB110)	30-172 (SEQ ID NO:24)	166-365 (SEQ ID NO:25)	359-507 (SEQ ID NO:26)	501-669 (SEQ ID NO:27)
SEQ ID NO:6 (DK21)	30-168 (SEQ ID NO:28)	162-344 (SEQ ID NO:29)	338-480 (SEQ ID NO:30)	475-647 (SEQ ID NO:31)
SEQ ID NO:7 (NEM316)	30-162 (SEQ ID NO:32)	155-337 (SEQ ID NO:33)	331-474 (SEQ ID NO:34)	468-639 (SEQ ID NO:35)

[0033] 以下鉴定的结构域D3的子片段(SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48)是表面暴露的片段。本发明人已经鉴定,当与spb1多肽组合时,这些D3子片段可能是特别有效的载体。

[0034] 表2

	D3 子片段	D4 子片段(螺旋)
SEQ ID NO:1 (2603)	363-483 (SEQ ID NO:36)	484-588 (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:2 (515)	332-447 (SEQ ID NO:38) 411-436 (SEQ ID NO: 270)	448-554 (SEQ ID NO:39)
SEQ ID NO:3 (cjb111)	331-446 (SEQ ID NO:40)	447-553 (SEQ ID NO:41)
SEQ ID NO:4 (h36b)	343-465 (SEQ ID NO:42)	466-572 (SEQ ID NO:43)
SEQ ID NO:5 (CJB110)	359-481 (SEQ ID NO:44)	482-588 (SEQ ID NO:45)
SEQ ID NO:6 (DK21)	338-453 (SEQ ID NO:46)	454-561 (SEQ ID NO:47)
SEQ ID NO:7 (NEM316)	331-446 (SEQ ID NO:48)	447-553 (SEQ ID NO:49)

[0035] 这些表面暴露的片段内的较小表位可以由技术人员容易地鉴定并用于本发明的组合物中。例如,已经发现两种单克隆抗体(17C4/A3和4H11/B7,SEQ ID NO:262-269)结合包含来自515进化枝的D3子片段(SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:2的片段)内的氨基酸411-436(SEQ ID NO:270)的表位。以下鉴定的结构域D4的子片段包含存在于结构域D4的N末端且不存在于D4结构域的其余部分的两个螺旋(本文称为D4H)。预计这些螺旋是表面暴露的。

[0036] 因此,在某些实施方案中,用于本发明的BP-2a多肽包含选自上述结构域的氨基酸序列,上述结构域之一的至少20个氨基酸的片段或与所述结构域或片段具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0037] 在优选的实施方案中,用于本发明的BP-2a多肽包含其同源物的D3片段。已经显示D3片段诱导保护性免疫应答[34]。在特别优选的实施方案中,用于本发明的BP-2a多肽包含D3子片段或由其组成。当与spb1多肽组合使用时,此类多肽可以是特别有效的载体。因此,用于本发明的BP-2a多肽可由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6或7的片段组成,所述片段包含如上所鉴定的结构域D3或D3子片段或由其组成。用于本发明的特别优选BP-2a多肽包含:选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列;选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列的至少20个连续氨基酸(例如至少25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250个)的片段;或与选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)或与所述选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列的片段具有所述同一性的氨基酸序列。用于本发明的其他BP-2a多肽包含:包含选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列的不超过20个连续氨基酸(例如,不超过25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250个连续氨基酸)或由其组成的片段。设想D3子片段的片段,例如,这样的片段,其缺乏选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列的C末端的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个)氨基酸和/或选自SEQ ID NO:36、38、40、42、44、46和48的氨基酸序列的N末端的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个)氨基酸、同时保留选自SEQ ID NO:36、38、40、42、

44、46和48的氨基酸序列的至少一个表位。在一些情况下,可以使用甚至更小的片段。例如,多肽可以由包含SEQ ID NO:78 (SEQ ID NO:3的氨基酸411至436)的SEQ ID NO:3的片段组成。

[0038] 尽管D3片段和D3子片段是用于本发明的优选的BP-2a多肽,但除了来自结构域D3的表位之外,片段还可以保留结构域D4、D2和/或D1。因此,本发明的多肽可由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6或7的片段组成,所述片段包含i) 结构域D2和D3;ii) 结构域D3和D4;iii) 结构域D1、D2和D3;或iv) 结构域D2、D3和D4或其组成,如上所鉴定。下面提供了示例性片段。这些片段含有结构域D2、D3和D4 (或D4H) 的组合,如下所示:

表3

	D3 + D4	D3 + D4H	D2 + D3 + D4	D2 + D3 + D4H
SEQ ID NO:1 (2603)	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:53
SEQ ID NO:2 (315)	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:57
SEQ ID NO:3 (cjb111)	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61
SEQ ID NO:4 (h36b)	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65
SEQ ID NO:5 (CJB110)	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:69
SEQ ID NO:6 (DK21)	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:73
SEQ ID NO:7 (NEM316)	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:77

[0039] 与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6或7或其片段相比,用于本发明的氨基酸序列可以包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)保守氨基酸替代,即一个氨基酸被具有相关侧链的另一个氨基酸替代。遗传编码的氨基酸通常分为四类:(1)酸性的,即天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性的,即赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性的,即丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;和(4)不带电的极性的,即甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时一起归类为芳香族氨基酸。通常,这些家族内的单一氨基酸的取代对生物活性不具有主要影响。相对于参考序列,所述多肽可以具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)单个氨基酸缺失。相对于参考序列,所述多肽还可以包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)插入(例如1、2、3、4或5个氨基酸中的每一个)。

[0040] 在优选的实施方案中,所述载体包含多于一个BP-2a多肽。本发明人已经显示,当与spb1多肽组合使用时,包含多个BP-2a多肽的载体可能是特别有效的载体。因此,在优选的实施方案中,所述载体包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个或至少7个BP-2a多肽。当存在多于一个BP-2a多肽时,各BP-2a多肽通常来自不同的菌株。

[0041] 本发明的缀合物可包含:至少两个(例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个或至少7个)选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列;至少两个选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的至少20个(例如25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或更多个)连续氨基酸或不超过20个(例如25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或更少个)连续氨基酸的片段;或至少两个与选自SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)或与所述SEQ ID NO:1-7的氨基酸序列的片段具有所述同一性的氨基酸序列。

[0042] 所述载体可以包含来自不同菌株的相应BP-2a结构域。例如,所述载体可以包含来

自2, 3, 4, 5, 6或7种不同菌株的D3结构域或D3子片段。

[0043] 通常,各BP-2a多肽将存在于单个多肽链中。当多个BP-2a多肽存在于单个多肽链中时,它们可以通过接头分开。合适的接头包括促进克隆的短肽序列,多-甘氨酸接头(即包含Gly_n,其中 $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:295))和组氨酸标签(即His_n,其中 $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:296))。其他合适的接头氨基酸序列是本领域技术人员将显而易见的。通过非限制性实例的方式,有用的接头可以包括GSGS (SEQ ID NO:277)、GSGGGG (SEQ ID NO:272)或GSGSGGGG (SEQ ID NO:273)。可以使用标准重组表达技术将包含BP-2a多肽(和任选接头)的多肽链表达为融合多肽。如本文所使用,术语“单个多肽链”通常是指其中所有氨基酸都通过肽键依次连接的多肽链。“单个多肽链”通常通过单个DNA序列的表达而产生。然而,可替代或另外,两个或更多个BP-2a多肽可以使用标准化学缀合技术、例如使用直链或支链碳接头、杂环碳接头、碳水化合物接头连接。例如,接头可以通过赖氨酸或半胱氨酸侧链连接。因此,在一些实施方案中,可以组合使用重组融合蛋白表达和化学缀合技术以产生包含多个BP-2a多肽的单个多肽链。

[0044] 不同的BP-2a多肽可以以任何顺序存在于多肽链中。下面提供了示例性组合。表中的每个数字表示相关的SEQ ID NO。

[0045] 表4

SEQ ID	BP-2a 肽	接头	BP-2a 肽	接头	BP-2a 肽	接头	BP-2a 肽	接头	BP-2a 肽	接头	BP-2a 肽
83 (融合体 E)	38 D3 frag 515	277	42 D3 frag h368	277	40 D3 frag cjb111	277	36 D3 frag 2603	277	44 D3 fragCJ B110	277	46 D3 fragDK 21
84 (融合体 F)	55 D3-D4 H 515	277	59 D3-D4 H cjb111	277	67 D3-D4 H CJB11 0	277	51 D3-D4 H 2603	277	63 D3-D4 H h368	277	71 D3-D4 H DK21
85 (融合体 G)	51 D3-D4 H 2603	277	55 D3-D4 H 515	277	63 D3-D4 H h368	277	59 D3-D4 H cjb111	-	-	-	-
86 (融合体 H)	59 D3-D4 H cjb111	277	63 D3-D4 H h368	277	51 D3-D4 H 2603	277	55 D3-D4 H 515	-	-	-	-
87 (融合体 I)	57 D2-D3 -D4H 515	277	53 D2-D3 -D4H 2603	277	61 D2-D3 -D4H cjb111	277	-	-	-	-	-

[0046] 因此,适用于本发明的BP-2a多肽杂合体的实例包括多肽,其包含选自SEQ ID NO: 83;SEQ ID NO:84;SEQ ID NO:85;SEQ ID NO:86;或SEQ ID NO:87的氨基酸序列,以及与所述序列具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)的同源物。其他合适的BP-2a杂合体公开于国际专利申请公开W02011/121576中。

[0047] spb1

原始spb1 (SAN1518;GBS1523) 序列在参考文献35中被注释为细胞壁表面锚定家族蛋白(参见GI:77408651或Uniprot登录号Q8E479)。术语‘spb1’和‘GBS1523’在本文中可互换使

用。为了参考目的,如COH1菌株中发现的全长spb1的氨基酸序列在本文中作为SEQ ID NO:206给出。用于本发明的优选spb1多肽包含:SEQ ID NO:206的氨基酸序列;SEQ ID NO:206的氨基酸序列的至少20个(例如25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或更多个)连续氨基酸的片段;SEQ ID NO:206的氨基酸序列的少于400个(例如395、390、389、388、387、386、385、384、383或更少个)连续氨基酸的片段;或与SEQ ID NO:206的氨基酸序列具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)或与所述SEQ ID NO:206的氨基酸序列的片段具有所述同一性的氨基酸序列。本发明的特定spb1片段包括片段spb1_{D2+D3}(在实施例中称为BP-2b_{D2+D3}或BP-2b₁₈₅₋₄₆₈),由全长spb1的氨基酸185至468组成的片段,特别是作为SEQ ID NO:285提供的SEQ ID NO:206的氨基酸185至468。本发明人已经显示,当与BP-2a多肽组合使用时,spb1多肽可能是特别有效的载体。这些spb1蛋白包括SEQ ID NO:206的变体。本发明的spb1多肽优选包含至少一个CD4⁺ T细胞表位。优选片段缺乏SEQ ID NO:206的C末端的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个)氨基酸和/或SEQ ID NO:206的N末端的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或更多个)氨基酸,同时保留SEQ ID NO:206的至少一个表位。其他片段省略一个或多个蛋白结构域。

[0048] 野生型spb1含有SEQ ID NO:206的氨基酸1至30的N-末端前导序列或信号序列区,其可以在片段(例如,SEQ ID NO:207)中去除。可替代或另外,SEQ ID NO:206的氨基酸468-502可以在片段(例如,SEQ ID NO:207)中去除。可替代或另外,SEQ ID NO:206的氨基酸1-185可以在片段中去除。因此,在优选的实施方案中,用于本发明的spb1多肽包含:SEQ ID NO:207的氨基酸序列;SEQ ID NO:207的氨基酸序列的至少20个(例如25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或更多个)连续氨基酸的片段;SEQ ID NO:207的氨基酸序列的不超过20个连续氨基酸(例如25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、260、270、280、290或更少个,例如,283个连续氨基酸)的片段;或与SEQ ID NO:206的氨基酸序列具有至少70%同一性(例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)或与所述SEQ ID NO:207的氨基酸序列的片段具有所述同一性的氨基酸序列。在特别优选的实施方案中,spb1多肽包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列或由其组成。

[0049] 野生型spb1序列含有指示SEQ ID NO:206的氨基酸468-472处的细胞壁锚(LPSTG)的氨基酸基序。在一些重组宿主细胞系统中,优选去除该基序以促进重组多肽从细胞分泌。或者,可优选使用细胞壁锚基序将重组表达的多肽锚定至细胞壁。表达的多肽的细胞外结构域可以在纯化期间被切割,或者在最终组合物中,重组多肽可以保持与灭活的宿主细胞或细胞膜连接。还在SEQ ID NO:206的氨基酸419-429鉴定了含有保守的谷氨酸残基的E盒,其在残基423具有保守的谷氨酸。E盒基序可能对于形成寡聚的纤毛样结构是重要的,因此spb1的有用片段可包括保守的谷氨酸残基。已经鉴定了spb1的突变体,其中作为编码核苷酸序列中的密码子从CAA突变为AAA的结果,SEQ ID NO:206的位置41的谷氨酰胺(Q)被取代为赖氨酸(K)。该取代可以存在于spb1序列和spb1片段(例如SEQ ID NO:208)中。

[0050] 杂合多肽

通常,spb1多肽和BP-2a多肽或BP-2a多肽表达为单一多肽链(“杂合”多肽)。杂合多肽可以由式NH₂-A-{-X-L-}_n-B-COOH表示,其中:A是任选的N-末端氨基酸序列;B是任选的C-末端氨基酸序列;n是2或更大的整数(例如,2、3、4、5、6等);各X是spb1多肽或BP-2a多肽的氨

氨基酸序列(如上所述),其中至少一个X是spb1多肽且至少一个X是BP-2a多肽;且L是任选的接头氨基酸序列。当 n 是2时, X_1 通常是BP-2a多肽且 X_2 通常是spb1多肽。当 n 大于2时,各spb1抗原(当存在超过一个时)可以是相同的或不同的且各BP-2a抗原(当存在超过一个时)可以是相同的或不同的。

[0051] 作为各X的氨基酸序列的spb1多肽或BP-2a多肽如上所定义。在这些多肽在包含与给定spb1或BP-2a多肽或片段具有至少特定百分比同一性的氨基酸序列的方面进行定义的情况下,每个X的同一性水平可以是相同的。

[0052] 对于 $\{-X-L-\}$ 的每种 n 情况,接头氨基酸序列-L-可以存在或不存在。例如,当 $n=2$ 时,杂合体可以是 $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-X_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$ 、 $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$ 等。接头氨基酸序列-L-通常是短的(例如20个或更少氨基酸,即20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个氨基酸)。实例包括促进克隆的短肽序列,多-甘氨酸接头(即包含 Gly_n ,其中 $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:295))和组氨酸标签(即 His_n ,其中 $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:296))。其他合适的接头氨基酸序列是本领域技术人员将显而易见的。有用的接头是GSGS (SEQ ID NO:277)、GSGGGG (SEQ ID NO:272)或GSGSGGGG (SEQ ID NO:273),其中Gly-Ser二肽由BamHI限制性位点形成,因此有助于克隆和操作,且 $(Gly)_4$ 四肽(SEQ ID NO:297)是典型的多甘氨酸接头。其他合适接头,尤其用作最后一个 L_n 的接头是Leu-Glu二肽或SEQ ID NO:274。SEQ ID NO:277优选用于连接不同的BP-2a多肽。SEQ ID NO:272优选用于连接BP-2a多肽和spb1多肽。

[0053] -A-是任选的N-末端氨基酸序列。这通常是短的(例如,40个或更少氨基酸,即40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、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个氨基酸)。实例包括指导蛋白运输的前导序列,或有利于克隆或纯化的短肽序列(例如组氨酸标签,即 His_n ,其中 $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:296))。其他合适的N-末端氨基酸序列是本领域技术人员将显而易见的。如果 X_1 缺乏其自身的N-末端甲硫氨酸,-A-优选是提供N-末端甲硫氨酸的寡肽(例如,具有1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸),例如Met-Ala-Ser或单个Met残基。优选的-A-是单个Met残基。

[0054] -B-是任选的C-末端氨基酸序列。这通常是短的(例如,40个或更少氨基酸,即39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、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个氨基酸)。实例包括指导蛋白运输的序列,有利于克隆或纯化的短肽序列(例如包含组氨酸标签,即 His_n ,其中 $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更多(SEQ ID NO:296),诸如SEQ ID NO:275),或增强蛋白稳定性的序列。其他合适的C-末端氨基酸序列是本领域技术人员将显而易见的。优选地,-B-不存在。

[0055] 优选的是,-A-、-B-和-L-序列不包括与人多肽序列共有10个或更多个连续氨基酸的序列。

[0056] 具体载体分子可以包含(i)至少一个选自GBS菌株515、H36B、CJB111、2603、CJB110和DK21的D3-子片段和(ii)spb1多肽或其片段的融合体。更具体地,载体分子可以包含(i)至少一个选自SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:46的D3-子片段序列和(ii)SEQ ID NO:207的spb1多肽的融合体。又更具体地,载体分子可以包含(i)至少一个选自SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:46的D3-子片段序列和(ii)spb1多肽的D2+D3片段、

具体地包含SEQ ID NO:206的氨基酸185至468或由其组成的片段的融合体。

[0057] 示例性杂合体是如SEQ ID NO:276中呈现的载体GBS59 (6XD3)-GBS1523。在某些实施方案中,本发明的载体分子包含与SEQ ID NO:276 (如在SEQ ID NO:276的长度上测定)具有至少70%同一性 (例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)的氨基酸序列。在某些此类实施方案中,所述载体分子包含至少一个spb1 CD4⁺ T细胞表位和至少一个来自BP-2a (515)、BP-2a (H36B)、BP-2a (CJB111)、BP-2a (2603)、BP-2a (CJB110)和BP-2a (DK21)各自的BP-2a CD4⁺ T细胞表位。

[0058] SEQ ID NO:276的氨基酸序列示意性显示于图12中。该具体载体分子从N末端至C末端由以下部分组成:N末端甲硫氨酸;来自515的D3-子片段 (SEQ ID NO:38);GSGS接头 (SEQ ID NO:277);来自H36B的D3-子片段 (SEQ ID NO:42);GSGS接头 (SEQ ID NO:277);来自CJB111的D3-子片段 (SEQ ID NO:40);GSGS接头 (SEQ ID NO:277);来自2603的D3-子片段 (SEQ ID NO:36);GSGS接头 (SEQ ID NO:277);来自CJB110的D3-子片段 (SEQ ID NO:44);GSGS接头 (SEQ ID NO:277);来自DK21的D3-子片段 (SEQ ID NO:46);GSGGGG接头 (SEQ ID NO:272);具有N-和C-末端缺失的spb1 (SEQ ID NO:207)。

[0059] 技术人员将理解,SEQ ID NO:276中所示的多肽的序列变体和排列的变化可以表现出实施例中显示的相同有利的载体特征。例如,可以改变spb1多肽的序列,如上文在标题为“spb1”的部分中所解释。类似地,可以改变不同BP-2a多肽的数目,并且可以改变存在的各BP-2a多肽的序列,如上文在标题为“BP-2a”的部分中所解释。在某些实施方案中,所述载体包含来自不同菌株的至少1个 (即1、2、3、4、5、6、7或更多个) BP-2a多肽。在优选的实施方案中,所述载体包含至少2个BP-2a多肽。甚至更优选地,所述载体包含来自不同菌株的至少4、5、6或7个BP-2a多肽。

[0060] BP-2a和spb1多肽可以以任何顺序存在于载体分子中。在优选的实施方案中,spb1多肽朝向或处于C末端 (即最终的-X-为spb1多肽)。在优选的实施方案中,存在于载体中的所有BP-2a多肽被分组在一起,并且都是spb1多肽的N末端或C末端。优选地,所述杂合多肽可以由式NH₂-A-{-XBP-2a-L-}_n-Xspb1-L-B-COOH表示,其中n为至少1,且优选为至少2,并且各XBP-2a衍生自不同的菌株。

[0061] 除了spb1和BP-2a多肽之外,所述载体可以包含其他多肽。例如,所述载体可以包含GBS80和/或GBS67多肽,或其同源物或片段。GBS80和GBS67多肽的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:177-205中。GBS80也称为SAG0645,在Uniprot中以登录号Q8E0S9 (细胞壁表面锚家族蛋白) 标识。

[0062] 可以使用如上所述的重组融合蛋白表达方法、化学缀合技术或任何组合来产生杂合多肽。

[0063] 修饰以并入非天然氨基酸的载体分子

本发明也涉及已经修饰以并入非天然氨基酸的载体分子。可以使用非天然氨基酸来将载体分子缀合至另一个分子。

[0064] 在一些替代方案中,所述载体分子包含一个或多个 (例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等个) 非天然氨基酸。非天然氨基酸可具有不同于由经典氨基酸构成的蛋白中可反应的官能团 (例如,赖氨酸的氨基或半胱氨酸的巯基) 的反应概况的官能团。这进而意味着化学选择性反应允许在非天然氨基酸已并入蛋白的预定的位点进行位点-选择性缀合。

[0065] 例如,所述载体分子可以包含一个或多个L-高烯丙基甘氨酸(L-homoallylglycine)(HAG)残基。通常,取代HAG残基以代替序列中的甲硫氨酸残基。HAG,化学上称为L-2-氨基-5-己烯酸,是甲硫氨酸的类似物,并且含有反应性烯烃位点。HAG可以在蛋白合成的起始和延伸步骤中取代甲硫氨酸。HAG具有拥有与经典氨基酸中发现的官能团不同的反应概况的烯烃侧链,通过硫-烯(thiyl-ene)机制反应。

[0066] 在其他实施方案中,所述载体分子可以被修饰以包括其他非天然氨基酸,其允许在预定的位点进行位点特异性缀合。例如,所述载体分子可以被修饰,使得在其序列中包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5个等)对乙酰基苯丙氨酸残基。该氨基酸具有不存在于任何经典氨基酸中的酮官能团,因此所述氨基酸可以在温和的水性条件下与胍、烷氧基胺和氨基脲特异性反应以产生脎、脞和缩氨基脲键。其他具有酮官能团的氨基酸包括间乙酰基苯丙氨酸和对苯甲酰基苯丙氨酸,且这些残基可以相同方式使用。

[0067] 在其他实施方案中,所述载体分子可以被修饰以包括叠氮基(其也不在经典氨基酸中出现),例如通过并入一个或多个(例如,1、2、3、4、5个等)对叠氮基苯丙氨酸残基。叠氮基可以与缀合伴侣上的乙炔基通过铜(I)催化的[2+3]环加成反应进行反应。相反,可能通过并入一个或多个(例如,1、2、3、4、5个等)对炔丙氧基苯丙氨酸残基将非天然存在的乙炔基工程改造至载体蛋白中,其然后通过相同的机制与缀合伴侣上的叠氮基反应。

[0068] 在又进一步实施方案中,所述载体分子可以被修饰以包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5个等)苯基硒基半胱氨酸残基。用过氧化氢处理该残基使其与巯基缀合。

[0069] 抗原

抗原通常是糖。当抗原是糖时,所述糖可以是任何糖,特别是来自病原生物体的糖。用于本发明中使用的示例性糖如下所述。具体而言,糖可以是细菌糖,例如,细菌荚膜糖。代表性细菌糖描述于图13中。

[0070] 可以使用寡糖形式的糖。这些通过以下方便地形成:对纯化的多糖进行片段化(例如通过水解),随后通常纯化期望大小的片段。可以从天然来源纯化糖。通常进行多糖的片段化,以使寡糖的最终平均聚合度(DP)小于30(例如,10至20,约10(例如,对于血清群A);15至25(例如,对于血清群W135和Y),约15-20;12至22(例如,对于血清群C);等)。DP可通过离子交换层析或通过比色测定方便地测量[36]。

[0071] 如果进行水解,则通常对水解产物进行筛分,以去除短长度寡糖[37]。这可以各种方式诸如超滤和随后离子交换层析实现。优选去除聚合度小于或等于约6的寡糖(例如,对于血清群A);优选去除聚合度小于约4的寡糖(例如,对于血清群W135和Y)。

[0072] 糖的化学水解通常涉及在本领域中标准的条件下用酸或碱处理。用于将荚膜糖解聚为它们的组分单糖的条件是本领域已知的。一种解聚方法涉及使用过氧化氢[38]。将过氧化氢添加至糖(例如,使最终H₂O₂浓度为1%),然后孵育混合物(例如在约55℃),直到已经实现期望的链长降低。随着时间降低随后可以从混合物移取样品,然后测量样品中糖的(平均)分子大小。然后通过一旦已经达到期望的链长就快速冷却而停止解聚。

[0073] 作为纯化的替代方案,可以通过完全或部分合成获得糖。

[0074] 当抗原不是糖时,其可以是任何其他抗原,例如,任何免疫原或半抗原。本发明的缀合物可以引发针对与载体分子缀合的半抗原的免疫应答。所述半抗原可以是例如滥用的药物[39]。实例包括但不限于鸦片、大麻、安非他命、可卡因、巴比妥盐类、苯乙哌啶酮、甲乙

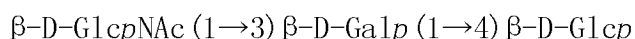
啉酮、水化氯醛、甲喹酮、苯二氮杂草类、LSD、尼古丁、抗胆碱能药、抗精神病药、色胺、其他拟精神病药物、镇静剂、苯环己哌啶、西洛西宾、挥发性亚硝酸盐和其他诱发生理和/或心理依赖性的药物。

[0075] 无乳链球菌荚膜糖

优选的细菌荚膜糖包括来自无乳链球菌的那些。实施例表明,包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体可以是GBS糖的有效载体。此外,包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体可诱导提供有用保护的载体特异性免疫应答。

[0076] 所述GBS荚膜糖共价连接至GBS的肽聚糖骨架,并且与B群抗原不同,所述B群抗原连接至肽聚糖骨架的另一种糖。

[0077] GBS荚膜糖化学上相关,并且所有GBS荚膜糖共有以下三糖核心:



各种GBS血清型的区别在于修饰其核心的方式。血清型Ia和III之间的差异,例如,由于使用该核心中的GlcNAc (Ia) 或Gal (III) 来连接连续的三糖核心而产生。血清型Ia和Ib都具有与核心中的GlcNAc连接的 $[\alpha\text{-D-NeupNAc (2}\rightarrow\text{3) } \beta\text{-D-Galp- (1}\rightarrow\text{)]}$ 二糖,但所述键是1 $\rightarrow$ 4 (Ia) 或1 $\rightarrow$ 3 (Ib)。

[0078] GBS-相关疾病主要是由血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII引起,其中超过85%由五种血清型引起:Ia、Ib、II、III & V。本发明可以使用来自这八种血清型中的一种或多种的糖,具体地选自Ia、Ib、II、III、IV和V的血清型中的一种或多种,又更具体地,选自血清型Ia、Ib、II、III和V的一种或多种糖。这些血清型各自的荚膜糖包括:(a) 末端N-乙酰神经氨酸(NeuNAc) 残基(通常称为唾液酸),其在所有情况下都与半乳糖残基2 $\rightarrow$ 3连接;和(b) 三糖核心内的N-乙酰基-葡萄糖胺残基(GlcNAc)。

[0079] 所有五种糖包括三糖核心内的半乳糖残基,但血清型Ia、Ib、II和III在每个重复单元中还含有额外的半乳糖残基。

[0080] 优选地,本发明的缀合物包含血清型II荚膜糖或血清型V荚膜糖。实施例表明本发明的BP-2a/spb1载体可以是血清型II荚膜糖和血清型V的特别有效的载体,并且可以比CRM更有效。在特别优选的实施方案中,本发明的缀合物包含血清型II荚膜糖。实施例表明本发明的BP-2a/spb1载体可以是血清型II荚膜糖的特别有效的载体。

[0081] 根据本发明使用的糖可以是其天然形式,或可已经被修饰。例如,糖可以比天然荚膜糖更短,或可被化学修饰。具体而言,本发明中使用的血清型V荚膜糖可以如参考文献40和41中所述进行修饰。例如,已经基本上脱唾液酸化的血清型V 荚膜糖。脱唾液酸化的GBS血清型V荚膜糖可通过以下制备:在温和酸性条件下(例如0.1M硫酸,80°C持续60分钟)处理纯化的GBS血清型V荚膜糖或者通过用神经氨酸酶处理,如参考文献40中所述。因此,根据本发明使用的糖可以是如天然中发现的基本全长荚膜多糖,或可短于天然长度。可解聚全长多糖以提供用于本发明的较短片段,例如,通过在温和酸中水解、通过加热、通过大小层析等。具体而言,本发明中使用的血清型II和/或III荚膜糖可以如参考文献42和43中所述进行解聚。

[0082] 所述糖可以相对于自然中发现的荚膜糖进行化学修饰。例如,糖可被去-O-乙酰化(部分或全部)、去-N-乙酰化(部分或全部)、N-丙酸化(N-propionated)(部分或全部)等。可在缀合之前、期间或之后进行去乙酰化,但优选在缀合之前进行。根据具体糖,去乙酰化可

影响或不影响免疫原性。参考文献44中讨论了各种血清型中的GBS糖上的O-乙酰化的关联,且在一些实施方案中,位置7、8和/或9的唾液酸残基的O-乙酰化在缀合之前、期间和之后得到保留,例如通过保护/去保护、通过再乙酰化等。然而,本发明中使用的GBS糖通常在位置7、8和/或9基本上没有唾液酸残基的O-乙酰化。具体而言,当所述GBS糖通过如下所述的碱提取纯化时,则通常丧失O-乙酰化。可通过常规测定评价去乙酰化等的效果。

[0083] 可以通过已知技术纯化荚膜糖,如参考文献45中所述。典型的方法涉及碱提取、离心、过滤、RNA酶/DNA酶处理、蛋白酶处理、浓缩、大小排阻层析、超滤、阴离子交换层析和进一步超滤。用酶变溶菌素处理GBS细胞(所述酶变溶菌素裂解细菌细胞壁以释放细胞壁组分)也是可用的。

[0084] 作为替代方案,可使用参考文献46中描述的纯化方法。这涉及碱提取、乙醇/CaCl₂处理、CTAB沉淀和再溶。参考文献47中描述了进一步替代方法。

[0085] 脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖

用于与本发明的载体一起使用的示例性荚膜糖包含来自脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)的那些。基于生物体的荚膜多糖,已经鉴定了脑膜炎奈瑟氏菌的各种血清群,包括A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、Y和Z。本发明中的糖可以来自任何这些血清群。糖通常来自以下脑膜炎球菌血清群之一:A、C、W135和Y。

[0086] 血清群C、W135和Y

用于从脑膜炎球菌制备荚膜多糖的技术已知多年,并且通常涉及包括多糖沉淀(例如,使用阳离子去污剂)、乙醇分馏、冷苯酚提取(以去除蛋白)和超速离心(以去除LPS)的步骤的方法[例如,参见参考文献48]。

[0087] 更优选的方法[49]涉及多糖沉淀和随后使用低级醇溶解沉淀的多糖。可以使用阳离子去污剂诸如四丁基铵和十六烷基三甲基铵盐(例如,溴化物盐),或海美溴铵(hexadimethrine bromide)和肉豆蔻基三甲基铵盐实现沉淀。特别优选十六烷基三甲基溴化铵('CTAB')[50]。使用低级醇诸如甲醇、丙-1-醇、丙-2-醇、丁-1-醇、丁-2-醇、2-甲基-丙-1-醇、2-甲基-丙-2-醇、二元醇等实现沉淀物质的溶解,但是乙醇特别适于溶解CTAB多糖复合物。可以向沉淀的多糖添加乙醇以得到50%至95%的最终乙醇浓度(基于乙醇和水的总含量)。

[0088] 再溶解后,可进一步处理多糖以去除污染物。这在甚至较少的污染也不可接受(例如对于人疫苗生产)的情况下特别重要。这通常涉及一个或两个过滤步骤,例如深度过滤(可以使用通过活性炭过滤)、大小过滤和/或超滤。一旦过滤去除污染物,可以沉淀多糖用于进一步处理和/或加工。这可以通过交换阳离子来方便地实现(例如通过添加钙盐或钠盐)。纯化之后,荚膜糖与如下所述的载体蛋白缀合。用于纯化和缀合脑膜炎球菌糖的其他和替代方法公开于参考文献38和51。作为纯化的替代方案,本发明的荚膜糖可以通过完全或部分合成获得,例如Hib合成公开于参考文献52, MenA合成公开于参考文献53。

[0089] 糖可以化学修饰,例如其可以被O-乙酰化或去-O-乙酰化。任何此类去-O-乙酰化或超-乙酰化可以在糖中的特定位置。例如,大多数血清群C菌株在唾液酸残基的位置C-7和/或C-8具有O-乙酰基,但约15%的临床分离株缺乏这些O-乙酰基[54,55]。乙酰化似乎不影响保护效力(例如,与Menjugate™产品不同,NeisVac-C™产品使用去-O-乙酰化的糖,但两种疫苗都是有效的)。血清群W135糖是唾液酸-半乳糖二糖单元的聚合物。血清群Y糖类似

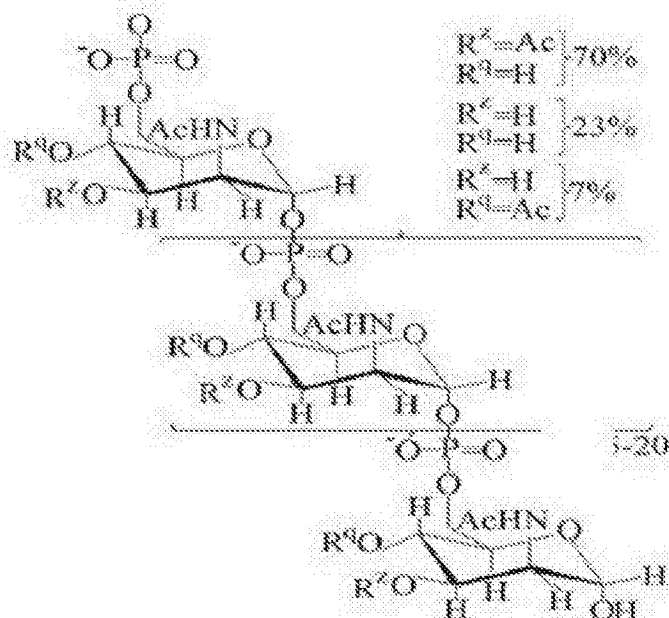
于血清群W135糖,除了二糖重复单元包括葡萄糖代替半乳糖。像血清群C糖, MenW135和MenY糖具有可变的O-乙酰化,但在唾液酸7 和9位置[56]。任何此类化学修饰优选在缀合之前进行,但可以可替代地或另外在缀合期间进行。

[0090] 来自不同血清群的糖优选分别纯化,然后可以在缀合之前或之后进行组合。

[0091] 血清群A

本发明的缀合物可以包括血清群A荚膜糖抗原。可以与用于血清群C、W135 和Y(参见上文)相同的方式纯化或缀合糖,尽管其在结构上不同—然而血清群C、W135和Y的荚膜基于唾液酸(N-乙酰基-神经氨酸, NeuAc), 而血清群A的荚膜基于N-乙酰基-甘露糖胺, 其是唾液酸的天然前体。血清群A 糖特别易于水解, 并且其在水性介质中的不稳定性意指(a) 针对血清群A的液体疫苗的免疫原性随着时间下降, 以及(b) 由于糖水解产物释放至疫苗中, 质量控制更困难。

[0092] 天然MenA荚膜糖是($\alpha 1 \rightarrow 6$)-连接的N-乙酰基-D-甘露糖胺-1-磷酸酯的均聚物, 其在C3和C4具有部分O-乙酰基化。主要糖苷键是涉及D-甘露糖胺的C1的半缩醛基和C6的醇基的1-6磷酸二酯键。平均链长为93个单体。其具有下式:



已经制备修饰的糖抗原,其保留天然血清群A糖的免疫活性,但在水中稳定得多。由保护基团(blocking group)替代在单糖单元的碳3和4连接的羟基[参考文献57和58]。

[0093] 具有保护基团替代羟基的单糖单元的数量可以变化。例如,所有或基本上所有的单糖单元可具有保护基团。或者,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的单糖单元可具有保护基团。至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个单糖单元可具有保护基团。

[0094] 类似地,单糖单元上的保护基团的数量可以变化。例如,在任何特定单糖单元上的保护基团的数量可以是1或2。

[0095] 末端单糖单元可以具有或不具有保护基团,而不是其天然羟基。优选在末端单糖单元上保留游离的异头羟基,以提供进一步反应(例如缀合)的把手。可以通过还原胺化(使用例如 $NaBH_3CN/NH_4Cl$)将异头羟基转化为氨基($-NH_2$ 或 $-NH-E$,其中E是氮保护基),然后可以

在其他羟基已转化为保护基团之后再生。

[0096] 替代羟基的保护基团可以经由羟基的衍生反应直接得到,即通过用另一种基团替代羟基的氢原子。充当保护基团的合适的羟基衍生物是,例如,氨基甲酸酯、磺酸酯、碳酸酯、酯、醚(例如甲硅烷基醚或烷基醚)和缩醛。此类保护基团的一些具体实例是烯丙基、Alloc、苄基、BOM、叔丁基、三苯甲基、TBS、TBDPS、TES、TMS、TIPS、PMB、MEM、MOM、MTM、THP等。非直接可得且完全替代羟基的其他保护基团包括C₁₋₁₂烷基、C₃₋₁₂烷基、C₅₋₁₂芳基、C₅₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基、NR¹R² (R¹和R²在下段中定义)、H、F、Cl、Br、CO₂H、CO₂ (C₁₋₆烷基)、CN、CF₃、CCl₃等。

[0097] 典型的保护基团具有下式:-O-X-Y或-OR³,其中:X是C(0)、S(0)或SO₂;Y是C₁₋₁₂烷基、C₁₋₁₂烷氧基、C₃₋₁₂环烷基、C₅₋₁₂芳基或C₅₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基,其各自任选地由独立地选自以下的1、2或3个基团取代:F、Cl、Br、CO₂H、CO₂ (C₁₋₆烷基)、CN、CF₃或CCl₃;或者Y是NR¹R²;R¹和R²独立地选自H、C₁₋₁₂烷基、C₃₋₁₂环烷基、C₅₋₁₂芳基、C₅₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基;或者R¹和R²可以接合以形成C₃₋₁₂饱和杂环基;R³是C₁₋₁₂烷基或C₃₋₁₂环烷基,其各自可以任选地由独立地选自以下的1、2或3个基团取代:F、Cl、Br、CO₂ (C₁₋₆烷基)、CN、CF₃或CCl₃;或者R³是C₅₋₁₂芳基或C₅₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基,其各自可以任选地由选自以下的1、2、3、4或5个基团取代:F、Cl、Br、CO₂H、CO₂ (C₁₋₆烷基)、CN、CF₃或CCl₃。当R³是C₁₋₁₂烷基或C₃₋₁₂环烷基时,其通常由上述定义的1、2或3个基团取代。当R¹和R²接合以形成C₃₋₁₂饱和杂环基时,意指R¹和R²与氮原子一起形成含有3到12之间的任何数量(例如,C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂)的碳原子的饱和杂环基。除了氮原子以外,杂环基可含有1或2个杂原子(诸如N、O或S)。C₃₋₁₂饱和杂环基的实例是吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基、咪唑烷基、氮杂环丁烷基和氮杂环丙烷基。

[0098] 可以通过标准衍生程序从-OH基团制备保护基团-O-X-Y和-OR³,诸如羟基与酰基卤、烷基卤、磺酰基等的反应。因此,-O-X-Y中的氧原子通常是羟基的氧原子,而-O-X-Y中的-X-Y基团通常替代羟基中的氢原子。

[0099] 或者,保护基团可以经由取代反应(诸如Mitsunobu-型取代)得到。从羟基制备保护基团的这些方法和其他方法是众所周知的。

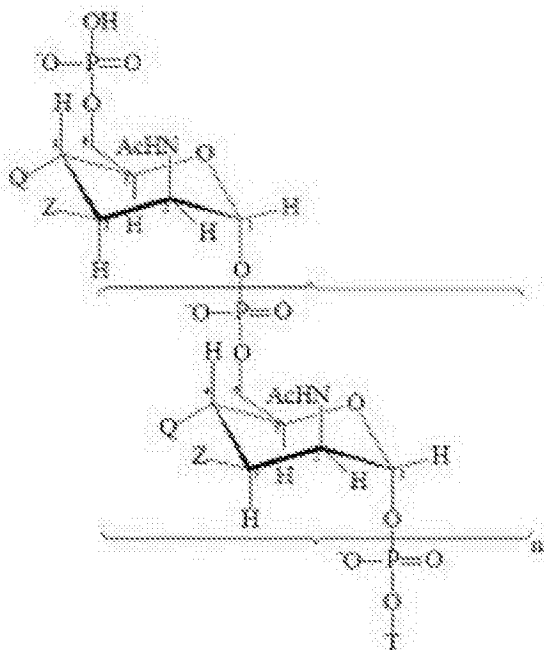
[0100] 用于本发明中使用的特定保护基团是-OC(0)CF₃ [59]和氨基甲酸酯基团OC(0)NR¹R²,其中R¹和R²独立地选自C₁₋₆烷基。通常,R¹和R²都是甲基,即保护基团是-OC(0)NMe₂。氨基甲酸酯保护基团对糖苷键具有稳定效果,并且可以在温和条件下制备。

[0101] 特别优选的保护基团是-OC(0)CH₃ [58]。在修饰的脑膜炎奈瑟氏菌血清群A糖(其具有该保护基团)中的4-和/或3-位置的比例可以变化。例如,具有保护基团的4-位置的比例可以是约0%,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或约100%,其中优选至少80%和约100%。类似地,具有保护基团的3-位置的比例可以是约0%,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或约100%,其中优选至少80%和约100%。通常,具有保护基团的4-和3-位置的比例在各位置上约相同。换言之,具有保护基团的4-位置与具有保护基团的3-位置的比例为约1:1。然而,在一些实施方案中,具有保护基团的4-位置的比例可以相对于具有保护基团的3-位置的比例变化。例如,具有保护基团的4-位置与具有保护基团的3-位置的比例可以是1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3或1:2。类似地,具有保护基团的3-位置与具有保护基团的4-位置的比例可以是1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3或1:2。

[0102] 典型的修饰的MenA糖含有 n 个单糖单元,其中至少 $h\%$ 的单糖单元在位置3和4两者上都没有-OH基团。 h 的值为24或更高(例如,25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98、99 或100)并且通常是50或更高。不存在的-OH基团是如上定义的保护基团。

[0103] 其他典型的修饰的MenA糖包含单糖单元,其中单糖单元中的至少 s 个在3位置没有-OH并且在4位置没有-OH。 s 的值至少为1(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90)。不存在的-OH基团是如上定义的保护基团。

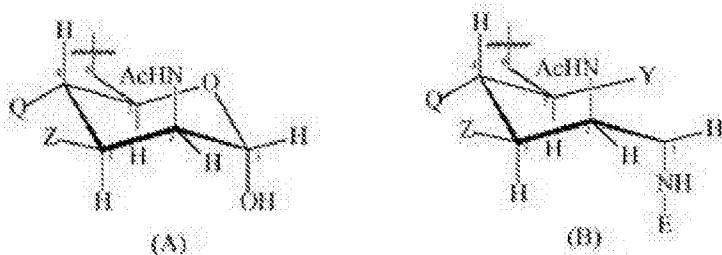
[0104] 用于本发明使用的合适的修饰的MenA糖具有下式:



其中

n 是1至100的整数(尤其是5至25的整数,通常15至25);

T是式(A)或(B):



各Z基团独立地选自OH或如上定义的保护基团;且

各Q基团独立地选自OH或如上定义的保护基团;

Y选自OH或如上定义的保护基团;

E是H或氮保护基(nitrogen protecting group);

并且其中多于约7%(例如8%、9%、10%或更高)的Q基团是保护基团。在一些实施方案中,在式(A)中的碳1上连接的羟基被如上定义的保护基团替代。在一些实施方案中,式(B)中的E是本发明的接头或载体分子。当E是接头时,接头可以共价键合至本发明的载体分子。

[0105] 各 $n+2$ Z基团可以是彼此相同或不同的。类似地,各 $n+2$ Q基团可以是彼此相同或不同的。所有Z基团可以是OH。或者,至少10%、20%、30%、40%、50%或60%的Z基团可以是OAc。通常,约70%的Z基团是OAc,剩余的Z基团是OH或如上定义的保护基团。至少约7%的Q基团是保护基团。通常,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或甚至100%的Q基团是保护基团。

[0106] 葡聚糖

所述糖可以是葡聚糖。葡聚糖是尤其在真菌细胞壁中发现的含有葡萄糖的多糖。 α -葡聚糖包括葡萄糖亚单位之间的一个或多个 α -键,而 β -葡聚糖包括葡萄糖亚单位之间的一个或多个 β -键。根据本发明使用的葡聚糖包括 β 键,且可仅含有 β 键(即,没有 α 键)。

[0107] 葡聚糖可包含一个或多个 β -1,3-键和/或一个或多个 β -1,6-键。它还包含一个或多个 β -1,2-键和/或 β -1,4-键,但通常其仅有的 β 键将是 β -1,3-键和/或 β -1,6-键。葡聚糖可以是支链的或直链的。

[0108] 全长的天然 β -葡聚糖是不溶性的,且具有兆道尔顿范围的分子量。在本发明的缀合物中优选使用可溶的葡聚糖。增溶可通过将长的不溶性葡聚糖片段化来实现。这可通过水解,或更便利地通过用葡聚糖酶(例如用 β -1,3-葡聚糖酶或 β -1,6-葡聚糖酶)消化来实现。作为替代方案,短葡聚糖可以通过连接单糖构建嵌段(building blocks)来合成制备。

[0109] 优选低分子量葡聚糖,特别是具有小于100 kDa的分子量(例如,小于80、70、60、50、40、30、25、20或15 kDa)的那些。还可能使用,例如,含有60或更少(例如,59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、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)个葡萄糖单糖单元的寡糖。在该范围内,具有10至50或20至40个单糖单元的寡糖是优选的。

[0110] 葡聚糖可以是真菌葡聚糖。“真菌葡聚糖”将通常从真菌获得,但当在真菌和非真菌(例如在细菌、低等植物或藻类)两者中发现特定的葡聚糖结构时,则非真菌生物体可用作替代来源。因此葡聚糖可源自念珠菌的细胞壁,所述念珠菌诸如白色念珠菌(*C. albicans*),或来自粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、疣状发癣菌(*Trichophyton verrucosum*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatidis*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)或诡谲腐霉(*Pythium insidiosum*)。

[0111] 存在各种真菌 β -葡聚糖来源。例如,纯 β -葡聚糖是市售可得的,例如石耳素(Calbiochem)是纯化自云南石耳(*Umbilicaria papullosa*)的 β -1,6-葡聚糖。 β -葡聚糖可以各种方式纯化自真菌细胞壁。例如,参考文献60公开了用于从不含细胞壁甘露聚糖的念珠菌制备水溶性 β -葡聚糖提取物的两步程序,其涉及NaClO氧化和DMSO提取。所得产物(“念珠菌可溶性 β -D-葡聚糖”或“CSBG”)主要由具有直链 β -1,6-葡聚糖部分的直链 β -1,3-葡聚糖部分构成。类似地,参考文献61公开了从念珠菌生产GG-zym。来自白色念珠菌的此类葡聚糖包括(a)具有 β -1,3-葡聚糖侧链且平均聚合度为约30的 β -1,6-葡聚糖,和(b)具有 β -1,6-葡聚糖侧链且平均聚合度为约4的 β -1,3-葡聚糖。

[0112] 在本发明的一些实施方案中,葡聚糖是具有一些 β -1,6分支的 β -1,3葡聚糖,如在例如昆布多糖中所见。昆布多糖在褐藻和海藻中发现。不同来源之间的昆布多糖的 β (1-3):

$\beta(1-6)$ 比例不同,例如在爱森藻 (*Eisenia bicyclis*) 昆布多糖中其低至3:2,但在掌状海带 (*Laminaria digitata*) 昆布多糖中高至7:1[62]。因此,本发明使用的葡聚糖可具有1.5:1至7.5:1(例如,约 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1或7:1)的 $\beta(1-3):\beta(1-6)$ 比例。任选地,葡聚糖可具有末端甘露醇亚单位,例如1,1- α -连接的甘露醇残基[63]。葡聚糖还可包含甘露糖亚单位。

[0113] 在其他的实施方案中,葡聚糖只具有或主要具有 $\beta-1,3$ 键,如在凝胶多糖中所见。这些葡聚糖可比包含其他键的葡聚糖(特别是包含 $\beta-1,3$ 键和更高比例的 $\beta-1,6$ 键的葡聚糖)引发更好的保护。因此,葡聚糖可仅由 $\beta-1,3$ -键的葡萄糖残基构成(例如仅具有1,3键的直链 β -D-吡喃葡萄糖)。任选地,然而,所述葡聚糖可以包括并非 $\beta-1,3$ -连接的葡萄糖残基的单糖残基,例如,其可以包括 $\beta-1,6$ -连接的葡萄糖残基。 $\beta-1,3$ -连接的葡萄糖残基与这些其他残基的比例应当是至少8:1(例如 $\geq 9:1$ 、 $\geq 10:1$ 、 $\geq 11:1$ 、 $\geq 12:1$ 、 $\geq 13:1$ 、 $\geq 14:1$ 、 $\geq 15:1$ 、 $\geq 16:1$ 、 $\geq 17:1$ 、 $\geq 18:1$ 、 $\geq 19:1$ 、 $\geq 20:1$ 、 $\geq 25:1$ 、 $\geq 30:1$ 、 $\geq 35:1$ 、 $\geq 40:1$ 、 $\geq 45:1$ 、 $\geq 50:1$ 、 $\geq 75:1$ 、 $\geq 100:1$ 等)和/或存在至少五个(例如 ≥ 5 、 ≥ 6 、 ≥ 7 、 ≥ 8 、 ≥ 9 、 ≥ 10 、 ≥ 11 、 ≥ 12 、 ≥ 13 、 ≥ 14 、 ≥ 15 、 ≥ 16 、 ≥ 17 、 ≥ 18 、 ≥ 19 、 ≥ 20 、 ≥ 30 、 ≥ 40 、 ≥ 50 、 ≥ 60 等)仅通过 $\beta-1,3$ 键连接至其他残基的相邻非末端残基中的一个或多个(例如 ≥ 1 、 ≥ 2 、 ≥ 3 、 ≥ 4 、 ≥ 5 、 ≥ 6 、 ≥ 7 、 ≥ 8 、 ≥ 9 、 ≥ 10 、 ≥ 11 、 ≥ 12 等)序列。“非末端”意指所述残基不存在于葡聚糖的游离端。在一些实施方案中,所述相邻非末端残基可以不包括与如上所述的载体分子、接头或其他间隔区偶联的任何残基。仅通过 $\beta-1,3$ 键与其他残基连接的五个相邻非末端残基的存在可以提供保护性抗体应答,例如针对白色念珠菌的抗体应答。

[0114] 在进一步实施方案中,缀合物可包括两种不同的葡聚糖,例如具有 1.5:1至7.5:1的 $\beta(1-3):\beta(1-6)$ 比例的第一葡聚糖,和只具有或主要具有 $\beta-1,3$ 键的第二葡聚糖。例如缀合物可包括昆布多糖葡聚糖和凝胶多糖葡聚糖。

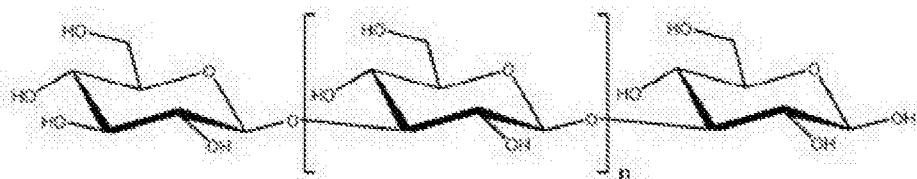
[0115] 当 β -葡聚糖以期望比例和/或序列包括 $\beta-1,3$ 和 $\beta-1,6$ 键两者时,则该葡聚糖可以在自然中发现(例如昆布多糖),或其可以是人工制备的。例如,其可以全部或部分通过化学合成制备。用于化学合成 $\beta-1,3/\beta-1,6$ 葡聚糖的方法是已知的,例如来自参考文献64-74。以期望比例包括 $\beta-1,3$ 和 $\beta-1,6$ 键两者的 β -葡聚糖也可以从购得的葡聚糖开始且用 $\beta-1,6$ -葡聚糖酶(也称为葡聚糖内切-1,6- β -葡糖苷酶、1,6- β -D-葡聚糖葡聚糖水解酶等;EC 3.2.1.75)或 $\beta-1,3$ -葡聚糖酶(诸如外切-1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.58)或内切-1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.39)处理购得的葡聚糖直至达到期望比例和/或序列来制备。

[0116] 当期望仅含有 $\beta-1,3$ -连接的葡萄糖的葡聚糖时,可以寻求完成 $\beta-1,6$ -葡聚糖酶处理,因为 $\beta-1,6$ -葡聚糖酶将最终产生纯 $\beta-1,3$ 葡聚糖。然而,更方便地,可以使用纯 $\beta-1,3$ -葡聚糖。这些可以通过化学和/或酶促合成来合成制备,例如使用(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-葡聚糖合酶,其中几个已知来自许多生物体(包括细菌、酵母、植物和真菌)。用于化学合成 $\beta-1,3$ 葡聚糖的方法是已知的,例如来自参考文献75-78。作为合成的有用替代方案,可以使用天然 $\beta-1,3$ -葡聚糖,诸如凝胶多糖(来自先前称为粪产碱菌产粘变种(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*)的农杆菌属(*Agrobacterium*)的直链 $\beta-1,3$ -葡聚糖;可商购自例如Sigma-Aldrich目录号C7821)或副淀粉(来自眼虫属(*Euglena*)的 $\beta-1,3$ -葡聚糖)。产生高水平 $\beta-1,3$ -葡聚糖的生物体是本领域已知的,例如参考文献79和80的农杆菌属(*Agrobacterium*),或参考文献81的小眼虫(*Euglena gracilis*)。

[0117] 昆布多糖和凝胶多糖通常作为高分子量聚合物在自然界中发现,例如,具有至少

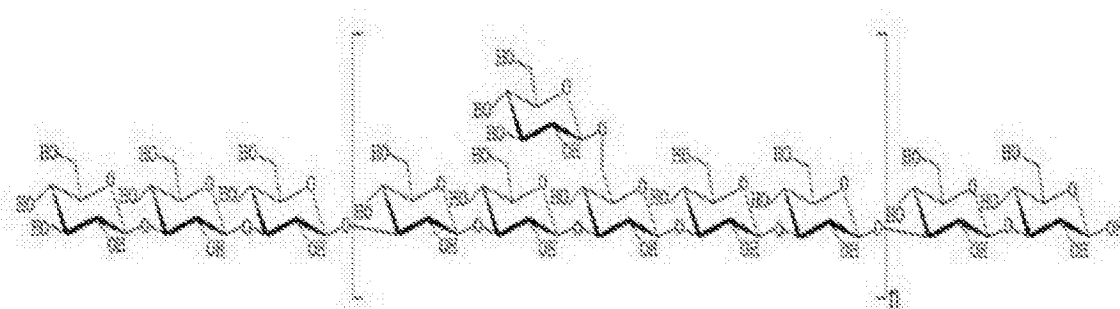
100 kDa的分子量。它们经常不溶于水性介质中。因此,在它们的天然形式中,它们不完全适于免疫。因此,本发明可以使用较短的葡聚糖,例如含有60或更少(例如59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4)的葡萄糖单糖单元的那些。可以使用具有2-60范围内数量的葡萄糖残基,例如10-50或20-40个葡萄糖单元的葡聚糖。具有25-30个葡萄糖残基的葡聚糖是特别有用的。合适的葡聚糖可以,例如通过天然葡聚糖的酸性水解,或通过例如用葡聚糖酶诸如 β -1,3-葡聚糖酶的酶促消化形成。具有11-19,例如13-19并且尤其是15或17个葡萄糖单糖单元的葡聚糖也是有用的。具体而言,具有以下结构(A)或(B)的葡聚糖专门设想用于本发明中:

(A)



其中 $n+2$ 在2-60,例如,10-50之间或2-40之间的范围内。优选地, $n+2$ 在25-30或11-19,例如,13-17的范围内。本发明人已经发现, $n+2 = 15$ 是合适的。

(B)



[0118] 其中 n 在0-9,例如,1-7之间或2-6之间的范围内。优选地, n 在3-4或1-3的范围内。本发明人已经发现, $n = 2$ 是合适的。

[0119] 在一些实施方案中,葡聚糖是单一分子种类。在这些实施方案中,所有葡聚糖分子在序列方面是相同的。因此,所有葡聚糖分子在它们的结构性质方面是相同的,包括分子量等。通常,该葡聚糖形式通过化学合成获得,例如使用上文描述的方法。例如,参考文献76描述了单一 β -1,3-连接的种类的合成。或者,在其他实施方案中,所述葡聚糖可从天然葡聚糖获得,例如来自上文描述的掌状海带 (*Laminaria digitata*)、农杆菌属或眼虫属的葡聚糖,其中将该葡聚糖纯化直至获得所需的单一分子种类。已经以该方式纯化的天然葡聚糖是商购可得的。作为单一分子种类的葡聚糖可通过测量葡聚糖样品的多分散性(M_w/M_n)进行鉴定。该参数可以通过SEC-MALLS,例如如参考文献82中所述方便地测量。用于本发明的该实施方案中的合适的葡聚糖具有约1,例如1.01或更低的多分散性。天然葡聚糖(诸如凝胶多糖)的溶解度可以通过引入离子基团(例如通过硫酸化、特别是在凝胶多糖中的O-6)增加。此类修饰可用于本发明,但理想地避免,因为它们可改变所述葡聚糖的抗原性。当糖是葡聚糖时,其通常是昆布多糖。

[0120] 肺炎链球菌荚膜糖

如上所讨论,糖也可以是细菌荚膜糖。进一步示例性的细菌荚膜糖包含来自肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的那些。

[0121] 当糖是来自肺炎链球菌的荚膜糖时,其通常来自以下肺炎链球菌血清型之一:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F,并且优选来自1、5、6B、14、19F和23F。来自肺炎链球菌的荚膜糖包含可以含有高达8个糖残基的重复寡糖单元。主要肺炎链球菌血清型的寡糖单元描述于参考文献83和84。

[0122] 金黄色葡萄球菌荚膜糖

其他示例性的细菌荚膜糖包含来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的那些,尤其是金黄色葡萄球菌5型和8型的荚膜多糖。5型和8型荚膜多糖的结构在参考文献85和86中被描述为:

5型: $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA (30Ac)} - (1 \rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc (1} \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc- (1} \rightarrow$

8型: $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA (40Ac)} - (1 \rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc (1} \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc- (1} \rightarrow$

近期的NMR光谱数据[87]已经导致将这些结构修改为:

5型: $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA- (1} \rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc (30Ac)} - (1 \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc- (1} \rightarrow$

8型: $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA (40Ac)} - (1 \rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc (1} \rightarrow 3) -\alpha\text{-D-FucNAc (1} \rightarrow$

该多糖可以相对于自然中发现的荚膜多糖进行化学修饰。

[0123] 例如,多糖可被去-O-乙酰化(部分或全部)、去-N-乙酰化(部分或全部)、N-丙酸化(部分或全部)等。可以在缀合之前、期间或之后进行去乙酰化,但通常在缀合之前进行。取决于特定多糖,去乙酰化可能影响或可能不影响免疫原性,例如NeisVac-C™ 疫苗使用去-O-乙酰化多糖,而Menjugate™ 被乙酰化,但两种疫苗都是有效的。可通过常规测定评价去乙酰化等的效果。例如,金黄色葡萄球菌5型或8型荚膜多糖上O-乙酰化的相关性在参考文献88中讨论。据该文献中称,天然多糖具有75%O-乙酰化。这些多糖诱导针对多糖骨架和O-乙酰基两者的抗体。具有0%O-乙酰化的多糖仍然引发针对该多糖骨架的抗体。两种类型的抗体针对其O-乙酰基含量不同的金黄色葡萄球菌菌株具有调理活性。因此,本发明中使用的5型或8型荚膜多糖可具有0至100% O-乙酰化。

[0124] 多糖的O-乙酰化程度可通过本领域已知的任何方法测定,例如质子NMR(例如如参考文献89、90、91或92中所述)。参考文献93中描述了另一种方法。类似方法可用于测定多糖的N-乙酰化的程度。可通过水解去除O-乙酰基,例如通过用碱诸如无水肼[94]或NaOH[88]处理。类似方法可用于去除N-乙酰基。为了维持5型和/或8型荚膜多糖上的高水平的O-乙酰化,尽可能减少导致O-乙酰基水解的处理,例如在极端pH下的处理。

[0125] 可通过已知技术纯化荚膜多糖,如本文的参考文献中所述。典型方法涉及苯酚-乙醇灭活金黄色葡萄球菌细胞、离心、溶葡萄球菌素处理、RNA酶/DNA酶处理、离心、透析、蛋白酶处理、进一步透析、过滤、用乙醇/CaCl₂沉淀、透析、冷冻干燥、阴离子交换层析、透析、冷冻干燥、大小排阻层析、透析和冷冻干燥[95]。另一种方法涉及高压灭菌金黄色葡萄球菌细胞、超滤含有多糖的上清液、浓缩、冻干、用偏高碘酸钠处理以去除磷壁酸、进一步超滤、渗滤、高效大小排阻液相层析、渗滤和冷冻干燥[96]。

[0126] 本发明不限于纯化自天然来源的多糖,然而,可通过其他方法诸如全合成或部分合成获得所述多糖。

[0127] 其他细菌荚膜糖

进一步示例性的细菌荚膜糖包括来自B型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) Typhi Vi和艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*)的那些。

[0128] 酿脓链球菌碳水化合物

本发明也可以使用非荚膜细菌糖。示例性的非荚膜细菌糖是酿脓链球菌 (*S. pyogenes*) GAS碳水化合物 (也被称为GAS细胞壁多糖, 或GASP)。该糖的特征在于具有由交替的 α -(1 $\rightarrow$ 2) 和 α -(1 $\rightarrow$ 3) 连接和 β -(1 $\rightarrow$ 3)-连接至交替的鼠李糖环的D-N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) 残基组成的L-鼠李吡喃糖 (Rhap) 骨架的分支结构 ([97])。

[0129] GAS碳水化合物将通常呈其天然形式, 但是其可能已经被修饰。例如, 糖可以比天然GAS碳水化合物更短, 或可被化学修饰。

[0130] 因此, 根据本发明使用的糖可以是如自然中发现的基本上全长的GAS碳水化合物, 或其可短于天然长度。全长多糖可解聚以提供较短片段用于本发明使用, 例如通过在温和酸中水解、通过加热、通过大小层析等。已经提出将认为对应于GAS 碳水化合物的末端单元的短片段用于疫苗中使用 [98]。因此, 本发明中设想短片段。然而, 优选使用基本上全长的糖。GAS碳水化合物通常具有约10, 尤其约7.5-8.5 kDa的分子量。可通过HPLC, 例如SEC-HPLC, 使用TSK Gel G3000SW柱 (Sigma) 相对于普鲁兰多糖 (pullulan) 标准品, 诸如购自Polymer Standard Service的那些来测量分子量 [99]。所述糖可相对于自然中发现的GAS碳水化合物进行化学修饰。例如, 所述糖可以进行去-N-乙酰化 (部分或完全)、N-丙酸化 (部分或完全) 等。可通过常规测定评价去乙酰化等例如对免疫原性的影响。

[0131] II型和V型糖缀合物的产生

荚膜糖可以通过已知技术纯化, 例如如描述于Wessels等人 (J Clin Invest, 1990 86:1428-33) 或Wessels等人 (Infect Immun 1989, 57:1089-94)。典型的纯化方法涉及碱提取、离心、过滤、RNase/DNase处理、蛋白酶处理、浓缩、大小排阻色谱、超滤、阴离子交换色谱和进一步超滤。用酶变溶菌素处理GBS细胞也是有用的, 所述酶变溶菌素切割细菌细胞壁以释放细胞壁组分。

[0132] 作为替代方案, 可以使用W02006/082527中描述的纯化方法。这涉及碱提取、乙醇/ CaCl_2 处理、CTAB沉淀和再溶解。进一步提取和纯化方法是本领域已知的, 诸如W0 2009/081276中描述的那些。

[0133] 缀合物

本发明涉及包含抗原和载体分子的缀合物, 其中所述载体分子包含spb1多肽和至少一种BP-2a多肽。具体地, 所述载体分子是融合蛋白, 其包含spb1多肽和至少一个BP-2a多肽、至少两个BP-2a多肽, 具体地三个、四个、五个、六个或七个BP-2a多肽或其片段。

[0134] 所述载体分子可以直接或经由接头共价地缀合至抗原。可以使用任何合适的缀合反应, 在期望时使用任何合适的接头。

[0135] 优选经由 $-\text{NH}_2$ 基团, 例如载体蛋白中赖氨酸残基侧链或精氨酸残基侧链中的 $-\text{NH}_2$ 基团连接抗原与载体。当抗原具有游离醛基时, 则其可以通过还原胺化与载体中的胺反应以形成缀合物。也可经由例如半胱氨酸残基侧链中的 $-\text{SH}$ 基团连接至载体。或者, 抗原可以经由接头分子连接至载体。

[0136] 抗原通常将在缀合前活化或官能化。活化可包括例如：用氰化试剂诸如CDAP（例如，1-氰基-4-二甲基氨基四氟硼酸吡啶[100, 101等]）。其他合适的技术使用碳二亚胺、酰肼、活性酯、降冰片烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU（还参见对参考文献7的介绍）。

[0137] 与蛋白的直接连接可以包含抗原的氧化和随后与蛋白还原胺化，如描述于，例如，参考文献102和103。

[0138] 可以使用任何已知程序，例如参考文献104和105中所述的程序经由接头基团进行连接。通常，接头经由糖抗原的异头碳连接。连接的优选类型是己二酸接头，其可以通过以下形成：偶联-NH₂基团（例如，通过胺化引入糖）与己二酸（使用，例如，二酰亚胺活化），然后将蛋白偶联至所得抗原-己二酸中间体[5, 106, 107]。连接的类似优选类型是戊二酸接头，其可以通过以相同的方式偶联游离-NH₂基团与戊二酸来形成。己二酸和戊二酸接头也可以通过直接偶联至抗原，即无需先前引入自由基，例如，游离的-NH₂基团，偶联至抗原，随后将蛋白偶联至所得抗原-己二酸/戊二酸中间体来形成。连接的另一种优选类型是羰基接头，其可以通过以下形成：使修饰抗原的游离羟基与CDI反应[108, 109]；随后与蛋白反应以形成氨基甲酸酯连接。其他接头包括β-丙酰胺基[110]、硝基苯基-乙胺[111]、卤代酰基卤化物[112]、糖苷键[113]、6-氨基己酸[114]、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯（SPDP）[115]、己二酸二酰肼（ADH）[116]、C₄至C₁₂部分[117]等。还可以使用碳二亚胺缩合[118]。

[0139] 双官能接头可用于提供用于偶联至抗原中的胺基团的第一基团（例如，通过胺化引入至抗原）和用于偶联至载体（通常用于偶联至载体中的胺）的第二基团。或者，第一基团能够直接偶联至抗原，即，无需事先引入基团，例如胺基，至抗原。

[0140] 在一些实施方案中，双官能接头中的第一基团因此能够与抗原上的胺基（-NH₂）反应。该反应通常涉及胺的氢的亲电取代。在其他实施方案中，双官能接头中的第一基团能够直接与抗原反应。在两组实施方案中，双官能接头中的第二基团通常能够与载体上的胺基反应。该反应将再次通常涉及胺的亲电取代。

[0141] 当与抗原和载体两者的反应涉及胺时，则优选使用双官能接头。例如，可以使用式X-L-X的同双官能接头，其中：两个X基团是彼此相同的，并且可以与胺反应；并且其中，L是接头中的连接部分。类似地，可以使用式X-L-X的异双官能接头，其中：两个X基团是不同的，并且可以与胺反应；并且其中L是接头中的连接部分。优选的X基团是N-氧基琥珀酰亚胺。L优选具有式L'-L²-L'，其中L'是羰基。优选的L²基团是具有1-10个碳原子（例如C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀）的直链烷基，例如-(CH₂)₄-或-(CH₂)₃-。

[0142] 类似地，在与抗原的反应涉及直接缀合且与载体的反应涉及胺的情况下，则也优选使用双官能接头。例如，可使用式X-L-X的同双官能接头，其中：两个X基团彼此相同，且可与抗原/胺反应；且其中L是接头中的连接部分。类似地，可使用式X-L-X的异双官能接头，其中：两个X基团不同，且一个可与抗原反应而另一个可与胺反应；且其中L是接头中的连接部分。优选的X基团是N-氧基琥珀酰亚胺。L优选具有式L'-L²-L'，其中L'是羰基。优选的L²基团是具有1-10个碳原子（例如C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀）的直链烷基，例如-(CH₂)₄-或-(CH₂)₃-。

[0143] 用于两个前述段落中所述的双官能接头中的其他X基团是当与HO-L-OH组合时形

成酯的基团,诸如降冰片烷、对-硝基苯甲酸和磺基-N-羟基琥珀酰亚胺。用于本发明的进一步双官能接头包括丙烯酰卤化物(例如丙烯酰氯)和卤代酰基卤化物。

[0144] 偶联至抗原过程中,接头通常以摩尔过量添加至抗原。

[0145] 当抗原具有单个与载体分子连接(任选地经由接头)的基团,且载体具有多个与不同抗原/接头分子连接的基团时,所得缀合物可以形成“星”结构。该结构包含中心载体分子,其具有多个从载体辐射的抗原分子(任选地经由接头)。当抗原具有多于一个与载体分子连接(任选地经由接头)的基团,且载体具有多于一个与不同抗原/接头分子连接的基团时,所得缀合物可以形成“网”结构。该结构包含通过抗原分子连接(任选地经由接头)的载体分子的网络。

[0146] 缀合物可具有过量载体(w/w)或过量抗原(w/w),例如比例范围为1:5-5:1。具有过量载体蛋白的缀合物通常,例如在0.2:1 to 0.9:1或等重量的范围内。所述缀合物可包括少量游离(即未缀合)的载体。该缀合物可包含少量游离(即未缀合)的载体。当给定载体蛋白以游离和缀合形式存在于本发明的组合物中时,未缀合形式优选为作为整体的组合物中载体蛋白的总量的不超过5%,更优选以少于2%(以重量计)存在。

[0147] 当在本发明的药物组合物内包含缀合物时,该组合物还可以包含游离的载体蛋白作为免疫原[119]。

[0148] 缀合后,可分离游离和缀合的抗原。存在许多合适的方法,例如疏水层析、切向超滤、透析等。[也参见参考文献120、121等]。切向流超滤是优选的。

[0149] 所述缀合物中的糖部分优选为如上所定义的低分子量糖或寡糖。寡糖将通常在缀合前按大小分类。

[0150] 所述缀合物优选溶解在水和/或生理缓冲液中。

[0151] 缀合

本发明涉及缀合物,其是各自与载体蛋白缀合的来自GBS血清型Ia、Ib、II、III和V的荚膜糖。通常,糖与载体的共价缀合增强了糖的免疫原性,因为所述缀合可将所述糖从T-非依赖性抗原转化为T-依赖性抗原,因此允许引发免疫记忆。缀合对于儿科疫苗是特别有用的,并且是众所周知的技术。GBS糖的缀合已被广泛报道,例如参见Paoletti等人(1990) *J Biol Chem* 265:18278-83。尽管多糖是免疫原性的,但多糖与载体蛋白的缀合可以改善或增强免疫原性。因此,如本文所使用,术语“载体”是指免疫原性物质,当与抗原(诸如多糖)缀合并施用于合适的动物时,其将诱导或增强动物中的免疫应答,特别是保护性免疫应答,并且引发特异性结合抗原、例如上述多糖的抗体的产生。用于GBS糖缀合的典型的现有技术方法通常涉及将纯化的糖还原胺化为载体蛋白诸如破伤风类毒素(TT)或CRM197 Wessels等人(1990) *J Clin Invest* 86:1428-33。还原胺化涉及载体中的氨基酸的侧链上的胺基和糖中的醛基。由于GBS荚膜糖不包括其天然形式的醛基,则这通常在通过氧化(例如,高碘酸盐氧化)糖的唾液酸残基的部分(例如5至40%,特别是10至30%,优选约20%)缀合之前生成。已经显示以这种方式制备的缀合物疫苗对于GBS血清型Ia、Ib、II、III和V各自在人中是安全和免疫原性的,Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-8。通常,本发明的免疫原性组合物中的所有缀合物都可以以这种方式制备。然而,当本发明使用被去唾液酸化的血清型V荚膜糖时,则醛基可以在通过氧化(例如,高碘酸盐氧化)糖的半乳糖残基的部分(例如5至40%,特别是10至30%,优选约20%)缀合之前在该糖中生成。一种

替代缀合方法涉及结合使用糖中的-NH₂基团(来自去-N-乙酰化或引入胺之后)和双官能接头。在一些实施方案中,本发明的免疫原性组合物中的一种或多种缀合物都可以以这种方式制备。一种进一步替代方法利用来自通过温和脱氨基切割将II型或III型荚膜糖糖解聚的末端2,5-脱水-D-甘露糖残基的游离醛基,其用于通过还原胺化进行缀合。在一些实施方案中,本发明的免疫原性组合物中的一种或多种缀合物都可以以这种方式制备。在一些实施方案中,所述载体和抗原可以通过分选酶介导的连接进行缀合,例如如W013065009或W013003555中所述。

[0152] 蛋白-蛋白缀合

本发明的缀合物可以包括利用蛋白-蛋白缀合并且可以包含与蛋白缀合的蛋白。具体而言,BP-2a多肽可以与spb1多肽缀合。可替代地或另外,本发明的蛋白载体分子可以与蛋白抗原缀合。可以使用任何适当的方法来产生本发明的缀合物。例如,下面详述了合适的方法。

[0153] 本发明的缀合物中的蛋白-蛋白键可以使用任何适当的技术产生,并且技术人员将意识到此类合适的技术。合适的交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、*N*-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、*N*-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和4-(*N*-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(参见例如[122,123])。其他方法包括参考文献124,125和126中描述的那些。优选的缀合剂是可得自Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)的SATA和磺基-SMCC。

[0154] 肽-蛋白载体缀合物也可以使用常规交联剂诸如碳二亚胺形成。碳二亚胺的实例是1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺(CMC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。其他合适交联剂的实例为溴化氰、戊二醛和琥珀酸酐。通常,可以使用多种同双官能剂中的任一种,包括同双官能醛、同双官能环氧化物、同双官能亚氨基酯、同双官能*N*-羟基琥珀酰亚胺酯、同双官能马来酰亚胺、同双官能烷基卤化物、同双官能吡啶基二硫化物、同双官能芳基卤化物、同双官能酰肼、同双官能重氮鎓衍生物和同双官能光反应性化合物。还包括异双官能化合物,例如,具有胺反应性和巯基反应性基团的化合物、具有胺反应性和光反应性基团的化合物以及具有羰基反应性和巯基反应性基团的化合物。

[0155] 此类同双官能交联剂的具体实例分别包括双官能*N*-羟基琥珀酰亚胺酯二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、辛二酸二琥珀酰亚胺基酯和酒石酸二琥珀酰亚胺基酯;双官能酰亚胺酯己二亚氨酸二甲酯、庚二亚氨酸二甲酯和辛二亚氨酸二甲酯;双官能巯基反应性交联剂1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺基]丁烷、双马来酰亚胺基己烷和双-*N*-马来酰亚胺基-1,8-辛烷;双官能芳基卤化物1,5-二氟-2,4-二硝基苯和4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基磺;双官能光反应性剂诸如双-[β-(4-叠氮基水杨基酰氨基)乙基]二硫化物;双官能醛甲醛、丙二醛、丁二醛、戊二醛和己二醛;双官能环氧化物诸如1,4-丁二醇二缩水甘油醚;双官能酰肼己二酸二酰肼、碳酰肼和琥珀酸二酰肼;双官能重氮鎓邻联甲苯胺、重氮化和双重氮化联苯胺;双官能烷基卤化物*N*₁,*N*'-亚乙基-双(碘乙酰胺)、*N*₁,*N*'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)、*N*₁,*N*'-十一亚甲基-双(碘乙酰胺)、以及苄基卤化物和卤基氮芥,诸如α1,α'-二碘基-对二甲苯磺酸和三(2-氯乙基)胺。

[0156] 可用于实现蛋白与肽的缀合的常见异双官能交联剂的实例包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯)、MBS(间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯)、GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯)、MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酐)、M2C2H(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酐)、SMPT(琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯)和SPDP(3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯)。交联可以通过经由还原胺化将羰基与胺基或酐基偶联来实现。

[0157] 修饰以并入非天然氨基酸的载体分子的产生和缀合

在一个或多个非天然氨基酸残基并入载体分子的情况下,则这可以使用标准程序来进行。一种此类方法包括使用修饰的宿主细胞,其中对于特定密码子的氨酰tRNA合成酶已经被工程改造为将tRNA与非-天然氨基酸缀合,所述非-天然氨基酸然后在翻译期间被引入载体中[对于此类技术的综述,参见参考文献127]。或者,一些程序利用以下事实,当天然同类氨基酸不存在时,一些非-天然氨基酸通过天然细胞机制并入蛋白中。在并入HAG中观察到这第二类程序的实例。在非天然氨基酸是HAG的情况下,则使用硫-烯(thiyl-ene)缀合[参见,例如,参考文献128]。

[0158] 包含所述缀合物的混合物

本发明的缀合物可以与其他抗原混合。这些其他抗原可以是本发明的其他缀合物或它们可以是其他抗原。

[0159] 例如,设想缀合物的混合物。通常,缀合物的混合物将作为药物组合物提供。这些混合物中的至少一种缀合物是本发明的缀合物,即载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽。这些混合物中的其他缀合物也可以是本发明的缀合物。然而,当其他缀合物不是本发明的缀合物时,所述载体分子可以是任何合适的载体蛋白(如下所述)。

[0160] 在优选的实施方案中,将本发明的缀合物与包含载体分子的缀合物混合,所述载体分子不包含BP-2a多肽和spb1多肽。例如,在具体实施方案中,将本发明的缀合物与包含CRM₁₉₇作为载体分子的缀合物混合。实施例表明当与包含CRM₁₉₇的另外缀合物组合时,包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体分子可以是特别有效的。类似地,在具体实施方案中,将本发明的缀合物与包含GBS80作为载体分子的缀合物混合。实施例表明当与包含GBS80的另外缀合物组合时,包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体分子可以是特别有效的。在特别优选的实施方案中,将本发明的缀合物与包含GBS80的缀合物和包含CRM₁₉₇的缀合物混合。

[0161] 当本发明的缀合物与其他缀合物混合时,其他缀合物优选包含来自与本发明的缀合物中的抗原相同的病原体的抗原。例如,设想这样的组合物,其包含与包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体缀合的来自病原体的第一抗原(诸如糖抗原)和与另一载体分子缀合的来自相同病原体的第二抗原(和可能来自相同病原体的第三抗原,和第四抗原等)。第二抗原可以衍生自不同的血清型。以这种方式,利用本发明的载体分子的有利特性,可能诱导对许多不同抗原特异性的广泛的免疫应答。

[0162] 例如,在优选的实施方案中,本发明提供了包含缀合物的混合物的药物组合物,其中至少一种缀合物含有包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体,且其中所述混合物包含多于一种衍生自无乳链球菌血清群Ia、Ib、II、III、V的荚膜糖。在优选的实施方案中,所述混合物

包含这些糖类中的4种或全部5种。在具体实施方案中,其为血清型-V糖,或甚至更具体地,与本发明的BP-2a和spb1载体缀合的血清型II糖。

[0163] 在其他实施方案中,本发明提供免疫原性组合物,其包含:(a)缀合物,其为与第一载体蛋白缀合的来自GBS血清型Ia的荚膜糖;(b)缀合物,其为与第二载体蛋白缀合的来自GBS血清型Ib的荚膜糖;(c)缀合物,其为与第三载体蛋白缀合的来自GBS血清型III的荚膜糖;(d)缀合物,其为与第四载体蛋白缀合的来自GBS血清型II的荚膜糖;和(e)缀合物,其为与第五载体蛋白缀合的来自GBS血清型V的荚膜糖,其中所述第一、第二、第三、第四或第五载体蛋白中的至少一种是本发明的BP-2a和spb1载体。

[0164] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含与CRM197缀合的无乳链球菌糖Ia、Ib和III,与GBS80缀合的来自血清型V无乳链球菌的糖,以及与本发明的BP-2a和spb1载体缀合的来自血清型II无乳链球菌的糖。或者,血清型II糖可以与GBS80缀合,且血清型V糖可以与本发明的BP-2a和spb1载体缀合。

[0165] 在一个进一步实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含:(a)缀合物,其为与第一载体蛋白缀合的来自GBS血清型Ia的荚膜糖,(b)缀合物,其为与第二载体蛋白缀合的来自GBS血清型Ib的荚膜糖,(c)缀合物,其为与第三载体蛋白缀合的来自GBS血清型III的荚膜糖,其中所述第一、第二和第三载体蛋白选自破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、GBS80、GBS67和CRM₁₉₇;和(d)缀合物,其为与第四载体蛋白缀合的来自GBS血清型II的荚膜糖,和(e)缀合物,其为与第五载体蛋白缀合的来自GBS血清型V的荚膜糖,其中第四或第五载体蛋白之一选自破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、GBS67、CRM₁₉₇和GBS80,且所述第四或第五载体蛋白中的另一种包含(i)至少一个选自SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:46的D3子片段序列和(ii)包含SEQ ID NO:206的氨基酸185至468或由其组成的spb1多肽的D2+D3片段的融合体。

[0166] 在替代实施方案中,设想来自脑膜炎奈瑟氏菌的多于一个血清群的缀合物的混合物,例如包含来自血清群A+C、A+W135、A+Y、C+W135、C+Y、W135+Y、A+C+W135、A+C+Y、C+W135+Y、A+C+W135+Y等的糖的组合物。通常,所述混合物是包含来自血清群A、C、W135和Y的糖的缀合物的混合物。这些混合物中的至少一种缀合物是本发明的缀合物,即载体分子包含BP-2a多肽和spb1多肽。通常,这些混合物中的其他缀合物也将是本发明的缀合物。然而,当其他缀合物不是本发明的缀合物时,所述载体分子可以是任何合适的载体蛋白(如下所述),通常各缀合物中相同的载体分子。

[0167] 合适的载体蛋白是细菌毒素,诸如白喉或破伤风毒素,或类毒素或其突变体。CRM197白喉毒素突变体[129]可以是合适的。其他合适的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白复合物[130],合成肽[131, 132],热休克蛋白[133, 134],百日咳蛋白[135, 136],细胞因子[137],淋巴因子[137],激素[137],生长因子[137],人血清白蛋白(通常是重组的),包含来自各种病原体衍生抗原的多种人CD4⁺ T细胞表位的人工蛋白[20],诸如N19 [138],来自流感嗜血杆菌的蛋白D[139-141],肺炎球菌表面蛋白PspA[142],肺炎球菌溶血素[143]或其无毒衍生物[144],铁摄取蛋白[145],来自艰难梭状芽胞杆菌的毒素A或B [146],GBS蛋白[147],GAS蛋白[148]等。

[0168] 单一载体蛋白可以携带多于一种多糖抗原[149,150]。为了实现该目的,可以在缀合过程之前混合不同的糖。然而,通常各糖存在不同的缀合物,其中在缀合后混合不同的

糖。分开的缀合物可以基于相同的载体,尤其是包含BP-2a多肽和spb1多肽的相同载体。

[0169] 所述混合物还可以包含蛋白。例如,所述混合物可以包含无乳链球菌或蛋白[例如,147,151-153]。

[0170] 另外的抗原可以包含来自非无乳链球菌病原体的抗原。因此,本发明的组合物可进一步包含一种或多种非无乳链球菌抗原,包括其他细菌、病毒或寄生虫抗原。这些可选自以下:

- 来自肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的糖抗原[例如,参考文献154-156;参考文献163的第22和23章]。

[0171] - 来自甲型肝炎病毒,诸如灭活病毒的抗原[例如,157,158;参考文献163的第15章]。

[0172] - 来自乙型肝炎病毒的抗原,诸如表面和/或核心抗原[例如158,159;参考文献163的第16章]。

[0173] - 来自丙型肝炎病毒的抗原[例如160]。

[0174] - 来自百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 的抗原,诸如来自百日咳博德特氏菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA),也可任选与百日咳杆菌粘附素 (pertactin) 和/或凝集原2和3组合[例如参考文献161和162;参考文献163的第21章]。

[0175] - 白喉抗原,诸如白喉类毒素[例如参考文献163的第13章]。

[0176] - 破伤风抗原,诸如破伤风类毒素[例如参考文献163的第27章]。

[0177] - 来自流感嗜血杆菌B的糖抗原[例如参考文献163的第14章]。

[0178] - 来自脑膜炎奈瑟氏菌的血清群B的蛋白抗原[例如,参考文献164至169]。

[0179] - 来自淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的抗原[例如164-167]。

[0180] - 来自肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 的抗原[例如170,171,172,173,174,175,176]。

[0181] - 来自沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 抗原[例如177]。

[0182] - 来自牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 抗原[例如178]。

[0183] - 脊髓灰质炎抗原[例如179,180;参考文献163的第24章],诸如IPV。

[0184] - 狂犬病抗原[例如181],诸如冻干的灭活病毒[例如182,RabAvert™]。

[0185] - 麻疹、腮腺炎和/或风疹抗原[例如参考文献163的第19、20和26章]。

[0186] - 流感抗原[例如参考文献163的第17和18章],诸如血细胞凝集素和/或神经氨酸酶表面蛋白。

[0187] - 来自卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 的抗原[例如183]。

[0188] - 来自酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群链球菌) 的抗原[例如184,185,186]。

[0189] - 来自表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 的抗原[例如可由菌株ATCC-31432、SE-360和SE-10获得的I、II和/或III型荚膜糖,如参考文献187、188和189中所述]。

[0190] 当使用糖或碳水化合物抗原时,其通常缀合至载体以增强免疫原性。所述载体分子可以是本发明的载体,即包含BP-2a多肽和spb1多肽的载体。或者,所述载体分子可以是任何合适的载体蛋白,例如如上所述。流感嗜血杆菌B、脑膜炎球菌和肺炎球菌糖抗原的缀

合是众所周知的。

[0191] 必要时,可使毒性蛋白抗原脱毒(例如通过化学和/或遗传方式使百日咳毒素脱毒[162])。

[0192] 当所述组合物中包括白喉抗原时,通常还包括破伤风抗原和百日咳抗原。类似地,当包括破伤风抗原时,通常还包括白喉和百日咳抗原。类似地,当包括百日咳抗原时,通常还包括白喉和破伤风抗原。

[0193] 抗原可以吸附至铝盐。组合物中的抗原通常各以至少1 μ g/ml的浓度存在。通常,任何给定抗原的浓度将足以引发针对该抗原的免疫应答。

[0194] 作为本发明的组合物中使用蛋白抗原的一种替代方案,可使用编码该抗原的核酸[例如参考文献190-198]。本发明的组合物的蛋白组分因此可被编码该蛋白的核酸(通常DNA,例如质粒形式的DNA)替代。

[0195] 在实践方面,本发明的组合物中包括的抗原数可存在上限。本发明的组合物中的抗原(包括本发明缀合物)数可以少于20、少于19、少于18、少于17、少于16、少于15、少于14、少于13、少于12、少于11、少于10、少于9、少于8、少于7、少于6、少于5、少于4、或少于3。组合物中的本发明缀合物数可少于6、少于5或少于4。

[0196] 包含所述缀合物的药物组合物。

[0197] 本发明提供了包含(a)本发明的缀合物和(b)药学上可接受的载体的药物组合物。此类载体的详细讨论可见参考文献199。

[0198] 微生物感染影响身体的各个区域,所以可将本发明的组合物以各种形式制备。例如,可将所述组合物制备为可注射剂,作为液体溶液或悬浮液。也可制备适合在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。所述组合物可以制备用于局部施用,例如作为软膏剂、乳膏剂或粉末剂。所述组合物被制备用于口服施用,例如作为片剂或胶囊,或作为糖浆剂(任选地调味)。可将所述组合物制备为使用细粉或喷雾进行肺部施用,例如作为吸入剂。可将所述组合物制备为栓剂或阴道栓。可将所述组合物制备用于鼻腔、耳部或眼部施用,例如作为滴剂,作为喷雾剂,或作为粉剂[例如,200]。可将所述组合物包括于漱口水中。可将所述组合物冻干。

[0199] 所述药物组合物优选是无菌的。其优选无热原。优选将其缓冲在例如pH6至pH8、通常约pH7。

[0200] 本发明还提供含有本发明的药物组合物的递送装置。所述装置可以是例如,注射器或吸入器。

[0201] 本发明的药物组合物优选为免疫原性组合物,因为它们包含免疫有效量的抗原。“免疫有效量”意指以单一剂量或作为一系列剂量的部分向个体施用该量对于治疗或预防是有效的。该量取决于待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的年龄、分类组(例如非人灵长类动物、灵长类动物等)、个体的免疫系统合成抗体的能力、期望的保护程度、疫苗制剂、治疗医生对医学情况的评估和其他相关因素而不同。预期所述量将落入可通过常规试验确定的相对宽范围内。剂量处理可以是单剂量时间表或多剂量时间表(例如包括加强剂量)。所述组合物可以与其他免疫调节剂结合施用。

[0202] 一旦配制,可以将本发明的组合物直接施用于主体。待治疗的主体可以是动物;具体而言,可以治疗人主体。

[0203] 可以治疗性(即治疗现有的干扰)或预防性(即预防未来的感染)使用本发明的免疫原性组合物。

[0204] 免疫原性组合物可以包括进一步佐剂,其可以用于增强在接受所述组合物的患者中引起的免疫应答(体液和/或细胞)。可以与本发明使用的佐剂包括,但不限于:

· 含有矿物质(包括钙盐和铝盐(或其混合物))的组合物。钙盐包括磷酸钙(例如参考文献201中公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等,其中所述盐采用任何合适形式(例如凝胶、结晶、无定形等)。优选吸附至这些盐。也可将含有矿物质的组合物配制为金属盐的颗粒[202]。可使用已知为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规的,但仅出于方便使用,因为其均不是存在的实际化合物的准确描述(例如参见参考文献285第9章)。本发明可使用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。称为“氢氧化铝”的佐剂通常是羟基氧化铝盐(aluminum oxyhydroxide salts)(通常至少部分为晶体)。已知为“磷酸铝”的佐剂通常是羟基磷酸铝,经常还含有少量硫酸(即硫酸羟基磷酸铝)。它们可通过沉淀获得,沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中的羟基的程度。本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝两者的混合物。在这种情况下,可以存在比氢氧化铝更多的磷酸铝,例如重量比为至少2:1,例如, $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ 等。施用于患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选小于10mg/ml,例如 $\leq 5\text{mg/ml}$ 、 $\leq 4\text{mg/ml}$ 、 $\leq 3\text{mg/ml}$ 、 $\leq 2\text{mg/ml}$ 、 $\leq 1\text{mg/ml}$ 等。优选的范围是0.3-1mg/ml。优选0.85mg/剂量的最大值。

[0205] · 皂苷[参考文献285的第22章],其为在许多种类植物的树皮、叶、茎干、根和甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。已广泛研究了作为佐剂的来自皂树(*Quillaia saponaria* Molina)树皮的皂苷。皂苷也可商业获得自丽花菝葜(*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)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂诸如QS21,以及脂质制剂诸如ISCOM。QS21作为Stimulon™销售。已使用HPLC和RP-HPLC纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术的特定纯化级分,包括QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B和QH-C。优选地,所述皂苷为QS21。产生QS21的方法公开于参考文献203。皂苷制剂也可包含甾醇,诸如胆固醇[204]。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285第23章]。ISCOM通常还包括磷脂,诸如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷均可用于ISCOM中。优选地,ISCOM包括QuilA、QHA和QHC中的一种或多种。参考文献204-206中进一步描述了ISCOM。任选地,ISCOM可不含额外的去污剂[207]。开发基于皂苷的佐剂的综述可参见参考文献208和209。

[0206] · 细菌ADP-核糖基化毒素(例如大肠杆菌不耐热肠毒素“LT”、霍乱毒素“CT”或百日咳毒素“PT”)及其脱毒的衍生物,诸如称为LT-K63和LT-R72的突变体毒素[210]。脱毒的ADP-核糖基化毒素作为粘膜佐剂的用途描述于参考文献211,且作为胃肠外佐剂的用途描述于参考文献212。

[0207] · 生物粘附剂和粘膜粘附剂,诸如酯化的透明质酸微球[213]或壳聚糖及其衍生物[214]。

[0208] · 优选由生物可降解且无毒的材料(例如,聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己内酯等)与丙交酯乙交酯共聚物形成的微粒(即直径为 $\sim 100\text{nm}$ 至 $\sim 150\mu\text{m}$,更优选直径 $\sim 200\text{nm}$ 至 $\sim 30\mu\text{m}$,或直径 $\sim 500\text{nm}$ 至 $\sim 10\mu\text{m}$ 的颗粒),其任选经处理以具有带负电表面

面(例如用SDS处理)或带正电表面(例如用阳离子去污剂诸如CTAB处理)。

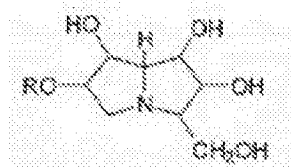
[0209] · 脂质体(参考文献285的第13和14章)。适用作佐剂的脂质体制剂的实例描述于参考文献215-217。

[0210] · 胞壁酰肽,诸如N-乙酰基胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(“thr-MDP”)、N-乙酰基-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧基丙基酰胺(“DTP-DPP”或“Theramide™”)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸基氧基)-乙胺(“MTP-PE”)。

[0211] · Polyoxidonium聚合物[218, 219]或其他N-氧化的聚乙烯-哌嗪衍生物。

[0212] · 甲基肌苷5'-单磷酸酯(“MIMP”)[220]。

[0213] · 多聚羟化吡咯双烷化合物[221],诸如具有下式的化合物:



其中R选自氢、直链或支链的、未取代的或取代的、饱和的或不饱和的酰基、烷基(例如环烷基)、烯基、炔基和芳基或其药学上可接受的盐或衍生物。实例包括,但不限于:木麻黄素(casuarine)、木麻黄素-6- α -D-吡喃葡萄糖、3-表-木麻黄素、7-表-木麻黄素、3,7-二表-木麻黄素等。

[0214] · CD1d配体,诸如 α -糖基神经酰胺[222-229](例如 α -半乳糖基神经酰胺)、含有植物鞘氨醇的 α -糖基神经酰胺、OCH、KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-半乳吡喃糖基)-2-(N-二十六烷基(hexacosanoyl)氨基)-1,3,4-十八烷三醇]、CRONY-101、3''-O-硫代-半乳糖基神经酰胺等。

[0215] · γ 菊粉[230]或其衍生物,诸如algammulin。

[0216] · 水包油乳液。各种此类乳液是已知的,并且它们通常包括至少一种油和至少一种表面活性剂,其中所述油和表面活性剂是可生物降解的(可代谢的)和生物相容的。乳液中的油滴直径通常小于5 μ m,并且可以甚至具有亚微米直径,用微流化床实现这些小尺寸以提供稳定乳液。优选尺寸小于220nm的液滴,因为这些液滴可以进行过滤除菌。

[0217] · 免疫刺激寡核苷酸,诸如含有CpG基序的(含有通过磷酸键连接至鸟苷残基的未甲基化的胞嘧啶残基的二核苷酸序列)或含有CpI基序的(含有连接至肌苷的胞嘧啶的二核苷酸序列)的免疫刺激寡核苷酸、或双链RNA或含有回文序列的寡核苷酸或含有聚(dG)序列的寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸可以包括核苷酸修饰/类似物诸如硫代磷酸酯修饰,且可以是双链或(除了RNA)单链的。参考文献231、232和233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234-239中进一步讨论了CpG寡核苷酸的佐剂作用。CpG序列可针对TLR9,诸如基序GTCGTT或TTCGTT [240]。CpG序列可特异性诱导Th1免疫应答,诸如CpG-A ODN(寡脱氧核苷酸),或其可更特异地诱导B细胞应答,诸如CpG-B ODN。参考文献241-243中讨论了CpG-A和CpG-B ODN。优选地,CpG为CpG-A ODN。优选地,构建CpG寡核苷酸,使得5'末端可被受体识别。任选地,将两个CpG寡核苷酸序列在其3'末端连接以形成“免疫聚体(immunomers)”。参见例如参考文献240和244-246。一种有用的 CpG佐剂是

CpG7909,也称为ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.)。另一种是CpG1826。作为使用CpG序列的替代方案,或除了使用CpG序列以外,可以使用TpG序列[247],且这些寡核苷酸可以不含未甲基化的CpG基序。免疫刺激性寡核苷酸可富含嘧啶。例如,其可包含多于一个连续的胸腺嘧啶核苷酸(例如TTTT,如参考文献247中所公开),和/或其可具有含有>25%(例如>35%、>40%、>50%、>60%、>80%等)胸苷的核苷酸组成。例如,其可包含多于一个连续的胞嘧啶核苷酸(例如CCCC,如参考文献247中所公开),和/或其可具有含有>25%(例如>35%、>40%、>50%、>60%、>80%等)胞嘧啶的核苷酸组成。这些寡核苷酸可不含未甲基化的CpG基序。免疫刺激性寡核苷酸将通常包含至少20个核苷酸。它们可包含少于100个核苷酸。

[0218] 基于免疫刺激性寡核苷酸的特别有用的佐剂已知为IC-31™ [248]。因此,与本发明使用的佐剂可包含以下的混合物:(i)包括至少一个(且优选多个)CpI基序的寡核苷酸(例如15-40个核苷酸),和(ii)聚阳离子聚合物,诸如包括至少一个(且优选多个)Lys-Arg-Lys三肽序列的寡肽(例如5-20个氨基酸)。所述寡核苷酸可以是包含26聚体序列5'-(IC)₁₃-3'(SEQ ID NO:98)的脱氧核苷酸。所述聚阳离子聚合物可以是包含11聚体氨基酸序列KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO:99)的肽。

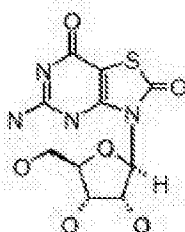
[0219] · 3-O-脱酰基化的单磷酰脂质A('3dMPL',也称为'MPL™')[249-252]。在水性条件下,3dMPL可以形成具有不同大小的胶束聚集体或颗粒,例如具有<150nm或>500nm的直径。这些中的任一者或两者均可以用于本发明,且可以通过常规测定选择更好的颗粒。根据本发明优选使用较小的颗粒(例如足够小以提供澄清的3dMPL的水性悬浮液),这是因为它们优异的活性[253]。优选的颗粒具有小于220nm、更优选小于200nm或小于150nm或小于120nm的平均直径,且甚至可以具有小于100nm的平均直径。然而,在大多数情况下,平均直径将不小于50nm。

[0220] · 咪唑并喹啉化合物,诸如咪唑莫特("R-837")[254,255]、瑞喹莫德("R-848")[256]和它们的类似物;及其盐(例如盐酸盐)。关于免疫刺激性咪唑并喹啉类的进一步细节可见参考文献257-261。

[0221] · 缩氨基硫脲化合物,诸如参考文献262中公开的那些。活性化合物的配制、制备和筛选的方法也描述于参考文献262中。缩氨基硫脲类在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子诸如TNF-α中特别有效。

[0222] · 色胺酮化合物,诸如参考文献263中公开的那些。活性化合物的配制、制备和筛选的方法也描述于参考文献263中。缩氨基硫脲类在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子诸如TNF-α中特别有效

· 核苷类似物,诸如:(a)艾沙托立宾(Isatorabine)(ANA-245;7-硫杂-8-氧代鸟苷):



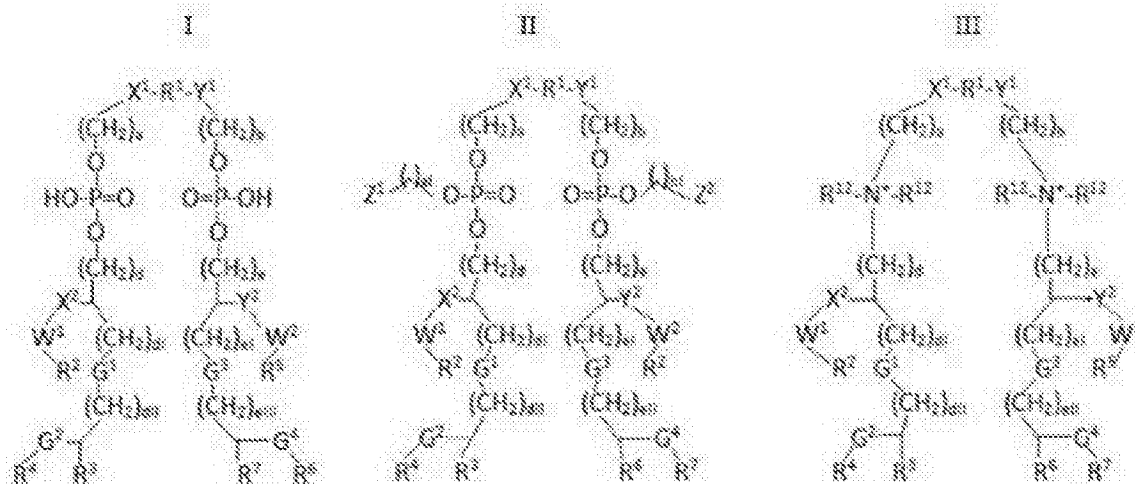
· 及其前药;(b)ANA975;(c)ANA-025-1;(d)ANA380;(e)参考文献264-266中公开的化合物和洛索立宾(7-烯丙基-8-氧代鸟苷)[267]。

[0223] · 参考文献268中公开的化合物,包括:酰基哌嗪化合物、咪唑二酮化合物、四氢异喹啉(THIQ)化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮杂乙烷基化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮(ABIQ)化合物[269,270]、水合酞酰胺(Hydraphtalamide)化合物、二苯甲酮化合物、异噁唑化合物、甾醇化合物、喹唑啉酮(Quinazilinone)化合物、吡咯化合物[271]、蒽醌化合物、喹喔啉化合物、三嗪化合物、吡唑并嘧啶化合物和咪唑(Benzazole)化合物[272]。

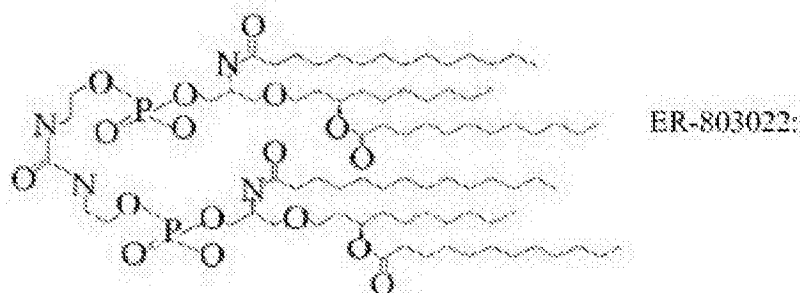
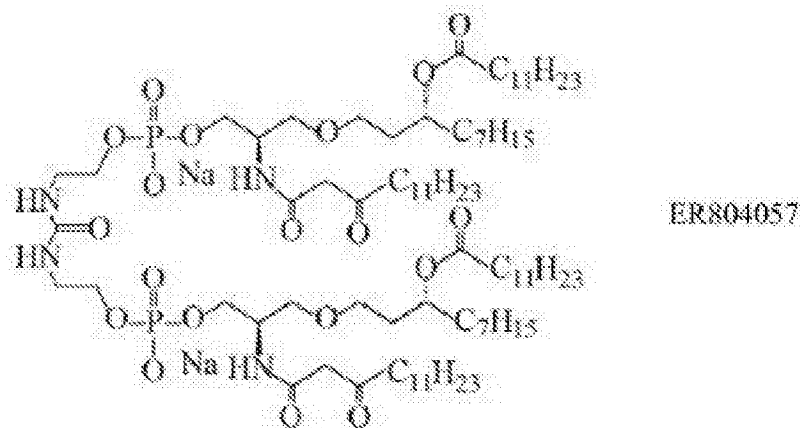
[0224] · 氨基烷基葡萄糖苷磷酸酯衍生物,诸如RC-529[273,274]。

[0225] · 磷腈,诸如聚[二(羧基合苯氧基)磷腈](poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]) (“PCPP”),如例如描述于参考文献275和276。

[0226] · 式I、II或III的取代的脲或化合物或其盐:

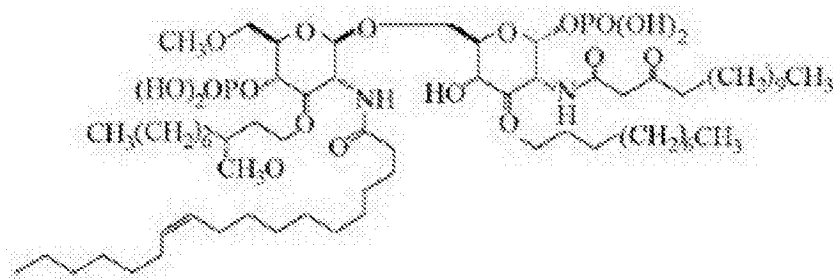


如定义于参考文献277,诸如‘ER 803058’、‘ER 803732’、‘ER 804053’、ER 804058’、‘ER 804059’、‘ER 804442’、‘ER 804680’、‘ER 804764’、ER 803022或‘ER 804057’,例如:



· 来自大肠杆菌的脂质A的衍生物,诸如OM-174 (描述于参考文献278和279)。

[0227] · 含有连接至含有磷酸酯的非环骨架的脂质的化合物,诸如TLR4拮抗剂E5564 [280,281]:



这些和其他佐剂-活性物质在参考文献285和286中更详细讨论。

[0228] 组合物中的抗原和佐剂通常处于混合物中。

[0229] 组合物可包括所述佐剂中的两种或更多种。例如,它们可有利地包括水包油乳液和3dMPL两者,等。

[0230] 可与本发明使用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于:

· 角鲨烯、Tween80和Span 85的亚微米(submicron)乳液。所述乳液的体积组成可以是约5%角鲨烯、约0.5%聚山梨醇酯80和约0.5%Span 85。在重量方面,这些比率变为4.3%角鲨烯、0.5%聚山梨醇酯80和0.48%Span 85。这种佐剂已知为‘MF59’ [282-284],如参考文献285的第10章和参考文献286的第12章中更详细描述。MF59®乳液有利地包括柠檬酸根离子,例如10mM柠檬酸钠缓冲液。

[0231] · 角鲨烯、生育酚和Tween80的乳液。所述乳液可包括磷酸盐缓冲盐水。它也可包括Span 85 (例如1%)和/或卵磷脂。这些乳液可具有2-10%角鲨烯、2-10%生育酚和0.3-3%Tween80,且角鲨烯:生育酚的重量比优选 ≤ 1 ,因为这提供更稳定的乳液。角鲨烯和Tween80可以约5:2的体积比存在。可通过以下制备一种此类乳液:将Tween80溶解于PBS以产生2%溶液,然后混合90ml该溶液与(5g DL- α -生育酚和5ml角鲨烯)的混合物,然后微流化该混合物。所得乳液可具有亚微米油滴,例如平均直径为100-250nm,优选约180nm。

[0232] · 角鲨烯、生育酚和Triton 去污剂(例如Triton X-100)的乳液。所述乳液也可包括3d-MPL(参见下文)。所述乳液可含有磷酸盐缓冲液。

[0233] · 包含聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)、Triton 去污剂(例如Triton X-100)和生育酚(例如 α -生育酚琥珀酸酯)的乳液。所述乳液可包括质量比约75:11:10的这三种组分(例如750 μ g/ml聚山梨醇酯80、110 μ g/ml Triton X-100和100 μ g/ml α -生育酚琥珀酸酯),并且这些浓度应当包括来自抗原的这些组分的任何贡献。所述乳液也可包括角鲨烯。所述乳液还可包括3d-MPL(参见下文)。所述水相可包含磷酸盐缓冲液。

[0234] · 角鲨烯、聚山梨醇酯80和泊洛沙姆401(“普朗尼克™ L121”)的乳液。所述乳液可在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水中配制。该乳液是胞壁酰二肽的有用递送媒介物,且已在“SAF-1”佐剂[287]中与苏氨酸-MDP一起使用(0.05-1% Thr-MDP,5%角鲨烯,2.5%普朗尼克L121和0.2%聚山梨醇酯80)。它也可以不与Thr-MDP使用,如“AF”佐剂[288](5%角鲨烯,1.25%普朗尼克 L121和0.2%聚山梨醇酯80)中。优选微流化。

[0235] · 具有0.5-50%油、0.1-10%磷脂和0.05-5%非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献289中所述,优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。亚微米液滴尺寸是有利的。

[0236] · 不可代谢油 (诸如轻矿物油) 和至少一种表面活性剂 (诸如卵磷脂, Tween80 或 Span 80) 的亚微米水包油乳液。可包括添加剂, 诸如QuilA皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂缀合物 (诸如参考文献290中所述通过经由葡萄糖醛酸的羧基将脂族胺添加至脱酰基皂苷而产生的GPI-0100)、二甲基双十八烷基溴化铵和/或N,N-双十八烷基-N,N-双(2-羟乙基)丙二胺。

[0237] · 其中皂苷 (例如QuilA或QS21) 和甾醇 (例如胆固醇) 结合为螺旋胶束的乳液 [291]。

[0238] 与本发明的免疫原性组合物一起使用的特定佐剂包括MF59[®]、Alum和/或toll样受体7 (TLR7) 激动剂, 例如如公开于通过引用并入本文的EP2459216中。

[0239] 医学治疗和用途

本发明还提供本发明的缀合物, 其用于医药中, 例如, 用于在合适哺乳动物中产生抗体应答。本发明还提供在合适哺乳动物中引起免疫应答的方法, 其包括向哺乳动物施用本发明的缀合物或药物组合物。本发明也提供本发明的缀合物在制备用于预防或治疗合适哺乳动物中的微生物感染的药物中的用途。

[0240] 通过这些方法和用途产生的免疫应答将通常包括抗体应答, 优选保护性抗体应答。用于评价抗原免疫之后的抗体应答的方法是本领域中众所周知的。所述抗体应答优选为IgA或IgG应答。所述免疫应答可以是预防性和/或治疗性的。所述哺乳动物优选为人, 具体地女人, 更具体地怀孕女人。

[0241] 治疗性治疗的效力可以通过在施用本发明的组合物之后监测微生物感染来测试。预防性治疗的效力可以通过在施用所述组合物之后监测针对抗原的免疫应答 (例如, 抗-抗原的抗体) 来测试。

[0242] 本发明的组合物将通常直接施用于患者。直接递送可通过肠胃外注射 (例如皮下、腹膜内、静脉内、肌内或至组织间隙), 或通过直肠、经口、阴道、局部、透真皮、真皮内、经眼、经鼻、经耳或经肺施用完成。优选注射或鼻内施用。本发明可用于引发全身和/或粘膜免疫。

[0243] 根据本发明制备的疫苗可用于治疗儿童和成人两者。因此, 主体可以为小于1岁、1-5岁、5-15岁、15-55岁或至少55岁。接受疫苗的具体主体为老人 (例如 ≥ 50 岁, ≥ 55 岁, ≥ 60 岁, 和 ≥ 65 岁) 或年轻人 (例如 ≤ 5 岁)。然而, 所述疫苗不仅适用于这些组, 还可更广泛地用于人群中。

[0244] 治疗可以通过单剂量时间表或多剂量时间表。多剂量可用于初次免疫时间表和/或加强免疫时间表。在多剂量时间表中, 各个剂量可通过相同或不同的途径 (例如肠胃外引发和粘膜加强, 粘膜引发和肠胃外加强等) 给予。多于一个剂量 (通常两个剂量) 的施用尤其可用于免疫幼稚的患者。多个剂量将通常间隔至少1周 (例如约2周、约3周、约4周、约6周、约8周、约10周、约12周、约16周等) 进行施用。

[0245] 本发明的用途和方法特别可用于治疗/保护免于由衍生所述抗原的生物体引起的感染。下面讨论示例性用途/方法。

[0246] 无乳链球菌荚膜糖

所述用途和方法可用于预防和/或治疗由无乳链球菌引起的疾病。实例表明本发明的载体分子是无乳链球菌糖的特别有效的载体。此外, 载体的BP-2a和spb1多肽也可能帮助诱导保护性的载体特异性免疫应答。包含本发明的载体蛋白的免疫原性组合物可用于: (i) 用于治疗或预防由无乳链球菌引起的感染性疾病的方法; 或(ii) 用于在主体中诱导针对无

乳链球菌的免疫应答的方法;或(iii)接种主体以保护免于或减少无乳链球菌感染症状的方法,其中所述方法包括向有需要的主体施用治疗有效量的所述组合物。在具体实施方案中,包含本发明的载体蛋白的免疫原性组合物可用于在婴儿中提供针对无乳链球菌的保护性免疫或保护婴儿免于由无乳链球菌引起的疾病的方法,其中所述婴儿由女性生产,在所述女性怀孕所述婴儿的时间期间向所述女性施用有效量的所述组合物。由无乳链球菌引起的疾病可以是早期发作性疾病(EOD)和/或晚期发作性疾病(LOD)。

[0247] 脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖

所述用途和方法可用于预防和/或治疗由脑膜炎奈瑟氏菌引起的疾病,例如,脑膜炎、败血症等。

[0248] 葡聚糖类

因为葡聚糖类(特别是 β -葡聚糖类)是几乎所有的病原体真菌、特别是涉及免疫受损的主体中的感染的那些和还有在细菌病原体和原生动物的基本和主要的多糖组分,所以抗-葡聚糖免疫可对宽范围的病原体和疾病具有效力。例如,用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)免疫后产生的抗-葡聚糖血清与白色念珠菌(*Candida albicans*)交叉反应。广谱免疫是特别有用的,因为,对于这些人感染性真菌剂,化学治疗是缺乏的,抗真菌药物耐受正在出现,并且对预防性和治疗性疫苗的需求日益得到认可。

[0249] 本发明的用途和方法特别可用于治疗/保护免受以下的感染:念珠菌属种,诸如白色念珠菌;隐球菌属种,诸如新型隐球菌;肠球菌属种,诸如粪肠球菌(*E. faecalis*);链球菌属种,诸如肺炎链球菌、变形链球菌(*S. mutans*)、无乳链球菌和酿脓链球菌(*S. pyogenes*);利什曼原虫属种,诸如硕大利什曼原虫(*L. major*);棘阿米巴属种,诸如堡棘棘阿米巴(*A. castellani*);曲霉菌属种,诸如烟曲霉菌(*A. fumigatus*)和黄曲菌(*A. flavus*);肺囊虫属种,诸如卡氏肺囊虫(*P. carinii*);分枝杆菌属种,诸如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*);假单胞菌属种,诸如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*);葡萄球菌属种,诸如金黄色葡萄球菌;沙门氏菌属种,诸如鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*);球孢子菌属种,诸如粗球孢子菌(*C. immitis*);发癣菌属种,诸如疣状毛癣菌(*T. verrucosum*);芽生菌属种,诸如皮炎芽生菌(*B. dermatidis*);组织胞浆菌属种,诸如荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*);副球孢子菌属种,诸如巴西副球孢子菌(*P. brasiliensis*);腐霉菌属种诸如 *P. insidiosum*;和埃希氏菌属种,诸如大肠杆菌。

[0250] 所述用途和方法特别可用于治疗/预防疾病,所述疾病包括但不限于:念珠菌病(包括肝脾念珠菌病、侵袭性念珠菌病、慢性皮肤粘膜念珠菌病和播散性念珠菌病);念珠菌血症;曲霉病、隐球菌病、皮肤真菌病、孢子丝菌病和其他皮下真菌病、芽生菌病、组织胞浆菌病、球孢子菌病、副球孢子菌病(paracoccidiomycosis)、肺孢子虫病、鹅口疮、结核病、分枝杆菌病、呼吸系统感染、猩红热、肺炎、脓疱病、风湿热、脓毒症、败血病、皮肤和内脏利什曼病、角膜棘阿米巴病、囊性纤维化、伤寒、胃肠炎和溶血性尿毒症性综合征。抗-白色念珠菌活性特别可用于治疗AIDS患者的感染。

[0251] 可将本发明的缀合物与非葡聚糖抗原组合成用于针对多种病原体同时免疫的单一组合物。作为制备组合疫苗的替代方案,可将缀合物与其他疫苗基本上同时(例如在到医疗保健专业或接种中心的同一医学会诊或诊视期间)施用于患者。用于这些组合疫苗中或用于伴随施用的抗原包括,例如,来自无乳链球菌、金黄色葡萄糖球菌和/或铜绿假单胞菌、

甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、脑膜炎奈瑟氏菌(诸如糖类或缀合的糖类,对于血清群A、C、W135和/或Y)、肺炎链球菌(诸如糖类或缀合的糖类)等的免疫原。

[0252] 本发明的缀合物可以与抗真菌剂结合使用,尤其是在患者已经被感染的情况下。抗真菌剂提供了立即治疗效果,而缀合物提供了较长持续的效果。合适的抗真菌剂包括,但不限于唑类(例如,氟康唑、伊曲康唑)、多烯类(例如,两性霉素B)、氟胞嘧啶和角鲨烯环氧化酶抑制剂(例如,特比萘芬)[也参见参考文献292]。抗真菌剂和缀合物可以单独或组合施用。当分开施用时,它们通常在各自的7天内施用。在缀合物的第一次施用之后,可以施用抗真菌剂多于一次。

[0253] 酿脓链球菌荚膜糖

所述用途和方法可用于预防和/或治疗由A群链球菌引起的疾病。

[0254] 肺炎链球菌荚膜糖

所述用途和方法可用于预防和/或治疗由肺炎球菌引起的疾病,例如脑膜炎、败血症、肺炎等。

[0255] 定义

除非另有说明,本发明的实施将采用本领域技术内的化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药学的常规方法。此类技术在文献中已详细解释。参见例如参考文献199和293-299等。

[0256] 上面使用“GI”编号。GI编号,或“GenInfo标识符”,是当将序列添加至其数据库时连续分配至由NCBI处理的每个序列记录的一系列数位。GI编号与序列记录的登录号没有任何相似性。当更新序列(例如,用于校正,或添加更多注释或信息)时,则其接收新的GI编号。因此,与给定GI编号相关的序列从不改变。

[0257] 当省略抗原“结构域”时,这可以涉及省略信号肽、胞质结构域、跨膜结构域、胞外结构域等。

[0258] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如,“包含”X的组合物可以仅由X组成或可包括额外物质,例如X+Y。术语“基本上由...组成”是指组合物、方法或结构可以包括额外的成分、步骤和/或部分,但仅当额外的成分、步骤和/或部分不会实质性改变请求保护的组合物、方法或结构的基本和新型特征。术语“由...组成”通常被认为意指如请求保护的本发明限于权利要求中具体叙述的那些要素(并且可以包括其等同物,只要等同原则适用)。

[0259] 关于数值x的术语“约”意指例如所述值的+两个标准偏差。在某些实施方案中,“约”被理解为在该特定领域内的可接受的变化和公差。例如,当提及可测量值诸如量、时间持续时间等时,可以涵盖距指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 且又更多优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为此类变化适于进行公开的方法。

[0260] 词语“基本”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。例如,“基本上不含”Y可以理解为含有不超过 5% Y、不超过 4% Y、不超过 3% Y、不超过 2% Y、不超过 1% Y或不超过 0.1% Y的组合物。必要时,词语“基本上”可以从本发明的定义中省略。

[0261] 与氨基酸相关的术语“经典”意味着氨基酸是由通用遗传密码编码的20种氨基酸之一,即丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、精氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、谷氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸、色氨酸、苏氨酸、酪氨

酸和缬氨酸。

[0262] 如本文所使用,除非上下文另有明确指出,“一个/种(a)”和“该(the)”被理解为包括单数和复数。

[0263] 如本文所使用,术语“片段”是指作为另一序列的子集的序列。当在核酸或氨基酸序列的上下文中使用时,术语“片段”和“子序列”可互换使用。这些术语用于指整个或完整的野生型多肽的一部分或部分,但其包含比整个或完整的野生型多肽更少的氨基酸残基。因此,该术语是指对应于野生型或参考多肽的一个或多个区域的截短或较短的氨基酸序列。本领域技术人员清楚的是,尽管此类片段是参考序列的截短或更短的片段,但此类片段可以被修饰成包含参考多肽中未发现的额外的序列,例如以形成融合多肽,包括“标签”序列,诸如His标签或谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签,接头序列等。因此,在此类修饰片段中,片段的N末端氨基酸的氨基不通过肽键连接至参考多肽中与之连接的氨基酸的羧基和/或该片段的C末端氨基酸的羧基不通过肽键连接至参考多肽中与之连接的氨基酸的氨基。通常通过计数第一和第二多肽之间的匹配位置的数目并将该数目除以最短多肽的总长度、随后将所得值乘以100来测定第一多肽和第二多肽的百分比同一性。对于片段的多肽,该值通常确定为约100%,因此意义很小。因此,在本发明的片段的上下文中,可以使用术语“参考多肽的比例”(表示为百分比)。通过计数片段和参考多肽之间的匹配位置的数目并将该数目除以参考多肽的总长度、随后将所得值乘以100来计算参考多肽的比例。具体地,片段将包含参考多肽的序列的少于90、80、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25或少于20%。

[0264] 除非特别说明,包括混合两种或更多种组分的步骤的方法不要求混合的任何特定顺序。因此,组分可以任何顺序混合。当存在三种组分时,则两种组分可以彼此组合,然后该组合可以与第三组分组合,等。

[0265] 当动物(特别是牛)材料在细胞培养中使用时,它们应当获得自不含传染性海绵状脑病(TSE)、特别是不含牛海绵状脑病(BSE)的来源。总体上,优选在动物来源材料完全不存在的条件下培养细胞。

[0266] 当化合物作为组合物的部分施用于机体时,则该化合物可以可选地被合适的前药替代。

[0267] 提到两种氨基酸序列之间的百分比序列同一性是指,当比对时,氨基酸的百分比在比较两种序列中是相同的。通常,百分比序列同一性通过将相同氨基酸的数量除以较长序列中的氨基酸总数来计算。该比对和百分比同源性或序列同一性可使用本领域已知的软件程序(例如参考文献300的7.7.18部分中所述的程序)来确定。优选的比对通过Smith-Waterman同源性搜索算法确定,其使用仿射缺口搜索,缺口开放罚分为12且缺口延伸罚分为2,BLOSUM矩阵为62。参考文献301中公开了Smith-Waterman同源性搜索算法。

[0268] 本文提供的所有GenBank登录号均以提交本申请之日可得的版本通过引用并入。

实施例

[0269] 实施例1:GBS59(6XD3)-GBS1523融合体

通过PIPE克隆通过使用引物59pipeF (SEQ ID NO:278)、59GSG41523.R (SEQ ID NO:281)扩增59(6XD3)的基因(再次来自购自genearth的合成基因)和使用引物59GSG41523.F (SEQ ID NO:280)和1523pipe.R (SEQ ID NO:279)扩增来自基因组GBS COHI菌株DNA的

gbs1523基因来产生融合蛋白“GBS59 (6XD3) -GSG4-1523”基因 (SEQ ID:276)。含有对应于GSG4接头 (SEQ ID NO:272) 的18 bp (SEQ ID NO:282) 的重叠区域的两个I-PCR使用pET15 TEV载体-PCR (编码N-末端6XHIS-TEV标签 (公开为SEQ ID NO:79和275的“6XHIS”)) 在PIPE反应中共同使用,并在HK100大肠杆菌菌株中共转化。通过获得的克隆的DNA测序来验证正确的序列。

[0270] 为了产生无标签的59 (6XD3) -GSG4-1523融合蛋白,通过使用引物596xD3 NheI F (SEQ ID NO:283) 和1523 XhoI Stop R (SEQ ID NO:284) 从pET15-TEV-59 (6XD3) -GSG4-1523克隆 (公开为SEQ ID NO:272的“GSG4”) 进一步扩增59 (6XD3) -GSG4-1523基因。PCR产物用NheI\XhoI限制酶切割,并连接至用相同限制酶预先消化的pET24b+载体 (novagen) 中。将连接反应物转化于DH5a大肠杆菌细胞中,并通过DNA测序验证克隆的正确序列。

[0271] 将pET24-59 (6XD3) -GSG4-1523克隆 (卡那霉素抗性) 转化于BL21 (DE3) t1抗性菌株 (NEB) 中。通过在LB-PTK +卡那霉素培养基中接种一个单个菌落并通过添加IPTG来诱导蛋白表达来实现蛋白表达。

[0272] 对于重组蛋白表达,对于pET克隆,将培养物在用1mM IPTG诱导后在25℃维持5小时。通过亲和层析和凝胶过滤纯化所有重组蛋白。简言之,将细胞通过离心收获,并在含有PBS中的10mM咪唑、1mg/ml溶菌酶、0.5 mg/ml DNase和COMPLETE抑制剂混合物 (Roche) 的“裂解缓冲液”中裂解。将裂解物通过离心澄清,并将其应用于在含有10mM咪唑的PBS中预平衡的His-Trap HP柱 (Amersham Biosciences) 上。使用含有250mM咪唑的相同缓冲液,在两次洗涤步骤后使用20mM和50mM咪唑缓冲液,进行蛋白洗脱。然后将洗脱的蛋白浓缩并上样于在PBS中预平衡的HiLoad 16/60 Superdex 75 (Amersham Biosciences) 上。

[0273] 实施例2:用GBS59 (6XD3) -GBS1523免疫提供保护

测试GBS59 (6XD3) -GBS1523-HIS融合体提供针对一系列GBS攻击菌株的保护的能力。分开组的小鼠用GBS59 (6XD3) -GBS1523-HIS融合体进行免疫,然后用表达不同GBS59等位基因或表达GBS1523的不同GBS攻击菌株进行攻击。用PBS进行免疫用作阴性对照。如表5中所示,融合体中GBS59和GBS1523抗原的存在提供了针对表达GBS59的菌株和针对表达GBS1523的菌株的保护。

[0274] 表5

攻击菌株	GBS59等位基因	PBS		GBS59(6XD3)-GBS1523-HIS	
		受保护/受治疗	%存活	受保护/受治疗	%存活
5401 (H36B 等位基因)	GBS59 (H36B)	8/57	14	22/47	47
3050 (2603 等位基因)	GBS59 (2603)	1/60	2	50/50	100
515 (515 等位基因)	GBS59 (515)	11/30	36	49/58	85
DK21 (DK21 等位基因)	GBS59 (DK21)	7/30	23	28/37	76
CON1	GBS1523	10/50	20	55/60	92
A909	GBS1523	27/79	34	58/70	83

[0275] 重要的是,包含GBS1523的融合体提供了与W02011/121576中公开的用GBS59 (6XD3) 融合体获得的相当的针对表达不同GBS59等位基因的菌株的保护,证明添加GBS1523不会负面影响免疫原性。

[0276] 实施例3:作为GBS PS-II的载体的GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物

将GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物作为GBS II型多糖的载体的效力与其他载体蛋白进行比较。以每剂量1 μ g蛋白的剂量向小鼠组施用3个剂量的Alum中的相关糖缀合物。如表6中所示,GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物是GBS II型多糖的特别有效的载体,并且100%的用GBS59 (6XD3) -GBS1523-II免疫的小鼠在用GBS II型菌株5401攻击后存活。值得注意的是,由GBS59 (6XD3) -GBS1523-II提供的保护大于由CRM-II提供的保护(85%存活),且大于由GBS80-II提供的保护(78%存活)。此外,GBS59 (6XD3) -GBS1523-II提供了针对III型菌株COH1 (100%存活) 和Ia型菌株515 (40%存活) 的攻击的良好保护。

[0277] 表6

抗原	5401 - II型		COH1 - III型		515 - Ia型	
	受保护/ 受治疗	%存活	受保护/ 受治疗	%存活	受保护/ 受治疗	%存活
PBS/Alum	17/118	14	29/110	26	2/50	4
CRM-II	85/100	85	ND	ND	ND	ND
GBS80-II	36/46	78	8/10	80	ND	ND
GBS59(6XD3)- GBS1523-II	60/60	100	40/40	100	28/70	40

[0278] 由所述组合物引发的对II型糖特异性的抗体的滴度显示于图1中。GBS59 (6XD3) -GBS1523-II引发高滴度的特异性抗体,且滴度与CRM-II引发的滴度相当或比之更高。再次,这些数据是显著的,因为它们表明GBS59 (6XD3) -GBS1523-II表现的相对于例如CRM-II的增加了的保护不仅仅是包含GBS抗原的载体蛋白的存在的结果。相比之下,GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物作为载体分子是有效的,并且增强对II型糖抗原特异性的免疫应答。由GBS59 (6XD3) -GBS1523-II组合物引发的对GBS59和GBS1523特异性的抗体的滴度显示于图2中。

[0279] 实施例4:作为GBS PS-V的载体的GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物

将GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物作为GBS V型多糖的载体的效力与其他载体蛋白进行比较。以每剂量1 μ g蛋白的剂量向小鼠组施用3个剂量的Alum中的相关糖缀合物。如表7中所示,GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物是GBS V型多糖的特别有效的载体,并且86%的用GBS59 (6XD3) -GBS1523-V免疫的小鼠在用GBS V型菌株CJB111攻击后存活。此外,GBS59 (6XD3) -GBS1523-V提供了针对III型菌株COH1的攻击的良好保护(60%存活)。

[0280] 表7

抗原	CJB111 - V型		COH1 - III型	
	受保护/ 受治疗	%存活	受保护/ 受治疗	%存活
PBS/Alum	23/107	21	26/115	23
GBS59(6XD3)-GBS1523-V	43/50	86	34/57	60

[0281] 实施例5:GBS59 (6XD3) -GBS1523相比于破伤风类毒素、CRM197和GBS80作为载体的效力

还将GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物作为GBS II型和V型多糖的载体的效力与TT、CRM197和GBS80进行比较。以每剂量1 μ g糖和400 μ g Alum的剂量向8只小鼠的组施用3个剂量的

Alum中的相关糖缀合物。如表8中所示,用GBS59 (6XD3)-GBS1523-II免疫提供了比CRM-II和GBS80-II更好的针对用II型菌株5401的攻击的保护,以及比TT-II更大的保护。

[0282] 表8

抗原	PBS/Alum	TT-II	CRM-II	GBS80-II	GBS59(6XD3)-GBS1523-II
%存活	30	80	70	62	91
抗原	PBS/Alum	TT-V	CRM-V	GBS80-V	GBS59(6XD3)-GBS1523-V
%存活	40	98	91	90	93

[0283] 图3提供了本研究中不同缀合物引发的抗II糖抗体的几何平均滴度。由GBS59 (6XD3)-GBS1523-II引发的滴度大于CRM-II和GBS80-II。这些数据是显著的,因为它们表明GBS59 (6XD3)-GBS1523-II表现的相对于例如CRM-II的增加了的保护不仅仅是包含GBS抗原的载体蛋白的存在的结果。相比之下,GBS59 (6XD3)-GBS1523缀合物作为载体分子是有效的,并且增强对II型糖抗原特异性的免疫应答。

[0284] 图4提供了本研究中不同缀合物引发的抗V糖抗体的几何平均滴度。由GBS59 (6XD3)-GBS1523-V引发的滴度大于CRM-V和GBS80-V。这些数据是显著的,因为它们表明GBS59 (6XD3)-GBS1523-V表现的相对于例如CRM-V的增加了的保护不仅仅是包含GBS抗原的载体蛋白的存在的结果。相比之下,GBS59 (6XD3)-GBS1523缀合物作为载体分子是有效的,并且增强对V型糖抗原特异性的免疫应答。

[0285] 由测试的组合物引发的对V型糖特异性的抗体的滴度显示于图5中。GBS59 (6XD3)-GBS1523-V引发高滴度的特异性抗体,且滴度与CRM-V引发的滴度相当或比之更高。再次,这些数据是显著的,因为它们表明GBS59 (6XD3)-GBS1523-V表现的相对于例如CRM-V的增加了的保护不仅仅是包含GBS抗原的载体蛋白的存在的结果。相比之下,GBS59 (6XD3)-GBS1523缀合物作为载体分子是有效的,并且增强对V型糖抗原特异性的免疫应答。

[0286] 由GBS59 (6XD3)-GBS1523-V组合物引发的对GBS59和GBS1523特异性的抗体的滴度显示于图6中。

[0287] 实施例6:不是所有GBS蛋白都是有效的载体蛋白

使用昆布多糖作为荚膜多糖模型测试其他GBS蛋白充当载体蛋白的能力。将以下蛋白(包括来自GBS纤毛岛的辅助蛋白)缀合至昆布多糖,并用于如前所述免疫小鼠:CRM197、GBS01132、GBS01157、GBS52 (uniprot Q8E0S8)、GBS150和SAN1516。只有一种蛋白(GBS52)才能充当这样的载体蛋白,其引发与用作基准的昆布多糖-CRM197缀合物的滴度相当的抗昆布多糖IgG滴度(图7)。因此,GBS蛋白抗原代替例如CRM197充当载体蛋白的能力不依赖于其诱导免疫应答的能力。

[0288] 实施例7:多价疫苗中作为载体的GBS59 (6XD3)-GBS1523缀合物 - 保护

当与其他载体-糖缀合物组合使用时,测试GBS59 (6XD3)-GBS1523缀合物的效力。具体而言,将GBS59 (6XD3)-GBS1523-II和GBS59 (6XD3)-GBS1523-V缀合物与包含与CRM缀合的Ia、Ib和III GBS糖的三价疫苗和GBS80缀合物组合。将由这些四价和五价组合物提供的保护与包含三价疫苗的组合物进行比较,所述三价疫苗与缀合至CRM₁₉₇和GBS80的血清型II和V糖组合。

[0289] 表9 - 用菌株5401 - II型攻击

抗原	受保护/受治疗	%存活
PBS	37/120	31
CRM-II	55/80	69
GBS80-II	80/120	67
GBS59(6XD3)-GBS1523-II	108/120	90
CRM-Ia/Ib/III	15/100	15
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	72/99	73
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	62/129	48
CRM-Ia/Ib/III + GBS80-II	84/96	87
CRM-Ia/Ib/III + GBS59(6XD3)-GBS1523-V + GBS80-II	103/105	98
CRM-Ia/Ib/III + GBS59-1523-II	68/84	81
CRM-Ia/Ib/III + GBS59(6XD3)-GBS1523-II + GBS80-V	47/49	96

[0290] 表10 - 用菌株CJB111 - V型攻击

抗原	受保护/受治疗	%存活
PBS	39/100	39
CRM-V	108/119	91
GBS80-V	114/127	90
GBS59(6XD3)-GBS1523-V	99/109	91
CRM-Ia/Ib/III	32/102	31
CRM-Ia/Ib/III + CRM-V	60/70	86
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	89/95	94
CRM-Ia/Ib/III + GBS80-V	82/90	91
CRM-Ia/Ib/III + GBS59(6XD3)-GBS1523-II + GBS80-V	60/60	100
CRM-Ia/Ib/III + GBS59-1523-V	79/98	81
CRM-Ia/Ib/III + GBS59(6XD3)-GBS1523-V + GBS80-II	99/120	82

[0291] 表9和10表明当单独施用或与其他糖缀合物组合施用GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物作为II型和V型糖的载体的效力。GBS59 (6XD3) -GBS1523-II提供了比当单独施用缀合物时CRM-II和GBS80-II更好的针对血清型II型菌株5401的保护(与67%存活和69%存活相比,90%存活)。当GBS59 (6XD3) -GBS1523-II缀合物与三价CRM-Ia/Ib/III组合物组合时,维持针对血清型II菌株5401的改进的保护。包含GBS59 (6XD3) -GBS1523-II和CRM-Ia/Ib/III的四价组合物提供了比包含CRM-II和CRM-Ia/Ib/III的组合物更高的保护(81%存活,相比于73%存活)。当添加GBS80-V以产生五价组合物时,该保护进一步增加(96%存活)。

[0292] 此外,GBS59 (6XD3) -GBS1523-V提供了针对血清型V型菌株CJB111的强大的保护,其与CRM-V提供的保护相当。当与三价CRM-Ia/Ib/III组合物组合以产生四价和五价组合物时,GBS59 (6XD3) -GBS1523-V也是有效的。

[0293] 这些数据还表明,包含GBS59 (6XD3) -GBS1523载体的多价组合物是特别有效的,并且不受困于依赖于现有技术载体CRM的组合物表现出的载体诱导的抑制。当在小鼠模型中使用高水平的CRM197(保护从73%下降至48%)时,大量的针对血清型II型菌株5401的保护丧失,这可能由于载体诱导的表位抑制(CIES)。相比之下,表9和10表明,包含GBS59 (6XD3) -GBS1523缀合物的五价组合物各自相对于相当的四价组合物提供了增加的保护。这对于载

体分子是特别有利的属性,并且允许开发有效的多价组合物以提供针对一系列不同生物体和一系列不同生物体株系的保护。

[0294] 当与三价CRM-Ia/Ib/III组合物和GBS80缀合物组合时,还测试GBS59 (6XD3) - GBS1523-II和GBS59 (6XD3) - GBS1523-V缀合物提供针对异源菌株的保护的能力。如下表11和12中所示,尽管由所述缀合物提供的保护是适度的,但其大于由PBS以及GBS59 (6XD3) - GBS1523和GBS80蛋白本身提供的保护。

[0295] 表11

由多价疫苗针对其他菌株提供的保护

抗原	攻击菌株	受保护/受治疗	%存活
PBS	IV型	56/153	37
CRM-Ia/Ib/III+GBS80-II+ GBS59(6XD3)-GBS1523-V	IV型	83/122	68

[0296] 表12

由多价疫苗针对其他菌株提供的保护。

抗原	攻击菌株	受保护/受治疗	%存活
PBS	VIII型	28/90	31
CRM-Ia/Ib/III+GBS80-II+ GBS59(6XD3)-GBS1523-V	VIII型	61/97	63

[0297] 实施例8:多价疫苗中作为载体的GBS59 (6XD3) - GBS1523缀合物 - 抗体滴度

在四项另外研究中,将GBS59 (6XD3) - GBS1523缀合物在多价疫苗的背景下增强对血清型II和血清型V糖的抗体应答的能力与CRM进行比较。

[0298] 图8显示由一系列不同多价疫苗组合物引发的对II型糖特异性的抗体滴度(“Triv.”是指CRM-Ia/Ib/III三价疫苗)。由包含GBS59 (6XD3) - GBS1523载体的组合物引发的滴度大于由包含CRM-缀合物的相应组合物引发的滴度。重要的是,对于五价GBS59 (6XD3) - GBS1523载体组合物没有观察到多糖干扰。在完全CRM197缀合物组合物中,更加分散的免疫应答是可见的,这可能是作为特定小鼠模型中使用的由高水平CRM197的载体免疫表位抑制的结果。

[0299] 图9显示由一系列不同多价疫苗组合物引发的对V型糖特异性的抗体滴度(“Triv.”是指CRM-Ia/Ib/III三价疫苗)。由包含GBS59 (6XD3) - GBS1523载体的组合物引发的滴度大于由包含CRM-缀合物的相应组合物引发的滴度。重要的是,对于五价GBS59 (6XD3) - GBS1523载体组合物没有观察到多糖干扰。

[0300] 图10和11提供了图8和9中所示一些数据的进一步统计分析。可以看到,GBS59 (6XD3) - GBS1523载体统计学上显著比CRM₁₉₇组合物更有效。

[0301] 由于所有GBS分离株都携带在小鼠中赋予保护的纤毛,所以三种蛋白的组合(纤毛1 (GBS80)和2b (GBS1523)的骨架蛋白以及纤毛2a (GBS59)的6种骨架变体的嵌合融合体)可以潜在地保护免于更广泛的GBS分离株,代表用于预防GBS感染的更有效的解决方案。

[0302] 与三种蛋白的混合物相比,融合蛋白方法提供了显著的优点:它是更加明确的产物,它减少了重组表达和纯化步骤的数量,造成在疫苗的成本和可行性方面的差异。纤毛2a

嵌合蛋白与纤毛2b骨架蛋白的融合体导致高度表达和稳定的抗原,其中每个结构域单独正确地折叠。

[0303] 单独或与GBS多糖缀合的重组嵌合体在用携带纤毛2b或纤毛2a变体的任何GBS菌株攻击的小鼠中赋予强大保护。

[0304] 实施例9 - *spb1* (BP-2b,GBS1523)的结构域

诱导保护性免疫应答的表位限于免疫原性蛋白内的特定结构域。一旦鉴定所述结构域,它们可以以重组形式表达,其用作没有与疫苗方面无关的区域的疫苗抗原。使用蛋白结构域的优点之一是它们通常是结构上有序的,并且可以容易地在体外处理,进一步简化了携带两个或更多个免疫原性结构域的合成融合蛋白的构建。因此,为了确定是否可以进一步优化融合蛋白的*spb1* (GBS1523)区域,应用结构疫苗学来定义携带保护性表位的最小结构域。

[0305] 重组蛋白的克隆、表达和纯化

从GBS菌株COH1 (SAN_1518) PCR扩增编码没有预测的N-末端信号肽和C-末端跨膜结构域的纤毛2b骨架蛋白BP-2b₃₀₋₄₆₈ (全长*spb1*) 以及缺乏N-末端结构域1和三个单一结构域 (D130-184、D2185-356、D3347-468, SEQ ID NOs:287、289、291) 的BP-2b₁₈₅₋₄₆₈ (BP-2b_{D2+D3}, SEQ ID NO: 285) 的基因,将其克隆在pET21b+载体中并表达为C-末端His标记的蛋白。在LB中或在Biosilta Enbase培养基中生长的大肠杆菌BL21 (DE3) (Novagen) 细胞中表达蛋白。通过使用溶解于Tris pH 7.5、300mM NaCl、10mM咪唑中的细胞裂解sigma试剂提取可溶性蛋白,并通过FF-Crude His-Trap HP镍螯合柱 (Amersham Bioscience) 纯化。将用300mM咪唑洗脱的重组蛋白通过超滤浓缩至10 mg/ml,并上样至在50mM Tris-HCl (pH 7.5)、75 mM NaCl中预平衡的HiLoad 26/60 Superdex 75 (Amersham Biosciences) 上。用BCA测定法 (Pierce) 定量纯级分中的蛋白丰度。

[0306] 细菌菌株、培养基和生长条件

蛋白	OD ₆₀₀	浓度 80% (mg/ml)	80% 280nm	ABD 0.1%	浓度 280nm (mg/ml)	浓度 80%
GBS 1523D2 His.	1.9543	0.015 mg/ml	0.0002	1.000	0.0002 mg/ml	0.00049
GBS 5903_8368 His	1.2039.0	0.175 mg/ml	0.140	0.791	0.175 mg/ml	0.0121
GBS 5903_Cjb110 His.	1.2073.3	0.167 mg/ml	0.132	0.787	0.165 mg/ml	0.0102
GBS 5903_Cjb111 His.	1.2744.0	0.160 mg/ml	0.208	1.203	0.172 mg/ml	0.0134
GBS 5903_2603 His.	1.2700.2	0.201 mg/ml	0.177	0.783	0.226 mg/ml	0.0177
GBS 5903_DK21 His.	1.2697.3	0.171 mg/ml	0.201	1.036	0.150 mg/ml	0.0118
GBS 5903_515 His	1.2655.3	0.150 mg/ml	0.169	1.022	0.172 mg/ml	0.00964
GBS 59 (6xHis)-GBS54-1523	1.20084	0.5 mg/ml	0.436	1.002	0.436 mg/ml	0.0013
GBS 1523	4.0038	3.4 mg/ml	1.70	1.195	1.4 mg/ml	0.0047
GBS 59 (6xHis)	1.1773		0.923	1.001	0.923 mg/ml	0.0119
GBS 1523 DCM 2x3	3.0008		0.048	1.011	0.027 mg/ml	0.0001

使无乳链球菌菌株在Todd Hewitt液体培养基 (Difco Laboratories) 或补充有5%绵羊血的胰蛋白酶大豆琼脂中在37°C下在5% CO₂中生长。

[0307] 小鼠主动母体免疫模型

使用GBS感染的小鼠母体免疫/幼崽攻击模型来验证抗原的保护效力,如前所述(Maione等人, 2005)。简言之,在第1、21和35天,用PBS或Alum制剂中每剂量20 μ g蛋白免疫5只CD-1雌性小鼠(6-8周龄)的组。在最后一次免疫后3天培育小鼠。在出生48小时内,将幼崽腹膜内注射计算为引起90%致死率的剂量的GBS细菌(COH1菌株)。每天监测小鼠,并当它们表现出根据诺华动物福利政策(Novartis Animal Welfare Policies)为研究预先建立的定义的人道终点时将其安乐死。使用Fisher精确检验进行统计学分析。

[0308] 互补载体的构建和定点诱变

为了检查靶向针对菌毛蛋白(pilin)蛋白BP的表面暴露表位的单克隆抗体可能识别单个BP结构域的可能性,通过western印迹测试BP全长蛋白、BP_{D2+D3}和单个结构域D1、D2和D3。

[0309] 获得自用mAb免疫印迹的结果显示于图13中。观察到对应于D2+D3蛋白片段和整个spb1的预期分子量的特异性条带,没有检测到个别结构域的染色。作为对照,我们使用针对全长重组BP产生的小鼠血清,其能够检测BP的所有重组亚结构域(数据未显示)。该结果表明,单克隆抗体识别全长和结晶的BP_{D2+D3}中包括、但在分离的D2和D3结构域中不包括的表位。这些数据表明,单个结构域D2或D3不能正确地折叠。两种抗体均可检测到全长野生型BP-2b蛋白;由GBS表达的重组或天然物,和重组D2+D3蛋白片段,而不是D2或D3单个重组结构域。

[0310] BP-2b_{D2+D3}保留全长蛋白的免疫学特性

最后,为了研究BP_{D2+D3}相比于全长蛋白和单个D1结构域的免疫学特性,纯化的重组蛋白被独立地用于免疫CD1小鼠,并且在主动母体小鼠免疫/新生幼崽攻击模型中测试各自的保护活性。对于所述攻击,我们使用在其表面表达高水平的BP-2b蛋白的GBS菌株COH1。如下所示,BP_{D2+D3}构建体在体内赋予水平与全长蛋白相当的保护,表明BP-2b中的保护性表位特异性集中在蛋白的该部分中,而D1结构域似乎是小鼠中的保护不必要的。图14呈现用来自人类患者的血清的Western印迹,所述血清强烈识别全长spb1 (GBS1523)和spb1_{D2+D3} (GBS1523_{D2+D3}),但不识别spb1_{D1} (GBS1523_{D1})。

BP-2b 构建体	存活/总数	%存活
D1	24/143	17
D2+D3	69/106	65
BP全长	51/87	59
PBS	23/230	10

[0311] 示例性GBS59 (6xD3)-GBS1523_{D2+D3}的序列作为SEQ ID:293提供。本发明的包含GBS59的7个D3亚结构域和GBS1523的D2+D3结构域的另外示例性载体的序列,GBS59 (7xD3_{SUB})-GBS1523_{D2+D3}作为SEQ ID:294提供。GBS1523结构域D1、D2和D3的变体序列提供于SEQ ID NO:288、290和292中。

[0312] 序列的列表

SEQ ID NO:1 (GBS59 2603)

SEQ ID NO:2 (GBS59 515)

SEQ ID NO:3 (GBS59 cjb111)
SEQ ID NO:4 (GBS59 h36b)
SEQ ID NO:5 (GBS59 CJB110)
SEQ ID NO:6 (GBS59 DK21)
SEQ ID NO:7 (GBS59 NEM316)
SEQ ID NO:8 (D1 2603)
SEQ ID NO:9 (D2 2603)
SEQ ID NO:10 (D3 2603)
SEQ ID NO:11 (D4 2603)
SEQ ID NO:12 (D1 515)
SEQ ID NO:13 (D2 515)
SEQ ID NO:14 (D3 515)
SEQ ID NO:15 (D4 515)
SEQ ID NO:16 (cjb111 D1)
SEQ ID NO:17 (cjb111 D2)
SEQ ID NO:18 (cjb111 D3)
SEQ ID NO:19 (cjb111 D4)
SEQ ID NO:20 (h36b D1)
SEQ ID NO:21 (h36b D2)
SEQ ID NO:22 (h36b D3)
SEQ ID NO:23 (h36b D4)
SEQ ID NO:24 (CJB110 D1)
SEQ ID NO:25 (CJB110 D2)
SEQ ID NO:26 (CJB110 D3)
SEQ ID NO:27 (CJB110 D4)
SEQ ID NO:28 (DK21 D1)
SEQ ID NO:29 (DK21 D2)
SEQ ID NO:30 (DK21 D3)
SEQ ID NO:31 (DK21 D4)
SEQ ID NO:32 (D1 NEM316)
SEQ ID NO:33 (D2 NEM316)
SEQ ID NO:34 (D3 NEM316)
SEQ ID NO:35 (D4 NEM316)
SEQ ID NO:36 (2603 D3子片段)
SEQ ID NO:37 (2603 D4H)
SEQ ID NO:38 (515 D3子片段)
SEQ ID NO:39 (515 D4H)
SEQ ID NO:40 (cjb111 D3子片段)
SEQ ID NO:41 (cjb111 D4H)

SEQ ID NO:42 (h36b D3子片段)
SEQ ID NO:43 (h36b D4H)
SEQ ID NO:44 (CJB110 D3子片段)
SEQ ID NO:45 (CJB110 D4H)
SEQ ID NO:46 (DK21 D3子片段)
SEQ ID NO:47 (DK21 D4H)
SEQ ID NO:48 (NEM316 D3子片段)
SEQ ID NO:49 (DK21 D4H)
SEQ ID NO:50 (2603 D3+D4)
SEQ ID NO:51 (2603 D3+D4H)
SEQ ID NO:52 (2603 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:53 (2603 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:54 (515 D3 + D4)
SEQ ID NO:55 (515 D3+D4H)
SEQ ID NO:56 (515 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:57 (515 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:58 (cjb111 D3+D4)
SEQ ID NO:59 (cjb111 D3+D4H)
SEQ ID NO:60 (cjb111 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:61 (cjb111 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:62 (h36b D3+D4)
SEQ ID NO:63 (h36b D3+D4H)
SEQ ID NO:64 (h36b D2+D3+D4)
SEQ ID NO:65 (h36b D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:66 (CJB110 D3+D4)
SEQ ID NO:67 (CJB110 D3+D4H)
SEQ ID NO:68 (CJB110 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:69 (CJB110 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:70 (DK21 D3+D4)
SEQ ID NO:71 (DK21 D3+D4H)
SEQ ID NO:72 (DK21 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:73 (DK21 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:74 (NEM316 D3+D4)
SEQ ID NO:75 (NEM316 D3+D4H)
SEQ ID NO:76 (NEM316 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:77 (NEM316 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:78 (D3的515短片段)
SEQ ID NO:79 (his标签)
SEQ ID NO:80 (接头)

SEQ ID NO:81 (接头)
SEQ ID NO:82 (接头)
SEQ ID NO:83 (融合体E)
SEQ ID NO:84 (融合体F)
SEQ ID NO:85 (融合体G)
SEQ ID NO:86 (融合体H)
SEQ ID NO:87 (融合体I)
SEQ ID NO:88 (编码融合体E)
SEQ ID NO:89 (编码融合体F)
SEQ ID NO:90 (编码融合体G)
SEQ ID NO:91 (编码融合体H)
SEQ ID NO:92 (编码融合体I)
SEQ ID NO:93 (编码融合体E - 大肠杆菌优化的)
SEQ ID NO:94 (编码融合体F - 大肠杆菌优化的)
SEQ ID NO:95 (编码融合体G - 大肠杆菌优化的)
SEQ ID NO:96 (编码融合体H - 大肠杆菌优化的)
SEQ ID NO:97 (编码融合体I - 大肠杆菌优化的)
SEQ ID NO:98 (IC佐剂)
SEQ ID NO:99 (聚阳离子肽佐剂)
SEQ ID NO:100 (编码GBS59 2603)
SEQ ID NO:101 (编码GBS59 515)
SEQ ID NO:102 (编码GBS59 cjb111)
SEQ ID NO:103 (编码GBS59 h36b)
SEQ ID NO:104 (编码GBS59 CJB110)
SEQ ID NO:105 (编码GBS59 DK21)
SEQ ID NO:106 (编码GBS59 NEM316)
SEQ ID NO:107 (编码2603 D1)
SEQ ID NO:108 (编码2603 D2)
SEQ ID NO:109 (编码2603 D3)
SEQ ID NO:110 (编码2603 D4)
SEQ ID NO:111 (编码515 D1)
SEQ ID NO:112 (编码515 D2)
SEQ ID NO:113 (编码515 D3)
SEQ ID NO:114 (编码515 D4)
SEQ ID NO:115 (编码cjb111 D1)
SEQ ID NO:116 (编码cjb111 D2)
SEQ ID NO:117 (编码cjb111 D3)
SEQ ID NO:118 (编码cjb111 D4)
SEQ ID NO:119 (编码h36b D1)

SEQ ID NO:120 (编码h36b D2)
SEQ ID NO:121 (编码h36b D3)
SEQ ID NO:122 (编码h36b D4)
SEQ ID NO:123 (编码CJB110 D1)
SEQ ID NO:124 (编码CJB110 D2)
SEQ ID NO:125 (编码CJB110 D3)
SEQ ID NO:126 (编码CJB110 D4)
SEQ ID NO:127 (编码DK21 D1)
SEQ ID NO:128 (编码DK21 D2)
SEQ ID NO:129 (编码DK21 D3)
SEQ ID NO:130 (编码DK21 D4)
SEQ ID NO:131 (编码NEM316 D1)
SEQ ID NO:132 (编码NEM316 D2)
SEQ ID NO:133 (编码NEM316 D3)
SEQ ID NO:134 (编码NEM316 D4)
SEQ ID NO:135 (编码2603 D3子片段)
SEQ ID NO:136 (编码2603 D4H)
SEQ ID NO:137 (编码515 D3子片段)
SEQ ID NO:138 (编码515 D4H)
SEQ ID NO:139 (编码cjb111 D3子片段)
SEQ ID NO:140 (编码cjb111 D4H)
SEQ ID NO:141 (编码h36b D3子片段)
SEQ ID NO:142 (编码h36b D4H)
SEQ ID NO:143 (编码CJB110 D3子片段)
SEQ ID NO:144 (编码CJB110 D4H)
SEQ ID NO:145 (编码DK21 D3子片段)
SEQ ID NO:146 (编码DK21 D4H)
SEQ ID NO:147 (编码NEM316 D3子片段)
SEQ ID NO:148 (编码NEM316 D4H)
SEQ ID NO:149 (编码2603 D3+D4)
SEQ ID NO:150 (编码2603 D3+D4H)
SEQ ID NO:151 (编码2603 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:152 (编码2603 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:153 (编码515 D3+D4)
SEQ ID NO:154 (编码515 D3+D4H)
SEQ ID NO:155 (编码515 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:156 (编码515 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:157 (编码cjb111 D3+D4)
SEQ ID NO:158 (编码cjb111 D3+D4H)

SEQ ID NO:159 (编码cjb111 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:160 (编码cjb111 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:161 (编码h36b D3+D4)
SEQ ID NO:162 (编码h36b D3+D4H)
SEQ ID NO:163 (编码h36b D2+D3+D4)
SEQ ID NO:164 (编码h36b D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:165 (编码CJB110 D3+D4)
SEQ ID NO:166 (编码CJB110 D3+D4H)
SEQ ID NO:167 (编码CJB110 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:168 (编码CJB110 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:169 (编码DK21 D3+D4)
SEQ ID NO:170 (编码DK21 D3+D4H)
SEQ ID NO:171 (编码DK21 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:172 (编码DK21 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:173 (编码NEM316 D3+D4)
SEQ ID NO:174 (编码NEM D3+D4H)
SEQ ID NO:175 (编码NEM316 D2+D3+D4)
SEQ ID NO:176 (编码NEM316 D2+D3+D4H)
SEQ ID NO:177 (GBS80 2603)
SEQ ID NO:178 (无前导序列的GBS80 2603)
SEQ ID NO:179 (无跨膜/胞质区的GBS80 2603)
SEQ ID NO:180 (无跨膜/胞质区和细胞壁锚的GBS80 2603)
SEQ ID NO:181 (无胞外结构域的GBS80 2603)
SEQ ID NO:182 (GBS80 2603的N-末端免疫原性片段)
SEQ ID NO:183 (GBS67 2603)
SEQ ID NO:184 (无跨膜区的GBS67 2603)
SEQ ID NO:185 (无跨膜和细胞壁锚基序的GBS67 2603)
SEQ ID NO:186 (GBS67 2603的N-末端片段)
SEQ ID NO:187 (GBS67 2603的N-末端片段)
SEQ ID NO:188 (GBS67 h36b)
SEQ ID NO:189 (GBS67 h36b的N-末端片段)
SEQ ID NO:190 (GBS67 h36b的N-末端片段)
SEQ ID NO:191 (GBS67 CJB111)
SEQ ID NO:192 (GBS67 CJB111的N-末端片段)
SEQ ID NO:193 (GBS67 CJB111的N-末端片段)
SEQ ID NO:194 (GBS67 515)
SEQ ID NO:195 (GBS67 515的N-末端片段)
SEQ ID NO:196 (GBS67 515的N-末端片段)
SEQ ID NO:197 (GBS67 NEM316)

SEQ ID NO:198 (GBS67 NEM316的N-末端片段)
SEQ ID NO:199 (GBS67 NEM316的N-末端片段)
SEQ ID NO:200 (GBS67 DK21)
SEQ ID NO:201 (GBS67 DK21的N-末端片段)
SEQ ID NO:202 (GBS67 DK21的N-末端片段)
SEQ ID NO:203 (GBS67 CJB110)
SEQ ID NO:204 (GBS67 CJB110的N-末端片段)
SEQ ID NO:205 (GBS67 CJB110的N-末端片段)
SEQ ID NO:206 (GBS1523 COH1)
SEQ ID NO:207 (无信号序列区的GBS1523 COH1)
SEQ ID NO:208 (在位置41具有突变的GBS1523 COH1)
SEQ ID NO:209 (GBS80-GBS1523杂合体)
SEQ ID NO:210 (GBS80-GBS1523杂合体)
SEQ ID NO:211 (GBS80-GBS1523杂合体)
SEQ ID NO:212 (GBS80-GBS1523杂合体)
SEQ ID NO:213 (GBS104 2603)
SEQ ID NO:214 (GBS1524)
SEQ ID NO:215 (GBS3 2603)
SEQ ID NO:216 (无信号序列区的GBS3 2603)
SEQ ID NO:217 (GBS3 2603卷曲螺旋和富含脯氨酸的区段)
SEQ ID NO:218 (GBS3 2603信号序列和卷曲螺旋)
SEQ ID NO:219 (GBS3 2603卷曲螺旋区段)
SEQ ID NO:220 (GBS3 2603信号序列、卷曲螺旋和富含脯氨酸的区段)
SEQ ID NO:221 (GBS3 515)
SEQ ID NO:222 (GBS3 cjb111)
SEQ ID NO:223 (GBS3 coh1)
SEQ ID NO:224 (SAN1485 coh1)
SEQ ID NO:225 (GBS147 2603)
SEQ ID NO:226 (GBS328 2603)
SEQ ID NO:227 (GBS84 2603)
SEQ ID NO:228-261 (引物)
SEQ ID NO:262 (4H11/B7-VH DNA序列)
SEQ ID NO:263 (4H11/B7-VH氨基酸序列)
SEQ ID NO:264 (4H11/B7-VLk DNA序列)
SEQ ID NO:265 (4H11/B7-VLk氨基酸序列)
SEQ ID NO:266 (17C4/A3-VH DNA序列)
SEQ ID NO:267 (17C4/A3-VH氨基酸序列)
SEQ ID NO:268 (17C4/A3-VLk DNA序列)
SEQ ID NO:269 (17C4/A3-VLk 氨基酸序列)

SEQ ID NO:270 (由4H11/B7和17C4/A3结合的D3的表位)
SEQ ID NO:271 (RrgB)
SEQ ID NO:272 (GSGGGG 接头)
SEQ ID NO:273 (GSGSGGGG 接头)
SEQ ID NO:274 (具有Leu-Glu二肽的接头)
SEQ ID NO:275 (组氨酸标签)
SEQ ID NO:276 (GBS59 (6XD3) GBS1523)
SEQ ID NO:277 (GSGS 接头)
SEQ ID NO:278 (PCR引物59pipeF)
SEQ ID NO:279 (PCR引物1523pipeR)
SEQ ID NO:280: (PCR引物59GSG41523.F)
SEQ ID NO:281: (PCR引物59GSG41523.R)
SEQ ID NO:282: (重叠区域)
SEQ ID NO:283: (PCR引物596xD3 NheI F)
SEQ ID NO:284: (PCR引物1523 XhoI Stop R)
SEQ ID NO:285: (GBS1523_{D2+D3})
SEQ ID NO:286: (具有额外N-末端序列的GBS1523_{D2+D3})
SEQ ID NO:287: (GBS1523_{D1})
SEQ ID NO:288: (GBS1523_{D1}变体)
SEQ ID NO:289: (GBS1523_{D2})
SEQ ID NO:290: (GBS1523_{D2}变体)
SEQ ID NO:291: (GBS1523_{D3})
SEQ ID NO:292: (GBS1523_{D3}变体)
SEQ ID NO:293: (GBS59 (6xD3)-GBS1523_{D2+D3} 融合蛋白)
SEQ ID NO:294: (GBS59 (7xD3_{SUB})-GBS1523_{D2+D3} 融合蛋白)
SEQ ID NO:295:

[0313] 参考文献

- [1] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36
- [2] BATTERY & MOXON (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-8
- [3] AHMAD & CHAPNICK (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii
- [4] GOLDBLATT (1998) *J Med Microbiol* 47:563-567
- [5] EP-B-0 477 508
- [6] 美国专利5,306,492
- [7] WO 98/42721
- [8] DICK等人于*Conjugate Vaccines* (编辑. Cruse等人) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114
- [9] HERMANSON, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego CA (1996)
- [10] RAMSAY等人(2001) *Lancet* 357 (9251):195-6

- [11] Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.
- [12] Prieler等人 (2006) 47th Annual ICAAC (abstract)
- [13] Rennels等人 (2004) *Pediatr Infect Dis J* 23(5):429-35
- [14] Snape等人 (2008) *JAMA* 299(2):173-84
- [15] WO 2012/035519
- [16] Dagan等人 (2010) *Vaccine* 28(34):5513-23. Epub 25th June 2010
- [17] WO 00/56360
- [18] Rosini 等人 (2006) *Molecular Microbiology* 61(1):126-141
- [19] Margarit 等人 (2009) *Journal of Infectious Diseases* 199:108-115
- [20] Falugi等人 (2001) *Eur J Immunol.* 31(12):3816-24
- [21] Geysen等人 (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002
- [22] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23
- [23] Jameson, BA等人 (1988) *CABIOS* 4(1):181-186
- [24] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89
- [25] De Lalla等人 (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29
- [26] Brusica等人 (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
- [27] Meister等人 (1995) *Vaccine* 13(6):581-91
- [28] Roberts等人 (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610
- [29] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7
- [30] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1
- [31] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190
- [32] Welling等人 (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218
- [33] Davenport等人 (1995) *Immunogenetics* 42:392-297
- [34] Nuccitelli等人 (2011) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 108(25):10278-83
- [35] Tettelin等人 (2005) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102(39):13950-13955
- [36] Ravenscroft等人 (1999) *Vaccine* 17:2802-2816
- [37] Costantino等人 (1999) *Vaccine* 17:1251-1263
- [38] WO 02/058737
- [39] US 6,699,474
- [40] WO 2006/050341
- [41] Guttormsen等人 (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(15):5903-8. Epub 31st March 2008
- [42] WO 96/40795
- [43] Michon等人 (2006) *Clin Vaccine Immunol* 13(8):936-43
- [44] Lewis等人 (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11123-8
- [45] Wessels等人 (1989) *Infect Immun* 57:1089-94
- [46] WO 2006/082527
- [47] WO 2009/081276
- [48] Frash (1990) *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (编辑.

Mizrahi & Van Wezel)的第123-145页

- [49] WO 03/007985
- [50] Inzana (1987) *Infect. Immun* 55:1573-1579
- [51] WO 200/5103230
- [52] Kandil等人 (1997) *Glycoconj J* 14:13-17
- [53] Berkin等人 (2002) *Chemistry* 8:4424-4433
- [54] Glode等人 (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [55] WO 94/05325; 美国专利5,425,946
- [56] WO 2005/033148
- [57] WO 03/080678.
- [58] WO 2008/084411
- [59] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69:292-296
- [60] Tokunaka等人 (1999) *Carbohydr Res* 316:161-172
- [61] WO 03/097091
- [62] Pang等人 (2005) *Biosci Biotechnol Biochem* 69:553-8
- [63] Read等人 (1996) *Carbohydr Res* 281:187-201
- [64] Takeo和Tei (1986) *Carbohydr Res.* 145:293-306
- [65] Tanaka等人 (2003) *Tetrahedron Letters* 44:3053-3057
- [66] Ning等人 (2002) *Tetrahedron Letters* 43:5545-5549
- [67] Geurtsen等人 (1999) *Journal of Organic Chemistry* 64(21):7828-7835
- [68] Wu等人 (2003) *Carbohydr Res.* 338:2203-12
- [69] Nicolaou等人 (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119:449-450
- [70] Yamada等人 (1999) *Tetrahedron Letters* 40:4581-4584
- [71] Yamago等人 (2001) *Org Lett* 24:3867-3870
- [72] Yuguo等人 (2004) *Tetrahedron* 60: 6345-6351
- [73] Amaya等人 (2001) *Tetrahedron Letters* 42:9191-9194
- [74] Mei等人 (2005) *Carbohydr Res.* 340:2345-2351
- [75] Takeo等人 (1993) *Carbohydr Res.* 245:81-96
- [76] Jamois等人 (2005) *Glycobiology* 15(4):393-407
- [77] Lefeber等人 (2001) *Chem. Eur. J.* 7(20):4411-4421
- [78] Huang等人 (2005) *Carbohydr Res.* 340:603-608
- [79] 美国专利5,508,191
- [80] MiKyoung等人 (2003) *Biochemical Engineering Journal* 16:163-8
- [81] Barsanti等人 (2001) *J Appl Phycol* 13:59-65
- [82] Bardotti等人 (2008) *Vaccine* 26:2284-96
- [83] Jones (2005) *An Acad Bras Cienc* 77(2) 293-324
- [84] Jones (2005) *J Pharm Biomed Anal* 38 840-850
- [85] Moreau等人 (1990) *Carbohydrate Res* 339(5):285-91
- [86] Fournier等人 (1984) *Infect Immun* 45(1):87-93

- [87] Jones (2005) *Carbohydrate Res* 340 (6):1097-106
- [88] Fattom等人 (1998) *Infect Immun* 66 (10):4588-92
- [89] Lemercinier和Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296:83-96
- [90] Jones and Lemercinier (2002) *J Pharm Biomed Anal.* 30 (4):1233-47
- [91] WO 05/033148
- [92] WO 00/56357
- [93] Hestrin (1949) *J Biol Chem* 180:249-261
- [94] Konadu等人 (1994) *Infect Immn.* 62:5048-5054
- [95] Fattom等人 (1990) *Infect Immun* 58 (7):2367-74
- [96] Gilbert等人 (1994) *J. Microb Meth* 20:39-46
- [97] Kreis等人 (1995) *Int J Biol Macromol.* 17 (3-4):117-30
- [98] Höög等人 (2002) *Carbohydr Res* 337 (21-23):2023-36
- [99] www.polymer.de
- [100] Lees等人 (1996) *Vaccine* 14:190-198
- [101] WO 95/08348
- [102] 美国专利4,761,283
- [103] 美国专利4,356,170
- [104] 美国专利4,882,317
- [105] 美国专利4,695,624
- [106] Porro等人 (1985) *Mol Immunol* 22:907-919
- [107] EP-A-0208375
- [108] Bethell G.S.等人 (1979) *J Biol Chem.* 254:2572-4
- [109] Hearn (1981) *J Chromatogr* 218:509-18
- [110] WO 00/10599
- [111] Gever等人 (1979) *Med. Microbiol Immunol* 165:171-288
- [112] 美国专利4,057,685
- [113] 美国专利4,673,574; 4,761,283; 4,808,700
- [114] 美国专利4,459,286
- [115] 美国专利5,204,098
- [116] 美国专利4,965,338
- [117] 美国专利4,663,160
- [118] WO 2007/000343
- [119] WO 96/40242
- [120] Lei等人 (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264
- [121] WO 00/38711
- [122] Karpovsky等人 (1984) *Exp Med* 160:1686
- [123] Liu等人 (1985) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 82:8648
- [124] Paulus (1985) *Behring Ins Mitt* 78, 118-132
- [125] Brennan等人 (1985) *Science* 229:81-83

- [126] Glennie等人 (1987) *Immunol* 139: 2367-2375
- [127] Wang等人 (2009) *Chem Biol* 16:323-336
- [128] Floyd等人 (2009) *Angew Chem* 48:7798-7802
- [129] *Research Disclosure*, 453077 (January 2002)
- [130] EP-A-0372501
- [131] EP-A-0378881
- [132] EP-A-0427347
- [133] WO 93/17712
- [134] WO 94/03208
- [135] WO 98/58668
- [136] EP-A-0471177
- [137] WO 91/01146
- [138] Baraldo等人 (2004) *Infect Immun* 72 (8) :4884-7
- [139] EP-A-0594610
- [140] Ruan等人 (1990) *J Immunol* 145:3379-3384
- [141] WO 00/56360
- [142] WO 02/091998
- [143] Kuo等人 (1995) *Infect Immun* 63:2706-13
- [144] Michon等人 (1998) *Vaccine* 16:1732-41
- [145] WO 01/72337
- [146] WO 00/61761
- [147] WO 2004/041157
- [148] WO 02/34771
- [149] WO 99/42130
- [150] WO 2004/011027
- [151] WO 03/093306
- [152] WO 2004/018646
- [153] WO 2004/041157
- [154] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332
- [155] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v
- [156] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207
- [157] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188
- [158] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326
- [159] Gerlich等人 (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80
- [160] Hsu等人 (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915
- [161] Gustafsson等人 (1996) *N Engl J Med* 334:349-355
- [162] Rappuoli等人 (1991) *TIBTECH* 9:232-238
- [163] *Vaccines* (2004) 编辑. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0
- [164] WO 99/24578

- [165] WO 99/36544
- [166] WO 99/57280
- [167] W000/22430
- [168] Tettelin等人(2000) *Science* 287:1809-1815
- [169] Pizza等人(2000) *Science* 287:1816-1820
- [170] WO 02/02606
- [171] Kalman等人(1999) *Nature Genetics* 21:385-389
- [172] Read等人(2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406
- [173] Shirai等人(2000) *J Infect Dis* 181(Suppl 3):S524-S527
- [174] WO 99/27105
- [175] WO 00/27994
- [176] WO 00/37494
- [177] WO 99/28475
- [178] Ross等人(2001) *Vaccine* 19:4135-4142
- [179] Sutter等人(2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308
- [180] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126
- [181] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6
- [182] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19
- [183] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107
- [184] WO 02/34771
- [185] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii
- [186] Ferretti等人(2001) *PNAS USA* 98:4658-4663
- [187] Ichiman和Yoshida (1981) *J Appl Bacteriol* 51:229
- [188] US 4,197,290
- [189] Ichiman等人 (1991) *J Appl Bacteriol* 71:176
- [190] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283
- [191] Donnelly等人 (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648
- [192] Scott-Taylor & Dalglish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480
- [193] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447
- [194] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120
- [195] Dubensky等人(2000) *Mol Med* 6:723-732
- [196] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74
- [197] Donnelly等人(2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193
- [198] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90
- [199] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472
- [200] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467
- [201] 美国专利6355271

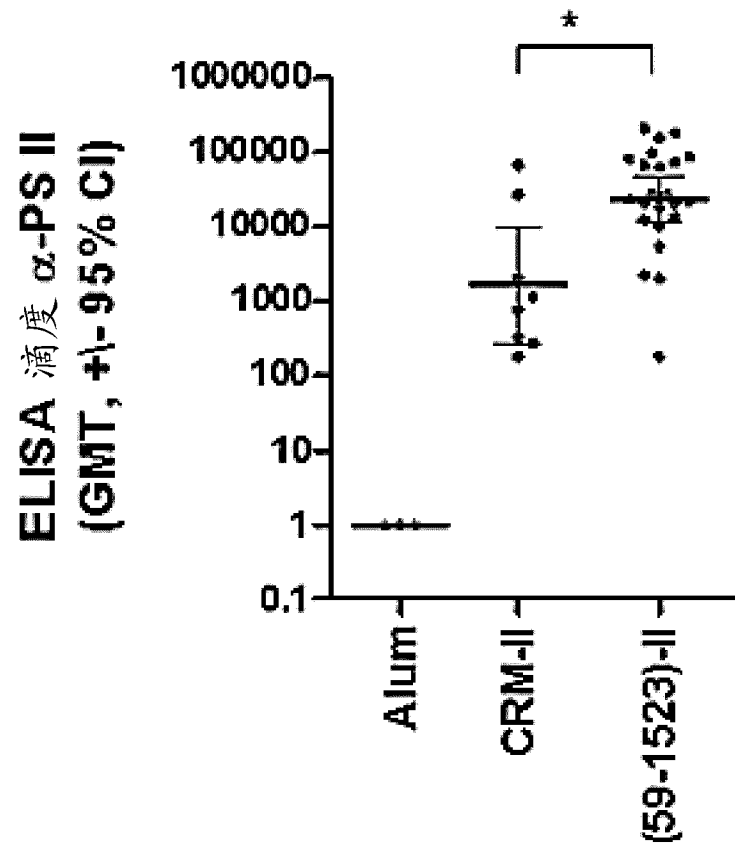
- [202] WO 00/23105
- [203] US 5,057,540
- [204] WO 96/33739
- [205] EP-A-0109942
- [206] WO 96/11711
- [207] WO 00/07621
- [208] Barr等人(1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271
- [209] Sjolanderet等人(1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338
- [210] Pizza等人(2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461
- [211] WO 95/17211
- [212] WO 98/42375
- [213] Singh等人(2001) *J Cont Release* 70:267-276
- [214] WO 99/27960
- [215] US 6,090,406
- [216] US 5,916,588
- [217] EP-A-0626169
- [218] Dyakonova等人 (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23
- [219] FR-2859633
- [220] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86
- [221] WO 2004/064715
- [222] De Libero 等人 (2005) *Nature Reviews Immunology*, 5:485-496
- [223] 美国专利5,936,076
- [224] Oki等人 (2004) *J Clin Investig* 113:1631-1640
- [225] US 2005/0192248
- [226] Yang 等人(2004) *Angew Chem Int Ed*, 43:3818-3822
- [227] WO 2005/102049
- [228] Goff等人(2004) *J Am Chem Soc* 126:13602-13603
- [229] WO 03/105769
- [230] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80
- [231] Kandimala等人 (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400
- [232] WO 02/26757
- [233] WO 99/62923
- [234] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835
- [235] McCluskie等人 (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185
- [236] WO 98/40100
- [237] 美国专利6,207,646
- [238] 美国专利6,239,116
- [239] 美国专利6,429,199

- [240] Kandimalla等人 (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658
- [241] Blackwell等人 (2003) *J Immunol* 170:4061-4068
- [242] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65
- [243] WO 01/95935
- [244] Kandimalla等人 (2003) *BBRC* 306:948-953
- [245] Bhagat等人 (2003) *BBRC* 300:853-861
- [246] WO 03/035836
- [247] WO 01/22972
- [248] Schellack等人 (2006) *Vaccine* 24:5461-72
- [249] Myers等人 (1990) *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions* 的第145-156页
- [250] Ulrich (2000) *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. 编辑O'Hagan. 的第16章 (第273-282页)
- [251] Johnson等人 (1999) *J Med Chem* 42:4640-9
- [252] Baldrick等人 (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413
- [253] WO 94/21292
- [254] US 4,680,338
- [255] US 4,988,815
- [256] WO 92/15582
- [257] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577
- [258] Wu等人 (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83
- [259] Vasilakos等人 (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74
- [260] 美国专利4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000和6924293
- [261] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218
- [262] WO 2004/060308
- [263] WO 2004/064759
- [264] US 6,924,271
- [265] US 2005/0070556
- [266] US 5,658,731
- [267] 美国专利5,011,828
- [268] WO2004/87153
- [269] US 6,605,617
- [270] WO 02/18383

- [271] WO 2004/018455
- [272] WO 03/082272
- [273] Johnson等人(1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278
- [274] Evans等人(2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229
- [275] Andrianov等人(1998) *Biomaterials* 19:109-115
- [276] Payne等人 (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196
- [277] WO 03/011223
- [278] Meraldi等人 (2003) *Vaccine* 21:2485-2491
- [279] Pajak等人 (2003) *Vaccine* 21:836-842
- [280] Wong等人(2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42
- [281] US 2005/0215517
- [282] WO 90/14837
- [283] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203
- [284] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680
- [285] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (编辑. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)
- [286] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. 编辑O' Hagan
- [287] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25
- [288] Hariharan等人(1995) *Cancer Res* 55:3486-9
- [289] WO 95/11700
- [290] 美国专利6,080,725
- [291] WO 2005/097181
- [292] Wills等人(2000) *Emerging Therapeutic Targets* 4:1-32
- [293] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream 等人, 编辑., 1998, Academic Press)
- [294] *Methods In Enzymology* (S. Colowick和N. Kaplan, 编辑., Academic Press, Inc.)
- [295] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir和C.C. Blackwell, 编辑, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [296] Sambrook等人(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- [297] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. 编辑, CRC Press, 1997)
- [298] Ausubel等人 (编辑) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 第5版 (Current Protocols)
- [299] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 第2版 (Newton & Graham 编辑., 1997, Springer Verlag)

[300] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人, 编辑., 1987) Supplement 30

[301] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489。



ELISA GMT (EU/mL)	1	1652	23325
存活率 (5401)	20%	76%	100%

图 1

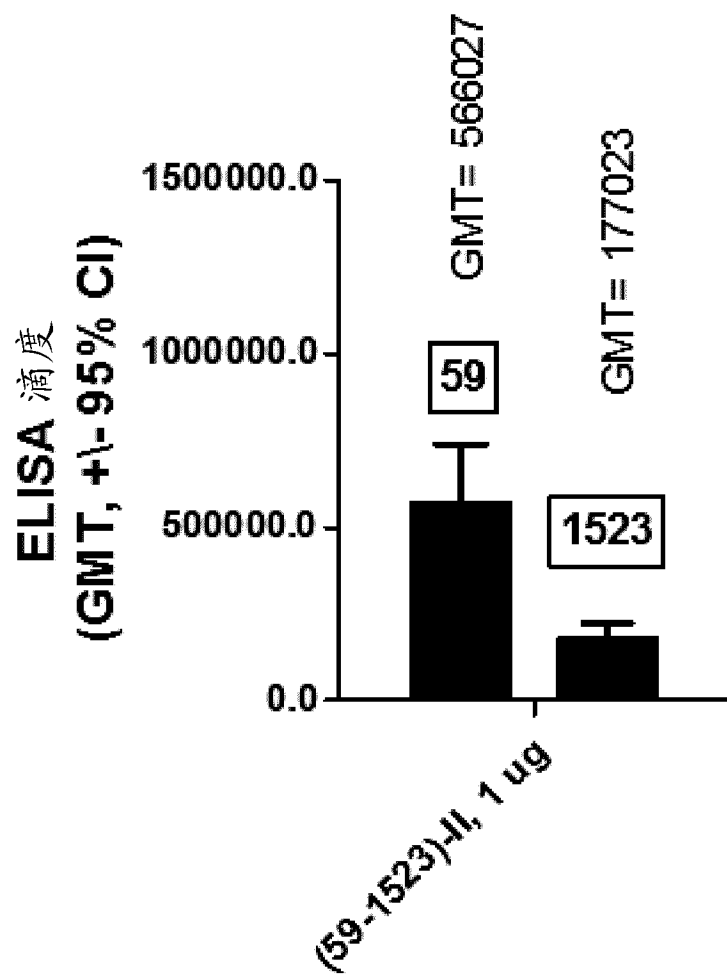


图 2

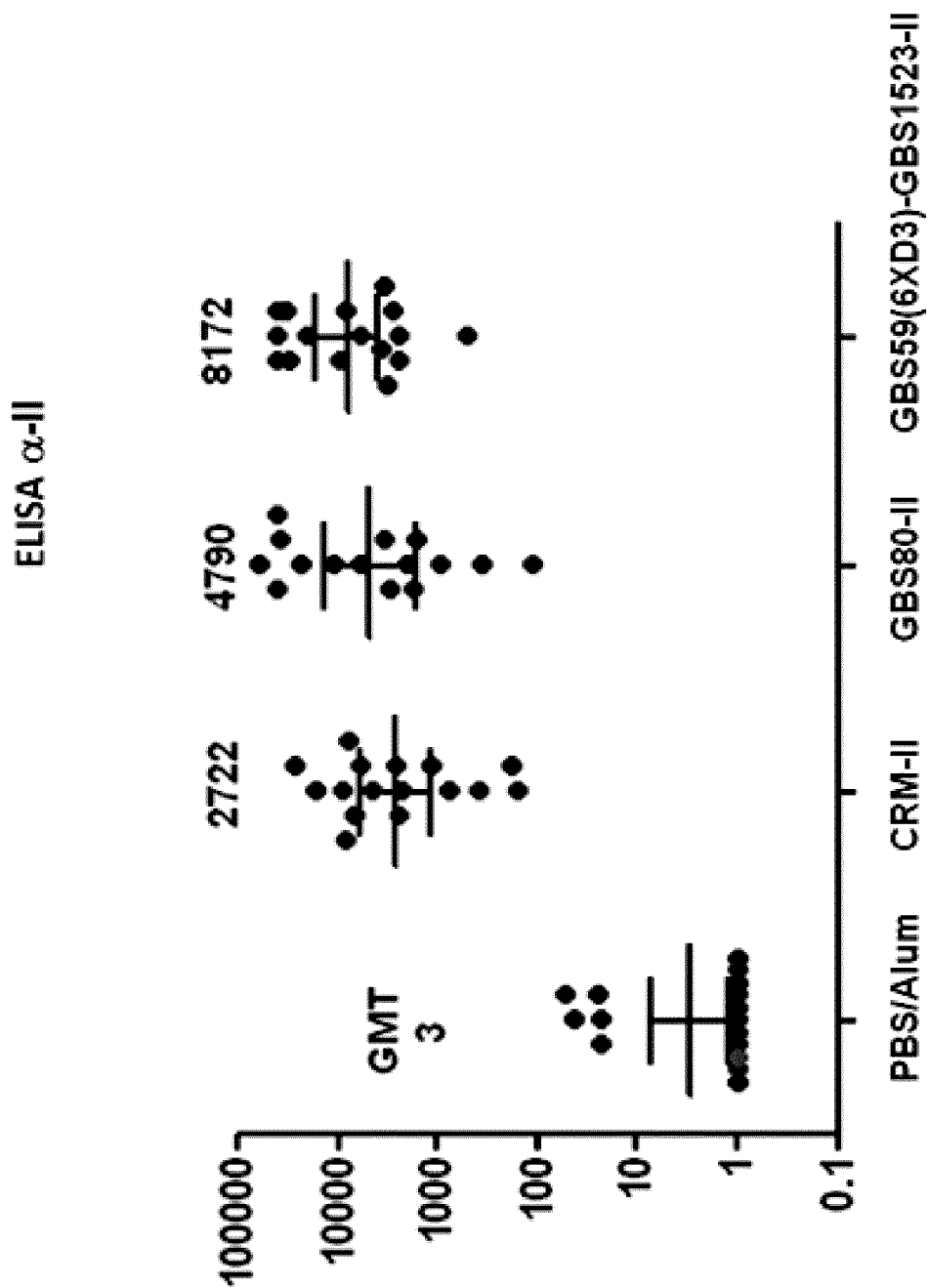


图 3

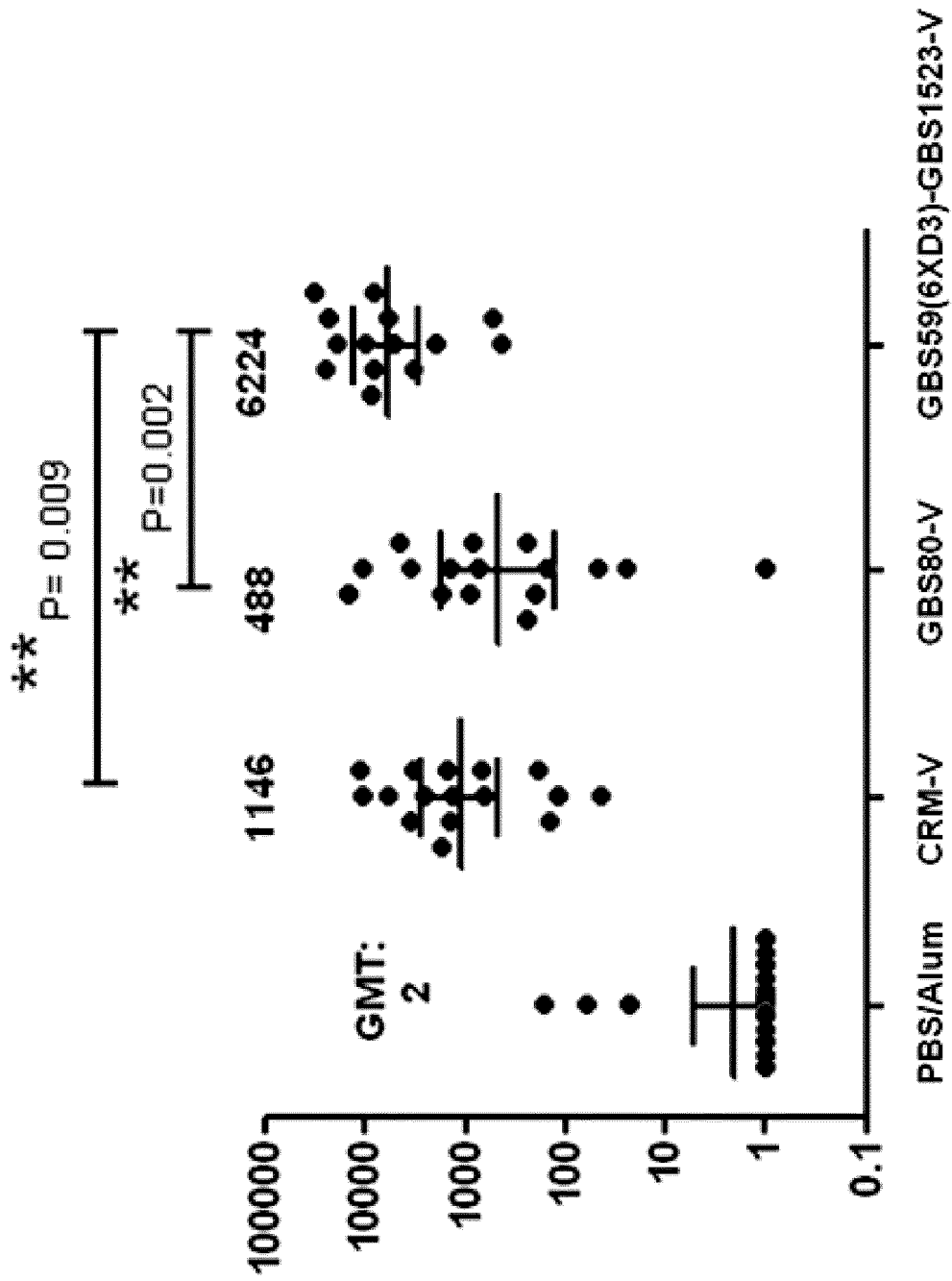


图 4

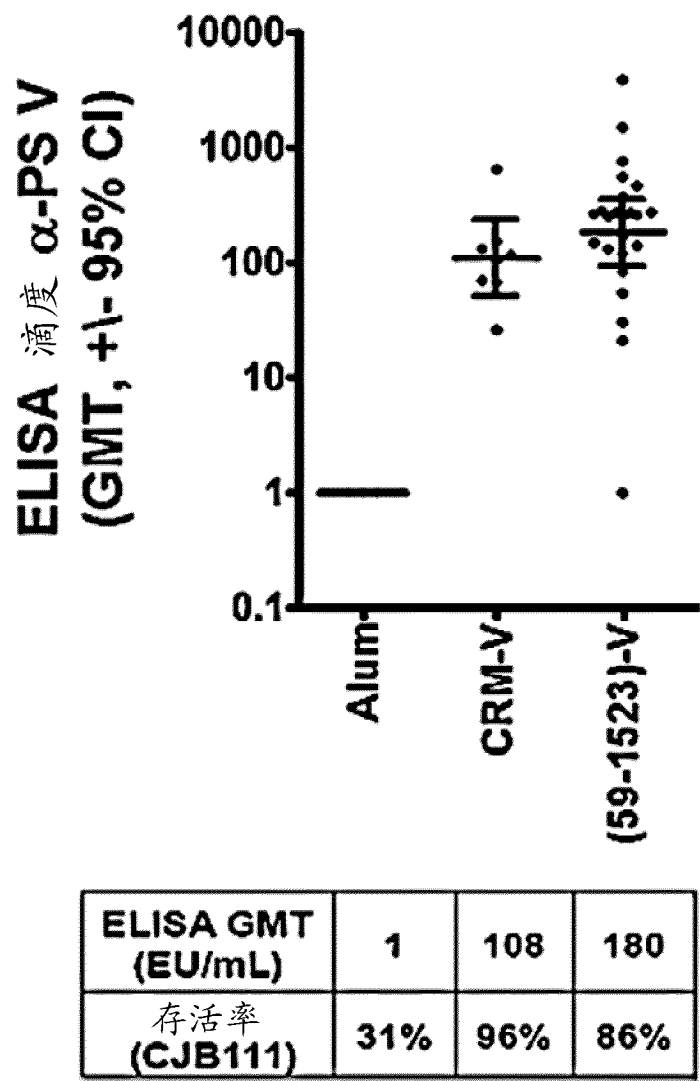


图 5

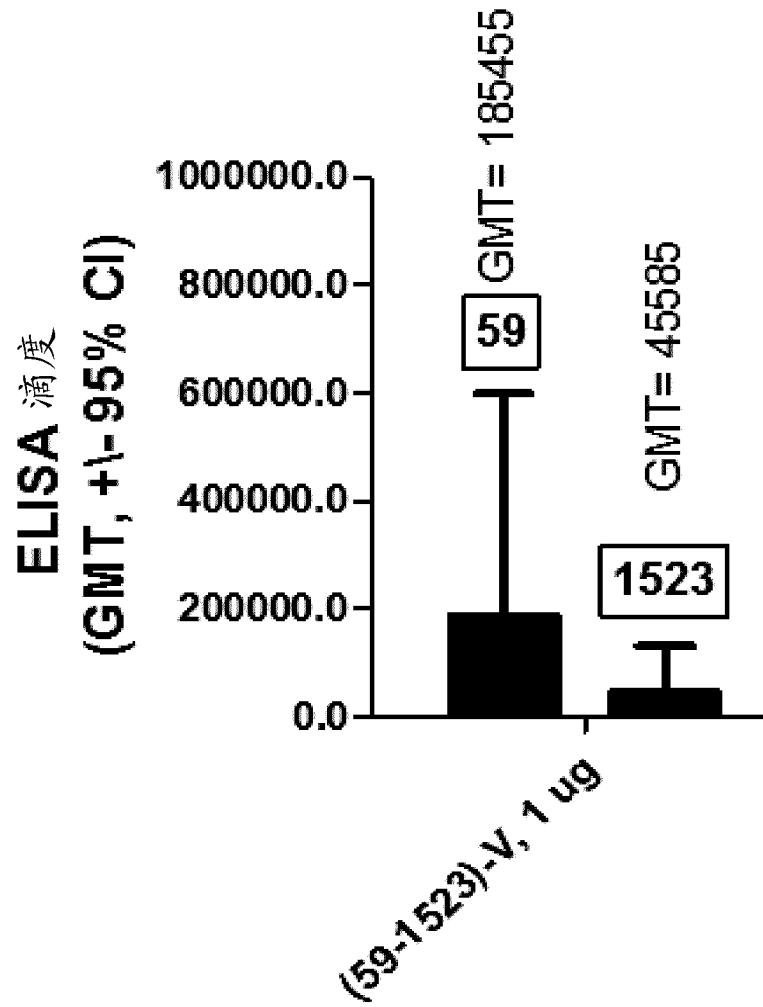


图 6

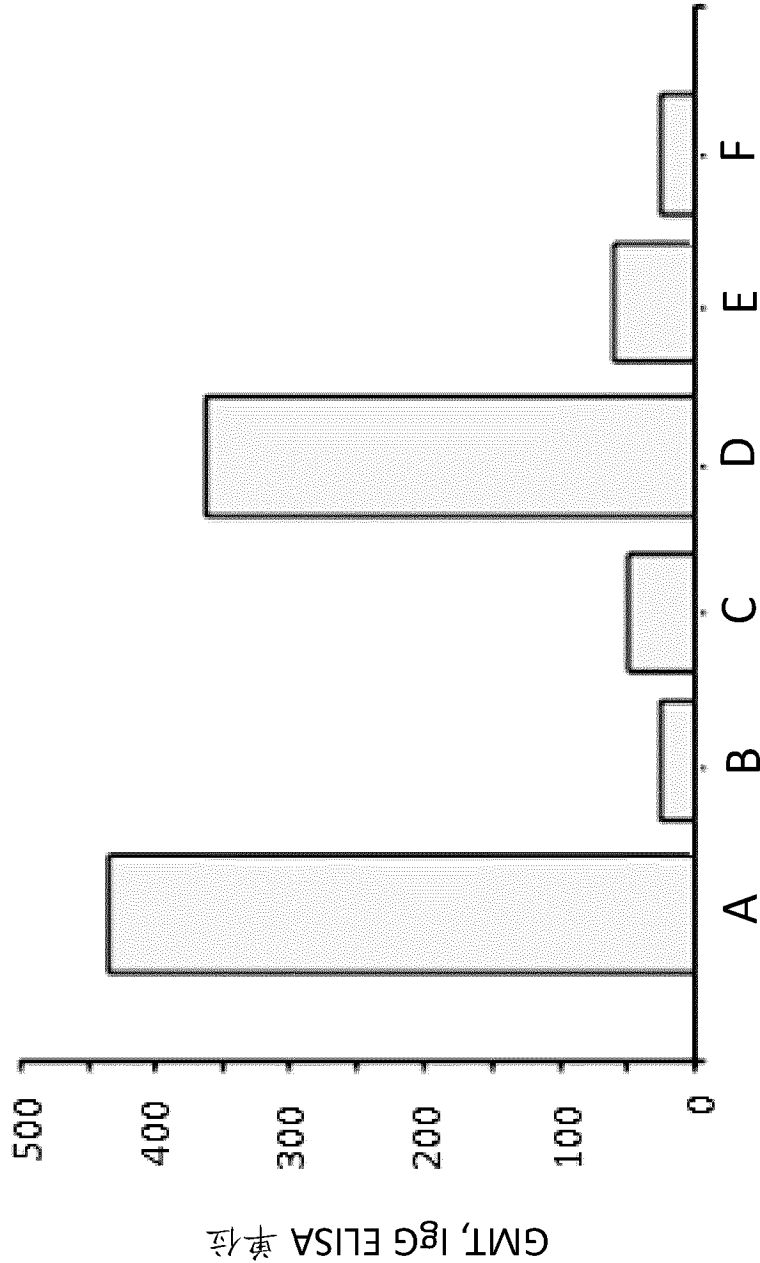


图 7

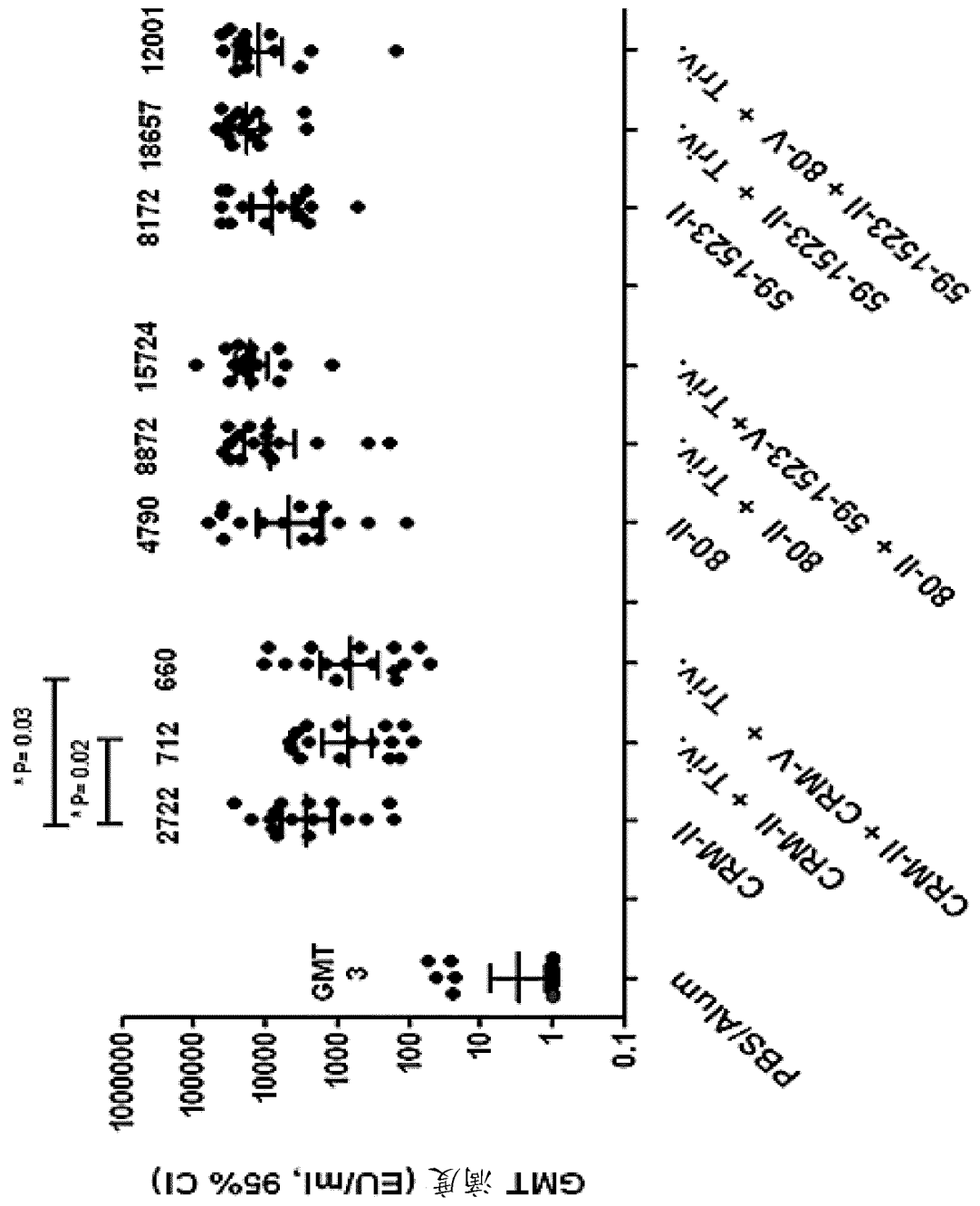


图 8

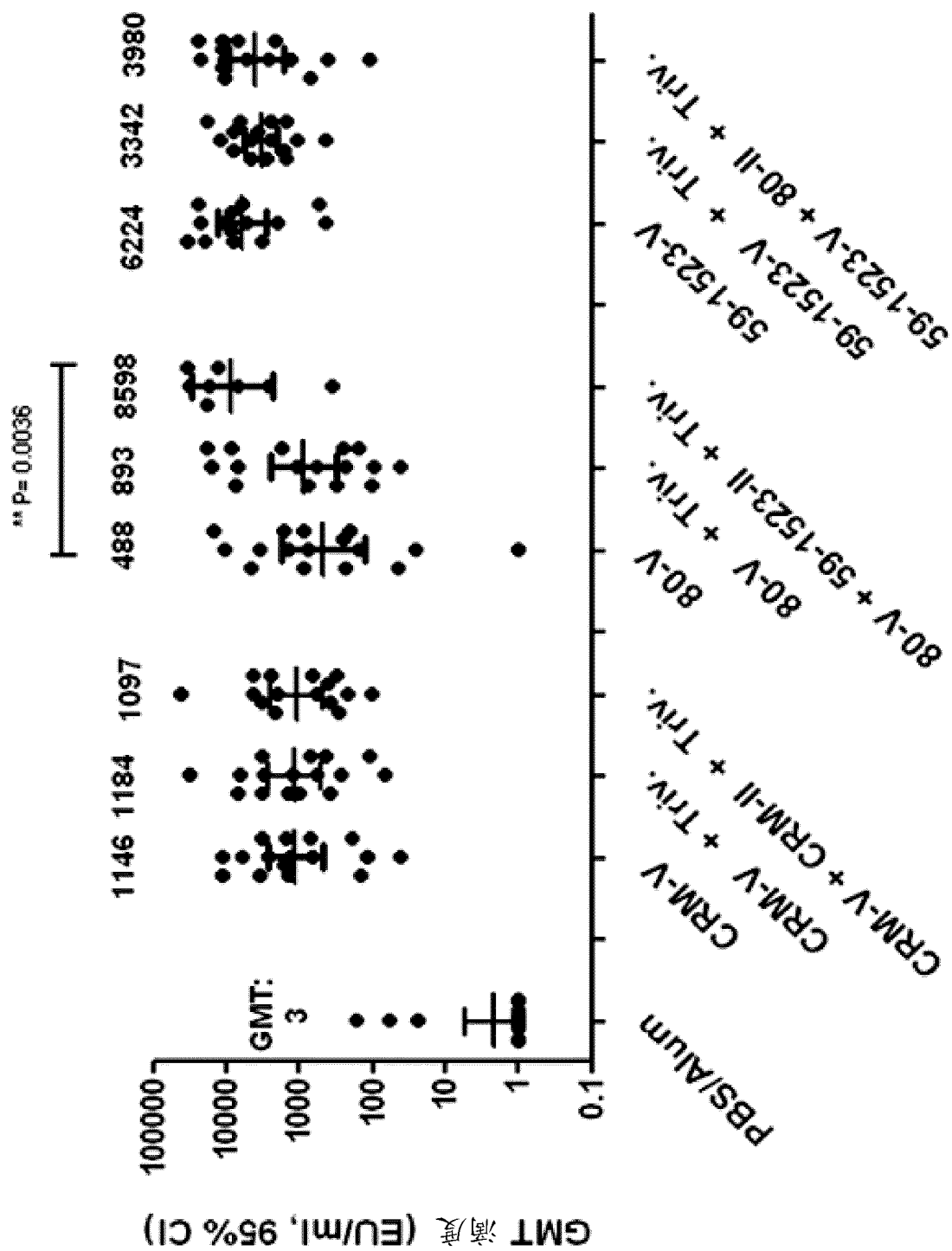


图 9

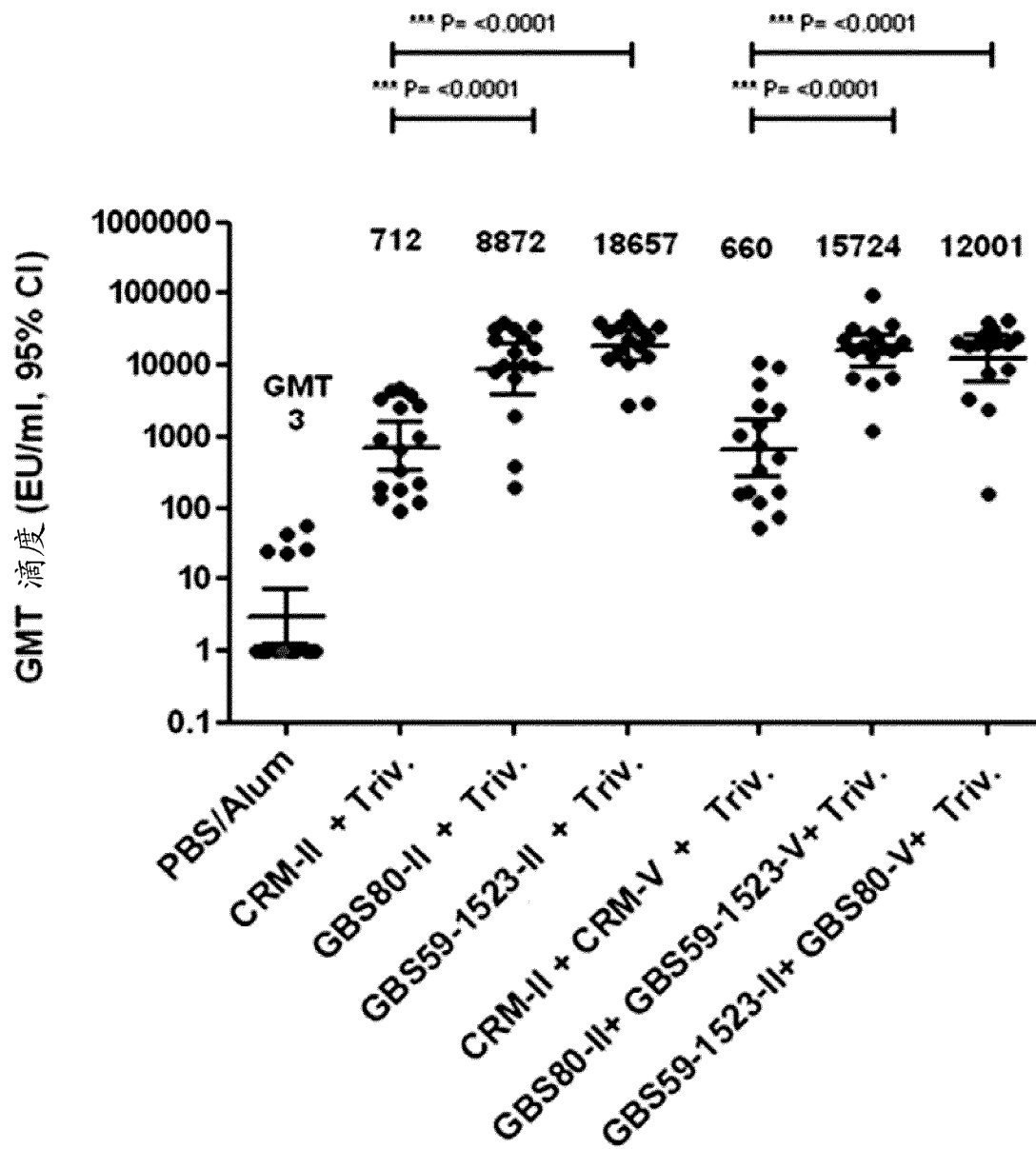


图 10

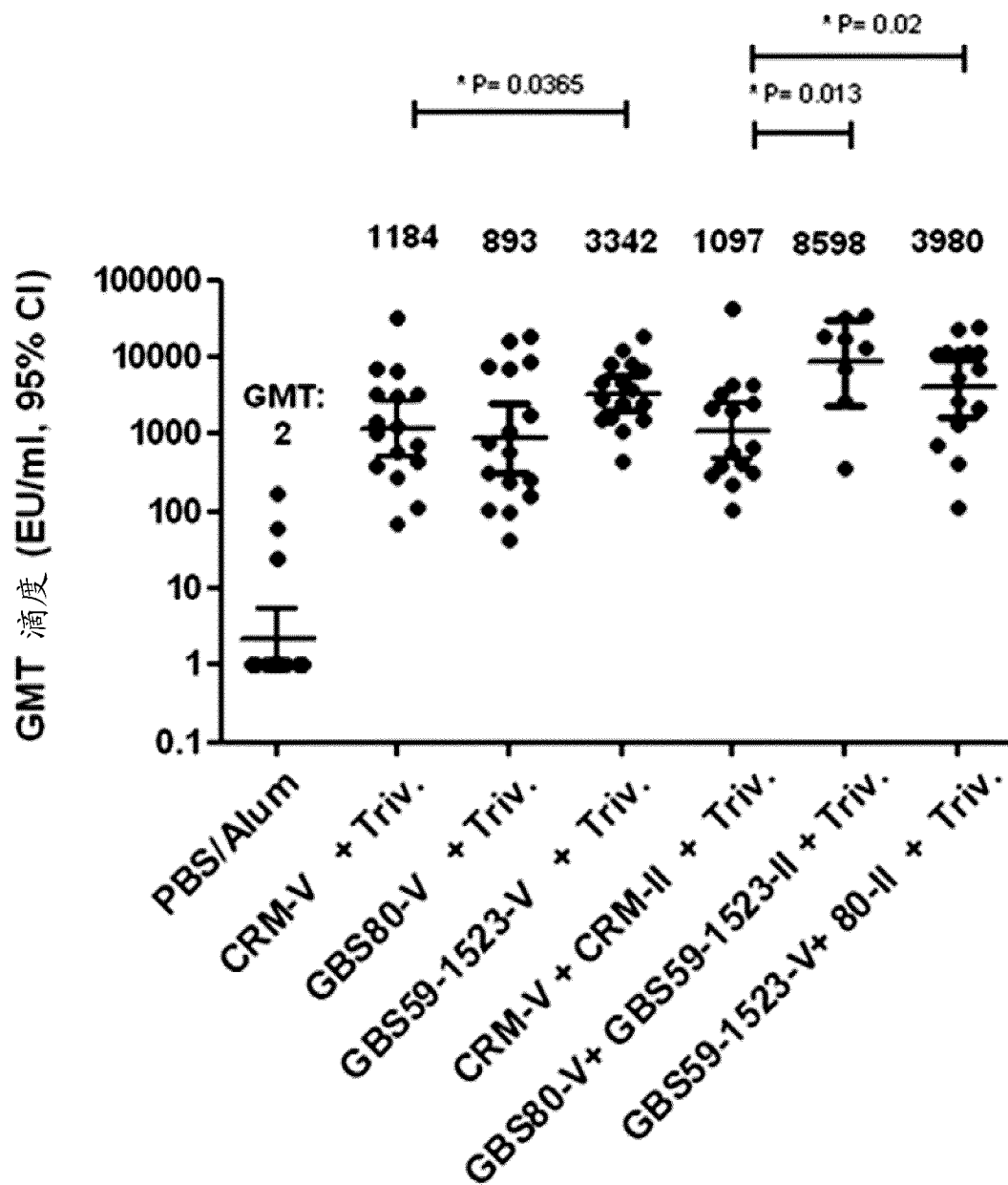


图 11

图 12

多糖	重复单元
流感嗜血杆菌b型 ("PRP")	$\rightarrow 3)\beta\text{-D-Ribf}-(1\rightarrow 1)\text{-D-Ribitol}(5\rightarrow \text{OPO}_3\rightarrow$
脑膜炎奈瑟氏菌	
A群	$\rightarrow 6)\alpha\text{-D-ManpNAc}(3\text{OAc})-(1\rightarrow \text{OPO}_3\rightarrow$
C群	$\rightarrow 9)\alpha\text{-D-Neu5Ac}(7/8\text{OAc})-(2\rightarrow$
W135群	$\rightarrow 6)\alpha\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Neu5Ac}(9\text{OAc})-(2\rightarrow$
Y群	$\rightarrow 6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Neu5Ac}(9\text{OAc})-(2\rightarrow$
肠道沙门氏菌 Typhi Vi	$\rightarrow \alpha\text{-D-GalpNAcA}(3\text{OAc})-(1\rightarrow$
肺炎链球菌	
1 型	$\rightarrow 3)\text{-D-AAT-}\alpha\text{-Galp}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-GalpA}(2/3\text{OAc})-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow$
2 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)[\alpha\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 2)]\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 3)\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$
3 型	$\rightarrow 3)\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow 4)\text{-3-D-Glcp}-(1\rightarrow$
4 型	$\rightarrow 3)\beta\text{-D-ManpNAc}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-L-FucpNAc}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-D-GalpNAc}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Galp2,3(S)Py}-(1\rightarrow$
5 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-PnepNAc}-(1\rightarrow 2)\beta\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 3)]\alpha\text{-L-FucpNAc}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-Sugp}-(1\rightarrow$
6B 型	$\rightarrow 2)\alpha\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 4)\text{-D-Rib-ol}-(5\rightarrow \text{P}\rightarrow$
9N 型	$\rightarrow 4)\alpha\text{-D-GlcpA}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-ManpNAc}-(1\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow$
14 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)[\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)]\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow$
18C 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)[\alpha\text{-D-Glcp}(6\text{OAc})-(1\rightarrow 2)][\text{Gro}-(1\rightarrow \text{P}\rightarrow 3)]\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$
19A 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-ManpNAc}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow \text{P}\rightarrow$
19F 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-ManpNAc}-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 2)\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow \text{P}\rightarrow$
23F 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 2)][\text{Gro}-(2\rightarrow \text{P}\rightarrow 3)]\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 4)\beta\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$
金黄色葡萄球菌	
5 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-ManNAcA}(3\text{OAc})-(1\rightarrow 4)\alpha\text{-L-FucNAc}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-FucNAc}-(1\rightarrow$
8 型	$\rightarrow 4)\beta\text{-D-ManNAcA}(4\text{OAc})-(1\rightarrow 3)\alpha\text{-L-FucNAc}-(1\rightarrow 3)\beta\text{-D-FucNAc}-(1\rightarrow$

AAT是2-乙酰氨基-4-氨基-2, 4, 5-三脱氧基半乳糖, Gro是甘油, Pnc是2-乙酰氨基-2, 6-2, 6-二脱氧基塔罗糖, 且P是磷酸二酯键中的磷酸酯

图 13

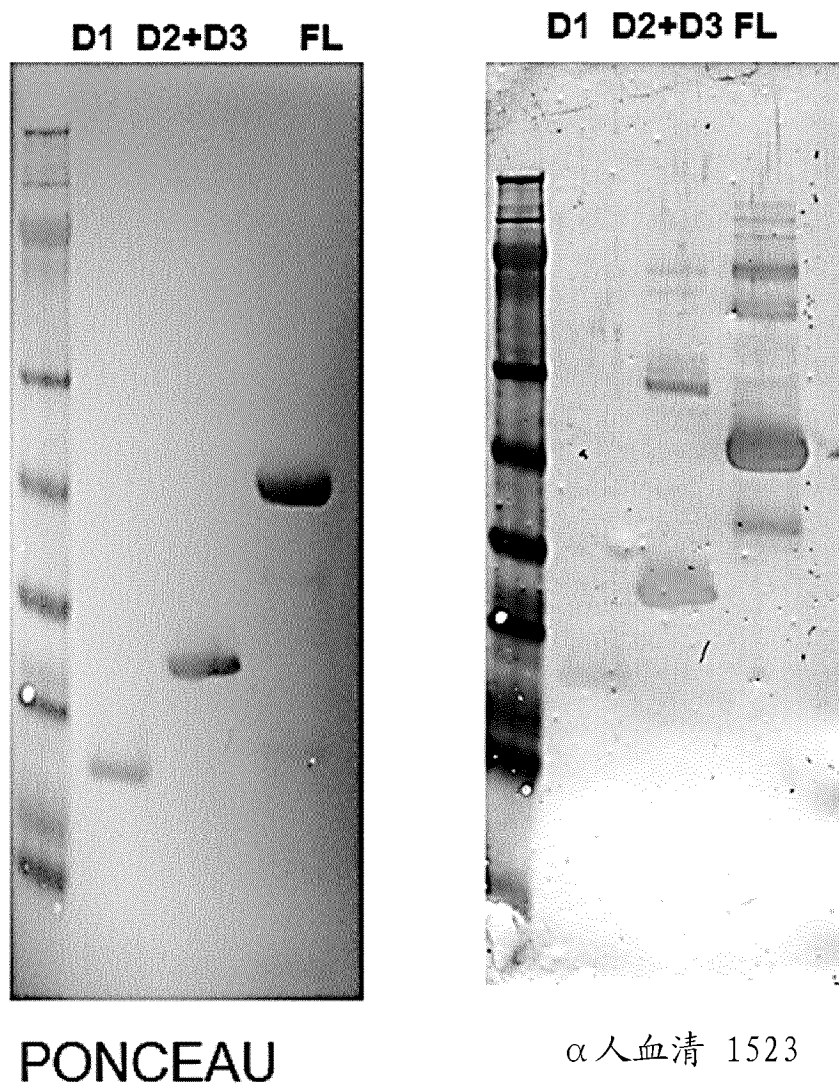


图 14