



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113395977 A

(43) 申请公布日 2021.09.14

(21) 申请号 201980090686.9

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2019.11.29

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

18306621.6 2018.12.05 EP

(51) Int.CI.

A61K 38/17 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/00 (2006.01)

2021.07.28

A61K 39/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/08 (2006.01)

PCT/US2019/063840 2019.11.29

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/117618 EN 2020.06.11

(71) 申请人 圣诺菲·帕斯图尔公司

权利要求书2页 说明书29页

地址 美国宾夕法尼亚州

序列表1页 附图33页

(72) 发明人 N·伯丁 M·欧克斯 M·加里诺

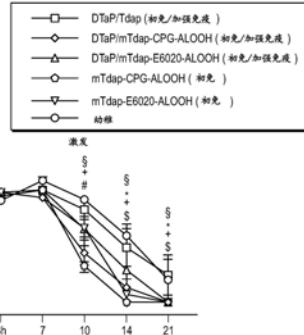
M·夏博-里乌 N·里韦诺  
刘元庆 N·米斯特雷塔

(54) 发明名称

百日咳加强疫苗

(57) 摘要

本公开文本涉及一种包含TLR激动剂的经修饰的无细胞百日咳加强疫苗及其用于诱导免疫反应的方法。



注射小鼠的数量	AUC*					
	时间点	3H	D7	D10	D14	D21
DTaP/Tdap (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	104.36
DTaP/mTdap-CPG-ALOOH (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	77.19
mTdap-CPG-ALOOH (初免)	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	72.31
DTaP/mTdap-E6020-ALOOH (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	89.59
mTdap-E6020-ALOOH (初免)	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	80.52
纯维	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	111.75

1. 一种无细胞百日咳 (aP) 加强疫苗, 其包含破伤风类毒素、白喉类毒素、脱毒百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素、2型和3型纤毛、至少一种toll样受体 (TLR) 激动剂和铝盐, 其中将所述至少一种TLR激动剂用所述铝盐进行配制。
2. 根据权利要求1所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR激动剂是TLR4激动剂和/或TLR9激动剂。
3. 根据权利要求2所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR4激动剂包括E6020。
4. 根据权利要求2所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR9激动剂包括CpG1018。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述破伤风类毒素以8-12Lf/mL、任选9-11Lf/mL或10Lf/mL的量存在。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述白喉类毒素以3-8Lf/mL、任选3-6Lf/mL或4-5Lf/mL的量存在。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述脱毒百日咳毒素是经遗传脱毒的百日咳毒素, 并且以16-24μg/mL、任选18-22μg/mL或20μg/mL的量存在。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述丝状血凝素以5-15μg/mL、任选8-12μg/mL或10μg/mL的量存在。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述百日咳杆菌粘附素以5-15μg/mL、任选8-12μg/mL或10μg/mL的量存在。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述2型和3型纤毛以10-20μg/mL、任选14-16μg/mL或15μg/mL的量存在。
11. 根据权利要求2-10中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR4激动剂以不超过10μg/mL、任选0.5-5μg/mL、或不超过2μg/mL的量存在。
12. 根据权利要求2-10中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR9激动剂以250-750μg/mL、任选400-600μg/mL或500μg/mL的量存在。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的aP加强疫苗, 其还包含tris缓冲盐水。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的aP加强疫苗, 其铝浓度为0.5-0.75mg/mL、任选0.66mg/mL。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述破伤风类毒素、所述白喉类毒素和所述经遗传脱毒的百日咳毒素中的至少一种被吸附到所述铝盐上。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述铝盐是氢氧化铝或磷酸铝。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的aP加强疫苗, 其中所述破伤风类毒素以9-11Lf/mL、任选8-12Lf/mL的量存在, 所述白喉类毒素以3-8Lf/mL、任选3-5Lf/mL的量存在, 所述脱毒百日咳毒素是经遗传脱毒的百日咳毒素并且以16-24μg/mL、任选18-22μg/mL的量存在, 所述丝状血凝素以5-15μg/mL、任选8-12μg/mL的量存在, 所述百日咳杆菌粘附素以5-15μg/mL、任选8-12μg/mL的量存在, 所述2型和3型纤毛以10-20μg/mL、任选14-16μg/mL的量存在, 所述铝盐是氢氧化铝并且以0.25-0.75mg/mL、任选0.6-0.7mg/mL的浓度存在, 并且其中所述TLR激动剂是TLR4激动剂和/或TLR9激动剂。
18. 根据权利要求17所述的aP加强疫苗, 其中所述TLR4激动剂包括E6020并且以不超过2μg/mL的量存在, 或者其中所述TLR9激动剂包括CpG1018并且以400-600μg/mL的量存在。

19. 根据权利要求18所述的aP加强疫苗,其中所述破伤风类毒素以10Lf/mL的量存在,所述白喉类毒素以4-5Lf/mL的量存在,所述脱毒百日咳毒素是经遗传脱毒的百日咳毒素并且以20 $\mu$ g/mL的量存在,所述丝状血凝素以10 $\mu$ g/mL的量存在,所述百日咳杆菌粘附素以10 $\mu$ g/mL的量存在,所述2型和3型纤毛以15 $\mu$ g/mL的量存在,所述铝盐是氢氧化铝并且以0.66mg/mL的浓度存在,并且其中所述TLR激动剂是TLR4激动剂和/或TLR9激动剂。

20. 根据权利要求19所述的aP加强疫苗,其中所述TLR4激动剂包括E6020并且以0.5-5 $\mu$ g/mL的量存在,或者其中所述TLR9激动剂包括CpG1018并且以500 $\mu$ g/mL的量存在。

21. 根据权利要求20所述的aP加强疫苗,其中所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的0.5mL单位剂量形式,并且其中所述破伤风类毒素以5Lf的量存在,所述白喉类毒素以2-2.5Lf的量存在,所述经遗传脱毒的百日咳毒素以10 $\mu$ g的量存在,所述丝状血凝素以5 $\mu$ g的量存在,所述百日咳杆菌粘附素以5 $\mu$ g的量存在,所述2型和3型纤毛以7.5 $\mu$ g/mL的量存在,所述氢氧化铝以0.33mg的浓度存在,并且E6020以0.25-2.5 $\mu$ g的量存在或者CpG1018以250 $\mu$ g的量存在。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的aP加强疫苗,其中所述脱毒百日咳毒素是经遗传脱毒的百日咳毒素,并且包含R9K突变和E129G突变。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的aP加强疫苗,其还包含b型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)糖缀合物、乙型肝炎病毒表面抗原和/或灭活脊髓灰质炎病毒。

24. 一种在先前已暴露于百日咳鲍特菌(*B. pertussis*)抗原的人类受试者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述人类受试者施用根据权利要求1-23中任一项所述的aP加强疫苗,其中所述先前暴露于百日咳鲍特菌抗原在所述人类受试者中诱导Th2偏倚免疫反应,并且其中所述aP加强疫苗在所述人类受试者中将所述Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚或Th1/Th17偏倚免疫反应。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中在施用所述aP加强疫苗前,所述人类受试者已接受过无细胞百日咳(aP)初免疫苗,并且其中所述aP初免疫苗在所述人类受试者中诱导Th2偏倚免疫反应。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中当施用所述aP加强疫苗时,所述人类受试者为4岁或以上。

27. 根据权利要求24或25所述的方法,其中当施用所述aP加强疫苗时,所述人类受试者为10岁或以上。

28. 根据权利要求24-27中任一项所述的方法,其中与由所述aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应相比,所述Th1偏倚免疫反应的特征在于以下中的一种或多种:IL-5产生减少或IgG1/IgG2a比率降低,并且与由所述aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应相比,所述Th1/Th17偏倚反应的特征在于IL-17产生增加以及以下中的一种或多种:IL-5产生减少或IgG1/IgG2a比率降低。

29. 根据权利要求24-28中任一项所述的方法,其中所述aP初免疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素以及2型和3型纤毛,条件是所述aP初免疫苗不含有TLR激动剂。

## 百日咳加强疫苗

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2018年12月5日提交的欧洲专利申请号18306621.6的权益并依赖于其申请日期,将其全部内容通过引用并入本文。

### 序列表

[0002] 本申请含有已以ASCII格式电子提交并通过引用以其整体特此并入的序列表。在2019年11月27日创建的所述ASCII副本被命名为0171\_0016-PCT\_SL,并且大小为1千字节。

### 技术领域

[0003] 本公开文本涉及无细胞百日咳疫苗及其使用方法。

### 背景技术

[0004] 百日咳 (pertussis或whooping cough) 是一种主要由百日咳鲍特菌 (*Bordetella pertussis*) 引起的急性且具高度传染性的呼吸系统疾病。在广泛实施免疫计划之前,百日咳是高度地方性的。有证据表明,几乎所有儿童在他们成年之前就感染了百日咳鲍特菌,他们中的大多数患有某种程度的临床疾病,并且这种细菌的高循环率提供了对感染获得的免疫的天然加强,估计这从7-10年持续至20年 (Wendelboe等, *Pediatr Infect Dis J*, 2005; 24:S58-S61)。

[0005] 疫苗接种一直是减少百日咳病例数的最有效策略 (Halperin, *N Engl J Med*. 2005; 353:1615-7)。最初的百日咳疫苗包含杀死的百日咳鲍特菌全细胞 (wP),所述细胞被化学脱毒并与白喉和破伤风抗原一起配制。自20世纪90年代以来,wP疫苗在许多国家已被无细胞百日咳疫苗取代。与wP疫苗相比,无细胞百日咳 (aP) 疫苗诱导相对较少的副作用,所述副作用与高发热风险、注射部位的反应原性以及较小程度的抽搐相关。当前的无细胞疫苗通常基于以下毒力因子:百日咳毒素 (PT)、丝状血凝素 (FHA)、百日咳杆菌粘附素 (PRN)、纤毛凝集原2和纤毛凝集原3 (FIM2/3或FIM)。虽然一些无细胞疫苗仅含有PT和FHA或单独的PT,但通常认为含有PT、FHA、PRN和FIM2/3组分的无细胞百日咳疫苗是当前可用的最有效的aP疫苗。

[0006] 尽管进行了数十年的疫苗接种,但百日咳仍然是世界范围内的一种地方病,每2至5年(通常为3或4年)发生局部特定的流行高峰或爆发,而没有一致的季节性模式 (Edwards等, *Whooping Cough Vaccine. Vaccines* 第6版. 由Plotkin S, Orenstein W, Offit P. 编辑第6版. Philadelphia, Elsevier, 2012:447-92; JD Cherry, *Pediatrics* 2005; 115:1422-27)。尽管各国之间报告的发病率有很大差异,但在每个国家中,目前在<1岁、主要是3月龄之前的婴儿中报告的百日咳病例、住院和并发症的年龄特异性发病率最高。年龄太小而无法完成其初次疫苗系列的婴儿占百日咳相关并发症、住院和死亡的大多数 (Bisgard等, *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23:985-89; Haberling等, *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28 (3):194-98; Public Health England, *Health Protection Report*. 2014; 8 (17); Centers for Disease Control and Prevention, *MMWR* 2012; 61 (28): 517-22; Winter等, *J*

Pediatr. 2012;161:1091-96)。在最近的流行病学观察中,在诸如美国或英国等具有完善疫苗接种计划的国家,青少年和成年人往往表现出第二高的疾病发病率和最高的发病率增加。

[0007] 积累的证据表明,观察到的死灰复燃和爆发可能是多种因素的组合效应的结果,所述因素包括意识(Kaczmarek等,MJA 2013;198:624-8)、实验室确认方法的敏感性增加(Tarr等,Am J Epidemiol. 2013;178 (2) :309-18)、计划不完整或疫苗覆盖率次优(Atwell等,Pediatrics 2013;132:624-30;Quinn等,Pediatrics 2014;133 (3) :e513-9;Glanz等,JAMA Pediatr. 2013;167 (11) :1060-64;Imdad等,Pediatrics 2013;132:37-43)、疫苗诱导免疫的性质减弱和变化以及生物体的基因型和表型变化(Lam等,Australia Emerg Infect Dis. 2014;20:626-33;Pawloski等,Clin Vaccine Immunol. 2014;21 (2) :119-25;Martin等,Clin Infect Dis. 2014;60 (2) :223-27)。

[0008] 为了降低儿童百日咳的发病率,许多国家已实施了4-6岁左右的aP加强疫苗接种(Zepp等,Lancet Infect Dis,2011;11 (7) :557-70;Clark等,NASN Sch Nurse,2012;27 (6) :297-300)。已在几种情况下评价了含百日咳的无细胞疫苗(Tdap)的加强剂量的功效。在美国于1997年与1999年之间进行的一项随机临床试验评价了Tdap疫苗在15至65岁的青少年和成年人中的功效。这项研究发现,在1年的观察期内,Tdap疫苗接种与临床疾病(即,咳嗽超过21天)的发病率降低以及抗百日咳抗体水平的升高相关,针对实验室确认的百日咳的疫苗功效估计为92%(Ward等,Clin Infect Dis 2006;43:151-57)。在美国和澳大利亚的非爆发情况下的几项观察性研究中也显示出了Tdap疫苗接种在百日咳控制中的有效性,这证明青少年Tdap疫苗接种对疾病发病率有显著影响;一项研究估计针对实验室确认的百日咳的有效性为85.4%(Skoff等,Arch Pediatr Adolesc Med. 2012;166 (4) :344-49;Rank等,Pediatr Infect Dis J. 2009;28 (2) :152-53;Quinn等,Bull World Health Organ 2011;89:666-674)。然而,最近在美国爆发情况下于主要用无细胞疫苗初免的群组中进行的几项病例对照研究一致地估计Tdap疫苗接种针对实验室确认的百日咳有中等有效性,为约65%或更低(Acosta等,Washington State,2012.IDWeek 2013 Meeting of the Infectious Diseases Society of America.Poster 139;Wei等,Clinical Infectious Diseases 2010;51 (3) :315-21;Baxter等,BMJ. 2013;347:f4249;Liko等,N Engl J Med. 2013年2月7日;368 (6) :581-82;Klein等,Pediatrics. 2016;137 (3) :e20153326)。尽管在大多数这些观察性研究中存在固有的方法学局限性,但在威斯康星州研究中观察到的Tdap加强剂量后全品牌有效性迅速减弱的证据与在华盛顿州爆发情况下进行的研究的观察结果一致,它们估计Tdap疫苗接种的有效性从加强剂量后第一年的75%迅速减弱至从第二年起的42%(Koepke等,J Infect Dis. 2014;210 (6) :942-53;Acosta等, IDWeek 2013 Meeting of the Infectious Diseases Society of America.Poster 139)。近年来,美国和加拿大百日咳病例的流行病学趋势和分布已被解释为确证了以下概念,即与先前用wP疫苗初免的群组相比,aP疫苗初免的个体对百日咳加强疫苗的反应更不稳健,并且其保护减弱的速度更快(A. Acosta, Advisory Committee on Immunization Practices. Summary Report 2013年6月19-20日;Chambers等,CCDR. 2014;40 (3) :31-41)。另外,分析在美国2010年和2012年的爆发和在澳大利亚2008年-2012年的爆发中获得的数据的几项研究表明,与wP疫苗初免的个体相比,由加强疫苗引起的保护减弱的速度在aP疫

苗初免的个体中更快 (Liko等, *N Engl J Med.* 2013年2月7日; 368 (6) : 581-82; Smallridge等, *Infect Dis.* 2014; 209 (12) : 1981-88; Witt等, *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (12) : 1730-35; Klein等, *N Engl J Med.* 2012; 367 (11) : 1012-19; Tartof等, *Pediatrics.* 2013; 131 (4) : e1047-52; Sheridan等, *JAMA.* 2012; 308 (5) : 454-56; Witt等, *Clin Infect Dis.* 2013; 5月; 56 (9) : 1248-54; Klein等, *Pediatrics.* 2013; 131 (6) : e1716-22)。尽管这些研究的结果受到了一些专家在方法学基础上的挑战,但它们的结论得到了美国CDC报告的生态学观察结果的支持,显示与先前在wP初免的群组中的观察结果相比,保护的减弱在aP初免的群组中发生地更早 (A. Acosta, *Advisory Committee on Immunization Practices. Summary Report* 2013年6月19-20日)。实际上,在涉及aP或wP疫苗初免的青少年的临床研究中获得的免疫原性结果的比较提供了与在Tdap疫苗施用后一个月体液和细胞 (B和Th1) 免疫反应较低一致的证据 (Marshall等, *Clinical and Vaccine Immunology.* 2014; 21 (11) : 1560-64; Sanofi Pasteur Clinical Trial Td516, *Final Clinical Statistical Report*, 1.0版日期为2010年6月11日; Sanofi Pasteur Clinical Trial Td551, *Final Clinical Study Report*, 1.0版日期为2013年7月16日; van der Lee等, *Front Immunol.* 2018; 9: 51)。

[0009] 虽然基于瑞典百日咳监测数据的建模研究表明,在aP疫苗背景下百日咳流行病学中存在羊群效应,但使用来自美国、意大利和其他国家的监测数据的几项其他研究已发现,最适合观察到的流行病学趋势的模型往往是假设aP疫苗比wP疫苗引起更低的加强反应、更快的保护减弱和更高的无症状传播的模型 (Althouse等, *BMC Med.* 2015; 13 (1) : 146-57; Domenech等, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111 (7) : E716-7; Magpantay等, *Parasitology* 2016; 143: 835-49)。

[0010] 根据Warfel等在非人灵长类动物中进行的一项研究,已提出了可能不同的wP和aP疫苗保护机制 (Warfel等, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 787-92)。尽管这项研究不是在人中进行的,并且是在无统计学意义的样本中进行的,但它发现aP疫苗预防临床疾病,但是不能像wP疫苗那样迅速清除定植,并且允许传播给易感动物(同上)。使用小鼠百日咳模型的研究也得出了类似的结论 (Smallridge等, *J Infect Dis.* 2014; 209 (12) : 1981-88)。特别地,在非人灵长类动物中进行的研究指出,与aP初免相比,wP疫苗接种后的免疫学概况有所不同。具体地, Th1或混合Th1/Th17反应谱与wP疫苗初免相关,而Th2谱与aP疫苗初免相关。因此,据推测,在wP疫苗接种之后观察到的免疫反应的Th1/Th17偏倚可能与和在aP疫苗接种之后观察到的Th2偏倚的情况下相比更长的保护持续时间和更快的感染清除(即,更强的初始保护)相关。此外,已观察到,在aP加强疫苗接种后,甚至在最初的初次疫苗接种之后数年,分别通过wP和aP的初次疫苗接种诱导的初始Th1/Th17与Th2反应得以维持,表明初免疫苗接种影响aP加强疫苗接种后的Th1/Th17与Th2偏倚 (Bancroft等, *Cell Immunol.* 2016, 304-305: 35-43)。Th1/Th17效应细胞在针对百日咳鲍特菌的免疫中的关键作用已在鼠感染模型中得到证实,从而进一步支持了这一假设 (Ross等, *PLoS Pathog.* 2013; 9 (4) : e1003264)。虽然支持这一假设的人证据尚未开发,但一些研究表明,接受wP疫苗与aP疫苗的人的T辅助细胞反应存在差异 (Fedele G.等, *Pathog Dis.* 2015; 73 (7) : doi:10.1093/femspd/ftv051)。另外,对aP疫苗的Th2主导反应似乎也与不同的IgG同种型分布相对应。对aP疫苗接种的反应主要产生IgG1,但也产生IgG2和IgG4,并且在加强疫苗接种之后IgG4的比例增加。相比之下,wP疫苗的Th1主导反应主要伴随着IgG1和IgG2抗体反应 (Brummelman

等,Pathog Dis.2015;73 (8) ;Diavatopoulos等,Cold Spring Harb Perspect Biol.2017年3月13日;van der Lee等,Vaccine 2018;36 (2) :220-26)。

[0011] 提供针对百日咳鲍特菌感染具有更持久保护的改进的加强aP疫苗将是有益的。

## 发明内容

[0012] 诸位发明人已开发出包含toll样受体(TLR)激动剂的新的经修饰的无细胞百日咳(aP)加强疫苗。更具体地,诸位发明人令人惊讶地发现,施用具有TLR4和/或TLR9激动剂的aP加强疫苗可以将由先前施用的aP疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚免疫反应。不旨在受任何理论的束缚,似乎由经修饰的aP加强疫苗诱导的T辅助细胞的再极化和Th1/Th2平衡的转变与百日咳鲍特菌的加速清除相关。

[0013] 本公开文本的第一方面涉及一种aP加强疫苗,其包含破伤风类毒素、白喉类毒素、脱毒百日咳毒素(通常为经遗传修饰的百日咳毒素)、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素、2型和3型纤毛、TLR激动剂和铝盐,其中至少将所述TLR激动剂用铝盐进行配制(方面1)。

[0014] 另一个方面涉及一种在先前已暴露于百日咳鲍特菌抗原的人类受试者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用aP加强疫苗,其中所述aP加强疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、脱毒百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素、2型和3型纤毛、至少一种TLR激动剂和铝盐,其中至少将所述TLR激动剂用铝盐进行配制,并且其中施用所述aP加强疫苗将所述人类受试者中的通过先前暴露于百日咳鲍特菌抗原诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚免疫反应或Th1/Th17偏倚免疫反应(方面2)。方面2还涵盖所述aP加强疫苗用于将通常经由aP初免疫苗而先前已暴露于百日咳鲍特菌抗原的人类受试者中的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚或Th1/Th17偏倚免疫反应的用途。

[0015] 通常,在方面2的上下文中,在施用所述aP加强疫苗前,所述人类受试者先前已接受过无细胞百日咳疫苗(在本文中也称为aP初免疫苗),所述aP初免疫苗诱导Th2偏倚免疫反应。可替代地,所述人类受试者可能已通过接受wP疫苗或通过百日咳鲍特菌的自然感染而暴露于百日咳鲍特菌抗原。通常,当已接受过aP初免疫苗的人类受试者接受不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如,ADACEL<sup>®</sup>)时,所述不含TLR激动剂的aP加强疫苗加强由所述aP初免疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应。相比之下,本文所述的含TLR激动剂的经修饰的aP加强疫苗出乎意料地将由所述aP初免疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚免疫反应或Th1/Th17偏倚免疫反应。

[0016] 在方面2的某些实施方案中,与由所述aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如,ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比,所述Th1偏倚免疫反应的特征在于以下中的一种或多种:IL-5产生减少、IFN- $\gamma$ 产生增加或IgG1/IgG2a比率降低。在方面2的某些实施方案中,与由所述aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如,ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比,所述Th1偏倚免疫反应的特征在于IL-5产生减少和/或IgG1/IgG2a比率降低。在方面2的某些实施方案中,Th1/Th17偏倚反应的特征在于IL-17产生增加以及以下中的一种或多种:IL-5产生减少或IgG1/IgG2a比率降低。在方面2的某些实施方案中,与由所述aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如,ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比,Th1/Th17偏倚反应的特征在于IL-17产生增加以及以下中的一种或多种:IL-5产生减少

或IgG1/IgG2a比率降低。

[0017] 在方面1和2的某些实施方案中,所述TLR激动剂是TLR4激动剂。优选地,所述TLR4激动剂是人TLR4的激动剂。在某些实施方案中,所述TLR4激动剂是E6020。

[0018] 在方面1和2的其他实施方案中,所述TLR激动剂是TLR9激动剂。优选地,所述TLR9激动剂是人TLR9的激动剂。在某些实施方案中,所述TLR9激动剂是CpG寡核苷酸。在某些实施方案中,所述CpG寡核苷酸是A类、B类、C类或P类CpG寡核苷酸。在某些实施方案中,所述CpG寡核苷酸是具有SEQ ID NO:1的核苷酸序列的CpG1018,其中SEQ ID NO:1中的所有核苷酸都用硫代磷酸酯键连接。

[0019] 在方面1和2的某些实施方案中,所述破伤风类毒素以8-12Lf/mL、任选9-11Lf/mL或任选10Lf/mL的量存在。

[0020] 在方面1和2的某些实施方案中,所述白喉类毒素以3-8Lf/mL、任选3-6Lf/mL或任选4-5Lf/mL的量存在。

[0021] 在方面1和2的某些实施方案中,所述脱毒百日咳毒素是经遗传脱毒的百日咳毒素(gdPT)。在某些实施方案中,所述gdPT包含R9处的突变。在某些实施方案中,所述gdPT包含R9K突变和E129G突变。在某些实施方案中,所述gdPT以4-30 $\mu$ g/mL、任选16-24 $\mu$ g/mL、任选18-22 $\mu$ g/mL或任选20 $\mu$ g/mL的量存在。

[0022] 在方面1和2的某些实施方案中,所述丝状血凝素以5-15 $\mu$ g/mL、任选8-12 $\mu$ g/mL或任选10 $\mu$ g/mL的量存在。

[0023] 在方面1和2的某些实施方案中,所述百日咳杆菌粘附素以5-15 $\mu$ g/mL、任选8-12 $\mu$ g/mL或任选10 $\mu$ g/mL的量存在。

[0024] 在方面1和2的某些实施方案中,所述2型和3型纤毛以10-20 $\mu$ g/mL、任选14-16 $\mu$ g/mL或任选15 $\mu$ g/mL的量存在。

[0025] 在方面1和2的某些实施方案中,所述TLR4激动剂(如E6020)以不超过10 $\mu$ g/mL、任选0.5-5 $\mu$ g/mL、或任选不超过2 $\mu$ g/mL的量存在。

[0026] 在方面1和2的某些实施方案中,所述TLR9激动剂(如CpG1018)以250-750 $\mu$ g/mL、任选400-600 $\mu$ g/mL或任选500 $\mu$ g/mL的量存在。

[0027] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗包含量为约8-12Lf/mL、任选9-11Lf/mL的破伤风类毒素;量为约3-8Lf/mL、任选3-6Lf/mL的白喉类毒素;量为约16-24 $\mu$ g/mL、任选18-22 $\mu$ g/mL的经遗传脱毒的百日咳毒素;量为约5-15 $\mu$ g/mL、任选8-12 $\mu$ g/mL的丝状血凝素;量为约5-15 $\mu$ g/mL、任选8-12 $\mu$ g/mL的百日咳杆菌粘附素;量从约10-20 $\mu$ g/mL、任选14-16 $\mu$ g/mL的2型和3型纤毛;量为约0.25-0.75mg/mL、任选0.6-0.7mg/mL的氢氧化铝(A100H);以及量不超过10 $\mu$ g/mL、任选0.5-5 $\mu$ g/mL或任选1-2 $\mu$ g/mL的TLR4激动剂,如E6020。可替代地,代替所述TLR4激动剂,所述aP加强疫苗可以含有量为250-750 $\mu$ g/mL、任选400-600 $\mu$ g/mL的TLR9激动剂,如CpG1018。

[0028] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗包含量为10Lf/mL的破伤风类毒素;量为4-5Lf/mL的白喉类毒素;量为20 $\mu$ g/mL的经遗传脱毒的百日咳毒素;量为10 $\mu$ g/mL的丝状血凝素;量为10 $\mu$ g/mL的百日咳杆菌粘附素;量为15 $\mu$ g/mL的2型和3型纤毛;量为0.66mg/mL的氢氧化铝(A100H);以及量不超过2 $\mu$ g/mL的TLR4激动剂,如E6020。可替代地,代替所述TLR4激动剂,所述aP加强疫苗可以含有量为500 $\mu$ g/mL的TLR9激动剂,如CpG1018。

[0029] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量为每0.5mL剂量4-6Lf、任选4.5-5.5Lf或任选5Lf的破伤风类毒素。

[0030] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量为1-4Lf、任选1.5-3Lf或任选2-2.5Lf的白喉类毒素。

[0031] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的通常为每0.5mL剂量的单位剂量形式,并且包含量为2-12 $\mu$ g、任选8-12 $\mu$ g或任选10 $\mu$ g的经遗传脱毒的百日咳毒素。

[0032] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量为2.5-7.5 $\mu$ g、任选4-6 $\mu$ g或任选5 $\mu$ g的丝状血凝素。

[0033] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含以2.5-7.5 $\mu$ g、任选4-6 $\mu$ g或任选5 $\mu$ g的量存在的百日咳杆菌粘附素。

[0034] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量为5-10 $\mu$ g、任选7-8 $\mu$ g或任选7.5 $\mu$ g的2型和3型纤毛。

[0035] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量不超过5 $\mu$ g、任选0.25-2.5 $\mu$ g、或任选不超过1 $\mu$ g的TLR4激动剂,如E6020。

[0036] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且包含量为125-375 $\mu$ g、任选200-300 $\mu$ g或任选250 $\mu$ g的TLR9激动剂,如CpG1018。

[0037] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为约4-6Lf、任选4.5-5.5Lf的破伤风类毒素;量为约1-4Lf、任选1.5-3Lf的白喉类毒素;量为约2-12 $\mu$ g、任选8-12 $\mu$ g的经遗传脱毒的百日咳毒素;量为约2.5-7.5 $\mu$ g、任选4-6 $\mu$ g的丝状血凝素;量为约2.5-7.5 $\mu$ g、任选4-6 $\mu$ g的百日咳杆菌粘附素;量为约5-10 $\mu$ g、任选7-8 $\mu$ g的2型和3型纤毛;量为约0.125-0.375mg、任选0.3-0.35mg的氢氧化铝(A100H);以及量不超过5 $\mu$ g、任选0.25-2.5 $\mu$ g的TL4激动剂,如E6020。可替代地,代替所述TLR4激动剂,所述aP加强疫苗可以含有量为125-375 $\mu$ g、任选200-300 $\mu$ g的TLR9激动剂,如CpG1018。

[0038] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为5Lf的破伤风类毒素;量为2-3Lf的白喉类毒素;量为10 $\mu$ g的经遗传脱毒的百日咳毒素;量为5 $\mu$ g的丝状血凝素;量为5 $\mu$ g的百日咳杆菌粘附素;量为约7.5 $\mu$ g的2型和3型纤毛;量为0.33mg的氢氧化铝(A100H);以及量不超过1 $\mu$ g的TLR4激动剂,如E6020。可替代地,代替所述TLR4激动剂,所述aP加强疫苗可以含有量为250 $\mu$ g的TLR9激动剂,如CpG1018。

[0039] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗还包含以下抗原中的一种或多种:b型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)寡糖或多糖缀合物(Hib)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和/或1型、2型和3型灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)。

[0040] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗还包含tris缓冲盐水。

[0041] 在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗的铝浓度为0.25-0.75mg/mL、任选0.6-0.7mg/mL或任选0.66mg/mL。在方面1和2的某些实施方案中,所述aP加强疫苗呈用于

向人类受试者施用的单位剂量形式，并且含有量为0.125-0.375mg、任选0.3-0.35mg或任选0.33mg的铝。

[0042] 在方面1和2的某些实施方案中，所述破伤风类毒素、所述白喉类毒素和所述脱毒百日咳毒素中的至少一种被吸附到所述铝盐上。在某些实施方案中，所述破伤风类毒素、所述白喉类毒素、所述脱毒百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素以及2型和3型纤毛被吸附到所述铝盐上。在某些实施方案中，将所述TLR4激动剂或TLR9激动剂用所述铝盐进行配制。在某些实施方案中，将所述aP加强疫苗中的所有细菌抗原和所述TLR4或TLR9激动剂用所述铝盐进行配制。

[0043] 在方面1和2的某些实施方案中，所述铝盐是氢氧化铝。在方面1和2的某些实施方案中，所述铝盐是磷酸铝。

[0044] 在方面1和2的某些实施方案中，所述aP加强疫苗还包含b型流感嗜血杆菌糖(Hib)缀合物、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和/或灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)。

[0045] 在方面2的某些实施方案中，当施用所述aP加强疫苗时，所述人类受试者为4岁或以上。

[0046] 在方面2的某些实施方案中，当施用所述aP加强疫苗时，所述人类受试者为10岁或以上。

[0047] 在方面2的某些实施方案中，与所述无细胞百日咳疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如，ADACEL<sup>®</sup>)相比，所述Th1偏倚免疫反应的特征在于以下中的一种或多种：IL-5产生减少、IFN- $\gamma$ 产生增加、IL-17产生增加或IgG1/IgG2a比率降低。在某些实施方案中，与所述无细胞百日咳疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如，ADACEL<sup>®</sup>)相比，所述Th1偏倚免疫反应的特征在于以下中的一种或多种：IL-5产生减少或IgG1/IgG2a比率降低。

[0048] 在方面2的某些实施方案中，所述aP初免疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、脱毒百日咳毒素、丝状血凝素和百日咳杆菌粘附素，条件是所述aP初免疫苗不含有TLR激动剂。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括但不限于一剂或多剂的DAPTACEL<sup>®</sup>、INFANRIX<sup>®</sup>、INFANRIX-HEXA<sup>®</sup>、

PENTACEL<sup>®</sup>、QUADRACEL<sup>®</sup>、KINRIX<sup>®</sup>、PEDIARIX<sup>®</sup>或VAXELIS<sup>®</sup>。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括DAPTACEL<sup>®</sup>。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括INFANRIX<sup>®</sup>或INFANRIX-HEXA<sup>®</sup>。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括PENTACEL<sup>®</sup>。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括KINRIX<sup>®</sup>或PEDIARIX<sup>®</sup>。在某些实施方案中，所述aP初免疫苗包括VAXELIS<sup>®</sup>。

[0049] 根据下文提供的具体实施方式，本公开文本的其他适用性领域将变得清楚。应当理解，具体实施方式和具体实施例虽然指示了本公开文本的一些期望方面，但仅旨在用于说明的目的，而不是旨在限制本公开文本的范围。

## 附图说明

[0050] 图1A至图1B示出了在引起PT特异性抗体反应时经遗传脱毒的PT(gdPT)与经化学

脱毒的PT (PTxd) 的免疫原性比较。图1A示出了在2次免疫之后通过ELISA测量的抗PT IgG1和IgG2a抗体滴度。图1B示出了在2次免疫之后如通过CHO测定测量的抗PT中和滴度。在第0天和第21天对小鼠免疫两次。在第二次免疫之后17天(第38天)给小鼠放血。

[0051] 图2A至图2B示出了PTxd或gdPT对PTxd引发的反应的可加强性的比较。图2A示出了在用PTxd或gdPT初免、随后用PTxd或gdPT加强免疫之后的ELISA PT特异性IgG1和IgG2a反应。图2B示出了在用PTxd或gdPT初免、随后用PTxd或gdPT加强免疫之后如通过CHO测定测量的PT中和滴度。在第0天、第21天和第42天对小鼠免疫三次。在第二次免疫之后17天以及在第三次免疫之后8天给小鼠放血。

[0052] 图3示出了在2次免疫之后gdPT对针对FIM抗原诱导的IgG1和IgG2a反应不存在免疫学干扰的评价。

[0053] 图4A至图4B示出了在3次免疫之后其他Tdap抗原对针对PT抗原的gdPT诱导的抗PT IgG1和IgG2a反应以及中和抗体反应的免疫学干扰的评价。图4A示出了在3次免疫之后如通过ELISA测量的抗PT IgG1和IgG2a抗体滴度。图4B示出了在3次免疫之后如通过CHO测定测量的抗PT中和滴度。

[0054] 图5示出了通过测量细胞因子(IL-5、IFN- $\gamma$  和IL-17)水平, 使用长初免-加强免疫计划经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 制剂下调DTaP诱导的Th2免疫记忆反应的能力。通过荧光免疫斑点(Fluorospot) 测定来测量细胞因子水平。

[0055] 图6A至图6L示出了在不同的初免/加强免疫计划之后在小鼠中诱导的不同抗原特异性IgG1和IgG2a的水平。用DTwP或DTaP肌内地对幼稚成年CD1小鼠进行免疫(初免)。四十二天后(D42), 用DTwP疫苗对DTwP初免的小鼠进行加强免疫, 并且用经修饰的TdaP疫苗(mTdaP-A100H、mTdaP-CpG-A100H或mTdaP-E6020-A100H) 对DTaP初免的小鼠进行加强免疫。使用长初免-加强免疫计划通过改良的ELISA技术(MSD) 在加强免疫后42天(D84) 和在D84时第二次加强免疫之后再42天后(D126) 收集的血清中评估FHA和FIM2,3、PRN、PT、DT和TT特异性IgG1和IgG2a抗体反应。图6A至图6L中IgG1和IgG2a条上方的数字表示IgG1/IgG2a比率, 其中数字越低表示比率越低, 反之亦然。在用含有TLR激动剂(CpG或E6020) 的经修饰的Tdap疫苗加强免疫的小鼠中观察到较低的IgG1/IgG2a比率。图6A和图6B分别示出了在D84和D126时FHA的IgG1和IgG2a结果和比率。图6C和图6D分别示出了在D84和D126时FIM的IgG1和IgG2a结果和比率。图6E和图6F分别示出了在D84和D126时PRN的IgG1和IgG2a结果和比率。图6G和图6H分别示出了在D84和D126时gdPT的IgG1和IgG2a结果和比率。图6I和图6J分别示出了在D84和D126时DT的IgG1和IgG2a结果和比率。图6K和图6L分别示出了在D84和D126时TT的IgG1和IgG2a结果和比率。

[0056] 图7描绘了用于评价新的Tdap加强疫苗制剂的小鼠过继转移模型。

[0057] 图8A至图8B示出了小鼠过继转移模型中PT、PRN、FHA和FIM2,3特异性IgG抗体反应的动力学, 如通过合并血清的平均 $\text{Log}_{10}$  IgG滴度(n=4, 每次合并6-7只小鼠)  $\pm$  SEM测量的。图8A示出了在加强免疫之后的几个时间点DTaP/Tdap(初免/加强免疫)、DTwP/Tdap(初免/加强免疫) 或DTwP/DTwP(初免/加强免疫) 的IgG反应。图8B示出了在DTaP初免疫苗后, 在过继转移的小鼠中, 与Tdap加强免疫反应相比, 经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强免疫和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强免疫的加速且更高的抗PT、PRN、FHA和FIM2,

3IgG滴度。在图8A中, P值<0.05指示如下: \*DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于DTwP/Tdap(初免/加强免疫); #DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于DTwP/DTwP(初免/加强免疫); +DTwP/Tdap(初免/加强免疫)相比于DTwP/DTwP(初免/加强免疫)。

[0058] 图9A至图9B显示在用百日咳鲍特菌鼻内激发之后,用经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 制剂加强免疫提供了早期和/或加速的细菌清除。图9A示出了在用DTaP或DTwP初免、随后进行Tdap或DTwP加强免疫之后的清除结果。图9B示出了在用DTaP初免、随后进行Tdap、经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 或经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018) 加强免疫之后的清除结果。图9A和图9B示出了每组n=3-4只小鼠在指示的时间点每个肺的CFU的 $\log_{10}$ 数±SEM。在图9B中, P值<0.05指示如下: \*DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于DTaP/mTdap-CPG-ALOOH(初免/加强免疫); §DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于DTaP/mTdap-CPG-ALOOH(初免/加强免疫); +DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于mTdap-E6020-ALOOH(仅初免); \$DTaP/Tdap(初免/加强免疫)相比于mTdap-CPG-ALOOH(仅初免); #DTaP/mTdap-CPG-ALOOH(初免/加强免疫)相比于DTaP/mTdap-E6020-ALOOH(初免/加强免疫)。所测试的单个小鼠(每个时间点每组4只)统计检验: 双向方差分析。符号指示可见显著性的时间点。

[0059] 图10A至图10B描绘了使用短免疫计划(图10A) 和长免疫计划(图10B) 的小鼠鼻内激发测定(INCA)。

[0060] 图10C显示在INCA短模型中, 在鼻内激发后, DTaP/Tdap(初免/加强免疫) 和DTwP/DTwP(初免/加强免疫) 保护小鼠免受百日咳鲍特菌肺定植。

[0061] 图11显示使用短初免-加强免疫计划, 在小鼠鼻内激发测定(INCA) 中, 与Tdap加强剂相比, 经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强剂显著加速百日咳鲍特菌清除。

[0062] 图12A至图12B显示使用长初免-加强免疫计划, 经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强疫苗能够保护DTaP初免的小鼠免受下呼吸道的疾病和定植。图12A示出了在激发后3天所有疫苗接种组中细菌载量的降低, 并且在第7天所有治疗组都达到了基线细菌载量。图12B显示所有无细胞百日咳给药方案都具有与DTwP/DTwP(初免/加强免疫) 给药方案类似的动力学。

[0063] 图13A至图13B显示用经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂对DTaP初免免疫进行加强以E6020剂量依赖性方式诱导IL-17产生, 如通过荧光免疫斑点测定测量的。分离来自用DTaP免疫并用mTdap-E6020-A100H加强免疫两次(D0和D21) 的CD1小鼠的脾细胞, 并且将其在体外用PTx(图13A) 或由PTx、PRN和FIM组成的百日咳抗原合并物(图13B) 进行再刺激。

[0064] 图14示出了以下经修饰的Tdap制剂的热曲线: mTdap (gdPT+A100H) 、mTdap (gdPT+E6020-A100H) 和mTdap (gdPT+CpG-A100H), 显示了本征荧光发射比(350nm/330nm) 的一阶导数。mTdap (gdPT+A100H) 的热转变(T<sub>m</sub>) 为74.6°C; mTdap (gdPT+E6020-A100H) 为74.2°C; 并且mTdap (gdPT+CpG-A100H) 为77.0°C。

## 具体实施方式

[0065] 对各个期望方面的以下描述本质上仅是示例性的, 并且绝不旨在限制本公开文本、其应用或用途。

[0066] 如自始至终所用,将范围用作描述范围内的每个值的简写。范围内的任何值均可以选择作为范围的终点。另外,将本文引用的所有参考文献都通过引用以其整体特此并入。在本公开文本中的定义与所引用参考文献的定义发生冲突的情况下,以本公开文本为准。

[0067] 如本文所用,“aP”是指无细胞百日咳鲍特菌疫苗。当前的无细胞百日咳鲍特菌疫苗通常基于以下毒力因子:脱毒百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)、百日咳杆菌粘附素(PRN)、纤毛凝集原2和纤毛凝集原3(FIM2/3或FIM)。虽然一些无细胞百日咳疫苗仅含有PT和FHA或PT、FHA和PRN,但通常认为含有PT、FHA、PRN和FIM2/3组分的无细胞百日咳疫苗是当前可用的最有效的aP疫苗。通常,无细胞百日咳疫苗是用白喉类毒素和破伤风类毒素配制的。

[0068] 如本文所用,“wP”是指全细胞百日咳鲍特菌疫苗。通常,全细胞百日咳疫苗包含已化学脱毒并与白喉类毒素和破伤风类毒素一起配制的百日咳鲍特菌全细胞。

[0069] 如本文所用,“DTwP”是指在婴儿中作为首次疫苗接种并且在儿童中作为加强剂用于预防白喉、破伤风和百日咳的wP。DTwP的一个例子是D.T.COQ/D.T.P.,它由Sanofi Pasteur销售,并且含有白喉类毒素和破伤风类毒素、在硫柳汞存在下被热灭活的百日咳鲍特菌和磷酸铝。

[0070] 如本文所用,“DTaP”是指在婴儿和儿童中用于针对白喉、破伤风和百日咳进行主动免疫的aP。通常,将DTaP在6周至6岁的婴儿和儿童中作为五剂系列来施用,或者在6周至2-4岁的婴儿和儿童中作为四系列剂量系列来施用。DTaP的例子包括但不限于DAPTACEL®、PENTACEL®和INFANRIX®或INFANRIX-HEXA®。例如,

DAPTACEL®由Sanofi Pasteur销售,并且含有白喉类毒素和破伤风类毒素,以下无细胞百日咳抗原:PT(经化学脱毒)、FHA、PRN和FIM2/3,以及磷酸铝。通常,与Tdap相比,DTaP含有增加量的白喉类毒素和PT。

[0071] 如本文所用,“Tdap”是指用于针对破伤风、白喉和百日咳进行主动加强免疫的aP。通常,将Tdap在10岁及以上的个体中作为单剂来施用。Tdap的例子包括但不限于ADACEL®和BOOSTRIX®。例如,ADACEL®由Sanofi Pasteur销售,并且含有白喉类毒素和破伤风类毒素和以下无细胞百日咳抗原:PT(经化学脱毒)、FHA、PRN和FIM2/3,以及磷酸铝。通常,与DTaP相比,Tdap含有减少量的白喉类毒素和PT。

[0072] 如本文所用,“经修饰的Tdap”或“mTdap”是指Tdap疫苗的修饰形式,其包含白喉类毒素和破伤风类毒素以及以下无细胞百日咳抗原:经遗传修饰的PT、FHA、PRN和FIM2/3。经修饰的Tdap与Tdap不同,至少因为经修饰的Tdap含有TLR激动剂(例如TLR4激动剂(例如,E6020)或TLR9激动剂(例如,CpG1018))。经修饰的Tdap还任选地含有经遗传脱毒的PT(gdPT)代替经化学脱毒的PT(PTdx)或氢氧化铝代替磷酸铝。在某些实施方案中,mTdap含有TLR激动剂(例如TLR4激动剂(例如,E6020)或TLR9激动剂(例如,CpG1018))、经遗传脱毒的PT(gdPT)和氢氧化铝。

[0073] 如本文所用,“加强剂”或“加强疫苗”是指在初免疫苗后施用的疫苗。加强疫苗含有包含在初免疫苗中的抗原,使得免疫系统在施用加强疫苗前已暴露于此类抗原。

[0074] 如本文所用,“初免疫苗”是指在疫苗接种计划中的一剂或多剂的疫苗,其在加强疫苗之前施用并诱导初次免疫反应和免疫记忆。

### Th1/Th2免疫反应

[0075] CD4 T辅助细胞对抗原的反应可以根据其产生的细胞因子进行分类。1型辅助性T细胞(Th1)优先产生炎性细胞因子,如IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$ 。Th1细胞激活巨噬细胞,并且通常与细胞介导的免疫反应和吞噬细胞依赖性保护反应(例如,调理抗体)相关。另一方面,2型辅助细胞(Th2)优先产生诸如IL-4、IL-5、IL-10和IL-13等细胞因子。Th2细胞激活B细胞,并且通常与抗体介导的免疫反应相关。

[0076] 在儿童中的研究已显示,wP初免疫苗优先诱导Th1偏倚反应,而aP初免疫苗优先诱导Th2偏倚反应。Ryan等,Immunology,1998,93:1-10;Ausiello等,Infect Immun,1997,65:2168-74。除了诱导不同的细胞因子谱外,小鼠中的aP初免疫苗主要诱导IgG1抗体,但也诱导IgG2和IgG4,并且在加强疫苗接种之后IgG4的比例增加,反映了Th2偏倚反应(Stenger等,Vaccine,2010,28:6637-46和Brummelman等,Vaccine,2015,33:1483-19),而小鼠中的wP初免疫苗主要诱导IgG2抗体以及IgG1和IgG3(Raeven等,J Proteome Res,2015,14:2929-42),与Th1偏倚反应一致。

[0077] 如本文所公开的,在本申请中所述的经修饰的aP加强疫苗能够将由先前施用的aP疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1或混合Th1/Th17偏倚免疫反应。如在相关文献(包括在前一段中引用的参考文献)中所反映的,本领域技术人员能够使用常规技术测量细胞因子谱和抗体同种型,以容易地确定aP疫苗是诱导Th1偏倚反应还是诱导Th2偏倚反应。通常,aP疫苗在小鼠中诱导的Th2偏倚免疫反应与IL-5水平增加和/或IgG1/IgG2a比率增加相关,而Th1偏倚免疫反应通常与IL-5水平降低、IFN- $\gamma$ 水平增加或IgG1/IgG2a比率降低中的一种或多种相关。例如,如本文所述的aP加强疫苗将由先前施用的aP疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚免疫反应的能力指示,与由先前施用的aP疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗诱导的免疫反应相比,IL-5水平降低和/或IgG1/IgG2a比率降低。通过IL-17的产生来测量Th17反应。

### 破伤风类毒素

[0078] 破伤风类毒素产生自破伤风梭菌(*Clostridium tentani*),一种革兰氏阳性、杆状、形成孢子的芽孢杆菌属(*bacillus*)细菌。破伤风类毒素是约150kDa的蛋白质,并且由通过硫醚键连接的两个亚基(约100kDa和约50kDa)组成。破伤风类毒素通常用甲醛脱毒,并且可以使用已知的方法(如硫酸铵沉淀和/或层析技术)从培养滤液中纯化,如例如在W0 1996/025425中披露的。破伤风梭菌可以在任何合适的生长培养基中生长,所述生长培养基包括例如不含牛心浸液的Mueller-Miller酪蛋白氨基酸培养基(Mueller等,J Bacteriol,1954,67 (3):271-277)或来源于牛酪蛋白的Latham培养基。破伤风类毒素也可以通过重组遗传手段来灭活。

[0079] 破伤风类毒素的量可以以“Lf”单位(即,絮凝极限或絮凝单位)来表示,其定义为当与一个国际单位的抗毒素混合时产生最佳絮凝混合物的类毒素量。参见WHO的The immunological basis for immunization系列的模组1(Galazka)。组合物中破伤风类毒素的量可以通过在絮凝测定中将组合物与用参考试剂校准的参考材料进行比较而容易地确定。

### 白喉类毒素

[0080] 白喉类毒素是由革兰氏阳性、不长孢子的需氧细菌白喉棒状杆菌

(*Corynebacterium diphtheriae*)产生的ADP核糖基化外毒素。与破伤风类毒素一样,白喉类毒素通常使用甲醛来脱毒,以产生无毒但仍具有抗原性的类毒素。白喉棒状杆菌可以在任何合适的生长培养基中生长,所述生长培养基是如改良的Mueller生长培养基(Stainer, DW, 在: Manclark CR编辑, *Proceedings of an informal consultation of the WHO requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines*, U.S. Public Health Service, Bethesda, MD. DHHS 91-1174, 1991, 7-11) 或Fenton培养基或Linggoud和Fenton培养基,它们可以补充有牛提取物。白喉毒素可以使用常规技术(如硫酸铵分级分离)来纯化,并且在纯化之前或之后使用标准技术(如甲醛处理)来脱毒。

[0081] 与破伤风类毒素一样,白喉类毒素的量可以以“Lf”单位来表示。组合物中白喉类毒素的量可以通过在絮凝测定中将组合物与用参考试剂校准的参考材料进行比较而容易地确定。

#### 百日咳毒素

[0082] 百日咳毒素(PT)是分泌型蛋白质外毒素,并且是由百日咳鲍特菌唯一产生的重要毒力因子。百日咳毒素由命名为S1、S2、S3、S4(x2)和S5的五个亚基构成,所述亚基由组织成大约3200个碱基对的操纵子的五个基因编码。这五个基因的表达受位于S1编码基因上游的启动子调节。毒素启动子的激活在鲍特菌属(*Bordetella*)毒力基因(bvg)系统的控制之下,所述系统不仅调节百日咳毒素的表达,而且还调节其他已知毒力因子(如FHA和PRN)的表达。

[0083] 百日咳毒素是具有A/B构型的约105kDa的蛋白质。由S1亚基构成的A结构域负责蛋白质的ADP核糖基化活性。它阻断G蛋白(鸟嘌呤核苷酸结合蛋白)与宿主细胞膜上的G蛋白偶联受体(GPCR)的结合,从而干扰信号转导,并且导致许多与PT活性相关的生物学效应,如组胺致敏、白细胞增多和胰岛素分泌改变。B寡聚体是由以1:1:2:1的比率缔合的亚基S2、S3、S4和S5构成的五聚体环,并且负责与真核细胞上的受体的结合。它与靶细胞表面上的各种(但大部分未鉴定的)糖缀合物分子结合。

[0084] 当前无细胞疫苗中使用的百日咳毒素通常是化学脱毒的。在本文所述的aP加强疫苗中,通常对脱毒百日咳毒素进行遗传修饰以降低酶活性和/或毒性。含有百日咳毒素的遗传修饰的许多构建体已被工程化以降低蛋白质的酶活性和/或毒性,同时保留其免疫原性和保护特性,包括例如在百日咳毒素的S1亚基的氨基酸129处具有突变的突变百日咳毒素,如E129G突变体或R9K/E129G双突变体。参见例如美国专利号5,433,945、7,144,576、7,666,436和7,427,404。因此,在某些实施方案中,经遗传脱毒的百日咳毒素在百日咳毒素的S1亚基的氨基酸129处含有突变。在某些实施方案中,突变是E129G突变。在某些实施方案中,经遗传脱毒的百日咳毒素含有R9K突变和E129G突变。尽管经遗传脱毒的百日咳毒素是优选的,但也可以使用经化学脱毒的百日咳毒素代替经遗传脱毒的百日咳毒素。例如,化学脱毒可以通过多种常规化学脱毒方法中的任一种来进行,如用甲醛、过氧化氢、四硝基甲烷或戊二醛处理。参见例如美国专利号5,877,298。

#### 百日咳杆菌粘附素

[0085] 百日咳杆菌粘附素是最初从支气管败血鲍特菌(*B. bronchiseptica*)中鉴定出的69kDa外膜蛋白(Montaraz, J.A.等 *Infect. Immun.* 1985; 161: 581-582)。已显示它是针对支气管败血鲍特菌的保护性抗原,随后在百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

(*B. parapertussis*) 中均被鉴定出。69kDa蛋白直接与真核细胞结合 (Leininger, E. 等, Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:345-349), 并且百日咳鲍特菌的自然感染诱导抗百日咳杆菌粘附素体液反应 (Thomas, M.G. 等 J. Infect. Dis. 1989; 159:211-18)。百日咳杆菌粘附素还诱导细胞介导的免疫反应 (Petersen, J.W. 等, Infect. Immun. 1992; 60:4563-70; De Magistris, T. 等, J. Exp. Med. 1988; 168:1351-1362; Seddon, P.C. 等, Serodiagnosis Immunother. Inf. Dis. 1990; 3:337-43)。全细胞或无细胞疫苗的疫苗接种诱导抗百日咳杆菌粘附素抗体 (Edwards, K.M. 等, Pediatr. Res. 1992; 31:91A; Podda, A. 等, Vaccine 1991; 9:741-45), 并且无细胞疫苗诱导百日咳杆菌粘附素细胞介导的免疫 (Podda, A. 等, Vaccine 1991; 9:741-45)。百日咳杆菌粘附素保护小鼠免受百日咳鲍特菌的气溶胶攻击 (Roberts, M. 等, Vaccine 1992; 10:43-48), 并且与FHA组合在脑内激发测试中保护免受百日咳鲍特菌的影响 (Novotny, P. 等, J. Infect. Dis. 1991; 164:114-22)。多克隆或单克隆抗百日咳杆菌粘附素抗体的被动转移也保护小鼠免受气溶胶攻击 (Shahin, R.D. 等, J. Exp. Med. 1990; 171:63-73)。

#### 丝状血凝素

[0086] 丝状血凝素 (FHA) 是大的 (220kDa) 无毒多肽, 其在细菌定植期间介导百日咳鲍特菌向上呼吸道纤毛细胞的附着 (Tuomanen, E. 和 Weiss, A., J. Infect. Dis., 1985; 152:118-25)。全细胞或无细胞百日咳疫苗的疫苗接种产生抗FHA抗体, 并且含有FHA的无细胞疫苗还诱导细胞介导的对FHA的免疫反应 (Gearing, A. 等, FEMS Microbial. Immunol. 1989; 47: 205-12; Thomas, M.G. 等, J. Infect. Dis. 1989; 160:838-45; Di Tommaso, A. 等, Infect. Immun. 1991; 59:3313-15; Tomoda, T. 等, J. Infect. Dis. 1992; 166:908-10)。

#### 2型和3型纤毛

[0087] 百日咳鲍特菌的血清型由其凝集纤毛来定义。WHO推介全细胞疫苗包含1型、2型和3型凝集原 (Agg), 因为它们不是交叉保护性的 (Robinson, A. 等, Vaccine 1985; 3:11-22)。Agg 1是非纤毛的并且在所有百日咳鲍特菌菌株上都有发现, 而血清型2和3Agg是纤毛的。自然感染或用全细胞或无细胞疫苗进行免疫诱导抗Agg抗体 (Thomas, M.G. 等, J. Infect. Dis. 1989; 160:838-45; Edwards, K.M. 等, Pediatr. Res. 1992; 31:91A)。在气溶胶感染之后, Agg 2和Agg 3可以在小鼠中产生特异性的细胞介导的免疫反应 (Petersen, J.W. 等, Immun. 1992; 60:4563-70)。Agg 2和3在小鼠中具有针对呼吸系统攻击的保护作用, 并且含有抗凝集原的人初乳在这个测定中也将保护 (Oda, M. 等, Infect. Immun. 1985; 47:441-45; Robinson, A. 等, Develop. Biol. Stand. 1985; 61:165-72; Robinson, A. 等, Vaccine 1989; 7:321-24)。

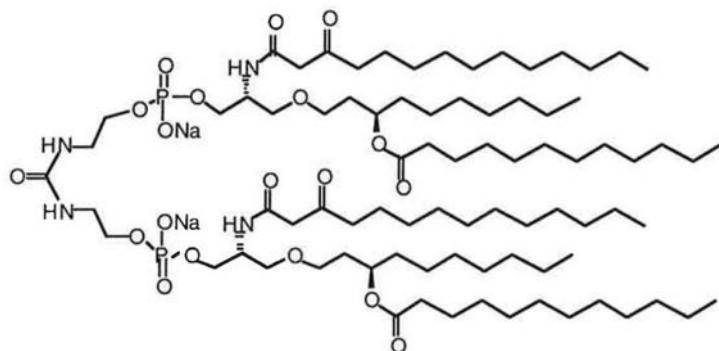
#### TLR激动剂

[0088] 本文所述的aP加强疫苗包含toll样受体 (TLR) 激动剂。TLR激动剂是可以激动或激活TLR的化合物。TLR是宿主的病原体感测机制的重要组成部分 (Janeway 等, Annu. Rev. Immunol. 2002; 20:197-216; Akira 等, Nat Rev Immunol. 2004; 4:499-511)。TLR通常根据其定位而被分为两个家族: TLR 1、2和4-6在细胞表面上表达并感测细菌细胞壁组分, 而TLR 3和7-9在内体中表达并感测病毒或细菌核酸 (Kawasaki 等, Front Immunol. 2014; 5:461)。TLR所识别的分子结构在进化上一直是保守的, 并且由多种传染性微生物表达 (Janeway 等, Annu. Rev. Immunol. 2002; 20:197-216; Akira 等, Nat Rev

Immunol. 2004; 4:499-511)。通过TLR激活引起的先天免疫反应的特征是产生促炎细胞因子、趋化因子、I型干扰素和抗微生物肽。这种先天反应促进和调节适应性免疫系统。常见的结果是产生高亲和力抗体的抗原特异性B细胞和细胞毒性T细胞的扩增,所述细胞毒性T细胞包括通过靶向效应子期的增强的细胞毒性功能来防止随后的感染的持久记忆细胞 (Wille-Reece等, J Exp Med. 2006; 203:1249-58; Xiao等, J Immunol. 2013; 190:5866-73)。TLR信号传导似乎在先天免疫反应的许多方面发挥重要作用。

[0089] 通过包含TLR激动剂, aP加强疫苗令人惊讶地能够将由先前施用的aP疫苗建立的Th2偏倚免疫反应转变为Th1偏倚免疫反应。优选地, TLR激动剂是人TLR的激动剂。

[0090] 在某些实施方案中, TLR激动剂是TLR4激动剂、优选人TLR4的激动剂。在一个实施方案中, TLR4激动剂是E6020, 一种合成磷脂二聚体, 其模拟来源于革兰氏阴性细菌的天然脂质A的理化和生物学特性 (Ishizaka等, Expert Rev Vaccines. 2007; (5) :773-84)。E6020是十二烷酸(1R,6R,22R,27R)-1,27-二己基-9,19-二羟基-9,19-二氧化-14-氧代-6,22-双[(1,3-二氧化十四烷基)氨基]-4,8,10,18,20,24-六氧杂-13,15-二氮杂-9,19-脱磷二十七烷-1,27-二基酯二钠盐 ( $C_{83}H_{158}N_4O_{19}P_2Na_2$ )。E6020的化学合成是可重复且控制良好的制造过程, 从而产生高纯度的化学化合物。E6020具有以下化学结构:



[0091] E6020与TLR4相互作用, 并且已在临床前研究中与乳剂、脂质体或铝盐组合作为佐剂进行了评价。据报道, E6020可增强IgG2a, 其在小鼠中与Th1激活相关。还已显示E6020可增强人外周血单核细胞(PBMC)和小鼠脾脏中的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$  (Ishizaka等, Expert Rev Vaccines. 2007; (5) :773-84)。

[0092] 在其他实施方案中, TLR激动剂是TLR9激动剂、优选人TLR9的激动剂。例如, TLR9激动剂可以是CpG寡脱氧核苷酸(“ODN”)。如本文所用, “CpG寡核苷酸”或“CpG ODN”是单链DNA分子, 其含有包埋在特定侧翼区域内的至少一个中央未甲基化的CG二核苷酸。CpG ODN以高频率存在于细菌DNA中, 并且具有免疫刺激作用。

[0093] 在人中, CpG ODN根据其诱导的免疫反应的结构和性质的差异已被分为4个不同的类别。尽管每个类别均含有至少一个中央未甲基化的CG二核苷酸和侧翼区域, 但它们的结构和免疫活性不同。B类ODN(也称为“K”型)通常在硫代磷酸酯骨架上含有一至五个CpG基序。硫代磷酸酯是非天然存在的核苷间连接基团, 其取代了在天然存在的DNA中发现的磷酸二酯键, 并且增强了对核酸酶消化的抗性并大大延长了体内半衰期。B类ODN触发浆细胞样树突细胞分化并产生TNF $\alpha$ , 并且刺激B细胞增殖并分泌IgM。

[0094] A类ODN(也称为“D”型)具有磷酸二酯核心, 其两侧是硫代磷酸酯末端核苷酸。它们包含单个CpG基序, 其两侧是能够形成茎环结构的回文序列。A类ODN在3'和5'末端还具有促

进串联体形成的聚G基序。A类ODN触发浆细胞样树突细胞成熟并分泌IFN $\alpha$ ，但是对B细胞没有影响。C类ODN类似于B类，因为它们完全由硫代磷酸酯核苷酸构成，但是在含有可以形成茎环结构或二聚体的回文CpG基序方面类似于A类。C类ODN刺激B细胞分泌IL-6，并且刺激浆细胞样树突细胞产生IFN $\alpha$ 。P类CpG ODN是含有双回文的高度有序的结构，所述双回文可以在其富含GC的3'末端形成发夹，并且由于5'回文的存在而使它们串联化。

[0095] 在某些实施方案中，aP加强疫苗中使用的CpG ODN是B类CpG ODN。在某些实施方案中，aP加强疫苗中使用的CpG ODN是A类CpG ODN。在某些实施方案中，aP加强疫苗中使用的CpG ODN是C类CpG ODN。在某些实施方案中，aP加强疫苗中使用的CpG ODN是P类CpG ODN。

[0096] 在某些实施方案中，CpG ODN含有至少一个硫代磷酸酯键。在某些实施方案中，CpG ODN中的所有核苷酸都用硫代磷酸酯键连接。在某些实施方案中，CpG ODN含有1-5个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN含有1个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN含有2个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN含有3个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN含有4个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN含有5个CG二核苷酸。在某些实施方案中，CpG ODN的长度为18-28个核苷酸。

[0097] 在一个实施方案中，CpG ODN是ISS1018 (Higgins等, Exp Rev Vaccines, 2007; 6 (5):747-59)，一种具有以下核苷酸序列的22聚体寡核苷酸：5'-TGACTGTGAAACGTTGAGATGA-3' (SEQ ID NO:1)。ISS1018中的所有核苷酸碱基都用硫代磷酸酯键连接。如本文所用，“CpG1018”可与ISS1018互换使用。

#### 铝盐

[0098] 佐剂(如铝盐)已用于增强对各种抗原的免疫反应。可以用作佐剂的铝盐包括但不限于铝氢氧化物/羟基氧化物(A100H)、磷酸铝(A1PO<sub>4</sub>)、羟基磷酸硫酸铝(AAHS)和/或硫酸铝钾。这些铝盐在疫苗中有很长的使用历史。

[0099] 如在本申请的其他地方所讨论的，aP加强疫苗的破伤风类毒素、白喉类毒素和无细胞百日咳鲍特菌抗原中的一种或多种可以被吸附到铝盐上。在某些实施方案中，aP加强疫苗中的所有疫苗抗原都被吸附到铝盐上。例如，在一个实施方案中，破伤风类毒素、白喉类毒素、PT、FHA、PT和FIM2,3被吸附到A100H上。在另一个实施方案中，破伤风类毒素、白喉类毒素、PT、FHA、PT和FIM2,3被吸附到A1PO<sub>4</sub>上。在又另一个实施方案中，aP加强疫苗中的一种或多种疫苗抗原被吸附到A100H上，并且aP加强疫苗中的一种或多种疫苗抗原被吸附到A1PO<sub>4</sub>上。

[0100] 在某些实施方案中，将TLR激动剂用铝盐进行配制。通常，将TLR4激动剂(如E6020)用A100H进行配制。在其他实施方案中，将TLR4激动剂(如E6020)用A1PO<sub>4</sub>进行配制。通常，将TLR9激动剂如CpG ODN(例如，CpG1018)用A100H进行配制。在其他实施方案中，将TLR9激动剂如CpG ODN(例如，CpG1018)用A1PO<sub>4</sub>进行配制。

[0101] 在某些实施方案中，aP加强疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、gdPT、FHA、PT、FIM2,3和TLR4激动剂(例如，E6020)，并且破伤风类毒素、白喉类毒素、gdPT、FHA、PT、FIM2,3中的每一种均被吸附到A100H上，并且将TLR4激动剂(例如，E6020)用A100H进行配制。在某些实施方案中，aP加强疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、gdPT、FHA、PT、FIM2,3和TLR9激动剂(例如CpG ODN，如CpG1018)，并且破伤风类毒素、白喉类毒素、gdPT、FHA、PT、FIM2,3中的每一种均被吸附到A100H上，并且将TLR9激动剂(例如CpG ODN，如CpG1018)用A100H进行

配制。

[0102] 在某些实施方案中, aP加强疫苗包含Al100H和AlPO<sub>4</sub>两者, 并且疫苗中的抗原可以被吸附到这些铝盐中的一种或两种上。

[0103] 用于将白喉类毒素、破伤风类毒素和百日咳抗原吸附到铝盐(如Al100H和AlPO<sub>4</sub>)上的方法是本领域已知的。

#### 其他抗原

[0104] 除了破伤风类毒素、白喉类毒素和无细胞百日咳鲍特菌抗原外, aP加强疫苗还可以含有一种或多种另外的抗原, 包括但不限于b型流感嗜血杆菌糖(Hib)缀合物、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和/或灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)。

[0105] b型流感嗜血杆菌引起细菌性脑膜炎。通常使用与载体蛋白缀合的Hib来配制Hib疫苗, 以增强其免疫原性, 尤其是在儿童中。通常, 载体蛋白是破伤风类毒素、白喉类毒素、流感嗜血杆菌蛋白D或来自血清群B脑膜炎球菌(Meningococcus)的外膜蛋白复合物。但是可以使用任何适当的载体蛋白。制备Hib缀合物的方法是本领域已知的。例如, PENTACEL®含有与破伤风类毒素共价结合的b型流感嗜血杆菌荚膜多糖(聚核糖基-核糖醇-278磷酸酯[PRP])。Hib缀合物通常被吸附到铝盐(例如, Al100H或AlPO<sub>4</sub>)上。

[0106] 乙型肝炎病毒(HBV)引起病毒性肝炎, 一种可能危及生命的肝脏感染。传染性HBV病毒体具有球形、双壳结构, 其由含有HBsAg的脂质包膜组成, 所述脂质包膜围绕由与病毒编码的聚合酶和病毒DNA基因组复合的乙型肝炎核心抗原(HBcAg)构成的内部核衣壳。HBsAg是通常具有226个氨基酸的长度和约24kDa的分子量的多肽。HBV疫苗通常含有HBsAg。因此, 制备HBsAg和包含HBsAg的疫苗的方法是本领域众所周知的。HBsAg通常被吸附到铝盐(例如, Al100H或AlPO<sub>4</sub>)上。

[0107] 脊髓灰质炎是由三种类型的脊髓灰质炎病毒中的任何一种引起的疾病:1型脊髓灰质炎病毒(例如, Mahoney株), 2型脊髓灰质炎病毒(例如, MEF-1株)和3型脊髓灰质炎病毒(例如, Saukett株)。脊髓灰质炎病毒可以使用已知技术在细胞培养物中生长, 随后使用诸如超滤、渗滤和层析等技术纯化病毒体。接下来, 使用例如甲醛灭活病毒体。通常, 每种类型的脊髓灰质炎病毒单独生长, 从细胞培养物中纯化, 并且在将它们组合以产生三价脊髓灰质炎病毒组合物之前灭活。通常, 在配制疫苗前, 灭活脊髓灰质炎病毒未被吸附在铝盐上。然而, 灭活脊髓灰质炎病毒可能被吸附到疫苗中未被吸附到另一种疫苗抗原上的任何铝盐上。

#### 无细胞百日咳加强疫苗

[0108] aP加强疫苗是免疫原性组合物, 其包含来源于来自百日咳鲍特菌和其他病原体(例如, 白喉棒状杆菌、破伤风梭菌等)的抗原或与之同源的一种或多种抗原, 而非所有抗原。这种疫苗基本上没有完整的致病颗粒或此类颗粒的裂解物。因此, aP加强疫苗可以由来自目标病原体或其类似物的至少部分纯化或基本纯化的免疫原性多肽来制备。获得疫苗中的一种或多种抗原的方法包括标准纯化技术、重组生产或化学合成。

[0109] 在各种实施方案中, 所述一种或多种抗原被配制成单位剂量的aP加强疫苗。如本文所用的“单位剂量”是指在单次施用中向受试者施用的疫苗量。通常, 这个量以0.1-2毫升(例如, 0.2-1毫升, 通常为0.5毫升)的体积存在。因此, 所指示的量可以例如以每0.5毫升散装疫苗的微克浓度存在。在某些实施方案中, (单个)单位剂量因此等于0.5毫升。

[0110] 如本文所述, aP 加强疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素和以下无细胞百日咳鲍特菌抗原: 脱毒百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素以及 2 型和 3 型纤毛。aP 加强疫苗还含有 TLR 激动剂, 如 TLR4 激动剂 (例如, E6020) 或 TLR9 激动剂 (例如, CpG1018); 和铝盐, 如 Al100H 或 AlPO<sub>4</sub>。

[0111] 无细胞百日咳抗原通常通过从在液体培养基中生长的百日咳鲍特菌培养物中分离来制备。可以使用本领域已知的用于培养鲍特菌属细胞的任何液体培养基。在各种实施方案中, 使用复合培养基。如本文所用, “复合培养基”是指含有植物或动物来源的蛋白胨消化物或提取物的培养基。适于与本发明方法一起使用的复合培养基的例子包括例如 Hornibrook 培养基、Cohen-Wheeler 培养基、B2 培养基或其他类似的液体培养基。还包含二甲基β-环糊精和酪蛋白氨基酸的改良的 Stainer & Scholte 培养基是适于使用的另一个例子。Stainer 等, J Gen Microbiol, 1970, 63: 211-20。百日咳毒素、丝状血凝素和百日咳杆菌粘附素通常与上清液培养基分开分离。通常从细菌细胞中提取和共纯化 2 型和 3 型纤毛。百日咳抗原可以使用任何常规方法从上清液和/或细菌细胞中纯化, 所述方法包括例如连续过滤、盐沉淀、超滤和层析。

[0112] 破伤风类毒素 (TT) 通常以从约 8-12Lf/mL 的量存在于 aP 加强疫苗中。在某些实施方案中, TT 以 9-11Lf/mL 的量存在。在某些实施方案中, TT 以 10Lf/mL 的量存在。如按单位剂量形式测量的, 在单位剂量为 0.5mL 的情况下, TT 通常以约 4-6Lf 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, TT 以 4.5-5.5Lf 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, TT 以 5Lf 的量存在。在 aP 加强疫苗中, TT 通常被吸附到铝盐上。通常, TT 被吸附在 Al100H 上。在其他实施方案中, TT 可以被吸附在 AlPO<sub>4</sub> 上。

[0113] 白喉类毒素 (DT) 通常以从约 3-8Lf/mL 的量存在于 aP 加强疫苗中。在某些实施方案中, DT 以 3-6Lf/mL 的量存在。在某些实施方案中, DT 以 4-5Lf/mL 的量存在。在某些实施方案中, DT 以 4Lf/mL 的量存在。如按单位剂量形式测量的, 在单位剂量为 0.5mL 的情况下, DT 通常以约 1.5-4Lf 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, DT 以 1.5-3Lf 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, DT 以 2-2.5Lf 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, DT 以 2Lf 的量存在。在 aP 加强疫苗中, DT 通常被吸附到铝盐上。通常, DT 被吸附在 Al100H 上。在其他实施方案中, DT 可以被吸附在 AlPO<sub>4</sub> 上。

[0114] 脱毒百日咳毒素 (PT) 通常以从约 4-30μg/mL 的量存在于 aP 加强疫苗中。在某些实施方案中, PT 是经化学脱毒的 PT, 并且以 4-10μg/mL 的量存在。在某些实施方案中, PT 是经遗传脱毒的 PT (gdPT), 并且以约 16-24μg/mL 的量存在。在某些实施方案中, gdPT 以 18-22μg/mL 的量存在。在某些实施方案中, gdPT 以 20μg/mL 的量存在。如按单位剂量形式测量的, 在单位剂量为 0.5mL 的情况下, PT 通常以约 2-15μg 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, PT 以 2-5μg 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, PT 是 gdPT, 并且以 8-12μg 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, gdPT 以 9-11μg 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, gdPT 以 10μg 的量存在。在其他实施方案中, PT 以每单位剂量范围从 2-50μg、5-40μg、10-30μg 或 20-25μg 的量存在。在 aP 加强疫苗中, PT 通常被吸附到铝盐上。在某些实施方案中, PT 被吸附在 Al100H 上。在某些实施方案中, PT 被吸附在 AlPO<sub>4</sub> 上。

[0115] 丝状血凝素 (FHA) 通常以从约 5-15μg/mL 的量存在于 aP 加强疫苗中。在某些实施方案中, FHA 以 8-12μg/mL 的量存在。在某些实施方案中, FHA 以 10μg/mL 的量存在。如按单位剂量形式测量的, 在单位剂量为 0.5mL 的情况下, FHA 通常以约 5-15μg 的量存在。在 0.5mL 剂量形式的某些实施方案中, FHA 以 8-12μg 的量存在。在某些实施方案中, FHA 以 10μg 的量存在。

量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,FHA通常以约2.5至7.5 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,FHA以4-6 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,FHA以5 $\mu$ g的量存在。在其他实施方案中,FHA以每单位剂量范围从2-50 $\mu$ g、5-40 $\mu$ g、10-30 $\mu$ g或20-25 $\mu$ g的量存在。在aP加强疫苗中,FHA通常被吸附到铝盐上。在某些实施方案中,FHA被吸附在A100H上。在某些实施方案中,FHA被吸附在AlPO<sub>4</sub>上。

[0116] 百日咳杆菌粘附素 (PRN) 通常以从约5-15 $\mu$ g/mL的量存在于aP加强疫苗中。在某些实施方案中,PRN以8-12 $\mu$ g/mL的量存在。在某些实施方案中,PRN以10 $\mu$ g/mL的量存在。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,PRN通常以约2.5至7.5 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,PRN以4-6 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,PRN以5 $\mu$ g的量存在。在其他实施方案中,PRN以每单位剂量范围从0.5-100 $\mu$ g、1-50 $\mu$ g、2-20 $\mu$ g、3-30 $\mu$ g或5-20 $\mu$ g的量存在。在aP加强疫苗中,PRN通常被吸附到铝盐上。在某些实施方案中,PRN被吸附在A100H上。在某些实施方案中,PRN被吸附在AlPO<sub>4</sub>上。

[0117] 2型和3型纤毛 (FIM2,3) 通常以从约10-20 $\mu$ g/mL的量存在于aP加强疫苗中。在某些实施方案中,FIM2,3以14-16 $\mu$ g/mL的量存在。在某些实施方案中,FIM2,3以15 $\mu$ g/mL的量存在。在某些实施方案中,FIM 2与FIM3的重量比为从约1:3至约3:1,例如从约1:1至约3:1,例如从约1.5:1至约2:1。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,FIM2,3通常以约5-10 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,FIM2,3以7-8 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,FIM2,3以7.5 $\mu$ g的量存在。在其他实施方案中,FIM2/3以范围从1-100 $\mu$ g/单位剂量、如3-50 $\mu$ g或3-30 $\mu$ g/单位剂量的量存在。在aP加强疫苗中,FIM2,3通常被吸附到铝盐上。在某些实施方案中,FIM2,3被吸附在A100H上。在某些实施方案中,FIM2,3被吸附在AlPO<sub>4</sub>上。

[0118] 通常,aP加强疫苗包含铝盐 (如A100H或AlPO<sub>4</sub>),其用于吸附一种或多种疫苗抗原和/或配制TLR激动剂。在某些实施方案中,铝盐以从约0.25-0.75mg/mL、0.25-0.35mg/mL或0.6-0.7mg/mL的量存在。在某些实施方案中,铝盐以0.66mg/mL的量存在。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,铝盐通常以0.125-0.375mg、0.125-0.175mg或0.3-0.35mg的量存在。在某些实施方案中,0.5mL单位剂量形式含有0.33mg铝盐。在某些实施方案中,铝盐为A100H。在其他实施方案中,铝盐为AlPO<sub>4</sub>。

[0119] 当TLR4激动剂为E6020时,它可以以不超过10 $\mu$ g/ml的量存在。在某些实施方案中,E6020以0.5-5 $\mu$ g/ml的量存在。在某些实施方案中,E6020以不超过2 $\mu$ g/ml的量存在。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,E6020通常以不超过5 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,E6020以约0.25-2.5 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,E6020以不超过1 $\mu$ g的量存在。

[0120] 在某些实施方案中,将E6020用铝盐进行配制。通常,铝盐为A100H。在其他实施方案中,铝盐可以为AlPO<sub>4</sub>。

[0121] 当TLR9激动剂为CpG1018时,它可以以约250-750 $\mu$ g/ml的量存在。在某些实施方案中,CpG1018以400-600 $\mu$ g/ml的量存在。在某些实施方案中,CpG1018以500 $\mu$ g/ml的量存在。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,CpG1018通常以约125-375 $\mu$ g的量存在。如按单位剂量形式测量的,在单位剂量为0.5mL的情况下,CpG1018以200-300 $\mu$ g的量存在。在0.5mL剂量形式的某些实施方案中,CpG1018以250 $\mu$ g的量存在。

[0122] 在某些实施方案中,将CpG1018用铝盐进行配制。通常,铝盐为AlOOH。在其他实施方案中,铝盐可以为AlPO<sub>4</sub>。

[0123] 在某些实施方案中,aP加强疫苗包含量为8-12Lf/mL的TT、量为3-8Lf/mL的DT、量为16-24μg/mL的gdPT、量为5-15μg/mL的FHA、量为5-15μg/mL的PRN、量从约10-20μg/mL的FIM2,3、量为0.25-0.75mg/mL的AlOOH以及量不超过10μg/ml的TLR4激动剂如E6020。

[0124] 在某些实施方案中,aP加强疫苗包含量为8-12Lf/mL的TT、量为3-8Lf/mL的DT、量为16-24μg/mL的gdPT、量为5-15μg/mL的FHA、量为5-15μg/mL的PRN、量从约10-20μg/mL的FIM2,3、量为0.25-0.75mg/mL的AlOOH以及量为250-750μg/ml的TLR9激动剂如CpG1018。

[0125] 在某些实施方案中,aP加强疫苗包含量为9-11Lf/mL的TT、量为4-6Lf/mL的DT、量为18-22μg/mL的gdPT、量为8-12μg/mL的FHA、量为8-12μg/mL的PRN、量为14-16μg/mL的FIM2,3、量为0.6-0.7mg/mL的AlOOH以及量为0.5-5μg/ml的TLR4激动剂如E6020。

[0126] 在某些实施方案中,aP加强疫苗包含量为9-11Lf/mL的TT、量为4-6Lf/mL的DT、量为18-22μg/mL的gdPT、量为8-12μg/mL的FHA、量为8-12μg/mL的PRN、量为14-16μg/mL的FIM2,3、量为0.6-0.7mg/mL的AlOOH以及量为400-600μg/ml的TLR9激动剂如CpG1018。

[0127] 在某些实施方案中,aP加强疫苗包含所指示浓度的以下组分,如表1所示:

[0128] 表1

组分	量
破伤风类毒素	10 Lf/mL
白喉类毒素	4-5 Lf/mL
经遗传脱毒的百日咳毒素	20 μg/mL
丝状血凝素	10 μg/mL
百日咳杆菌粘附素	10 μg/mL
2型和3型纤毛	15 μg/mL
铝盐 (AlOOH)	0.66 mg/mL Al
TLR激动剂	E6020 (0.5-5 μg/mL) 或 CpG1018 (0.5 mg/mL)

[0129] 在表1所示的aP加强疫苗的某些实施方案中,白喉类毒素以4Lf/mL的量存在。在表1所示的aP加强疫苗的某些实施方案中,白喉类毒素以5Lf/mL的量存在。

[0130] 在某些实施方案中,aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为4-6Lf的TT、量为1.5-4Lf的DT、量为8-12μg的gdPT、量为2.5-7.5μg的FHA、量为2.5-7.5μg的PRN、量从约5-10μg的FIM2,3、量为0.125-0.375mg的AlOOH以及量不超过5μg的TLR4激动剂如E6020。

[0131] 在某些实施方案中,aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为4-6Lf的TT、量为1.5-4Lf的DT、量为8-12μg的gdPT、量为2.5-7.5μg的FHA、量为2.5-7.5μg的PRN、量从约5-10μg的FIM2,3、量为0.125-0.375mg的AlOOH以及量为125-375μg的TLR9激动剂如CpG1018。

[0132] 在某些实施方案中,aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为4.5-5.5Lf的TT、量为1.5-3Lf的DT、量为9-11μg的gdPT、量

为4-6 $\mu$ g的FHA、量为4-6 $\mu$ g的PRN、量从约7-8 $\mu$ g的FIM2,3、量为0.3-0.35mg的A100H以及量为0.25-2.5 $\mu$ g的TLR4激动剂如E6020。

[0133] 在某些实施方案中,aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分:量为4.5-5.5Lf的TT、量为1.5-3Lf的DT、量为9-11 $\mu$ g的gdPT、量为4-6 $\mu$ g的FHA、量为4-6 $\mu$ g的PRN、量从约7-8 $\mu$ g的FIM2,3、量为0.3-0.35mg的A100H以及量为200-300 $\mu$ g的TLR9激动剂如CpG1018。

[0134] 在某些实施方案中,aP加强疫苗呈用于向人类受试者施用的单位剂量形式,并且每0.5mL剂量包含以下组分,如表2所示:

[0135] 表2

组分	量
破伤风类毒素	5 Lf
白喉类毒素	2-2.5 Lf
经遗传脱毒的百日咳毒素	10 $\mu$ g
丝状血凝素	5 $\mu$ g
百日咳杆菌粘附素	5 $\mu$ g
2型和3型纤毛	7.5 $\mu$ g
铝盐 (AlOOH)	0.33 mg Al
TLR激动剂	E6020 (0.25-2.5 $\mu$ g) 或 CpG1018 (250 $\mu$ g)

[0136] 在表1所示的aP加强疫苗的某些实施方案中,白喉类毒素以2Lf的量存在。在表1所示的aP加强疫苗的某些实施方案中,白喉类毒素以2.5Lf的量存在。

[0137] 在某些实施方案中,aP加强疫苗被配制成含有除破伤风类毒素、白喉类毒素或鲍特菌属抗原以外的抗原。例如,在某些实施方案中,aP加强疫苗包含以下中的一种或多种:b型流感嗜血杆菌寡糖或多糖(Hib)缀合物、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和/或灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)。

[0138] 本文所述的aP加强疫苗可以被配制为可注射的液体溶液或乳剂。例如,可以将破伤风类毒素、白喉类毒素和鲍特菌属抗原与和抗原相容的药学上可接受的赋形剂混合。此类赋形剂可以包括水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇及其组合。aP加强疫苗还可以含有辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂或增强其有效性的佐剂。

[0139] 通常,aP加强疫苗将以水性形式来配制。通常,aP加强疫苗的组分将用Tris缓冲盐水来稀释,以获得所需的最终浓度。可替代地,用于配制的稀释剂可以是注射用水。

#### 施用aP加强疫苗的方法

[0140] 本文所述的aP加强疫苗适于向人类受试者施用。因此,一个方面涉及在人类受试者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述人类受试者施用如本文所述的aP加强疫苗。还描述了aP加强疫苗,用于在人类受试者中诱导免疫反应和/或用于在人类受试者中将Th2偏倚免疫反应重新定向为Th1偏倚免疫反应或Th1/Th17偏倚免疫反应。

[0141] 通常,在施用aP加强疫苗前,人类受试者已接受过wP疫苗、没有接受过百日咳疫苗或接受过aP初免疫苗,所述aP初免疫苗诱导Th2偏倚免疫反应。通常,当已接受过aP初免

苗的人类受试者接受不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如, ADACEL<sup>®</sup>)时,不含TLR激动剂的aP加强疫苗加强由aP初免疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应,从而维持由aP初免疫苗诱导的Th2偏倚。相比之下,本文所述的含TLR激动剂的经修饰的aP加强疫苗出乎意料地将由aP初免疫苗诱导的Th2偏倚免疫反应重新定向或转变为Th1偏倚免疫反应或Th1/Th17偏倚免疫反应。

[0142] 在某些实施方案中,与由aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如, ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比, Th1偏倚免疫反应的特征在于以下中的一种或多种: IL-5产生减少、IFN- $\gamma$ 产生增加或IgG1/IgG2a比率降低。在某些实施方案中,与由aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如, ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比, Th1偏倚免疫反应的特征在于IL-5产生减少和/或IgG1/IgG2a比率降低。

[0143] 在某些实施方案中,与由aP初免疫苗或不含有TLR激动剂的aP加强疫苗(例如, ADACEL<sup>®</sup>)诱导的免疫反应相比, Th1/Th17偏倚免疫反应的特征在于IL-17产生增加以及以下中的一种或多种: IL-5产生减少和/或IgG1/IgG2a比率降低。

[0144] 在施用aP加强疫苗前,aP初免疫苗可以作为单剂或一系列多剂(例如,2、3、4或5剂)来施用。通常,将aP初免疫苗以一系列剂量来施用,尤其是对于儿童而言。例如,在某些实施方案中,将aP初免疫苗在6周与6岁之间的婴儿和儿童中作为一系列五剂来施用。aP初免疫苗也可以在6周与4岁之间的婴儿和儿童中作为一系列四剂来施用。通常,儿童的初次免疫计划包括在2月龄、4月龄、6月龄、15-20月龄和4-6岁时施用aP初免疫苗。

[0145] 通常在初次免疫计划完成之后施用aP加强疫苗。在某些实施方案中,将aP加强疫苗施用给10岁或以上的人类受试者。在某些实施方案中,将aP加强疫苗施用给4岁或以上的人类受试者。

[0146] 通常,通过肌内注射施用aP疫苗加强剂。

[0147] 在某些实施方案中,aP初免疫苗包含破伤风类毒素、白喉类毒素、脱毒百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素和任选的FIM2,3,条件是aP初免疫苗不含有TLR激动剂。

[0148] 在某些实施方案中,aP初免疫苗包括一剂或多剂的 DAPTACE L<sup>®</sup>、PENTACEL<sup>®</sup>、QUADRACEL<sup>®</sup>、INFANRIX<sup>®</sup>、INFANRIX-HEXA<sup>®</sup>、KINRIX<sup>®</sup>、PEDIARIX<sup>®</sup>或VAXELIS<sup>®</sup>。在某些实施方案中,aP初免疫苗包括DAPTACEL<sup>®</sup>。在某些实施方案中,aP初免疫苗包括PENTACEL<sup>®</sup>或QUADRA CEL<sup>®</sup>。在某些实施方案中,aP初免疫苗包括INFANRIX<sup>®</sup>或INFANRIX-HEXA<sup>®</sup>。在某些实施方案中,aP初免疫苗包括KINRIX<sup>®</sup>或PEDIARIX<sup>®</sup>。在某些实施方案中,aP初免疫苗包括VAXELIS<sup>®</sup>。

#### 实施例

[0149] 材料与方法-通用

[0150] 百日咳鲍特菌激发

[0151] 使百日咳鲍特菌18323在补充有1%甘油、20%去纤维蛋白羊血(Sanofi Pasteur, Alba La Romaine)的Bordet-Gengou琼脂(Difco)上生长。在36°C下24h之后,将菌落转移到1%酪蛋白氨基酸(Difco)缓冲液中,并且测量细菌悬浮液的光密度。将5x10<sup>6</sup>个菌落形成单

位 (CFU) 以 30 $\mu$ l 的体积鼻内滴入通过肌内注射 Imalgen (氯胺酮 60mg/kg; Merial SAS) 和 Rompun (甲苯噻嗪 (Xylazine) 4mg/kg; Bayer) 麻醉的小鼠中。然后在感染后 2 小时通过腹膜内注射 Dolethal (戊巴比妥 180mg/kg; Vétoquinol SA) 对小鼠实施安乐死以定量肺中的活百日咳鲍特菌 CFU 的初始数量，并且在第 3 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天或第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天对小鼠实施安乐死以确定细菌定植。简而言之，将肺匀浆铺板在 Bordet-Gengou 琼脂板上，并且在 36°C 下孵育 4 天之后计数 CFU 的数量。保护功效的度量表示为幼稚对照小鼠与免疫小鼠之间的清除曲线下面积 (AUC) 的比率。

[0152] 佐剂配方 (所有实施例)

[0153] 经修饰的 Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强剂和经修饰的 Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强剂 (用于小鼠) 含有 10Lf/ml TT、4Lf/ml DT、20 $\mu$ g/ml gdPT、10 $\mu$ g/ml PRN、15 $\mu$ g/ml FIM2/3、10 $\mu$ g/ml FHA 和 0.66mg/ml 铝 (A100H) 以及 500 $\mu$ g/ml CpG1018 (TLR9 激动剂) 或 10 $\mu$ g/ml E6020 (TLR4 激动剂)。

[0154] 抗原、佐剂与免疫 (所有实施例)

[0155] 用 1/5 人剂量 (在两条后腿中 50 $\mu$ l) 的以下疫苗对小鼠进行肌内初免：小儿白喉-破伤风-无细胞百日咳 (aP) **DAPTACEL®** 疫苗 (Sanofi Pasteur)，其含有 10 $\mu$ g 经化学脱毒的 PT、5 $\mu$ g FHA、3 $\mu$ g PRN 和 5 $\mu$ g FIM2,3 以及破伤风和白喉类毒素 (在实施例和附图中简称为 DTaP)；或白喉-破伤风-全细菌细胞百日咳 (wP) D.T.COQ/D.T.P 疫苗 (Sanofi Pasteur)，其含有  $\geq 4$ I.U. 的在硫柳汞存在下被热灭活的百日咳鲍特菌 (在实施例和附图中简称为 DTwP)。用 1/5 人剂量 (在两条后腿中 50 $\mu$ l) 的以下制剂对受体小鼠进行肌内加强免疫：小儿白喉-破伤风-aP **ADACEL®** 疫苗 (Sanofi Pasteur)，其含有 2.5ug 经化学脱毒的 PT、5ug FHA、3 $\mu$ g PRN 和 5 $\mu$ g FIM2,3 以及破伤风和白喉类毒素 (在实施例和附图中简称为 Tdap)；D.T.COQ/D.T.P 疫苗 (即，DTwP)；或上述经修饰的 Tdap 加强制剂 (在实施例和附图中简称为 经修饰的 Tdap 或 mTdap)。

[0156] 荧光免疫斑点法 (所有实施例)：

[0157] 使用荧光免疫斑点测定 (利用荧光团标记的检测试剂的酶联免疫斑点法 (ELISPOT)) 检测脾 IFN- $\gamma$ 、IL-5 或 IL-17 细胞因子分泌细胞。简而言之，用 50 $\mu$ L 的 35% 乙醇将 96 孔 IPFL 封底微孔板 (Millipore) 的膜预润湿 30 秒。然后除去乙醇，并且将每个孔用无菌 PBS 洗涤 3 次。然后通过添加 100 $\mu$ L/孔的 10 $\mu$ g/ml 的大鼠抗小鼠 IFN- $\gamma$ 、大鼠抗小鼠 IL-5 或大鼠抗小鼠 IL-17 抗体溶液 (PharMigen) 包被微孔板，并且在 +4°C 下孵育过夜。在第二天，将板用无菌 PBS 洗涤 3 次，然后在 +37°C 下用 200 $\mu$ L 的 RPMI GSP $\beta$  10% FBS 封闭 2 小时。在将板洗涤之后，将 106 个新鲜分离的脾细胞/孔与百日咳抗原 (PT 2.5 $\mu$ g/ml；PRN 5 $\mu$ g/ml；FIM 5 $\mu$ g/ml；FHA 5 $\mu$ g/ml) 或作为阳性对照的伴刀豆球蛋白 A (Con A, 2.5 $\mu$ g/ml) 在鼠 IL-2 (10U/ml) 的存在下一起孵育。在孵育 24 小时 (对于 IFN  $\gamma$  和 IL-17) 和 48 小时 (对于 IL-5) 之后，将板用补充有 0.05% BSA 的 PBS (200 $\mu$ L/孔) 洗涤 6 次。在洗涤之后，在黑暗中于室温下经 2 小时添加 100 $\mu$ L/孔的生物素化的抗小鼠 IFN- $\gamma$  (2 $\mu$ g/ml) 或抗小鼠 IL-5 (1 $\mu$ g/ml) 或抗小鼠 IL-17 (1 $\mu$ g/ml) 抗体。然后，将板用 PBS-BSA 0.05% (200 $\mu$ L/孔) 洗涤 3 次。然后，将 100 $\mu$ L/孔的 1 $\mu$ g/ml 的在 PBS-BSA 0.05% 中的链霉亲和素-PE 在黑暗中于室温下孵育 1 小时。将板用 PBS-BSA 0.05% (200 $\mu$ L/孔) 进一步洗涤 6 次。将板在黑暗中储存在 +5°C  $\pm$  3°C 下直到读取为止。用自动 ELISPOT 荧光读板器 (Microvision) 枚举对应于 IFN- $\gamma$ 、IL-5 或 IL-17 分泌细胞的每个斑点。结果表示

为每106个脾细胞中IFN- $\gamma$ 、IL-5或IL-17分泌细胞的数量。计算每组的几何平均值和标准差。

[0158] 抗体定量

[0159] 在多重U-PLEX测定 (Meso-Scale Diagnostics, 马里兰州洛克维尔) 中滴定对百日咳抗原 (FIM、PT、FHA、PRN) 、白喉类毒素和破伤风类毒素具有特异性的血清 IgG1 和 IgG2a 抗体。

[0160] U-PLEX 测定由 5 个独特的 U-PLEX 接头组成, 所述接头与 96 孔 U-PLEX 板上的 5 个单独斑点特异性地结合。基于生物素的捕获偶联机制涉及两步过程: (1) 使接头与生物素化的抗原结合和 (2) 使接头偶联的抗原与板结合。添加血清样品、对照和参考血清的连续稀释液, 进行洗涤步骤, 并且使用 SULFO-TAG<sup>TM</sup> 标记的抗 IgG1 或 SULFO-TAG<sup>TM</sup> 标记的抗 IgG2a 检测与包被抗原结合的 IgG1 或 IgG2a 抗体。

[0161] 实施例 1

[0162] 经遗传脱毒的 PT (gdPT) 与经化学脱毒的 PT (PTxd) 的免疫原性比较

[0163] 进行了一项研究, 以比较经遗传脱毒的百日咳毒素 (gdPT) 的免疫原性与经化学脱毒的 PT (PTxd) 的免疫原性。幼稚 CD1 小鼠的组接受了两次 gdPT 或 PTxd 免疫, 每次间隔三周 (在第 0 天和第 21 天), 每只小鼠剂量为 2.5、0.5、0.1 或 0.02 $\mu$ g。另外, 为了评价 gdPT 加强由 PTxd 引发的反应的能力, 用单次 0.5 $\mu$ g 剂量的 PTxd 对一组小鼠进行免疫, 随后以每剂 0.5 $\mu$ g 进行两次 gdPT 免疫, 每次间隔 3 周 (在第 0 天、第 21 天和第 42 天)。100 $\mu$ L 注射量的所有制剂都含有 0.066mg AlPO<sub>4</sub>。在第二次免疫之后 17 天 (第 38 天) 和在第三次免疫之后 8 天 (第 50 天) 收集血液样品, 以通过百日咳毒素特异性 ELISA 分析 IgG1 和 IgG2a 滴度并分析 PT 中和抗体滴度。

[0164] 与 PTxd 的制剂相比, 含有 gdPT 的制剂诱导了更强且剂量依赖性的抗 PT 特异性 IgG1 和 IgG2a 反应, 特别是在较低剂量下, 以及更高的 PT 中和抗体滴度 (图 1A 至图 1B)。gdPT 和 PTxd 两者都能够类似地加强由 PTxd 引发的 PT 特异性 IgG1 和 IgG2a 反应 (图 2A)。然而, 在用 PTxd 初免的小鼠中, 与用 PTxd 进行加强免疫相比, 用 gdPT 进行加强免疫导致 PT 中和抗体滴度更高 (图 2B)。

[0165] 接下来, 进行了一项研究, 以评估在 Tdap 疫苗中用 gdPT 代替 PTxd 是否对其他疫苗组分的免疫原性产生影响。为了解决这种可能性, 将含有 PTxd 的对照 Tdap 疫苗制剂的免疫原性与含有 gdPT 的疫苗制剂的免疫原性进行了比较。将含有 2.0、0.1 或 0.02 $\mu$ g/剂的 gdPT 的疫苗用其他 Tdap 疫苗抗原 (100 $\mu$ L 中每只小鼠剂量 1Lf 破伤风类毒素、0.4Lf 白喉类毒素、1 $\mu$ g FHA、1 $\mu$ g PRN、1.5 $\mu$ g FIM2,3 和 66 $\mu$ g 铝 (Al100H, 或 1/5 人剂量) 组合地配制。配制了作为比较物的具有相同 Tdap 抗原浓度的含有 2 $\mu$ g 经化学脱毒 PT 的对照 Tdap 疫苗。这项研究还包括单独接受了在 Al100H 中的每剂 0.1 或 0.02 $\mu$ g 的 gdPT 的小鼠的组。CD1 小鼠接受了三次疫苗制剂免疫 (间隔三周), 并且在最后一次免疫之后 7 天被处死。在第二次免疫之后 10 天收集血液样品 (图 3), 并且在处死时收集血液样品, 以分析 PT 特异性 IgG1 和 IgG2a 滴度以及 PT 中和抗体反应 (图 4A 至图 4B)。

[0166] 与含有每剂 2 $\mu$ g PTxd 的在其他方面相同的对照 Tdap 疫苗相比, 含有 gdPT 的经修饰的 Tdap 疫苗 (每剂 2 $\mu$ g, 并且每只小鼠免疫 3 次) 引起了更高的 PT 中和抗体滴度 (图 4B), 尽管含 gdPT 和含 PTxd 的 Tdap 疫苗具有相当的 PT 特异性 IgG1 和 IgG2a 滴度 (图 4A)。此外, 针对 FIM

的IgG1和IgG2a抗体滴度在含gdPT的Tdap制剂与含PTxd的Tdap制剂之间是可比的(图3)。对于其他疫苗抗原(即,破伤风类毒素、白喉类毒素、FHA和PRN),观察到类似的IgG1和IgG2a谱。因此,gdPT不影响由其他疫苗抗原诱导的抗体反应(图3)。然而,其他Tdap疫苗抗原的存在似乎降低了由低剂量的gdPT诱导的PT中和抗体滴度(图4A、图4B)。具体地,在第三次免疫之后7天由0.1 $\mu$ g gdPT诱导的平均对数PT中和滴度在不存在其他Tdap抗原的情况下显著高于(0.7倍)在具有Tdap抗原的情况下(图4B),尽管没有观察到对PT特异性IgG1和IgG2a滴度的影响(图4A)。

[0167] 总之,在Tdap制剂中,gdPT被证实比PTdx更具免疫原性。此外,gdPT不干扰疫苗制剂中其他Tdap抗原的免疫原性。

[0168] 实施例2:使用长初免-加强免疫计划,TLR佐剂将DTaP诱导的Th2免疫记忆反应重新定向为Th1免疫记忆反应

[0169] 为了测试经修饰的Tdap制剂加强和再极化先前建立的Th2偏倚记忆反应的能力,应用了长免疫计划。在这项研究中,通过肌内注射DTaP疫苗对8只CD1小鼠的组进行初免,以建立Th2偏倚记忆反应。在第一个研究中,6周后(第42天)用经修饰的Tdap(gdPT+E6020-A100H)制剂或经修饰的Tdap(gdPT+CpG1018-A100H)制剂对小鼠进行加强免疫。在第二个研究中,小鼠接受了两剂经修饰的Tdap加强疫苗,第一剂在6周(第42天)并且第二剂在12周(第84天)。通过测量在体外抗原再刺激之后的离体脾细胞因子产生细胞或上清液中细胞因子产生来评价经修饰的Tdap加强制剂将免疫记忆反应重新定向为Th1免疫记忆反应的潜力。还确定了在最后一次免疫之后1、3和6周收集的血清中的破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、PT、FHA、PRN和FIM的抗体滴度(IgG1和IgG2a)。作为对照,用DTwP疫苗对一组小鼠进行免疫(初免),随后用DTwP疫苗进行免疫(加强免疫);并且用DTaP疫苗对另一组进行免疫(初免),随后用具有gdPT-A100H(20 $\mu$ g/ml gdPT)但没有TLR激动剂的经修饰的对照Tdap疫苗制剂(即,经修饰的对照Tdap(gdPT-A100H))进行加强免疫。

[0170] 与DTaP/经修饰的对照Tdap(gdPT-A100H)(初免/加强免疫)计划相比,DTwP/DTwP(初免/加强免疫)计划诱导了更少的Th2偏倚免疫谱,如通过更弱的IL-5分泌(图5)和更低的IgG1/IgG2a比率(图6A至图6L)证明的。与经修饰的对照Tdap(gdPT-A100H)加强疫苗相比,经修饰的Tdap(gdPT+E6020-A100H)或经修饰的Tdap(gdPT+CpG101-A100H)加强制剂诱导了显著降低的IL-5产生(图5)。然而,这些具有TLR激动剂佐剂的新的经修饰的Tdap制剂都没有改变在经修饰的对照Tdap(gdPT-A100H)情况下观察到的IFN- $\gamma$ 水平(图5)。与朝向较少Th2偏倚反应的总体细胞因子平衡一致,在被经修饰的Tdap(gdPT+E6020-A100H)或经修饰的Tdap(gdPT+CpG1018-A100H)疫苗加强免疫的小鼠中观察到较低的IgG1/IgG2a比率(图6A至图6L)。在用mTdap-CpG-A100H免疫之后,与用不含有TLR激动剂的mTdap-A100H免疫的小鼠相比,在一次加强免疫之后针对抗FHA并且在两次加强免疫之后针对抗FIM观察到IgG1/IgG2a比率的统计学显著降低(图6A和图6D)。在用mTdap-E6020-A100H免疫之后,与用不含有TLR激动剂的mTdap-A100H免疫的小鼠相比,在一次加强免疫之后针对抗FHA观察到IgG1/IgG2a比率的统计学显著降低(图6A)。在DTaP初免的小鼠中,与没有TLR激动剂的经修饰的对照Tdap(gdPT-A100H)加强疫苗相比,在被经修饰的Tdap(gdPT+E6020-A100H)或经修饰的Tdap(gdPT+CpG1018-A100H)制剂加强免疫之后针对IL-17分泌没有观察到统计学显著差异(图5)。

[0171] 总之,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 疫苗能够在DTaP初免的小鼠中改变朝向较少Th2偏倚反应的T辅助细胞反应的平衡,从而实现T辅助反应再极化和Th1/Th2平衡的转变。

[0172] 实施例3:百日咳免疫的过继转移模型

[0173] 在不存在通过DTaP疫苗接种诱导的循环抗体的情况下,测试了经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 制剂再激活DTaP诱导的用于百日咳鲍特菌保护的免疫记忆反应的能力。

[0174] 人与小鼠之间的一个差异是通过DTaP初免诱导的血清抗体的寿命。虽然这些抗体在人中迅速减弱,但小鼠中延长的抗体持久性可能会干扰加强反应的读出,从而影响经修饰的Tdap加强制剂的评价。为了解决这个差异,使用鼠双重转移模型来消除通过DTaP疫苗接种诱导的循环抗体 (Gavillet等2015Vaccine),如图7中总结的。在这种情况下,用DTwP或DTaP对成年BALB/c小鼠进行一次初免,并且在六周后收获其脾细胞,并且将( $50 \times 10^6$ 个脾细胞)转移给受体幼稚BALB/c小鼠。通过DTwP(仅在DTwP初免背景下)、Tdap、经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂或经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 制剂对受体小鼠进行加强免疫。六周后,收获加强免疫的小鼠的脾细胞,并且将( $50 \times 10^6$ 个脾细胞)转移给新的受体幼稚的BALB/c小鼠。在转移之后一周,用 $10^6$ 个活百日咳鲍特菌激发双重过继转移受体小鼠,并且在激发之后第0天、第7天、第10天、第14天或第21天将其处死。在不存在通过疫苗接种诱导的循环抗原特异性抗体的情况下,测量处死小鼠的肺中的细菌计数作为有效免疫回忆反应的指示(图9A至图9B)。还通过检测在加强免疫之后7、14、21、28和42天收集的血清中的PT、PRN、FHA和FIM2,3特异性IgG抗体反应来监测疫苗诱导的反应(图8A至图8B)。加速且更高的疫苗抗原IgG滴度是过继转移的小鼠中回忆抗体反应的特征。

[0175] 在百日咳鲍特菌激发时不存在循环抗体的情况下,DTwP/DTwP(初免/加强免疫)小鼠中的记忆细胞提供了早期的百日咳鲍特菌控制并促进了细菌从肺中清除(图9A),这至少部分地由于对百日咳疫苗抗原(如PT和PRN)具有特异性的抗体的迅速产生(图8A)。相比之下,与幼稚对照动物相比,DTaP初免/Tdap加强免疫没有加速肺中的细菌清除(图9A至图9B)。在这个过继转移模型中,与接受Tdap加强免疫的小鼠相比,用DTaP初免并用经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强免疫的小鼠显示出加速且更高的抗PT、FHA、FIM IgG滴度(图8B)。

[0176] 尽管PT特异性IgG抗体反应增强,但在Tdap加强疫苗中用gdPT取代经化学脱毒的PT对百日咳鲍特菌肺清除没有影响(数据未显示)。然而,对于经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 疫苗,观察到抗原特异性记忆反应的强烈再激活。在DTaP初免/经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强免疫组中记录了早期细菌控制和加速的细菌清除,其动力学与DTwP初免/DTwP加强免疫组类似(图9A至图9B)。类似地,在经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 制剂的情况下观察到对PT和FHA疫苗抗原具有特异性的抗体的迅速产生(图8B)。对经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 进行的测试表明了针对一些aP抗原(例如,PT和FHA)的百日咳特异性抗体反应的早期再激活(图8B)。然而,与经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强免疫相比,观察到经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强免疫对早期百日咳鲍特菌控制的影响更小(图9B)。总之,在小鼠中进行的这个过继转移实验证明,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+CpG1018-A100H) 加强制剂能够改善

百日咳特异性回忆抗体反应,从而加速针对细菌定植的保护。

[0177] 实施例3的材料与方法

[0178] 小鼠:成年BALB/cByJ小鼠购自Charles River (L'Arbresle, 法国), 并且在无特定病原体的条件下饲养。使用6-8周龄的小鼠。所有动物实验都根据瑞士和欧洲指南进行, 并且得到了日内瓦兽医办公室 (Geneva Veterinary Office) 的批准。

[0179] 过继转移:在初免或加强免疫之后42天收获脾脏。通过机械破坏器官获得单细胞悬浮液, 并且将其进一步处理以进行红细胞裂解。将 $50 \times 10^6$ 个脾细胞以 $100\mu\text{l}$ 的体积静脉内转移到幼稚受体小鼠中。

[0180] 百日咳鲍特菌激发:使链霉素抗性百日咳鲍特菌Tahoma I衍生株BPSM在补充有1%甘油、10%去纤维蛋白羊血 (Chemie Brunschwig AG) 和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的Bordet-Gengou琼脂 (Difco) 上生长。在 $37^\circ\text{C}$ 下24h之后, 将菌落转移到PBS中, 并且测量细菌悬浮液的光密度。将 $1 \times 10^6$ 个菌落形成单位 (CFU) 以 $20\mu\text{l}$ 的体积鼻内滴入通过腹膜内注射Ketasol (100mg/kg; Graeub) 和Rompun (10mg/kg; Bayer) 麻醉的小鼠中。在感染后3小时将小鼠处死以定量肺中的活百日咳鲍特菌CFU的初始数量, 并且在第7天、第10天、第14天和第21天将小鼠处死以确定细菌定植。简而言之, 将肺匀浆铺板在Bordet-Gengou琼脂板上, 并且在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育4天之后计数CFU的数量。保护功效的度量表示为幼稚对照小鼠与免疫小鼠之间的清除曲线下面积 (AUC) 的比率。

[0181] ELISA:在于指示的时间点收集的血清样品中通过Ag捕获ELISA来确定PT、PRN、FHA和FIM2,3特异性抗体滴度。简而言之, 将96孔板 (Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>; Thermo Fisher Scientific) 在 $4^\circ\text{C}$ 下用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中的PT ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )、PRN ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )、FHA ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或FIM2,3 ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 包被过夜。在用PBS、0.05% Tween 20和1% BSA (Sigma) 在 $37^\circ\text{C}$ 下饱和1h之后, 将孔与单独或合并小鼠血清的2倍连续稀释液在 $37^\circ\text{C}$ 下一起孵育1h。将第二辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗小鼠 IgG、抗小鼠 IgG2a (均来自 Invitrogen) 和抗 IgG1 (BD Pharmingen) 在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育1h, 并且用2,2'-连氨基双[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]-二铵盐 (ABTS) 底物展示1h。在405nm处测量每个孔的光密度, 并且用SoftMax Pro软件分析数据。图8中IgG和IgG1的结果表示为参考WHO/NIBSC参考试剂百日咳鲍特菌抗血清 (NIBSC代码: 97/642) 的连续稀释液确定的Ag特异性滴度的 $\text{Log}_{10}$ , 并且IgG2a的结果表示为参考免疫小鼠的超免疫血清的滴定合并物的连续稀释液确定的Ag特异性滴度的 $\text{Log}_{10}$ 。

[0182] 统计分析:值表示为平均值 $\pm$ SEM。当测试超过2组小鼠时, 使用未配对t检验或单向方差分析, 随后进行Tukey多重比较检验来进行统计分析。所有分析都使用GraphPrism软件进行。p>0.05的差异被认为是不显著的。

[0183] 实施例4:小鼠鼻内激发模型

[0184] 已开发、实施和验证了反映得到许可的百日咳疫苗的临床功效水平的小鼠肺清除模型 (Guiso N. 等, Vaccine. 1999; 17: 2366-76)。WHO推荐将小鼠鼻内激发测定 (INCA) 模型用于新候选疫苗注册的非临床测试, 并且被称为疫苗研发中的有效研究模型 (World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to Assure the Quality Safety and Efficacy of Acellular Pertussis Vaccines. 2011; WHO/BS/2011.2158)。此外, WHO咨询小组已同意, INCA对于评估改变百日咳疫苗配方和/或制造工程的潜在影响是有用的。

[0185] 在这个模型中,在用亚致死剂量进行鼻内激发后,细菌粘附到气管的纤毛上皮上,并且侵入肺中的巨噬细胞。疾病持续存在,持续4-8周,伴有白细胞增多和免疫抑制。在恢复期小鼠再次受到激发后,观察到感染的迅速清除。已显示INCA模型可区分在临床试验中显示出不同功效的无细胞百日咳疫苗(Guiso N.等1999)。

[0186] 使用INCA小鼠模型来评价新的经修饰的Tdap加强疫苗如经修饰的Tdap (gdPT+ CpG1018-A100H) 和经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 疫苗是否将在用DTaP初免的小鼠中引起等于或高于Tdap对照加强疫苗的短期保护水平。图10A示出了使用短计划的小鼠鼻内激发测定 (INCA) 的图形表示,并且图10B示出了使用长计划的小鼠INCA的图形表示。图10C显示使用短计划,在这个模型中,在鼻内激发后,DTwP/DTwP(初免/加强免疫)计划和DTaP/Tdap(初免/加强免疫)计划保护小鼠免于百日咳鲍特菌肺定植。

[0187] 使用短初免-加强免疫计划的小鼠鼻内激发测定

[0188] 按照WHO协调方案 (WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2011) 中所述的,实施了2周时间间隔的短免疫计划。这项研究的读出是肺中细菌载量 (CFU/肺) 的降低以及基于血液中白细胞 (WCB) 计数的高白细胞增多。

[0189] 40只小鼠的组通过肌内途径注射了1/5人剂量的DTaP,并且在两周后接受了第二次注射Tdap、经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 疫苗或用经化学脱毒的PT、A100H配制且没有TLR激动剂的对照Tdap疫苗(对照Tdap (PTxd-A100H))。还包括接受了两次DTwP注射(初免/加强免疫)的组。两个对照组接受了PBS (感染对照) 或单独E6020-A100H佐剂,以确证铝盐和E6020与感染对照相比对定植没有影响。

[0190] 在第二次免疫后两周,通过向鼻孔中滴入百日咳鲍特菌18323悬浮液来激发小鼠。在激发后,在激发后2小时以及在激发后3、7、14和21天处死每组的八只小鼠。将肺无菌地取出并分别匀浆以测量细菌载量。通过在将匀浆的连续稀释液铺板之后计数Bordet-Gengou琼脂板上生长的菌落来确定每个肺的平均CFU。还在激发后收集了血液样品,并且进行了WBC计数。

[0191] 如图11所示,百日咳鲍特菌18323在进入清除期之前在激发后三天在PBS对照小鼠的肺中定植并扩增。在PBS对照小鼠中,完全百日咳鲍特菌肺清除需要超过21天。单独的佐剂对肺定植和疾病没有影响。在激发后3天在所有疫苗接种组中都观察到百日咳鲍特菌肺定植的降低,并且对于所有制剂在激发后14天都达到了基线细菌载量。DTwP引起的百日咳鲍特菌肺清除最快,并且在激发后7天达到了基线。结果显示当与感染对照(在第3天为41og,并且在第7天51og)相比时,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂大幅降低了肺中的细菌载量,从而证明了其在用百日咳鲍特菌18323鼻内激发后具有预防下呼吸道定植的能力。值得注意的是,清除谱更接近DTwP/DTwP(初免/加强免疫)获得的清除谱,并且更远离DTaP/Tdap(初免/加强免疫)获得的清除谱。在第7天在经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂加强免疫与Tdap(含有经化学脱毒的PT) 加强免疫之间获得的细菌载量的差异是显著的( $p$ 值<0.0001)。所有疫苗都具有针对疾病的保护作用(图11),并且预防了高白细胞增多。这项研究证明使用短初免-加强免疫计划,在小鼠INCA中,与Tdap( ADACEL<sup>®</sup> )相比,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂显著加速百日咳鲍特菌清除。

[0192] 使用长初免-加强免疫计划的小鼠鼻内激发测定

[0193] 为了确认新的经修饰的Tdap制剂在具有先前建立的aP引发的免疫背景的小鼠中

的功效,进行了一项研究,以评价使用长初免-加强免疫计划经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 加强剂在小鼠中预防百日咳鲍特菌肺定植和疾病的能力,如上文所讨论。参见图10B。在这项研究中,无细胞百日咳疫苗对照是Tdap疫苗(对照Tdap (PTxd-A100H)),其含有经化学脱毒的PT,但是被修饰以含有与经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂中相同剂量的抗原和铝盐 (A100H),以更好地理解gdPT和TLR激动剂在新的经修饰的Tdap制剂中的作用。

[0194] 40只小鼠的组通过肌内途径注射了1/5人剂量的DTaP,并且在六周后接受了第二次注射经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 或对照Tdap (PTxd-A100H)。还包括用DTwP初免并用DTwP加强免疫的组。在第二次免疫后六周,通过向鼻孔中滴入百日咳鲍特菌18323悬浮液来激发小鼠。在激发后,在激发后2小时以及在激发后1、2、3、7和14天处死每组的八只小鼠。将肺无菌地取出并分别匀浆以测量细菌载量。通过在将匀浆的连续稀释液铺板之后计数Bordet-Gengou琼脂板上生长的菌落来确定每个肺的平均CFU。还在激发后收集了血液样品,并且进行了WBC计数。

[0195] 如图12B所示,当与感染对照相比时,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂早在第1天就大幅降低了肺中的细菌载量(降低61og)。在第1天,在经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 与对照Tdap (PTxd-A100H) 之间也观察到显著差异( $p$ 值=0.007),其中肺中的CFU计数降低了7.7倍。所有疫苗接种小鼠的细菌载量到第7天都恢复到了基线,表明在肺中没有可检测的细菌(图12B)。

[0196] 这项研究证明与没有gdPT或TLR激动剂的Tdap对照相比,经修饰的Tdap (gdPT+E6020-A100H) 制剂在长初免-加强免疫计划中更有效地预防肺定植(至少在感染的早期期间),表明这种作用是由于经修饰的Tdap制剂中包含的gdPT和/或TLR激动剂所致。

[0197] 实施例5:脾细胞中通过荧光免疫斑点法测量的Th17分泌细胞

[0198] 为了研究TLR佐剂将免疫反应从Th2再极化为更多Th-17反应的能力,在以下实验中测量IL-17细胞因子。在剂量-效应设计中,用DTaP组合物对CD1小鼠进行初免,并且在D0和D21用含或不含TLR4佐剂的mTdap-E6020-A100H加强免疫两次,间隔2周。E6020和A100H分别以10 $\mu$ g和66 $\mu$ g的量存在于mTdap制剂中。每0.1mL剂量的mTdap抗原组分如下:

	gdPT ( $\mu$ g)	FHA ( $\mu$ g)	FIM2/3 ( $\mu$ g)	PRN ( $\mu$ g)	D (Lf)	T (Lf)	TLR4 ( $\mu$ g)
每0.1 mL mTdap	2	1	1.5	1	0.4	1	0、0.1、0.5、1、4和10
每0.5 ml HD当量	10	5	7.5	5	1	5	

[0199] 在麻醉(Imalgen/Rompun 80mg/kg氯胺酮和16mg/kg甲苯噻嗪,或100 $\mu$ L/10g异氟醚)下,对于所有组,在D20(200 $\mu$ L)和D35(放血)从小鼠中收集血液样品。通过离体荧光免疫斑点测定分析脾脏细胞中的细胞免疫反应以测量IL-17分泌细胞,并且通过MSD测定分析脾脏细胞中的细胞免疫反应以测量IL-17的分泌。上文描述了荧光免疫斑点技术。使用荧光免疫斑点测定和MSD Uplex试剂盒,在用2.5 $\mu$ g/mL的PTx(图13A)或百日咳抗原合并物(2.5 $\mu$ g/mL PTx、5 $\mu$ g/mL PRN、5 $\mu$ g/mL FIM)(图13B)体外刺激3天之后,在脾细胞上清液中测量Th17细胞因子(IL-17)的产生。

[0200] 如图13A至图13B所示,在注射没有TLR4的mTdap疫苗之后,IL-17分泌细胞频率低

于荧光免疫斑点测定中的阳性截止值(低于19个斑点/10<sup>6</sup>个细胞的线)。当用PT类毒素(PTx)(图13A)或百日咳抗原合并物(图13B)再刺激脾细胞时, mTdap-E6020制剂从0.1μg至4μg/剂以剂量依赖性方式诱导了渐增量的IL-17分泌细胞。当用PTx再刺激时, 含有4μg E6020/剂的mTdap加强疫苗将IL-17分泌细胞频率增加到高于荧光免疫斑点测定中的阳性截止值(图13A); 而当用百日咳抗原合并物再刺激时, 含有0.5、1、4和10μg E6020/剂的mTdap加强疫苗将IL-17分泌细胞频率增加到高于荧光免疫斑点测定中的阳性截止值(图13B)。

[0201] 总体而言, 通过MSD测量的细胞因子分泌谱与通过荧光免疫斑点法测量的细胞因子分泌细胞频率一致(数据未显示)。含有E6020的mTdap制剂以剂量-效应方式诱导了IL-17分泌, 其中从0.5μg至4μg/剂达到了最高效应。

[0202] 实施例6:热稳定性

[0203] 使用Prometheus NT.48系统(Nano Temper Technologies, 德国慕尼黑)进行nanoDSF方法。nanoDSF使用本征荧光来评价蛋白质内的芳香族残基(荧光团)响应于其局部环境的变化的变化。监测荧光发射的位移和强度变化, 其中本征荧光的变化表明蛋白质已解折叠。使用熔解温度(T<sub>m</sub>)来表征蛋白质的热稳定性, 所述温度指示蛋白质的一半被解折叠的点。在nanoDSF方法中, 这是通过使用在330nm和350nm处记录的荧光的比率来确定的。已显示与使用单个波长相比, 这个比率在检测T<sub>m</sub>方面更灵敏。将样品在没有任何进一步制备的情况下填充在毛细管中, 并且在285nm处用100%功率输出进行激发。以2°C/min的扫描速率从20°C至95°C记录热曲线。

[0204] 可以通过nanoDSF评估不同疫苗制剂的三级结构和热稳定性, 以评估在用不同佐剂配制疫苗时是否可以检测到构象差异。对于所有疫苗制剂, 都检测到一个热转变。图14。当mTdap疫苗(gdPT)被吸附到A100H上(mTdap-A100H)时, 它具有74.6°C的热转变。类似地, 当mTdap-A100H制剂含有E6020(mTdap E6020-A100H)时, 热转变为74.2°C。当mTdap-A100H制剂含有CpG(mTdap CpG-A100H)时, 热转变有少量增加, 现在于77.0°C下检测到。

[0205] 虽然在说明书中已描述了一个或多个示例性实施方案, 但本领域普通技术人员将理解, 在不脱离如以下权利要求所限定的本发明构思的精神和范围的情况下, 可以在其中进行形式和细节上的各种改变。

## 序列表

<110> 圣诺菲 • 帕斯图尔公司 (Sanofi Pasteur Inc.)

<120> 百日咳加强疫苗

<130> 0171.0016-PCT

<140>

<141>

<150> 18306621.6

<151> 2018-12-05

<160> 1

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CpG寡核苷酸 (ISS1018)

<400> 1

tgactgtgaa cgttcgagat ga 22

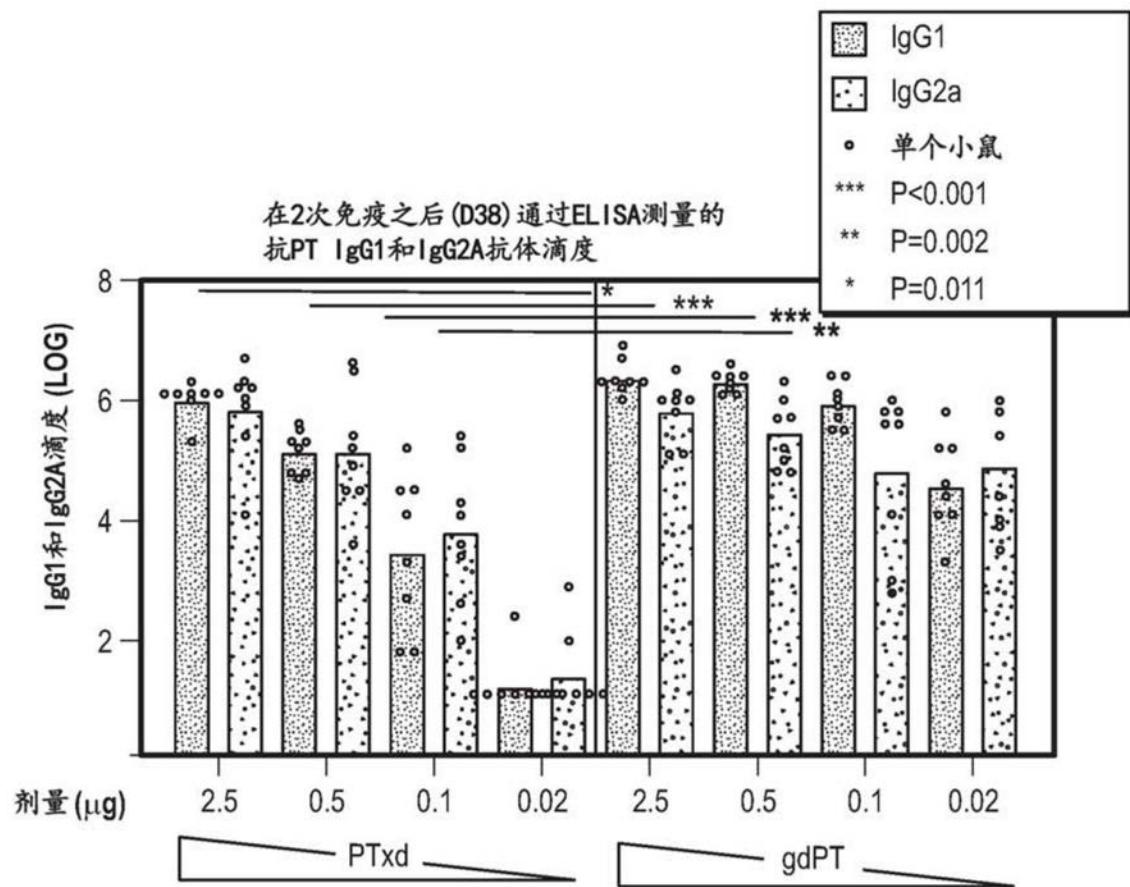


图1A

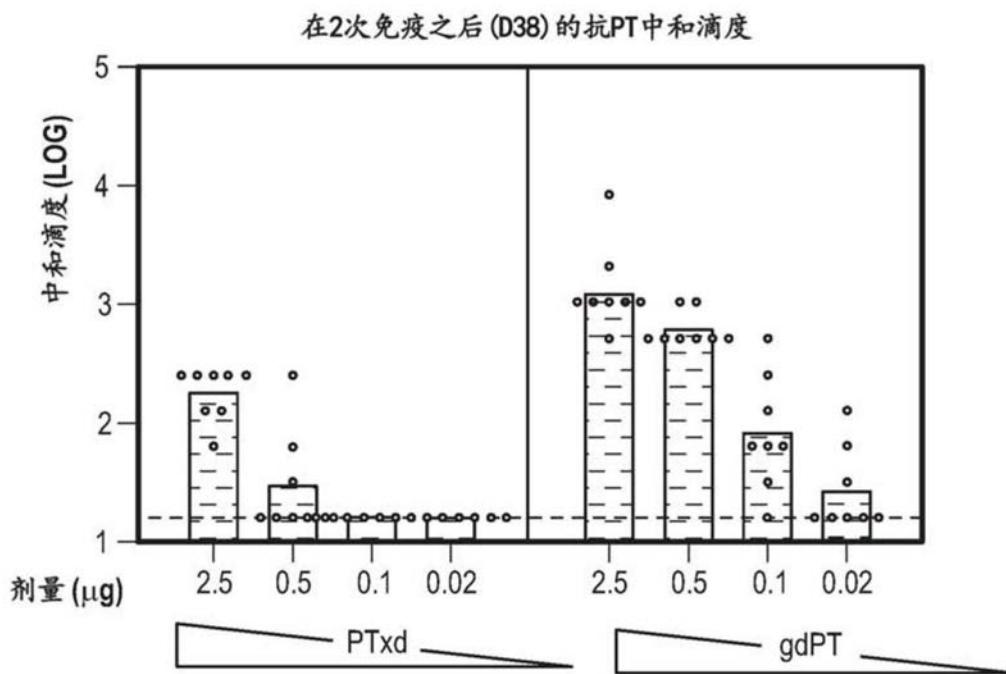


图1B

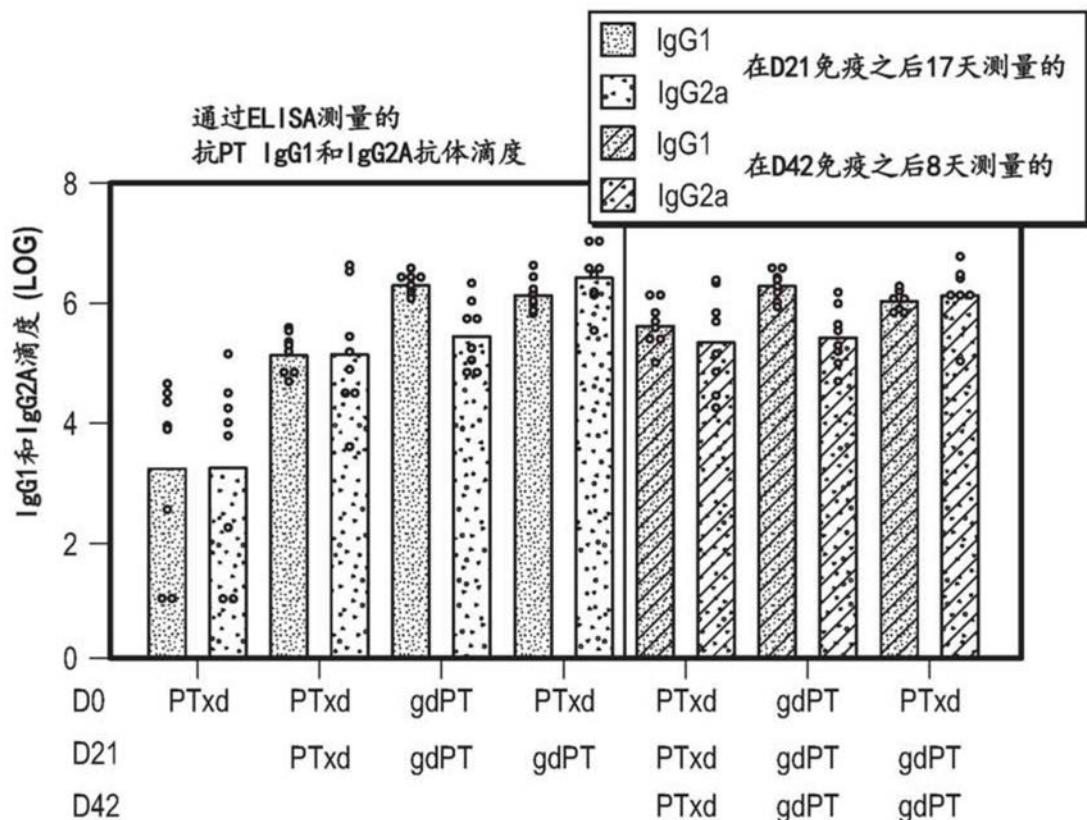


图2A

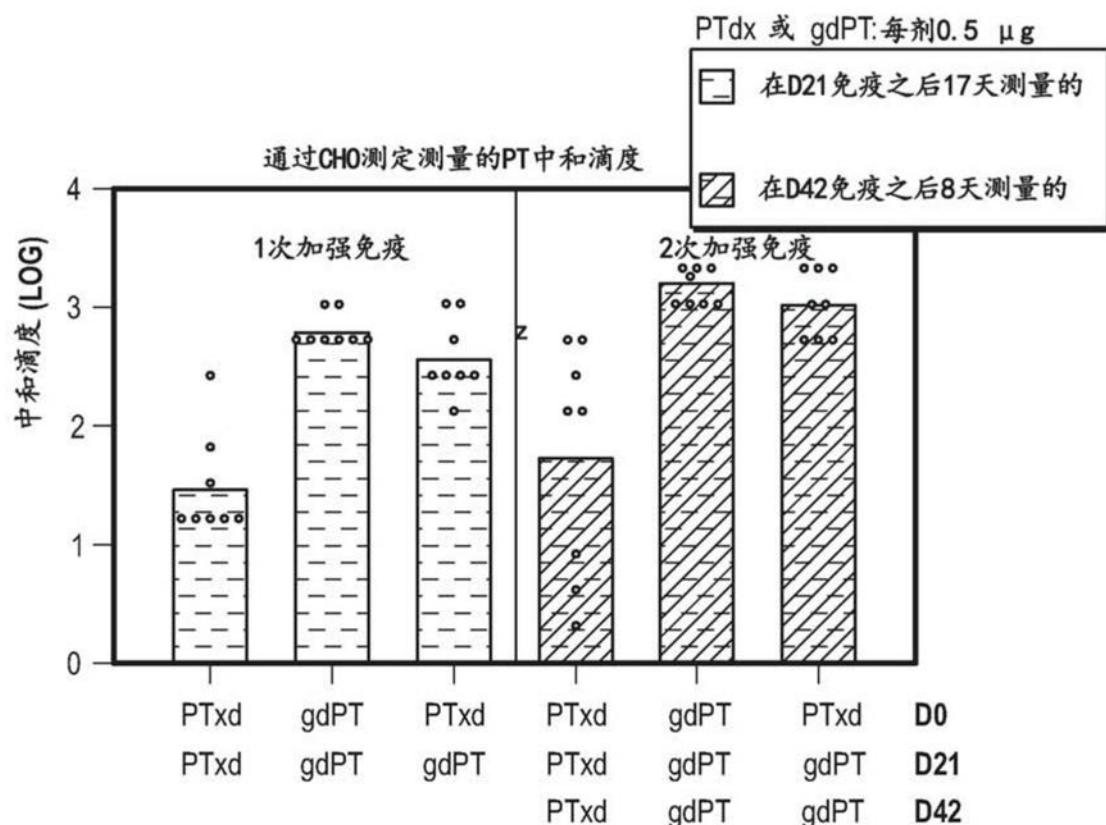


图2B

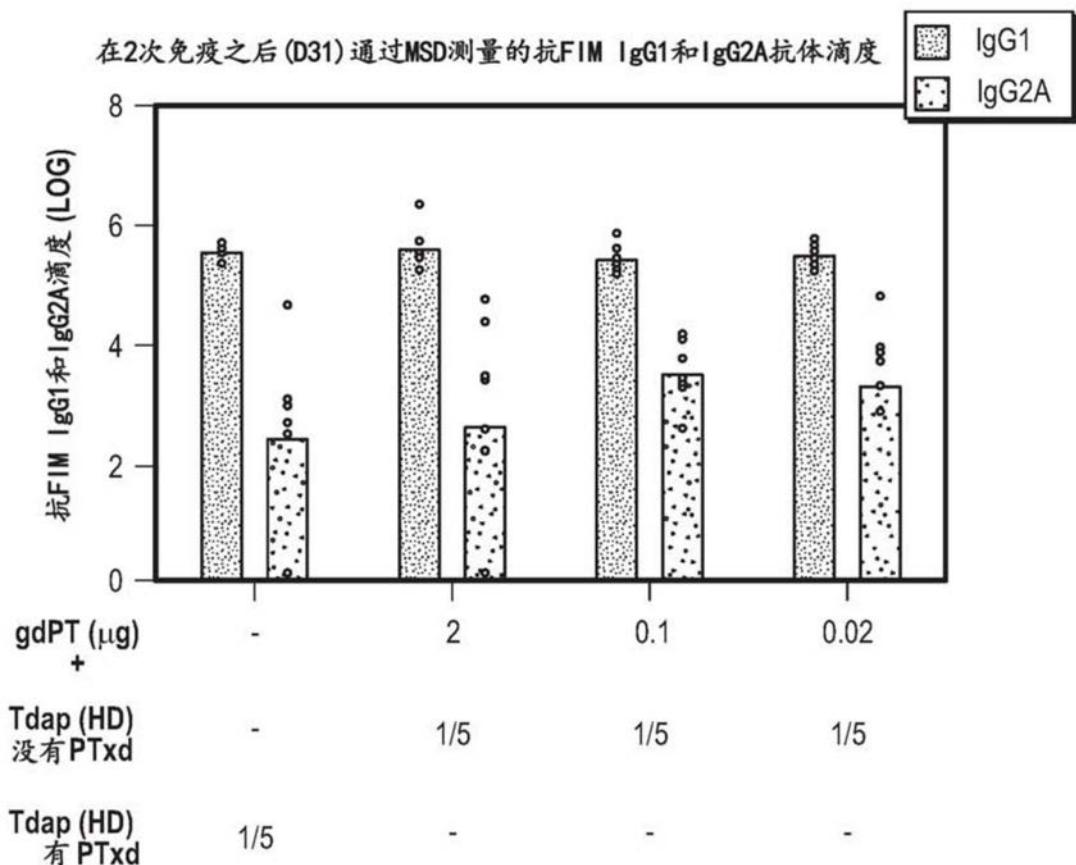


图3

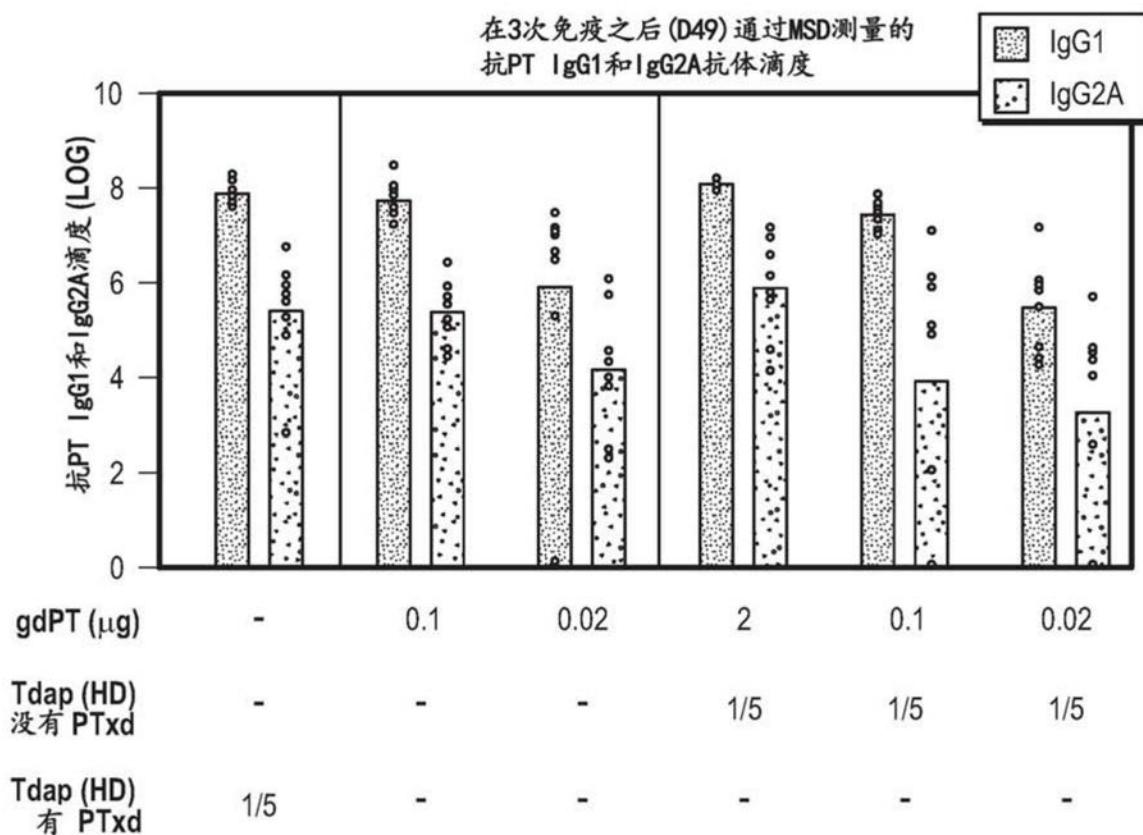


图4A

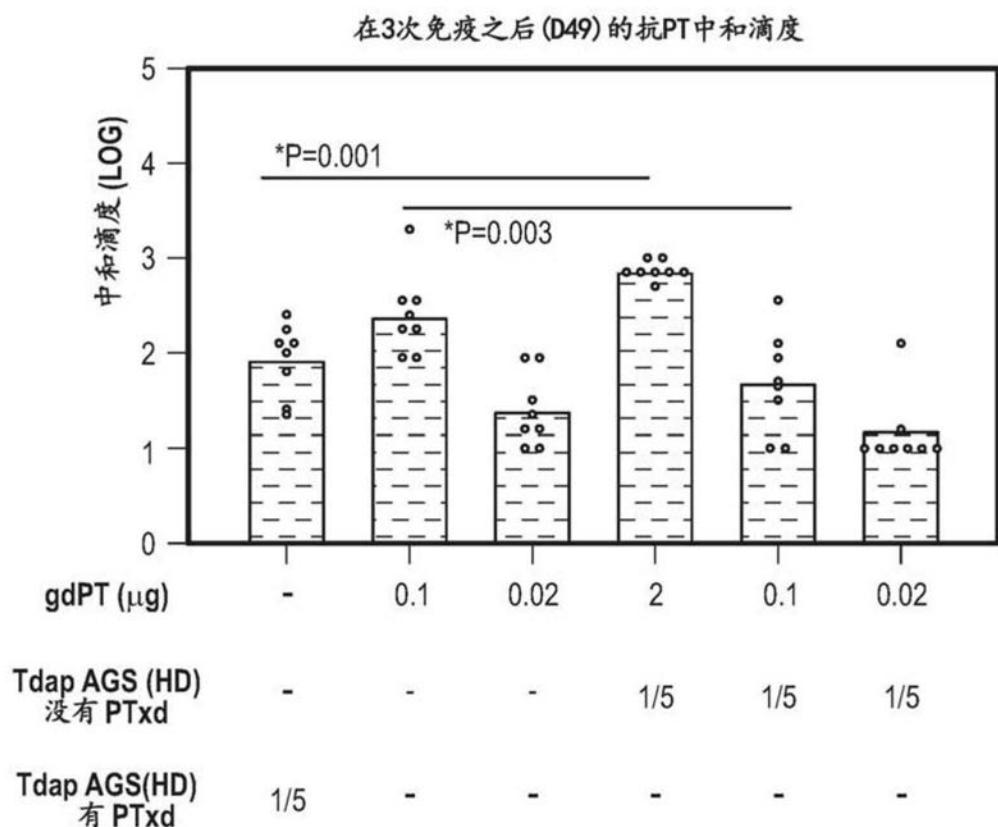


图4B

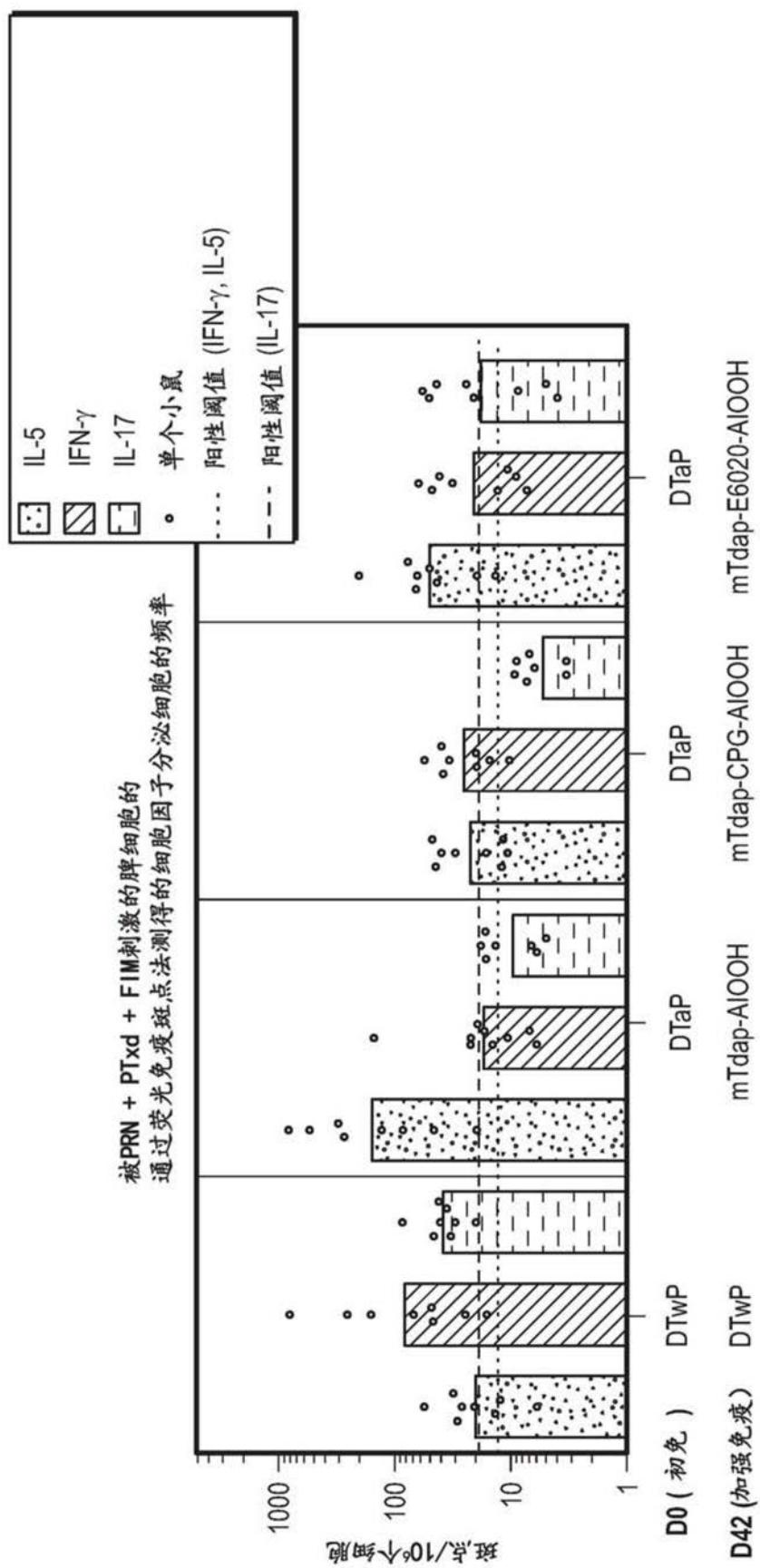


图5

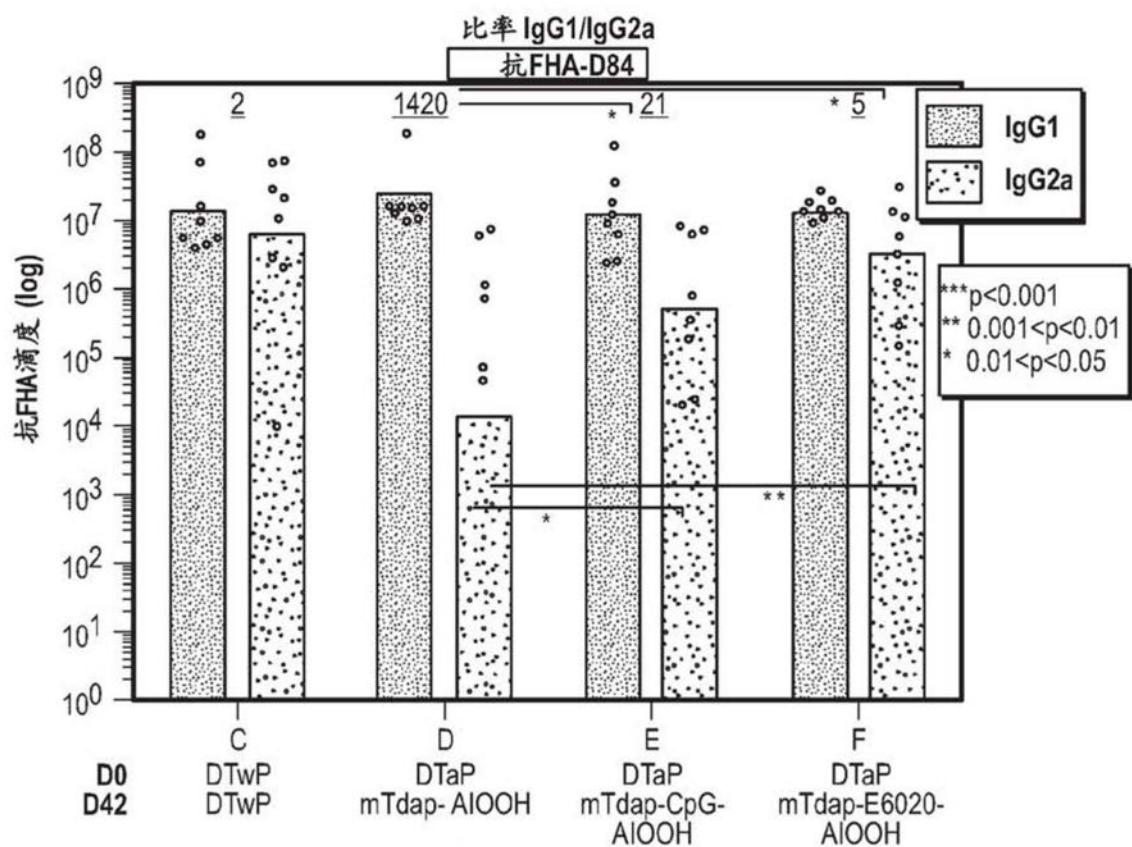


图6A

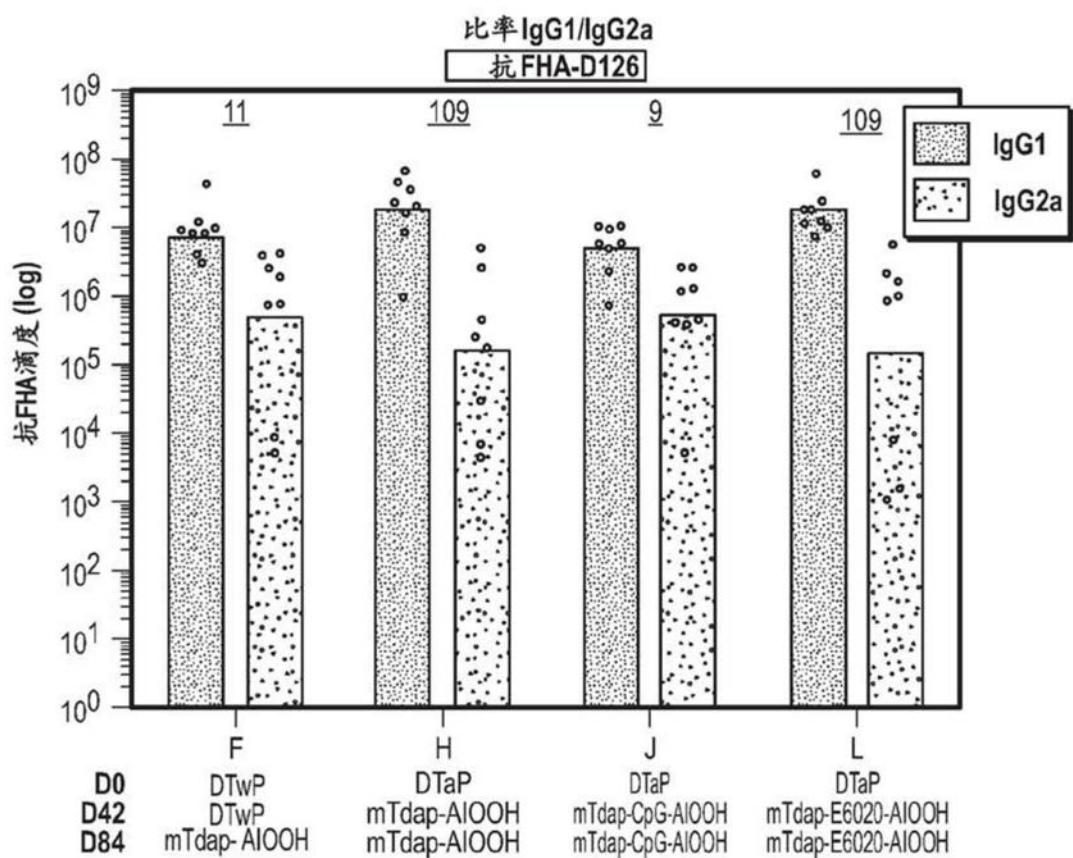


图6B

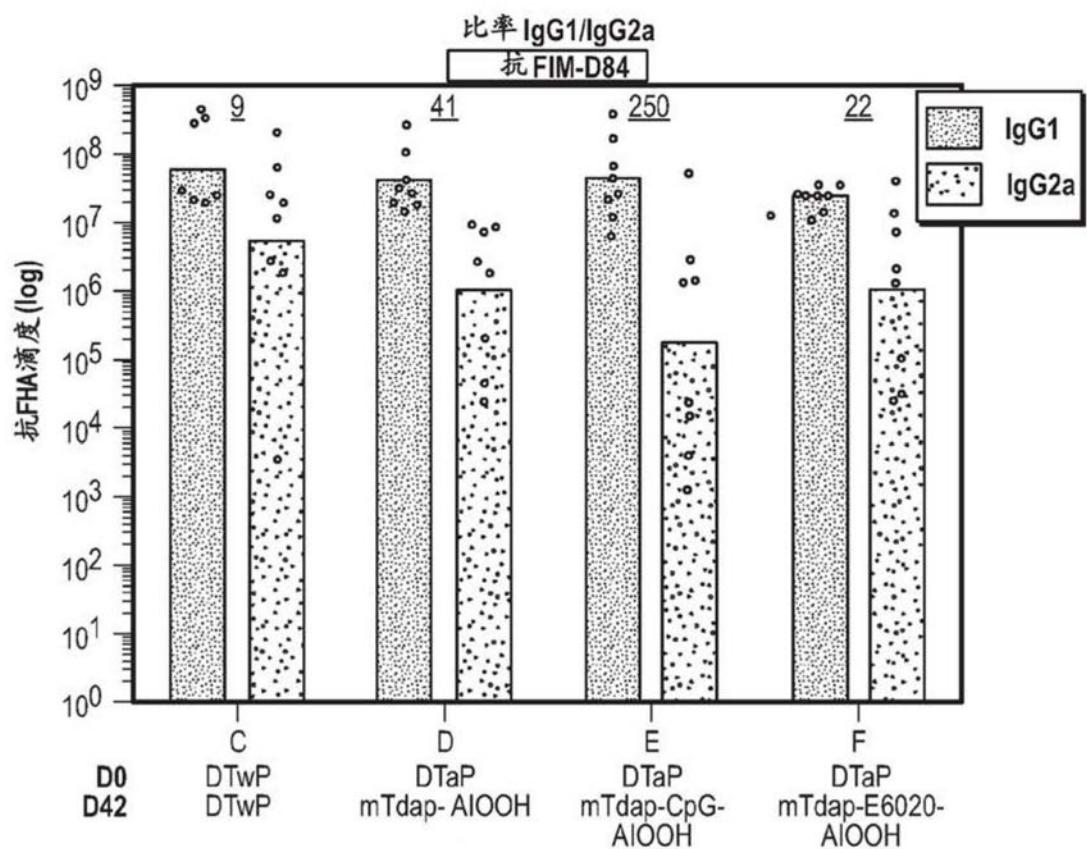


图6C

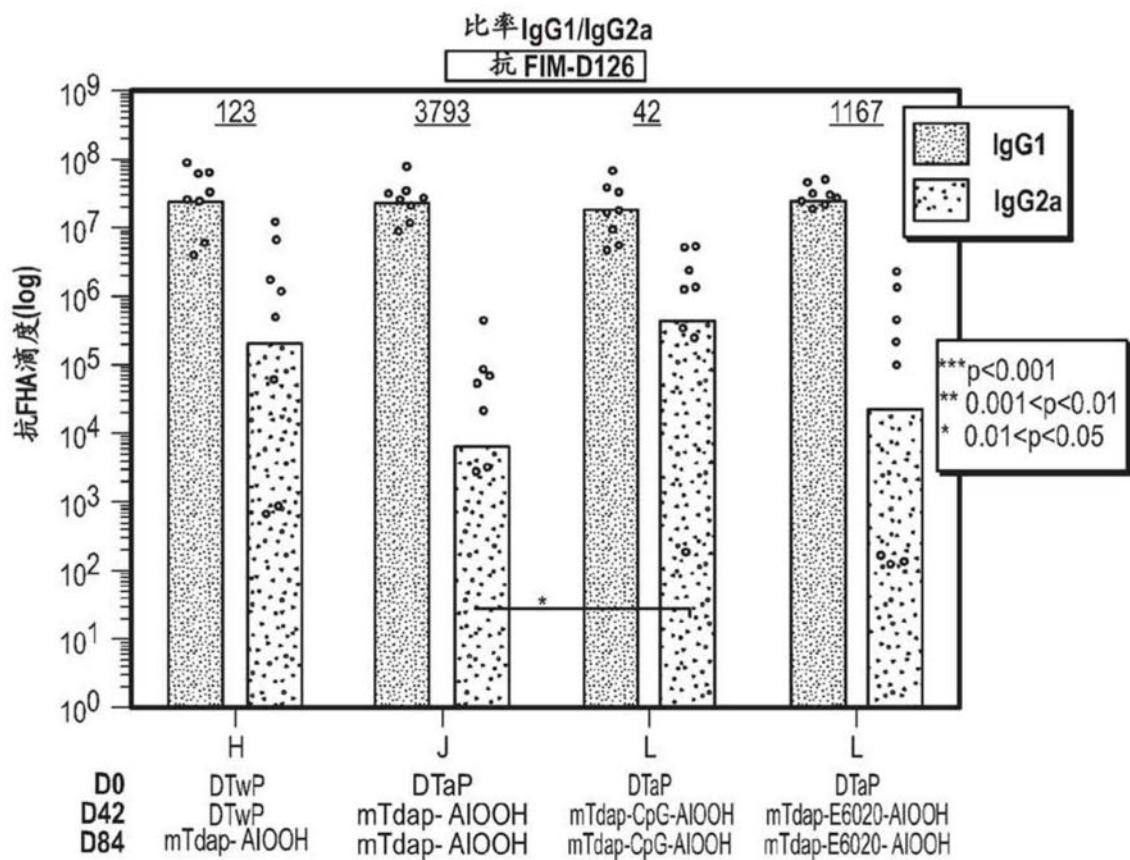


图6D

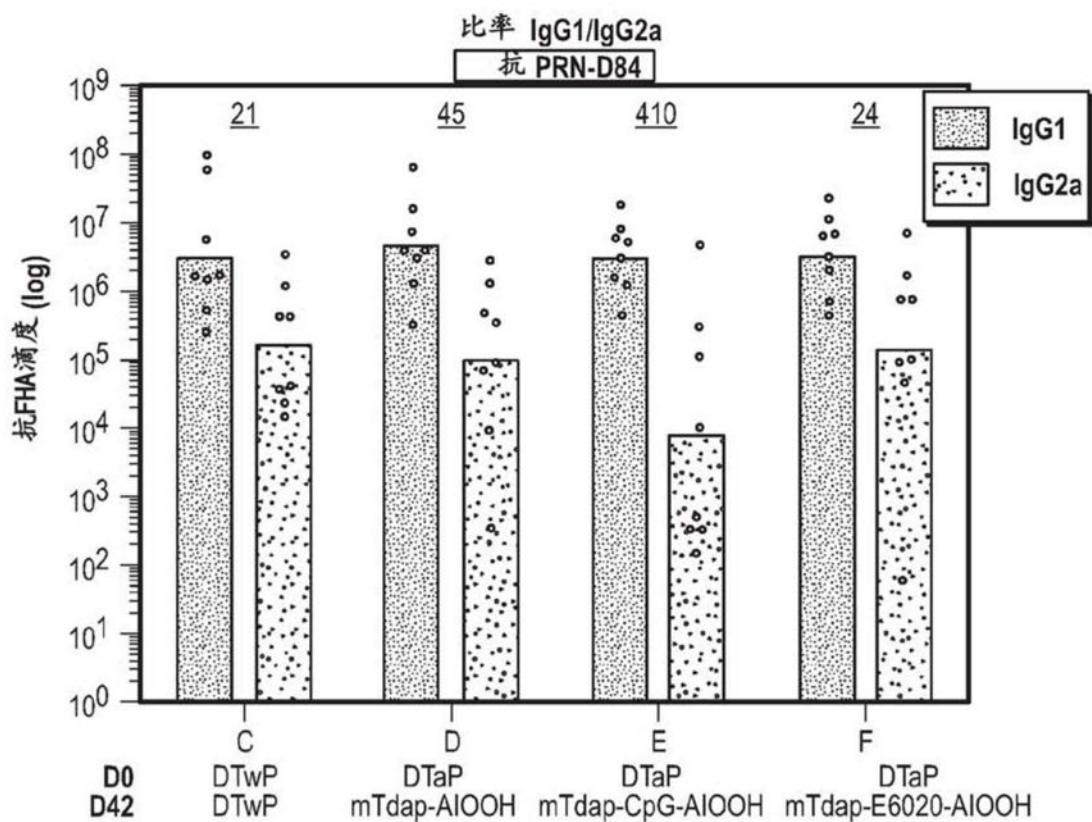


图6E

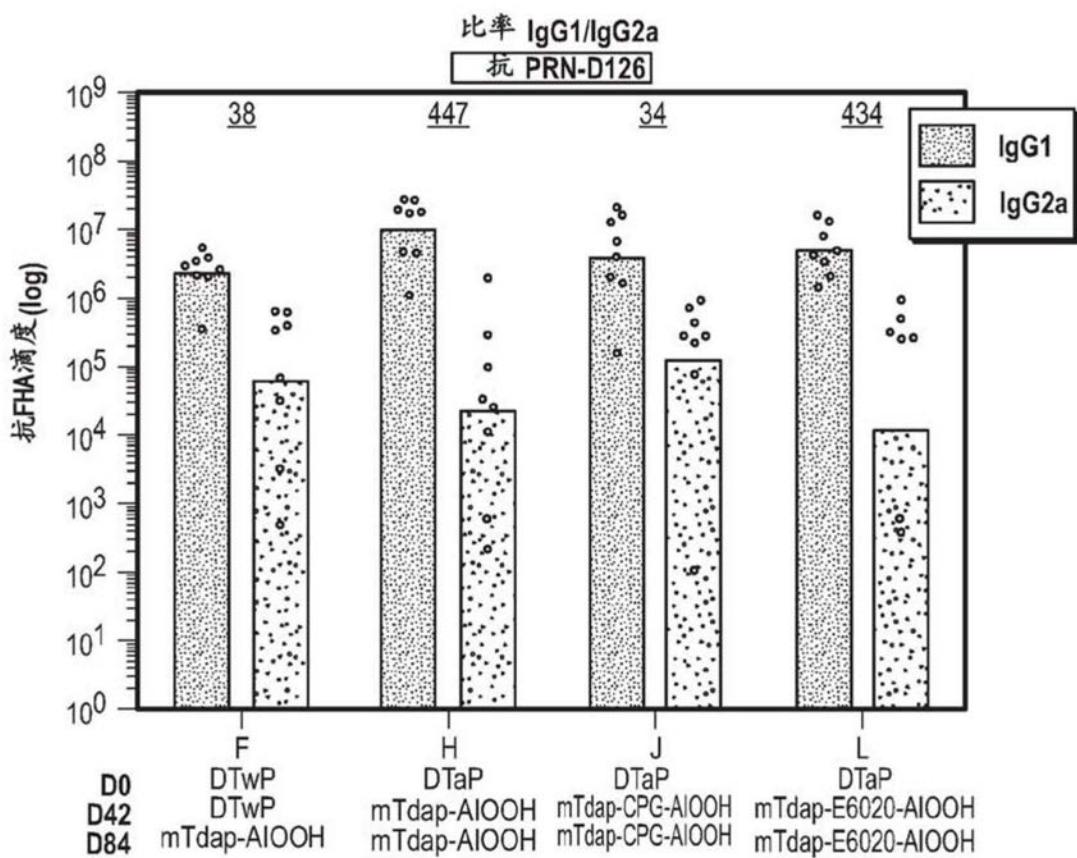


图6F

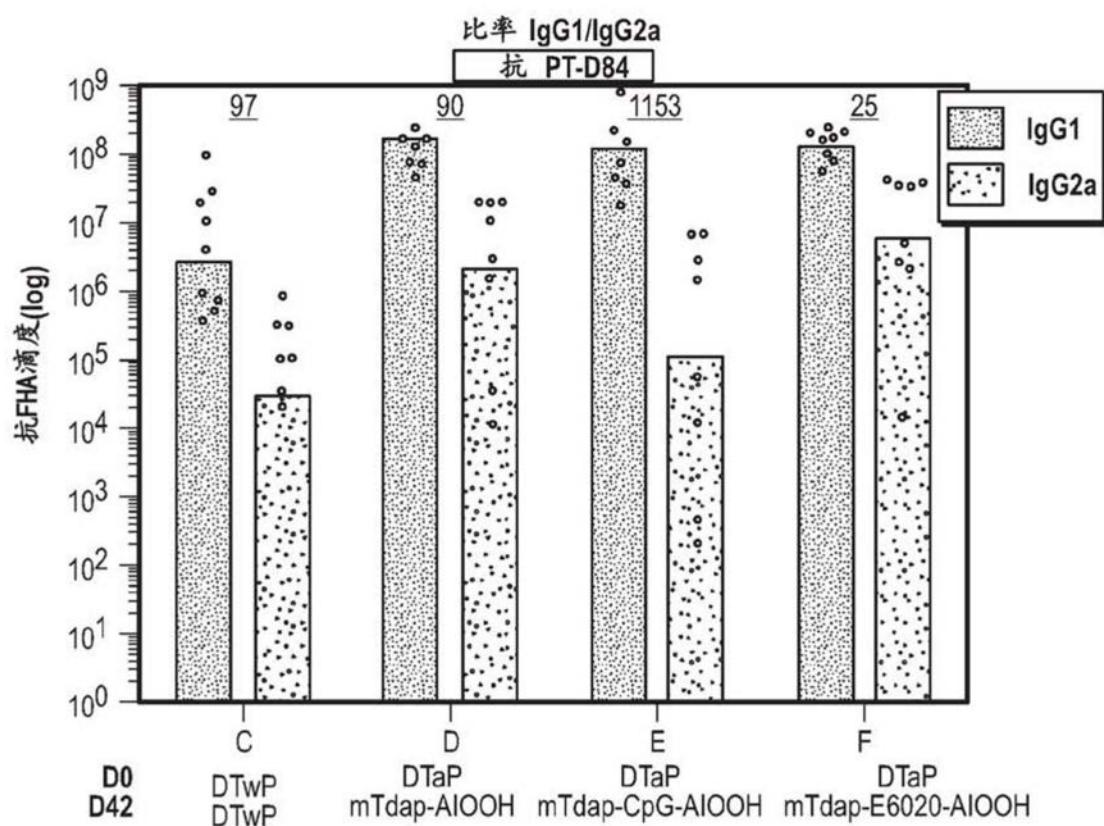


图6G

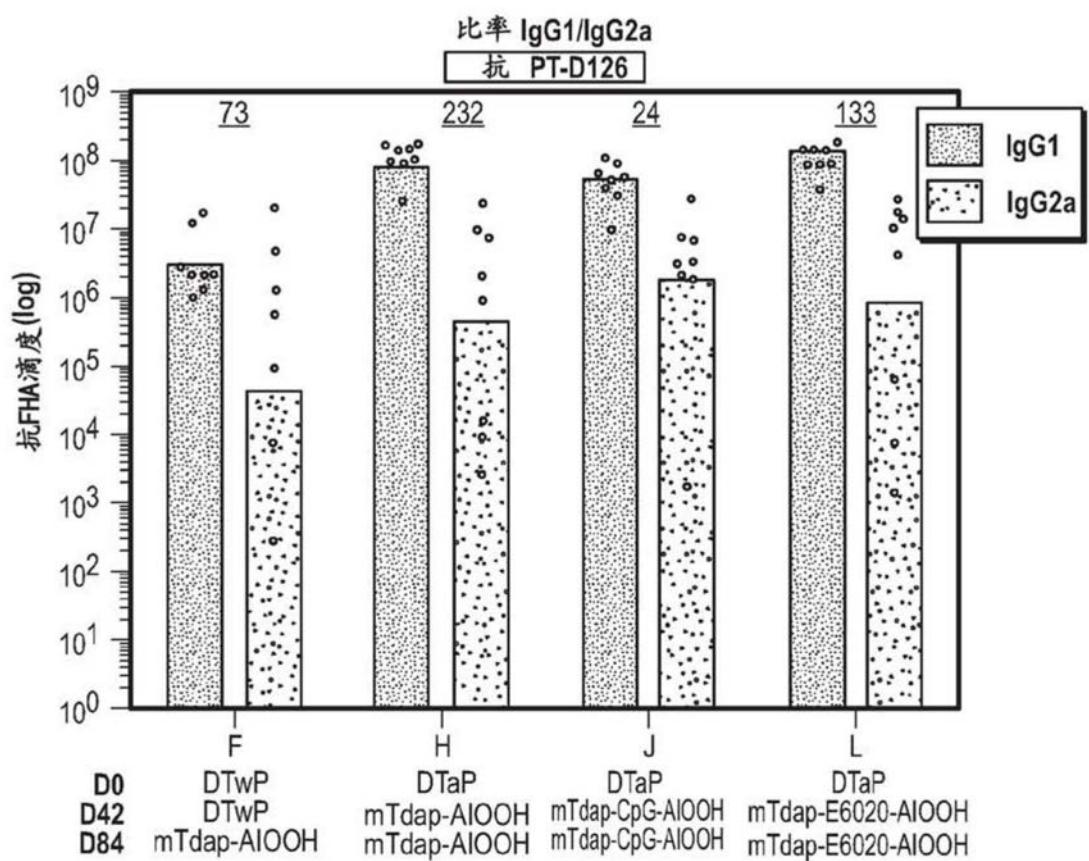


图6H

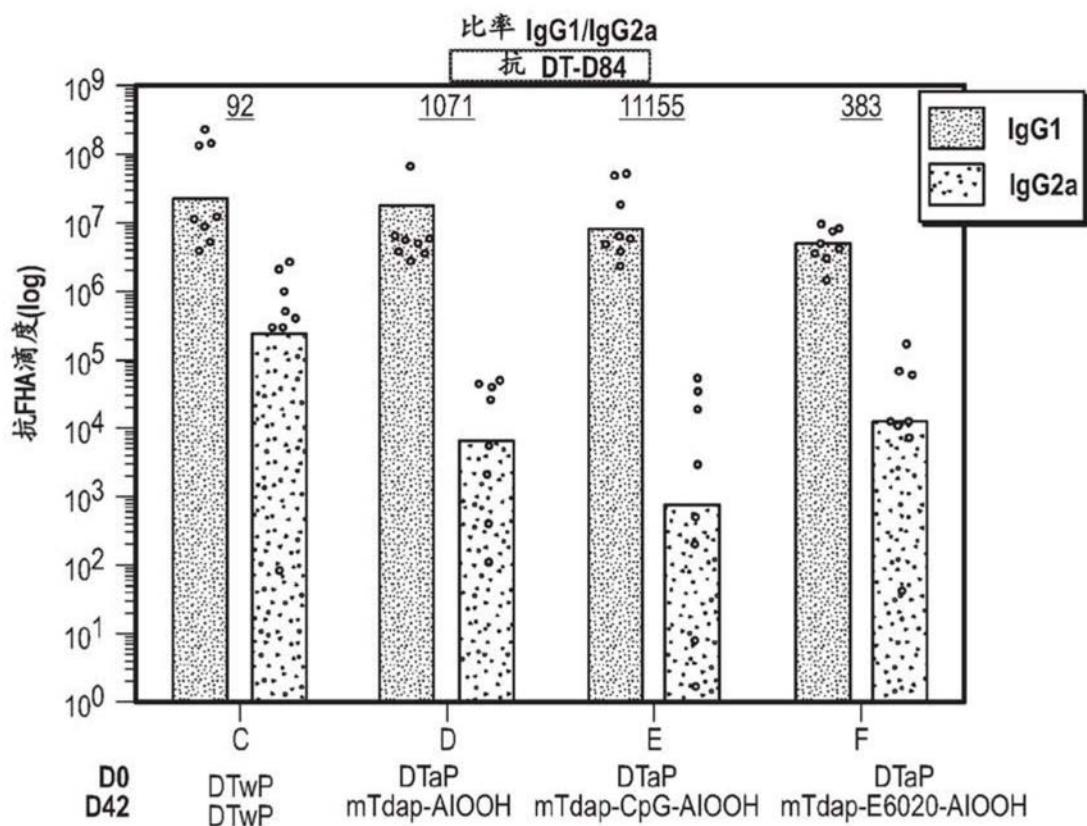


图6I

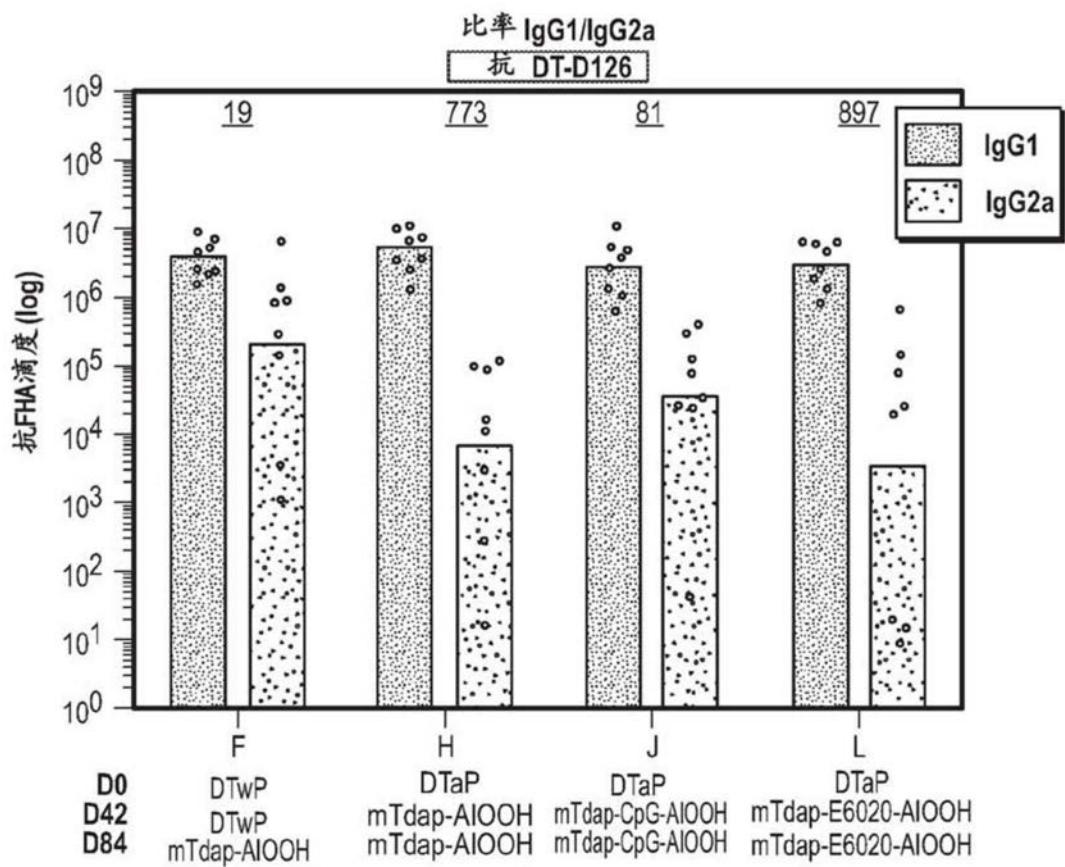


图6J

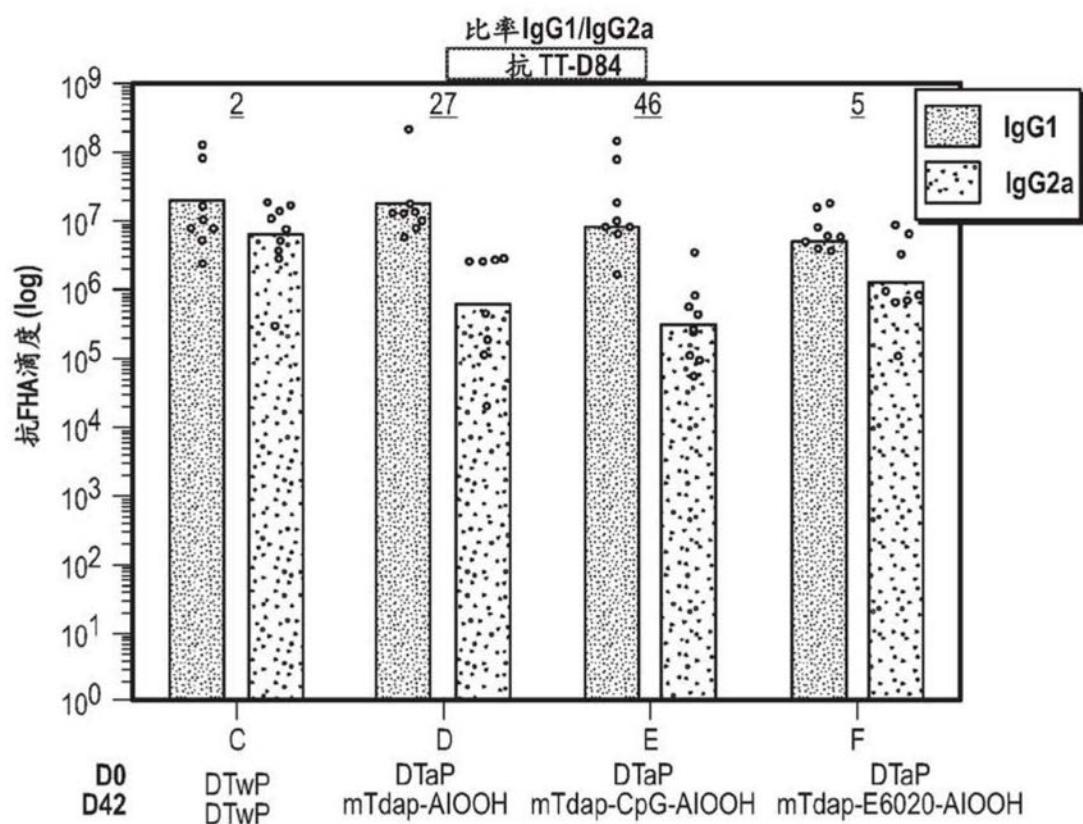


图6K

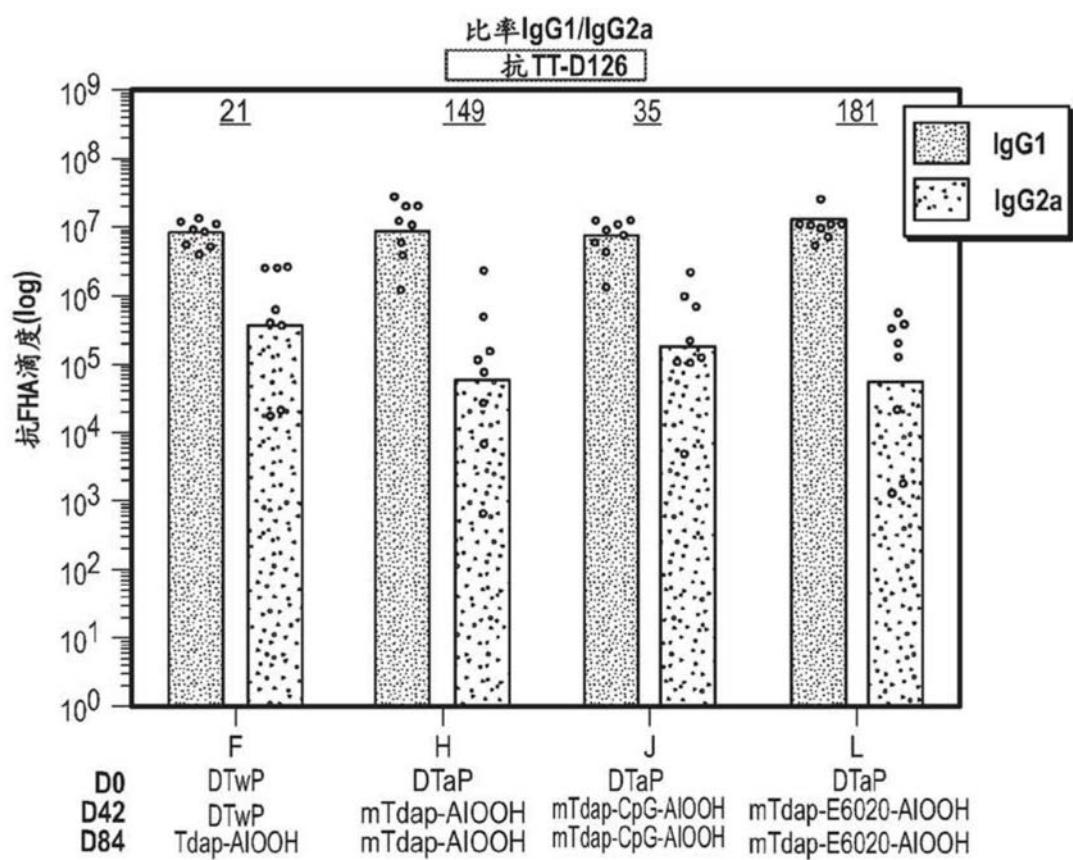


图6L

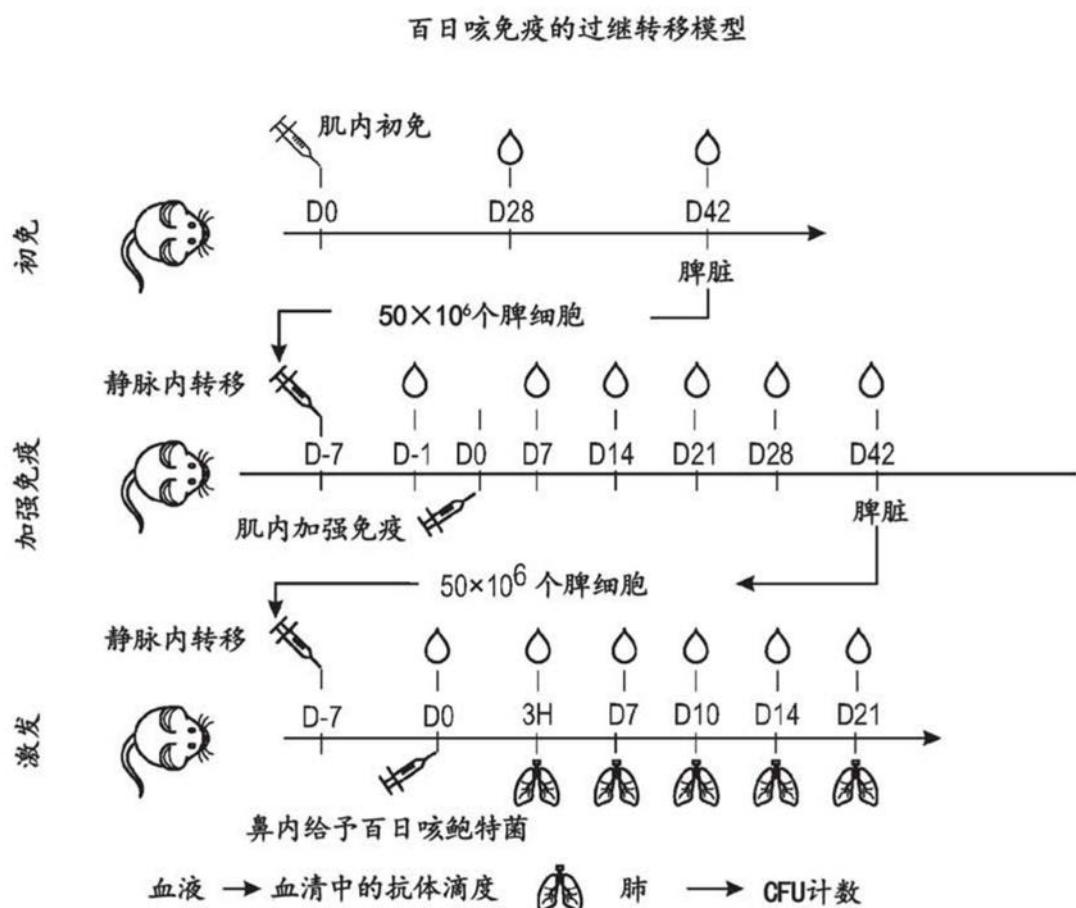


图7

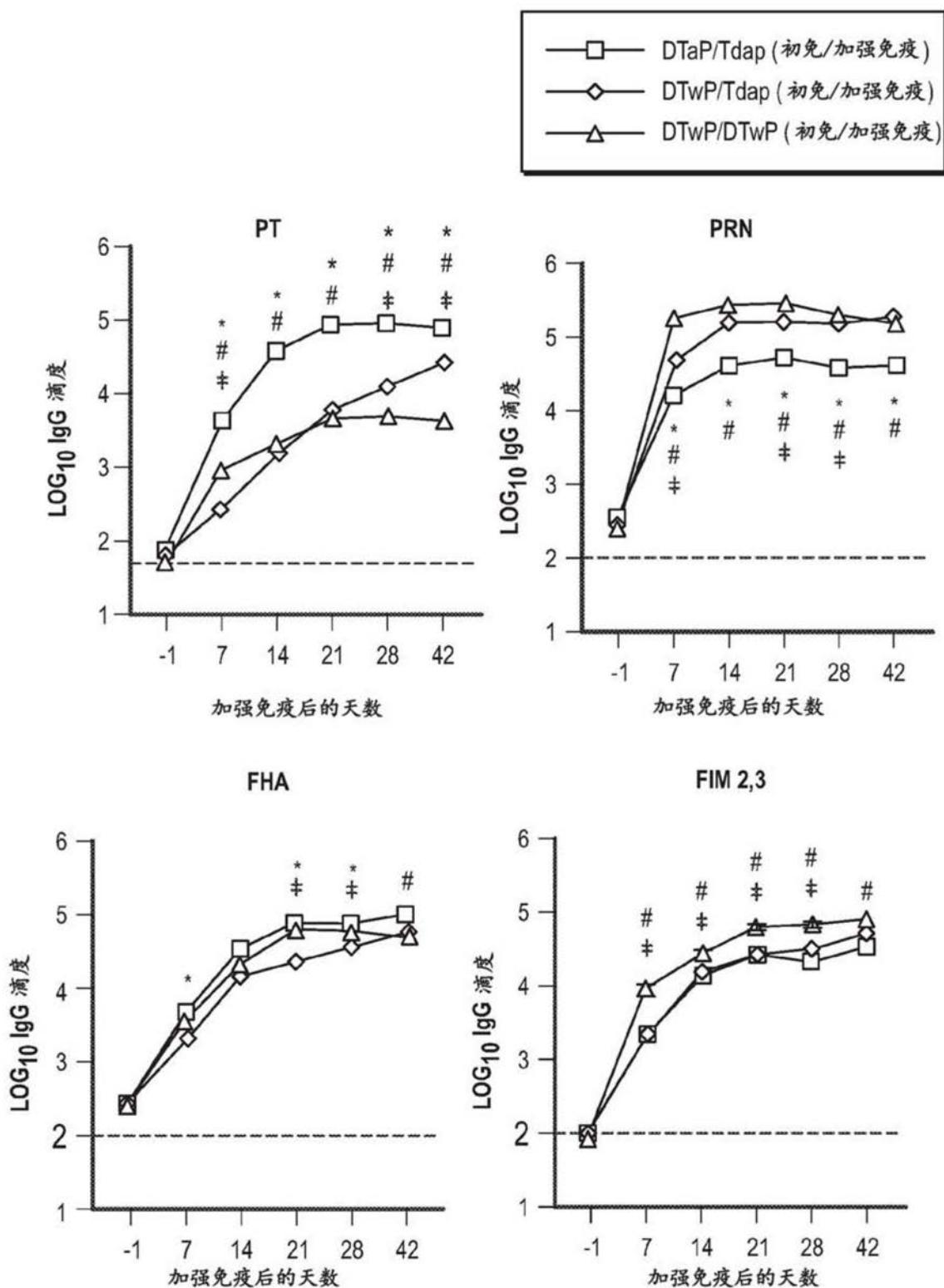


图8A

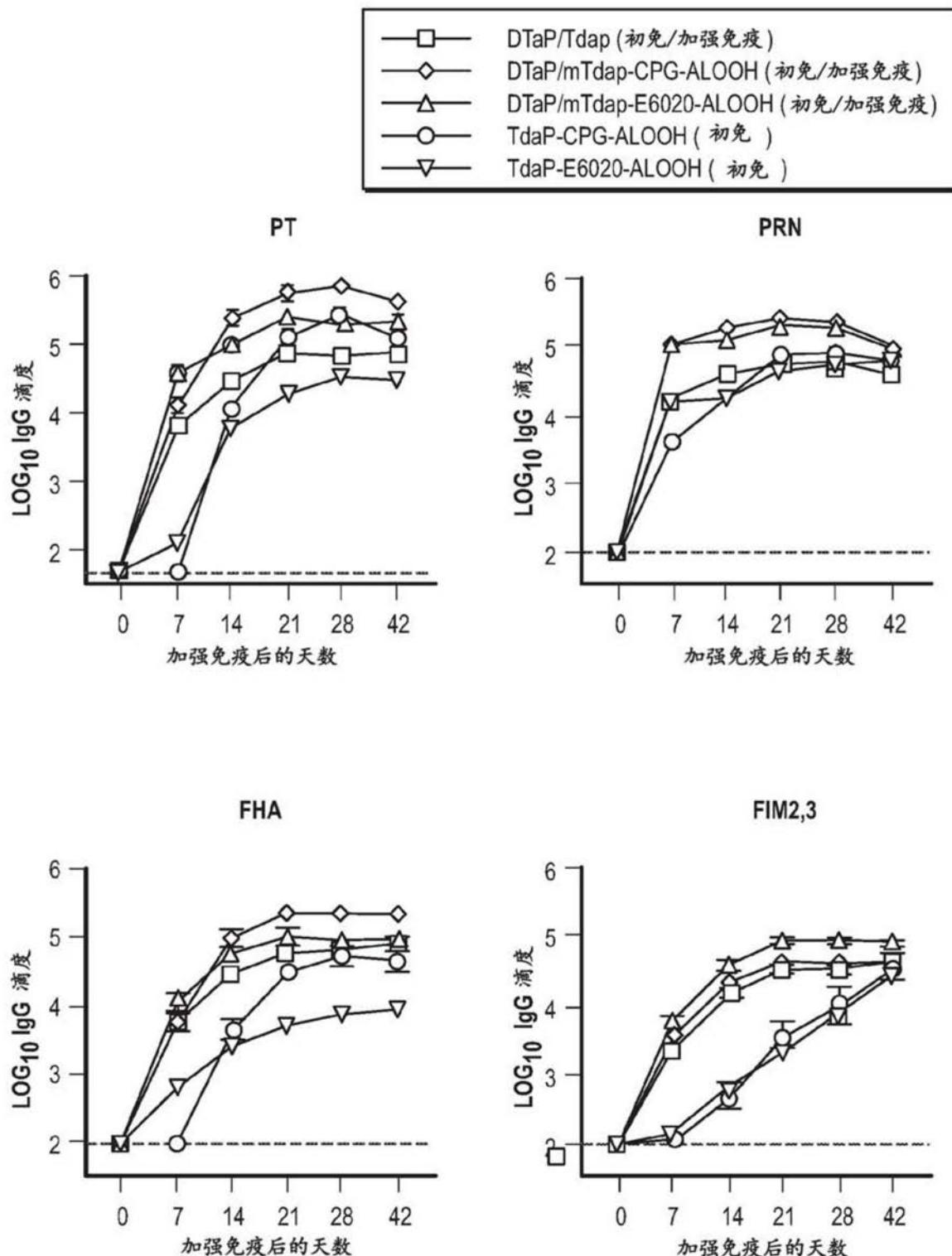
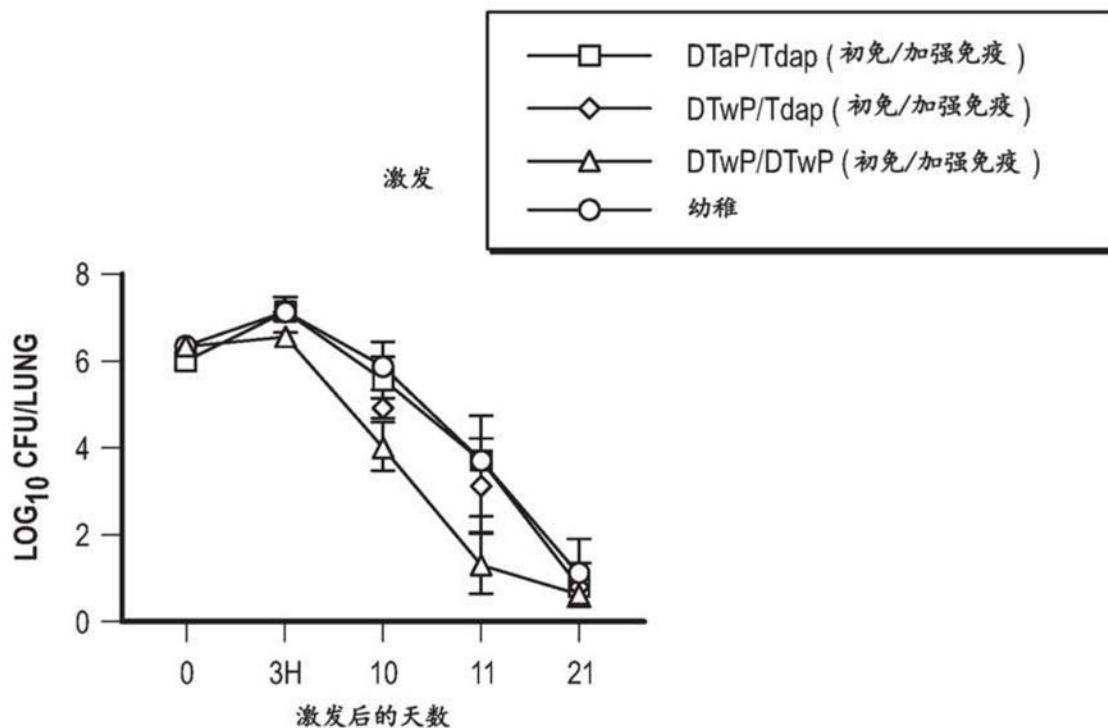


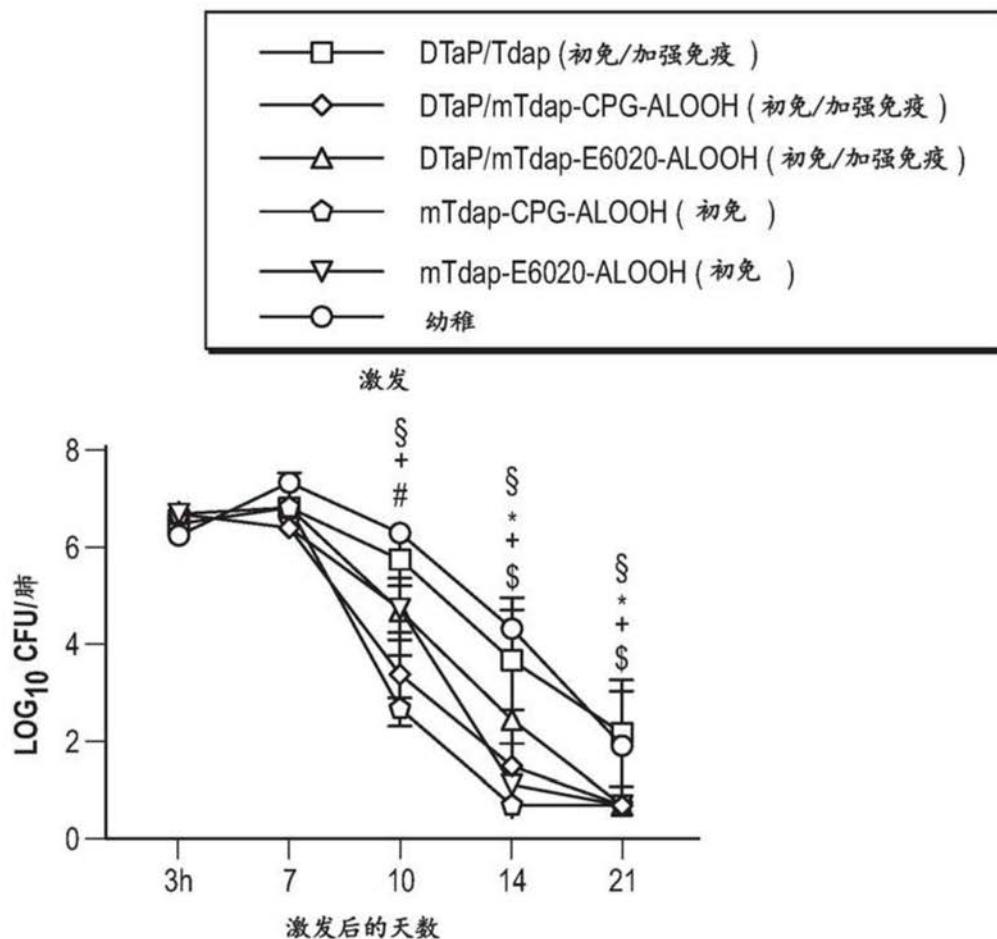
图8B



时间点	注射小鼠的数量					AUC*
	3H	D7	D10	D14	D21	
DTaP/Tdap (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	85.55
DTwP/Tdap (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	82.36
DTwP/DTwP (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	<b>72.36</b>
幼稚	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	86.71

\*AUC：曲线下面积

图9A



时间点	注射小鼠的数量					AUC*
	3H	D7	D10	D14	D21	
DTaP/Tdap (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	104.36
DTaP/mTdap -CPG-ALOOH (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	77.19
mTdap-CPG-ALOOH (初免)	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	72.31
DTaP/mTdap -E6020-ALOOH (初免/加强免疫)	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	89.59
mTdap -E6020-ALOOH (初免)	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	80.52
犹稚	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	111.75

图9B

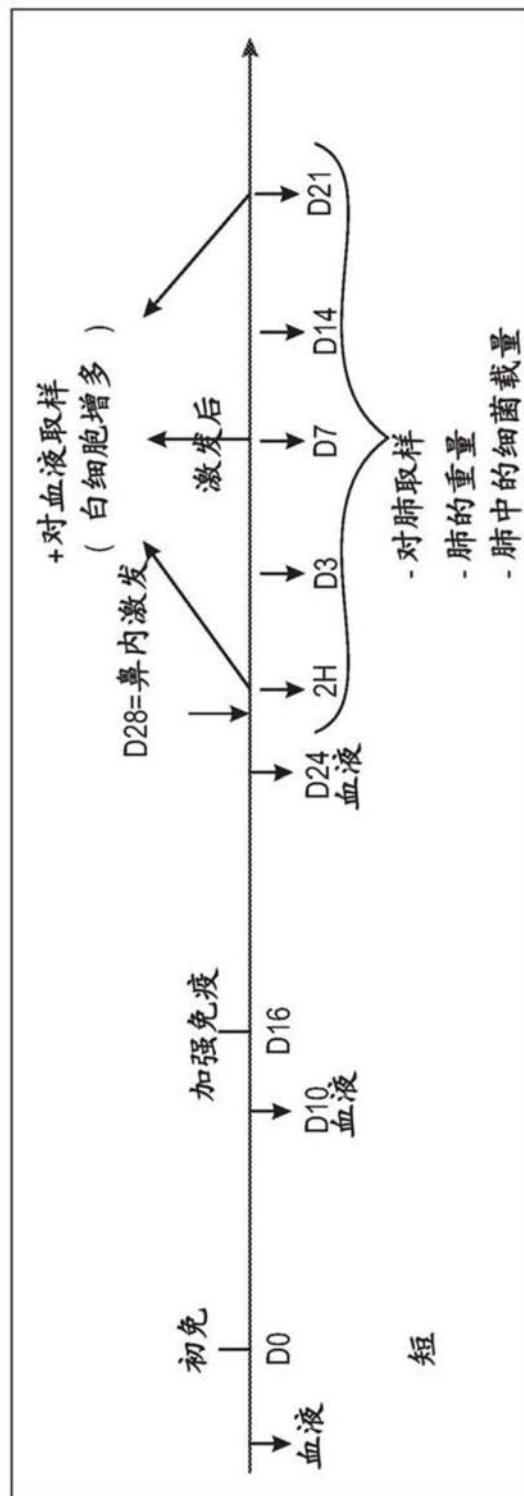


图10A

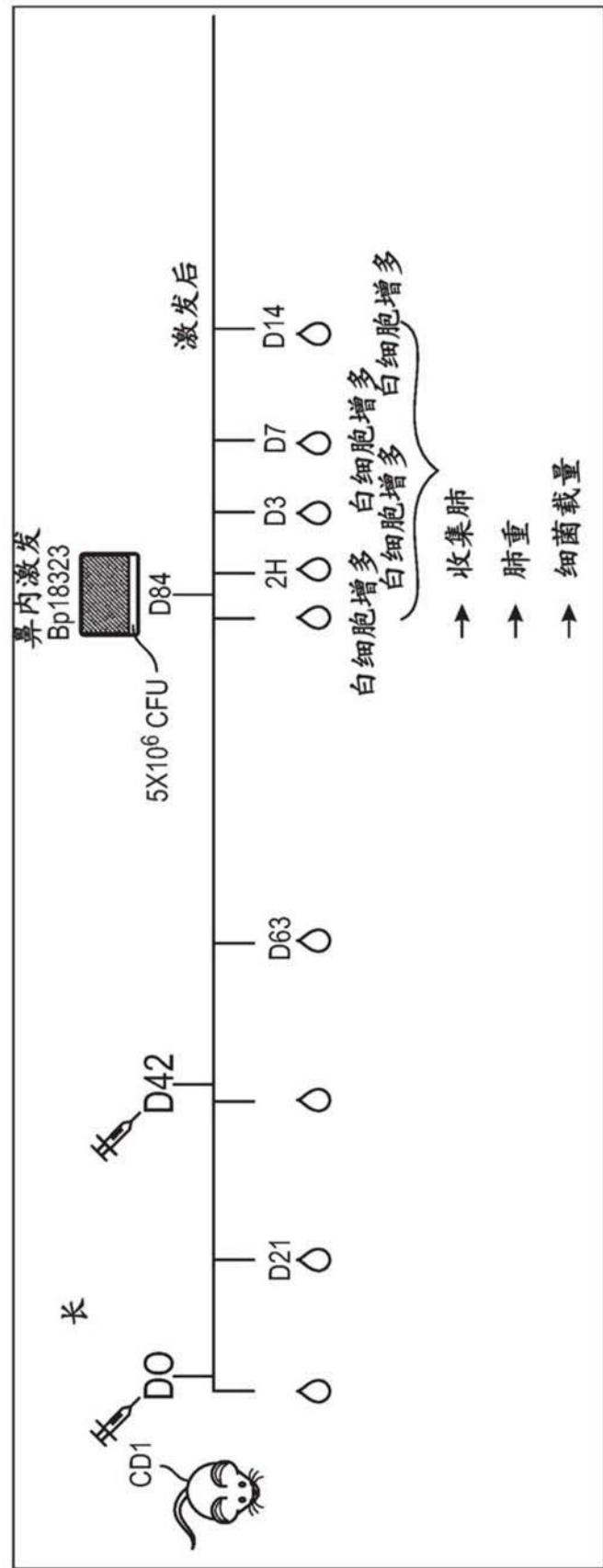


图10B

## 在鼻内施用百日咳鲍特菌18323之后CD1小鼠的肺清除

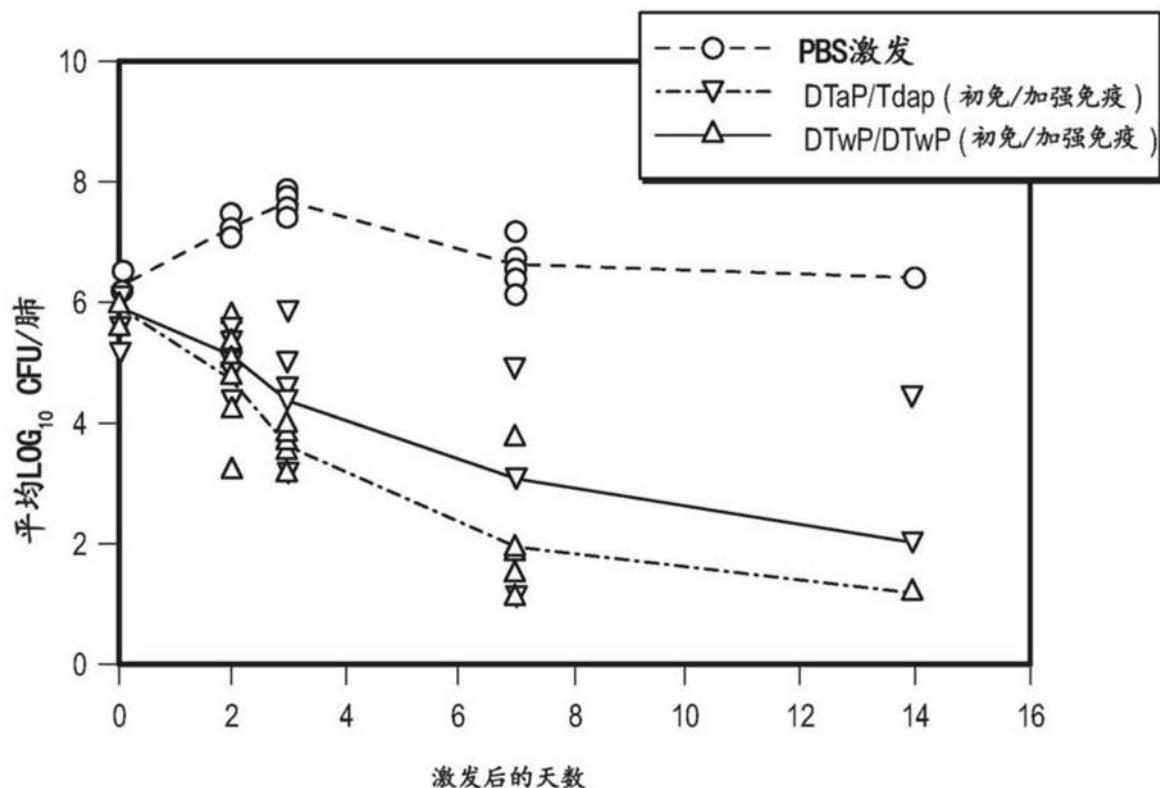


图10C

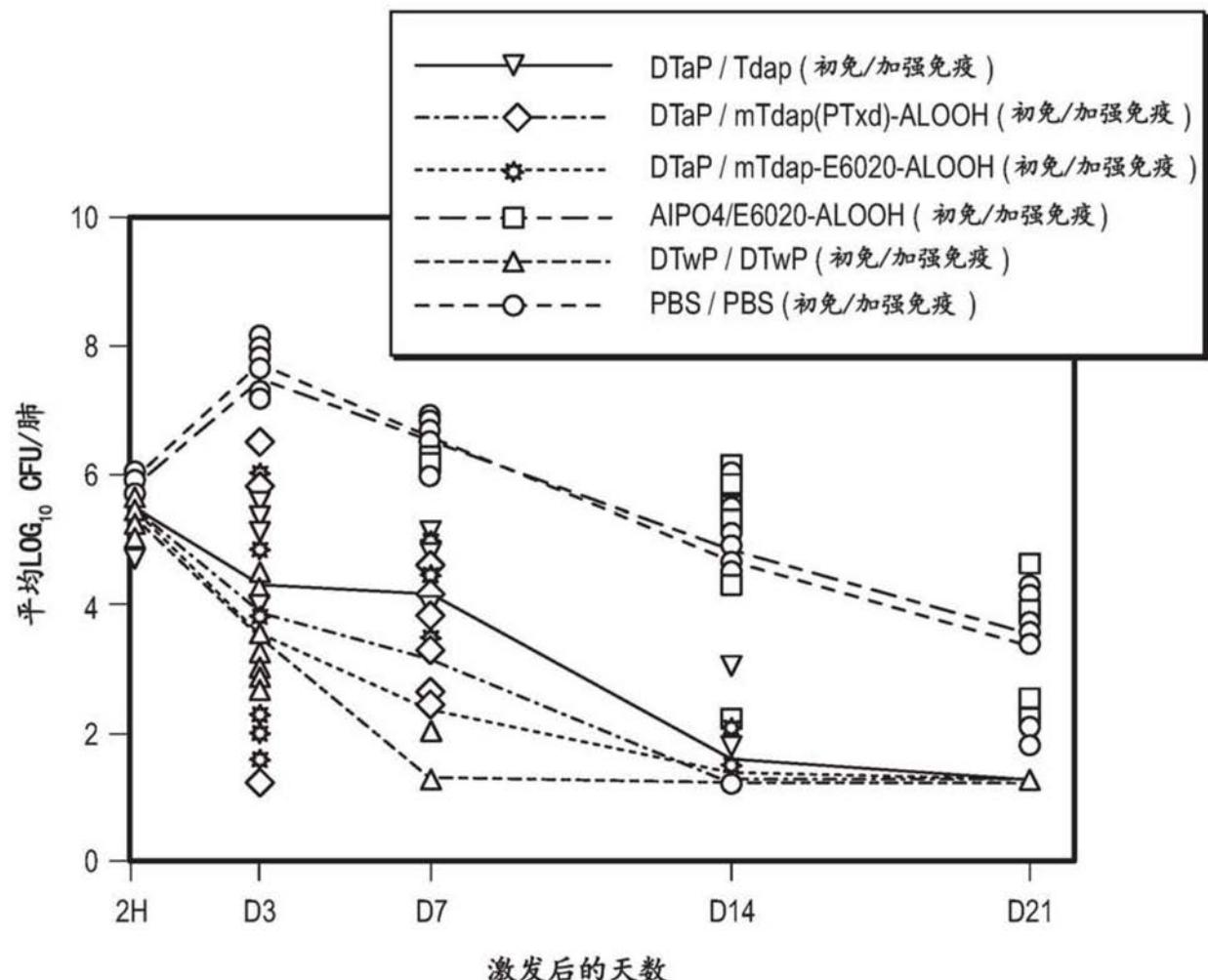


图11

## 在鼻内施用百日咳鲍特菌18323之后经免疫的CD1小鼠的肺清除

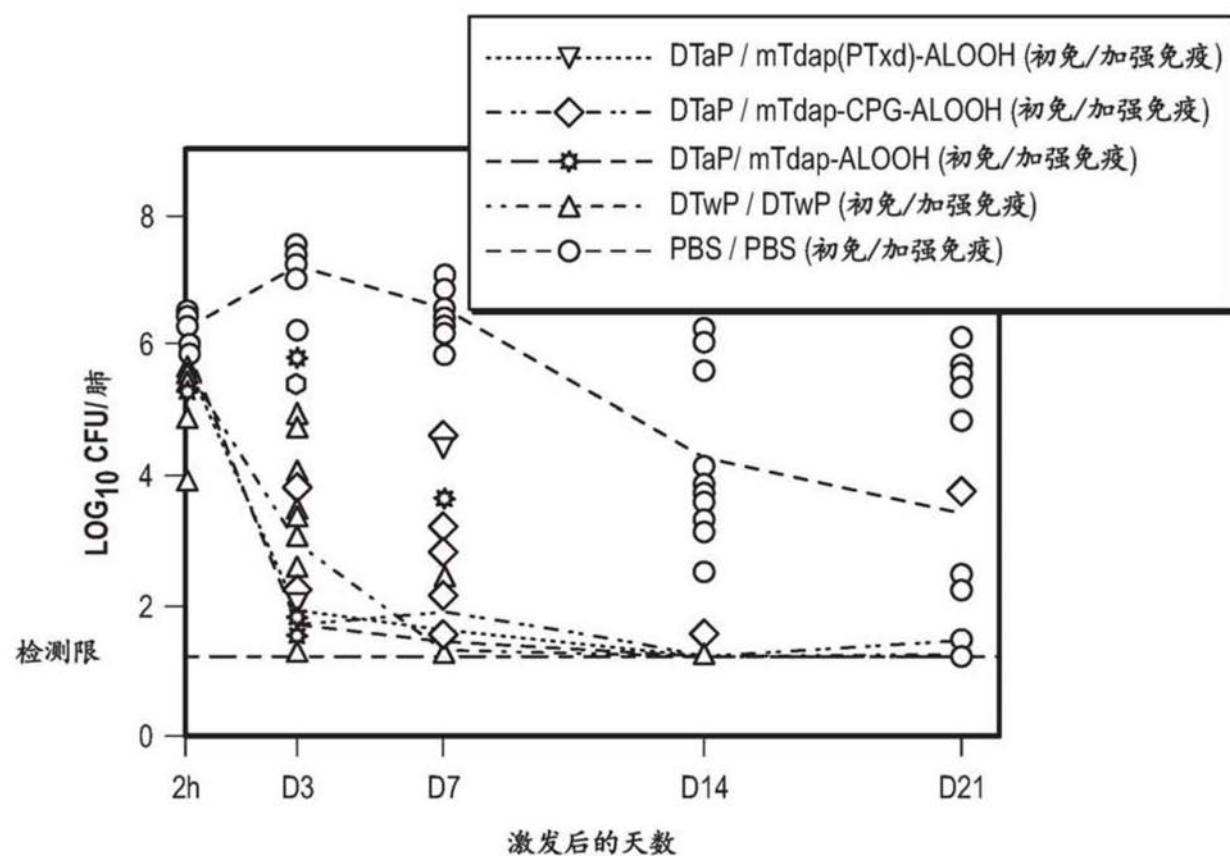


图12A

在鼻内施用百日咳鲍特菌18323之后经免疫的CD1小鼠的肺清除

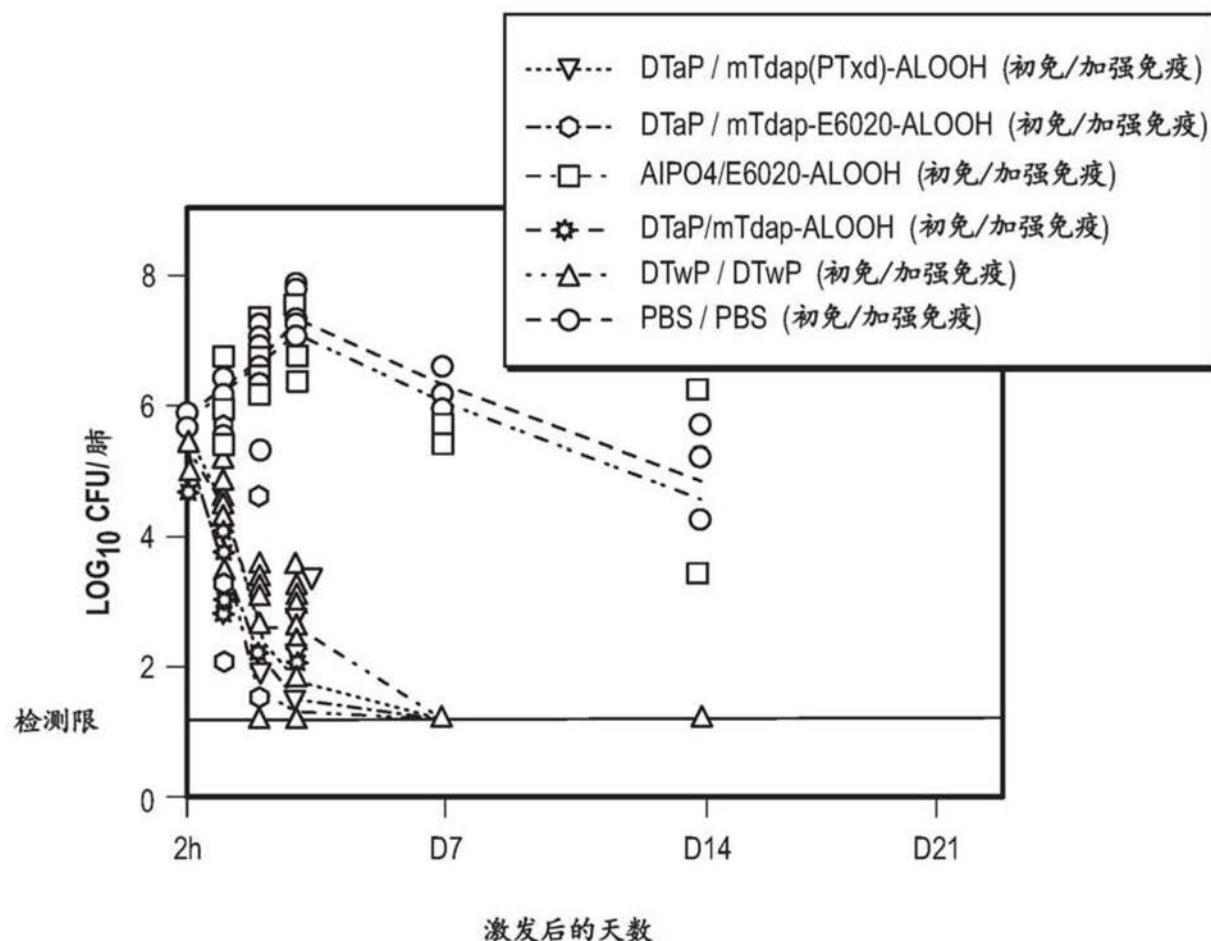


图12B

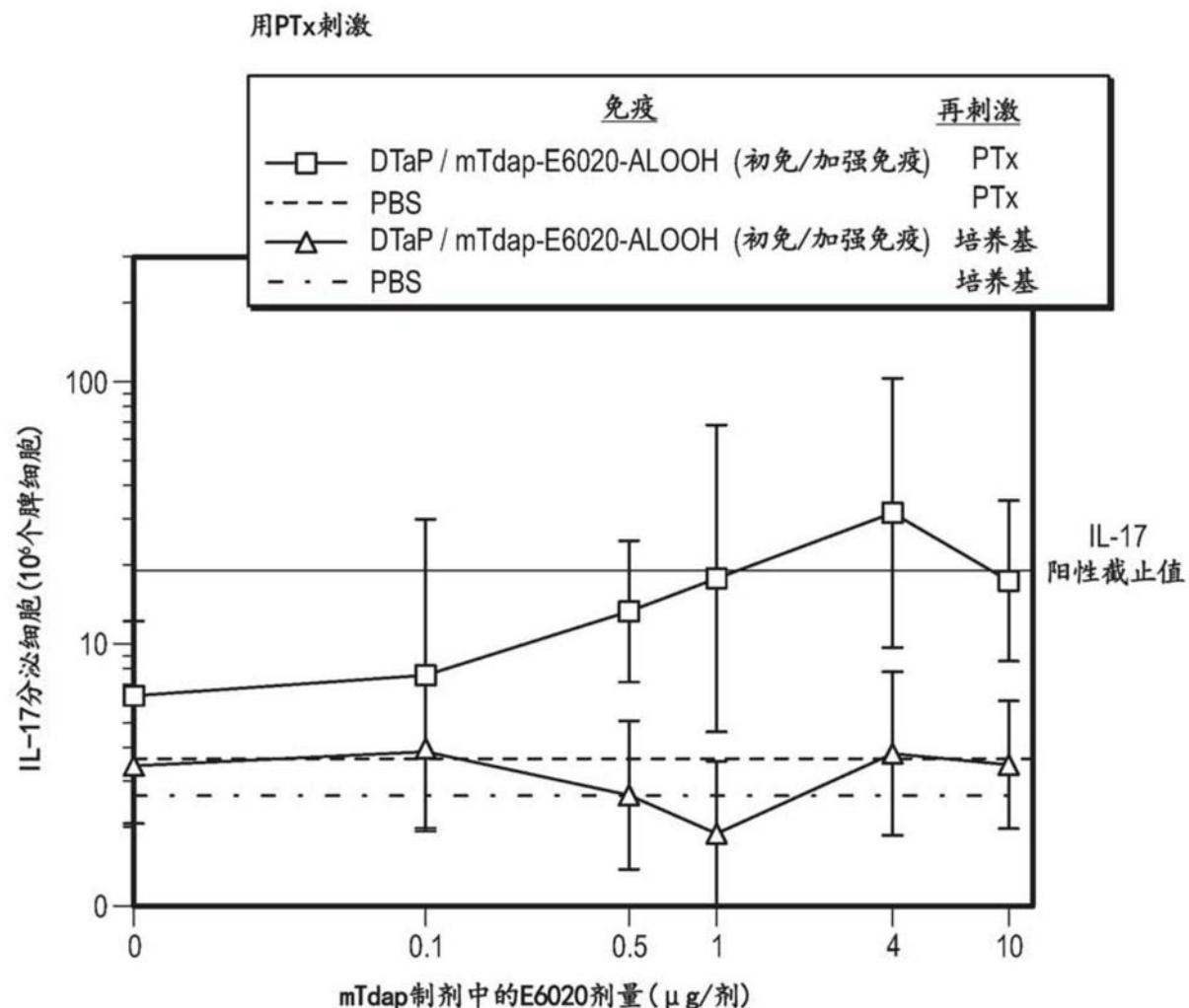


图13A

## 用合并物刺激

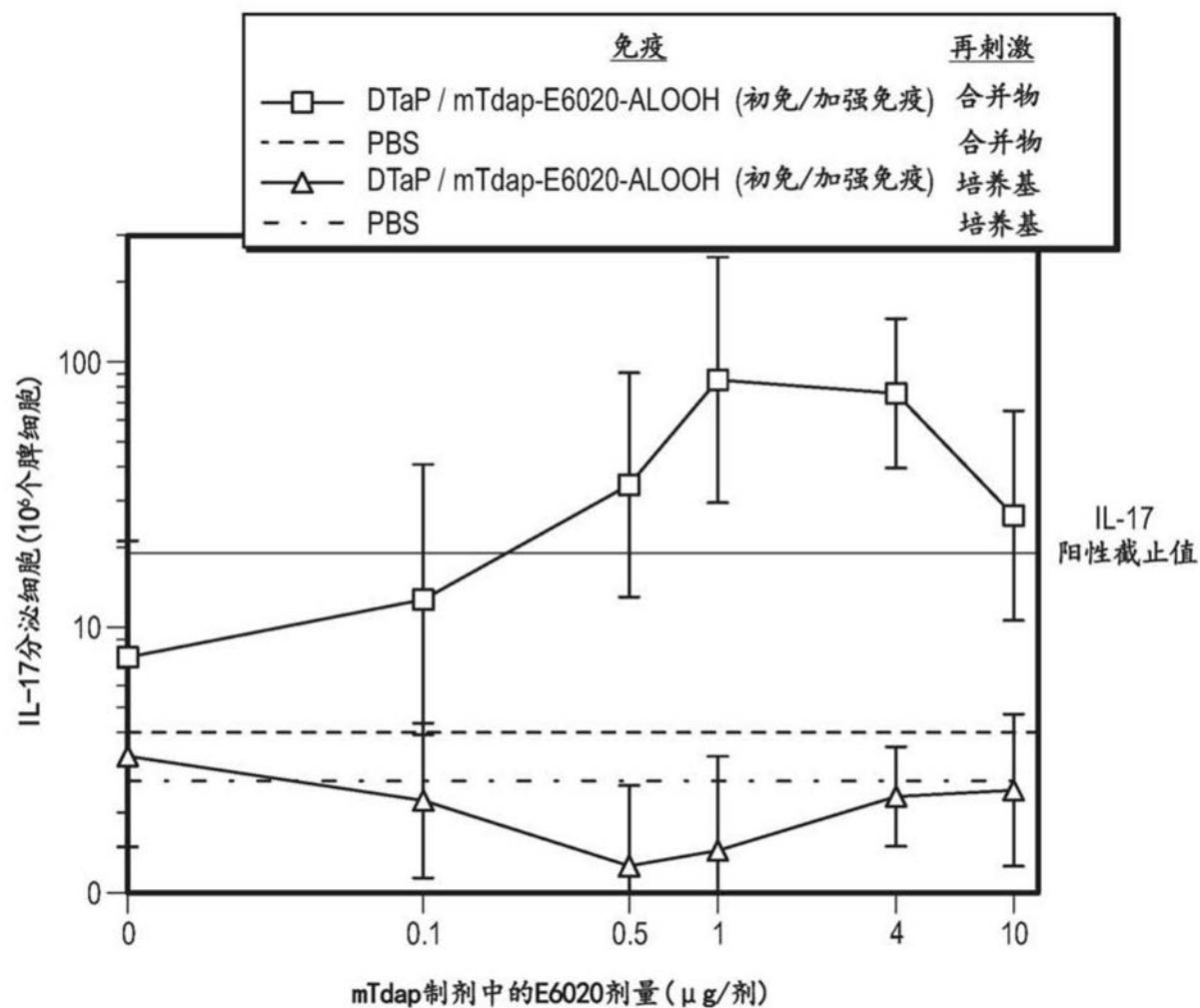


图13B

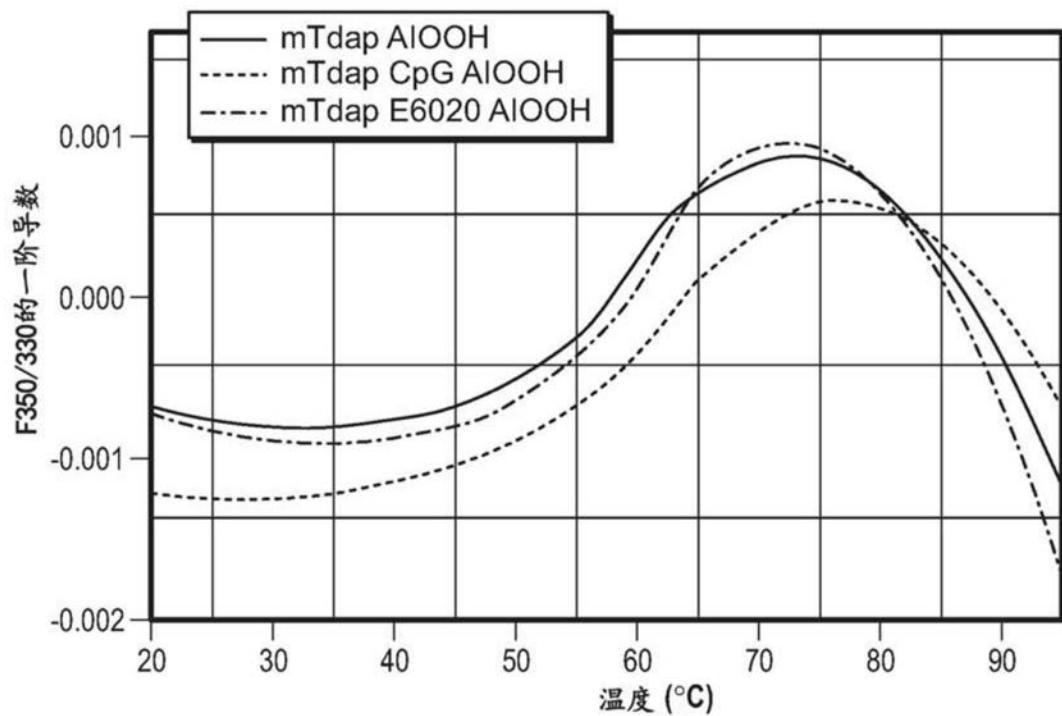


图14