



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104582718 B

(45)授权公告日 2017.10.24

(21)申请号 201380045446.X

(22)申请日 2013.10.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104582718 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(30)优先权数据

61/744,880 2012.10.03 US

61/799,123 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/070647 2013.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/053607 EN 2014.04.10

(73)专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·肯托尼 G·格兰迪 D·迈文

I·马格里特 伊 若斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 杨昀 沈端

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/02(2006.01)

A61K 39/05(2006.01)

A61K 39/08(2006.01)

A61K 39/09(2006.01)

A61K 39/13(2006.01)

(56)对比文件

W0 2012035519A1 ,2012.03.22,参见权利要求第1-33项.

W0 9640240 ,1996.12.19,参见全文.

US 2004202668A1 ,2004.10.14,参见全文.

Palazzi D L et al.Use of type V group B streptococcal conjugate vaccine in adults 65-85 years old.《Journal of infectious disease》.2004,第190卷参见第558-564页.

审查员 程婷

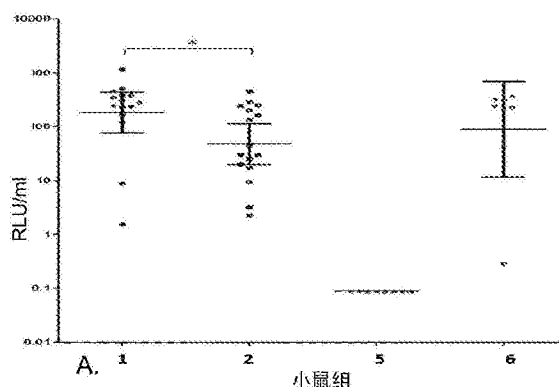
权利要求书3页 说明书35页 附图17页

(54)发明名称

免疫原性组合物

(57)摘要

本发明提供包含一种或多种GBS偶联物和一种或多种抗原的免疫原性组合物,所述一种或多种抗原选自:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原,其中各GBS偶联物是B组链球菌荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物.本发明还提供用于在患者内产生免疫应答的方法,所述方法包括给予所述患者本发明组合物的步骤.



1. 一种免疫原性组合物,其包含:与载体蛋白偶联的GBS血清型Ia的荚膜糖、与载体蛋白偶联的GBS血清型Ib的荚膜糖、与载体蛋白偶联的GBS血清型III的荚膜糖、细胞或非细胞百日咳抗原、未偶联的破伤风类毒素,和,未偶联的白喉类毒素,其中,所述免疫原性组合物中,破伤风类毒素的量等同于1-20Lf/剂量,且白喉类毒素的量等同于1-50Lf/剂量。

2. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物包含:非细胞百日咳抗原,其选自:5-50 μ g/ml百日咳类毒素(PT)、10-50 μ g/ml的丝状血细胞凝集素(FHA),和5-16 μ g/ml的百日咳杆菌粘附素。

3. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物还包含:失活的脊髓灰质炎病毒抗原。

4. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述GBS荚膜糖的总量 $\leq$ 70 μ g。

5. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,各GBS荚膜糖以0.1~30 μ g/剂量的量存在。

6. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,每单位剂量的所述GBS血清型Ia、Ib和III荚膜糖的量选自下组:20 μ g、20 μ g和20 μ g;10 μ g、10 μ g和10 μ g;以及5 μ g、5 μ g和5 μ g。

7. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述GBS血清型Ia、Ib和III荚膜糖的质量比是1:1:1。

8. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物的糖:蛋白质重量比为1:1~1:2;所述GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物的糖:蛋白质重量比为1:1~1:2;和/或所述GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物的糖:蛋白质重量比为3:1~1:1。

9. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,包含GBS血清型Ia荚膜糖的荚膜糖的GBS偶联物、包含GBS血清型Ib荚膜糖的GBS偶联物和包含GBS血清型III荚膜糖的GBS偶联物中的载体蛋白选自白喉类毒素、破伤风类毒素和CRM197。

10. 如权利要求9所述的免疫原性组合物,其特征在于,包含GBS血清型Ia荚膜糖的荚膜糖的GBS偶联物、包含GBS血清型Ib荚膜糖的GBS偶联物和包含GBS血清型III荚膜糖的GBS偶联物中的载体蛋白是CRM197。

11. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性偶联物还包含选自下组的GBS荚膜糖的偶联物:GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;和GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。

12. 如权利要求11所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述载体蛋白选自:白喉类毒素、破伤风类毒素或CRM197。

13. 如权利要求12所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述载体蛋白是CRM197。

14. 如权利要求2所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物包含具有选自下组的重量比的PT、丝状血细胞凝集素和百日咳杆菌粘附素:16:16:5、5:10:6、20:20:3、25:25:8,和10:5:3(PT:FHA:PRN)。

15. 如权利要求14所述的免疫原性组合物,其特征在于,以重量计,失活的百日咳毒素、丝状血细胞凝集素和百日咳杆菌粘附素以16:16:5的比率存在。

16. 如权利要求3所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述失活的脊髓灰质炎病毒抗原包含各来自脊髓灰质炎病毒1型毒株、脊髓灰质炎病毒2型毒株和脊髓灰质炎病毒3型毒

株的抗原。

17. 如权利要求16所述的免疫原性组合物,其特征在于,以D-抗原单位计,所述失活的脊髓灰质炎病毒抗原以1型:2型:3型为5:1:4的比率存在。

18. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素以4Lf/ml~8Lf/ml剂量的浓度存在。

19. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素以4Lf/0.5ml剂量的浓度存在。

20. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素以20~50Lf/ml剂量的浓度存在。

21. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素以25Lf/0.5ml剂量的浓度存在。

22. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,破伤风类毒素以5Lf/0.5ml剂量的浓度存在。

23. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,破伤风类毒素以5~10Lf/0.5ml剂量的浓度存在。

24. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素:破伤风类毒素的比率大于1,以Lf单位计。

25. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素:破伤风类毒素的比率为2:1~3:1,以Lf单位计。

26. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述白喉类毒素:破伤风类毒素的比率为2.5:1,以Lf单位计。

27. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述破伤风类毒素:白喉类毒素的比率大于1,以Lf单位计。

28. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述破伤风类毒素:白喉类毒素的比率为1.5:1~2.5:1,以Lf单位计。

29. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述破伤风类毒素:白喉类毒素的比率为2:1,以Lf单位计。

30. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物包含佐剂。

31. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物包含铝盐佐剂。

32. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是可注射的液体溶液或悬浮液。

33. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是冻干的。

34. 如权利要求33所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含甘露醇以使所述偶联物稳定。

35. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含磷酸二氢钾缓冲剂。

36. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含氯化钠。

37. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物不含防腐剂。

38. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是疫苗。
39. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物用于给予人类。
40. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物用作药物。
41. 如前述权利要求中任一项所述的组合物在制备用于在患者内产生免疫应答的药物中的应用。
42. 一种制备如权利要求1-40中任一项所述的免疫原性组合物的方法,所述方法包括:将包含三种GBS偶联物的第一组分和包含a) 细胞或非细胞百日咳抗原、b) 破伤风类毒素和c) 白喉类毒素的第二组分混合。
43. 如权利要求42所述的方法,其特征在于,所述第一组分中的GBS偶联物是冻干的。
44. 如权利要求42或权利要求43所述的方法,其特征在于,所述第二组分包含水性抗原。
45. 如权利要求44所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:用第二组分的水性抗原重建第一组分中的冻干的GBS偶联物的步骤。
46. 如权利要求42所述的方法,其特征在于,第一组分不包含佐剂。
47. 如权利要求42所述的方法,其特征在于,第二组分包含佐剂。
48. 如权利要求42所述的方法,其特征在于,第二组分包含铝盐佐剂。
49. 一种用于制备如权利要求1-40所述的免疫原性组合物的试剂盒,所述试剂盒包含第一组分和第二组分,所述第一组分含有三种GBS偶联物;所述第二组分含有a) 细胞或非细胞百日咳抗原、b) 破伤风类毒素,和c) 白喉类毒素;其中所述两种组分于分开的容器中放置。
50. 如权利要求49所述的试剂盒,其特征在于,第一组分中的GBS偶联物是冻干的。
51. 如权利要求49或权利要求50所述的试剂盒,其特征在于,第二组分包含水性抗原。
52. 如权利要求49所述的试剂盒,其特征在于,第一组分不包含佐剂。
53. 如权利要求49所述的试剂盒,其特征在于,第二组分包含佐剂。
54. 如权利要求49所述的试剂盒,其特征在于,第二组分包含铝盐佐剂。

免疫原性组合物

技术领域

[0001] 本申请属于联合疫苗领域,联合疫苗即包含来自多于一种病原体的免疫原的混合物的疫苗,从而给予所述疫苗能够使对象同时免疫抵抗多于一种病原体。具体而言,本发明涉及包含无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)荚膜糖和载体蛋白的联合疫苗。

背景技术

[0002] 单一剂量中含有来自多于一种病原性生物体的抗原的疫苗被称为“多价”疫苗或“联合”疫苗。在欧洲和美国,多种联合疫苗已经被批准用于人体,包括针对白喉、破伤风和百日咳的多价疫苗(“DTP”疫苗)以及针对麻疹、腮腺炎和风疹的多价疫苗(“MMR”疫苗)。联合疫苗给患者提供的益处在于减少注射次数,从而带来顺应性提高的临床优势(例如参见参考文献1的第29章)。

[0003] 无乳链球菌(B组链球菌,GBS)是溶血性带荚膜革兰氏阳性微生物,寄居在25-30%健康女性的生殖道。GBS导致携带该细菌的母亲所产婴儿的新生儿感染,并且是新生儿败血症和脑膜炎的主要原因。该病原体被越来越多地鉴定为成人(尤其是那些具有潜在疾病的人以及老年人)中的重要病因。

[0004] 针对无乳链球菌的偶联疫苗已在例如参考文献2~10的文件中有所描述。已显示针对各GBS血清型Ia、Ib、II、III和V的偶联疫苗在人体中安全且具有免疫原性[11]。参考文献12也公开了多种含GBS偶联物的疫苗。

[0005] 本发明的目的是提供另外且改进的联合疫苗,用以保护抵抗无乳链球菌以及白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)和脊髓灰质炎病毒(*Poliovirus*)中的一种或多种。

发明内容

[0006] 本发明基于对如下联合疫苗的研究,所述联合疫苗包含GBS偶联物和选自下组的一种或多种抗原:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素,和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原。发明人已发现这些联合疫苗引发针对对应抗原的特定抗体效价,而在所用不同抗原之间几乎没有或没有免疫学干扰。

[0007] 因此,本发明提供一种免疫原性组合物,其包含一种或多种GBS偶联物和选自下组的一种或多种抗原:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原,其中各GBS偶联物是偶联至载体蛋白的B组链球菌荚膜糖。

[0008] 本发明还提供用于使患者产生免疫应答的方法,所述方法包括给予所述患者本发明的免疫原性组合物的步骤。

[0009] 本发明还提供一种制备本发明的免疫原性组合物的方法,所述方法包括将第一组分和第二组分混合,第一组分含有一种或多种GBS偶联物的,第二组分含有选自下组的一种或多种抗原:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素,和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0010] 本发明还提供一种制备本发明的免疫原性组合物的试剂盒,所述试剂盒包含第一组分和第二组分,第一组分含有一种或多种GBS偶联物,第二组分含有选自下组的一种或多种抗原:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素,和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原;其中所述两种组分在分开的容器中。

[0011] GBS偶联物

[0012] 荚膜糖

[0013] 本发明是基于无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的荚膜糖。所述荚膜糖共价连接到GBS的肽聚糖骨架上,并且与B组抗原不同,B组抗原是连接到肽聚糖骨架上的另一种糖。

[0014] 所述GBS荚膜糖在化学上相关,但是抗原性上非常不同。所有GBS荚膜糖共有以下三糖核心:

[0015] β -D-GlcpNAc (1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4) β -D-Glcp

[0016] 各种GBS血清型的区别在于修饰其核心的方式。例如,血清型Ia和III的区别在于,核心中采用GlcNAc (Ia) 或Gal (III) 来连接连续的三糖核心。血清型Ia和Ib的核心中都具有与GlcNAc相连的 [α -D-NeupNAc (2 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp- (1 $\rightarrow$)] 二糖,只是连接键是1 $\rightarrow$ 4 (Ia) 或1 $\rightarrow$ 3 (Ib)。

[0017] GBS-相关疾病主要是由血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII引起,超过85%是由以下五种血清型引起的:Ia、Ib、III和V。本发明通常使用来自这四种血清型中一种或多种的糖,特别是来自血清型Ia、Ib和III中的一种或多种。这四种血清型各自的荚膜糖包含:(a)末端N-乙酰基-神经氨酸(NeuNAc)残基(一般称为唾液酸),在所有情况下2 $\rightarrow$ 3连接至半乳糖残基;和(b)三糖核心内的N-乙酰基-葡萄糖胺残基(GlcNAc)。所有四种糖包含所述三糖核心中的半乳糖残基,但是血清型Ia、Ib、II和III也包含各重复单位中的其他半乳糖残基。

[0018] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含一种GBS偶联物。例如,所述GBS偶联物可以是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。所述GBS偶联物可以是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。所述GBS偶联物可以是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。所述GBS偶联物可以是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。所述GBS偶联物可以是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。

[0019] 所述免疫原性组合物可以包含多于一种GBS偶联物。下面描述包含两种、三种、四种或五种GBS偶联物的本发明实施方式。在一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在第二个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在第三个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在第四个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在第五个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在第六个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型V

的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在其它个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在其它实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在其它实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在其它实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。

[0020] 通常而言,本发明的免疫原性组合物包含三种GBS偶联物。通常而言,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在一个可选实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在另一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第三GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。

[0021] 采用相同方式,所述免疫原性组合物可以包含四种GBS偶联物。在一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在一个

实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。在一个实施方式中,第一GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。

[0022] 采用相同方式,所述免疫原性组合物可以包含五种GBS偶联物。例如,第一GBS偶联物是GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第二GBS偶联物是GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,第三GBS偶联物是GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,而第四GBS偶联物是GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白的偶联物,且第五GBS偶联物是GBS血清型II的荚膜糖与载体蛋白的偶联物。

[0023] 通常而言,上述免疫原性组合物不包含具体提到的那些以外的任何GBS偶联物,特别是含有特定提到的那些以外的GBS血清型的荚膜糖的GBS偶联物。然而,在一些实施方式中,所述组合物可以包含其他GBS偶联物,包括含有其他GBS血清型的荚膜糖的GBS偶联物。例如,所述组合物可以包含GBS血清型VI的荚膜糖与载体蛋白偶联的GBS偶联物。在另一种可能中,所述组合物可包含GBS血清型VIII的荚膜糖与载体蛋白的GBS偶联物。

[0024] 本发明所用的糖可以是其天然形式,也可以是经修饰的形式。例如,糖可以比天然荚膜糖短,或可被化学修饰。具体而言,本发明使用的所述血清型V荚膜糖可以如参考文献13和14所述进行修饰。例如,本发明特定设想采用如参考文献13和14所述的实质脱唾液酸化的血清型V荚膜糖。脱唾液酸化的GBS血清型V荚膜糖可通过以下方式制备:在温和和酸性条件下(例如0.1M硫酸,80℃持续60分钟)处理纯化的GBS血清型V荚膜糖或者用神经氨酸酶处理,如参考文献13所述。一种优选的制备脱唾液酸化GBS血清型V荚膜糖的方法是将纯化的糖用1M乙酸在81℃+/-3℃处理2小时。因此,本发明所用的糖可以是如天然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、通过尺寸层析等。已有报道称,链长影响GBS糖在兔子中的免疫原性[5]。特别地,本发明使用的所述血清型II和/或III荚膜糖可以如参考文献15和16所述进行解聚。这些文献描述了通过温和和去氨基切割为含还原末端2,5-脱水-D-甘露糖残基的抗原片段来部分解聚II型和III型荚膜糖。简单说,使所述荚膜糖溶解于0.5N NaOH中,随后加热到70℃约1-4小时。该孵育时长控制解聚程度,所述解聚程度可由标准方法(如由参考文献15所述的HPLC)测定。所述样品在冰水浴中冷却,然后加入冰醋酸将pH调到4。然后,部分N-脱乙酰化的产物通过加入5% (wt/vol) NaNO₂在4℃搅拌2小时来脱氨。如参考文献[12]所述,新形成的2,5-脱水-D-甘露糖残基的游离醛可以用于与载体蛋白偶联。

[0025] 已经报道了血清型III荚膜糖由内-β-半乳糖苷酶的来解聚[参考文献2和5-7],这包含采用所述解聚材料来与破伤风类毒素载体形成偶联物。GBS血清型III和VIII的荚膜多糖的臭氧分解也已经用于解聚[17]。优选使用MW>30kDa的糖,并且可采用基本全长的荚膜多糖。就血清型Ia而言,优选采用MW为150-400kDa,尤其是300-350kDa的多糖。通常而言,采

用MW约为330kDa的血清型Ia的糖。对血清型Ib而言,优选采用MW为150-400kDa,特别是250-300kDa的多糖。通常而言,采用MW约为280kDa的血清型Ib的糖。对血清型III而言,优选使用MW为50-200kDa,特别是100-150kDa的多糖。通常而言,采用MW约为140kDa的血清型III的糖。对血清型V而言,也优选采用MW为50-200kDa,特别是150-200kDa的多糖。通常而言,采用MW约为180kDa的血清型V的糖。这些分子量可通过凝胶过滤相对于葡聚糖标准品,如购自PSS公司(Polymer Standard Service)的标准品测定[18]。

[0026] 所述糖可相对于与天然情况下发现的荚膜糖有化学修饰。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-丙酸酯化(部分或全部)等。去乙酰化可在偶联之前、期间或之后进行,但优选在偶联前进行。根据具体的糖,去乙酰化可能会影响或不影响免疫原性。参考文献19讨论了各种血清型中GBS糖上O-乙酰化的关联,且在一些实施方式中,第7、8和/或9位的唾液酸残基的O-乙酰化在偶联前、期间和之后都保留,例如通过保护/去保护、通过再乙酰化等。然而,本发明所用的GBS糖通常在第7、8和/或9位处基本没有唾液酸残基的O-乙酰化。具体而言,如果GBS糖通过参考文献[12]中所述的碱提取方式纯化,那么通常会丧失O乙酰化(参考文献19)。可用常规实验评价去乙酰化等的影响。

[0027] 荚膜糖可通过已知技术例如本文引用的参考文献(如参考文献3和20)所述来纯化。典型的方法包括碱提取、离心、过滤、RNA酶/DNA酶处理、蛋白酶处理、浓缩、尺寸排阻层析、超滤、阴离子交换层析和进一步超滤。也使用酶变溶菌素处理GBS细胞,酶变溶菌素剪切细菌细胞壁以释放所述细胞壁的成分。

[0028] 作为替代,可使用参考文献21所述的纯化过程。这涉及碱提取、乙醇/ CaCl_2 处理、CTAB沉淀和再溶。参考文献22中记载了另一种替代方法。

[0029] 本发明不限于纯化自天然来源的糖,然而,可通过其它方法如全合成或部分合成获得所述糖。

[0030] 上述免疫原性组合物可以包含任何合适量的荚膜糖/单位剂量。在各剂量内,个体糖抗原的量通常是0.1-50 μg (以糖质量计),具体是1-50 μg 或0.5-25 μg ,更具体是2.5-7.5 μg ,如约1 μg 、约2.5 μg 、约5 μg 、约10 μg 、约15 μg 、约20 μg 或约25 μg 。在各剂量内,GBS荚膜糖的总量通常 $\leq 70\mu\text{g}$ (以糖质量计),如 $\leq 60\mu\text{g}$ 。具体而言,所述总量可以是 $\leq 40\mu\text{g}$ (如 $\leq 30\mu\text{g}$)或 $\leq 20\mu\text{g}$ (如 $\leq 15\mu\text{g}$)。当所述免疫原性组合物包含如下组分时,这些总量特别有效:i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;和iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。每单位剂量的荚膜糖总量减小可能有利于降低可能的毒性。因此,本发明通常采用 $\leq 20\mu\text{g}$,如 $\leq 15\mu\text{g}$ 、 $\leq 7.5\mu\text{g}$ 或 $\leq 1.5\mu\text{g}$ 的总量。

[0031] 可以进一步使每个单位剂量的荚膜糖的量最小化。具体而言,合适量的荚膜糖可以是0.1-5 μg /单位剂量。因此,各GBS荚膜糖通常可以0.1-5 μg ,如0.5、2.5或5 μg /单位剂量的量存在。例如,各GBS荚膜糖可以0.5-5 μg 、1-4 μg 、2-3 μg 或约2.5 μg /单位剂量的量存在。当所述免疫原性组合物包含如下组分时,这些量通常是特别有效的:i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;和iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物。

[0032] 在所述免疫原性组合物包含多于一种GBS偶联物的上述实施方式中,给定的荚膜糖质量与其他荚膜糖质量的比率可以变化。例如,当免疫原性组合物包含GBS血清型Ia、Ib

和III荚膜糖时,GBS血清型Ia、Ib和III荚膜糖的质量比是1:1:1。

[0033] 偶联

[0034] 本发明采用的GBS偶联物是与载体蛋白偶联的GBS血清型Ia、Ib、II、III或V的荚膜糖。本文中所用的术语“偶联物”指通过使两个部分共价结合以形成单一结构来形成的化合物,其中第一部分是抗原,尤其是多糖,而第二部分是免疫原性载体,例如载体蛋白。所述结合可通过分子之间的共价化学键或通过采用连接基团来实现,非排他地包括二氨基烷和一种或多种氨基酸,其中一种提供游离的巯基、羧基、氨基或其它基团用于偶联至载体。出于本发明目的,一般而言,术语“偶联物”指的是共价连接至载体蛋白的细菌抗原,特别是细菌糖或多糖。一般,糖与载体的共价偶联增强糖的免疫原性,因为这将糖由T非依赖性抗原转变为T-依赖性抗原,由此能够引发免疫记忆。偶联对于儿科疫苗特别有用[例如参考文献23],而且是公知技术[例如在参考文献24-32中综述]。因此,本发明的方法可包括将经纯化糖与载体分子偶联的其他步骤。

[0035] 已广泛报道GBS糖的偶联,例如参见参考文献2-103。GBS糖偶联的典型现有技术方法通常涉及将纯化的糖还原性胺化到载体蛋白,例如破伤风类毒素(TT)或CRM197[3]。还原胺化涉及载体氨基酸侧链上的胺基与糖上的醛基。由于GBS荚膜糖在其天然形式中不包括醛基,通常是在偶联之前通过糖唾液酸残基的一部分(如5-40%,特别10-30%,优选约20%)发生氧化(如高碘酸盐氧化)产生醛基[3,33]。已显示此方法制备的偶联物疫苗就各GBS血清型Ia、Ib、II、III和V而言在人体中安全且具有免疫原性[11]。通常,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的所有偶联物。然而,当本发明使用脱唾液酸化的血清型V荚膜糖时,那么可在这种糖中生成醛基,然后通过氧化(如高碘酸盐氧化)部分(如5-40%,特别10-30%,优选约20%)糖半乳糖残基来偶联[2,33]。一个替代的偶联过程涉及利用糖中的-NH₂基团(来自去N-乙酰化或在引入胺后)以及双功能接头,如文献34中所述。在这些实施方式中,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的一种或多种偶联物。参考文献15和16中记载了另一种替代方法。在这个过程中,所述通过温和去氨基切割从II型或III型荚膜糖解聚的末端2,5-脱水-D-甘露糖残基的游离醛基用于还原性胺化的偶联。在这些实施方式中,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的一种或多种偶联物。可通过分开的方法制备偶联物,并将其合并至单一剂量制剂中。

[0036] 载体蛋白

[0037] 本发明涉及载体蛋白的应用。尽管多糖本身具有免疫原性,多糖与载体蛋白的偶联能够促进或加强免疫原性。因此,本文所用的术语“载体”指的是一种免疫原性物质,当其与抗原(例如多糖)偶联并给予动物时,将诱导或加强该动物中的免疫应答,尤其是保护性免疫应答,并且引发产生特异性结合至所述抗原(例如,上述多糖)的抗体。有用的载体蛋白包含细菌毒素或类毒素,如白喉毒素或破伤风类毒素。还可使用毒素或类毒素的片段,例如破伤风类毒素的片段C[35]。

[0038] 白喉毒素的CRM197突变体[36-38]是可用于本发明的特别特别有用的载体。白喉是一种急性、常致命的细菌性疾病,由白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)引起,该疾病的临床表现主要缘于循环白喉类毒素的存在。一般而言,针对白喉的主动免疫程序基于通过对白喉类毒素进行甲醛解毒产生的包含白喉类毒素的制剂(见下文)。这些交叉反应的物质(CRM197)是白喉毒素的基因工程脱毒化制剂。CRM197与白喉毒素(DT)仅有单个氨

基酸差异,因而与DT具有高度交叉反应性(CRM=交叉反应物质)。白喉毒素的该突变体并不需要用甲醛脱毒,并且能够容易地获得纯化抗原的均质制备物,例如,来自酪蛋白氨基酸和酵母提取物培养基中生长的白喉棒状杆菌菌株C7(beta197)的培养物。或者,可根据US5,614,382来重组制备CRM197。CRM197是经许可用于人类应用的用于若干荚膜多糖抗原的载体蛋白,并且是通过甲醛处理制备的传统白喉类毒素的潜在替代物。如下文所述,CRM197作为载体的应用可能是有利的,因为该载体能够引发产生针对白喉棒状杆菌的抗体。

[0039] 其他合适的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌(*N.meningitidis*)外膜蛋白复合物[39]、合成肽[40,41]、热激蛋白[42,43]、百日咳蛋白[44,45]、细胞因子[46]、淋巴因子[46]、激素[46]、生长因子[46]、人血清白蛋白(优选重组的)、包含多种来自各种病原体衍生抗原的人CD4⁺T细胞表位的人工蛋白[47]例如N19[48]、来自流感嗜血杆菌(*H.influenzae*)的蛋白D[49,50]、肺炎球菌表面蛋白PspA[51]、肺炎球菌溶血素[52]、摄铁蛋白[53]、来自艰难梭菌(*C.difficile*)的毒素A或B[54]、重组绿脓假单胞菌(*P.aeruginosa*)胞外蛋白A(rEPA)[55]、GBS蛋白(特别是GBS67)[56]等等。

[0040] 优选通过-NH₂基团与载体连接,例如在载体蛋白中赖氨酸残基侧链或精氨酸残基侧链或在N末端的-NH₂基团。也可通过-SH基团,如半胱氨酸残基侧链中的-SH基团连接。

[0041] 可以使用多于一种的载体蛋白,例如用于降低载体抑制的风险。因此,不同的载体蛋白可用于不同的GBS血清型,如血清型Ia糖可以偶联至CRM197,而血清型Ib糖可以偶联至破伤风类毒素。也可以对特定糖抗原使用多于一种的载体蛋白,例如血清型III糖可以分为两组,一些偶联于CRM197且其它偶联于破伤风类毒素。然而,一般对所有糖采用相同的载体蛋白。

[0042] 一种载体蛋白可携带多于一种的糖抗原[57,58]。例如,单个载体蛋白可以偶联于来自血清型Ia和Ib的糖。为了实现这一目的,可以在偶联反应之前混合不同糖。然而,通常优选各血清型的分开的偶联物,不同的糖在偶联之后混合。分开的偶联物可基于同一载体。

[0043] 通常使用糖:蛋白质之比(w/w)为1:5(即蛋白质过量)-5:1(即糖过量)的GBS偶联物,特别是比率1:5-2:1。若本发明采用GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的GBS偶联物,则糖:蛋白质的比率(w/w)通常是约1:1-1:2,特别是约1:1.3。类似地,若本发明采用GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,则所述比例通常是约1:1-1:2,特别是约1:1.3。若本发明采用GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,则糖:蛋白质的比率(w/w)通常是约3:1-1:1,特别是约2:1。然而也可使用糖:蛋白质比率(w/w)约1:1-1:5(特别是约1:3.3)的GBS血清型III与载体蛋白的偶联物。若本发明采用GBS血清型II荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,则所述比率通常是约2:1~1:1。最后,若本发明采用GBS血清型V的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,则所述比率通常是约2:1~1:1,特别是约1:1:1。因此通常糖过重,特别对较长的糖链而言。

[0044] 组合物可包含少量游离的载体[59]。当本发明组合物中给定的载体蛋白同时以游离和偶联形式存在时,未偶联形式通常不多于整体组合物中载体蛋白总量的5%,例如,以重量计少于2%。

[0045] 偶联后,可将游离和偶联的糖分开。有许多合适的方法,包括疏水色谱、切向超滤、透析等。[也参见参考文献60和61等]。参考文献62中记载了优选方法。

[0046] 若本发明组合物包含解聚寡糖,优选在偶联前进行解聚。

[0047] 一种或多种抗原

[0048] “抗原”是一种化合物、组合物或物质，其刺激体内的免疫应答，尤其是通过刺激产生抗体和/或T细胞应答的保护性免疫应答。当上述的细菌多糖偶联物是抗原时，如本文一般所用的术语“抗原”用于指白喉类毒素、破伤风类毒素、百日咳类毒素、细胞百日咳抗原、非细胞百日咳抗原和脊髓灰质炎病毒抗原，包括下文描述的失活的脊髓灰质炎抗原。因此，该术语将用于将主要提供抵抗无乳链球菌的偶联的组分与提供抵抗白喉棒状杆菌、破伤风梭菌、百日咳博代氏杆菌和/或脊髓灰质炎病毒的保护的组分区分开。本文所用的术语“一种(个)或多种(个)”指的是一种(个)、两种(个)、三种(个)、四种(个)、五种(个)、六种(个)、七种(个)、八种(个)、九种(个)、十种(个)或更多种(个)。

[0049] 白喉类毒素

[0050] 白喉是由白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)，一种革兰氏阳性无孢子需氧菌产生的。该生物体表达原噬菌体编码的ADP-核糖基化外毒素(“白喉毒素”)，(例如用甲醛)处理后得到无毒但保留抗原性的类毒素，能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献63的第13章更详细地揭示了白喉类毒素。优选的白喉类毒素是通过甲醛处理而制备的那些。采用可补充牛提取物的生长培养基(如Fenton培养基，或Linggoud和Fenton培养基)培养白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)，接着进行甲醛处理、超滤和沉淀，可获得白喉类毒素。然后可通过包括无菌过滤和/或透析的方法来处理该类毒素物质。

[0051] 可用国际单位(IU)来表示白喉类毒素的量。例如，NIBSC [64] 提供了“吸附的白喉类毒素的第三国际标准品1999”[65, 66]，其包含160IU/安瓿。作为IU系统的替代形式，“Lf”单位(“絮凝单位”、“边界絮凝剂量”或“絮凝限值”)定义为与一个国际单位的抗毒素混合时，产生最优絮凝混合物的类毒素量[67]。例如，NIBSC提供了“白喉类毒素，普通(Plain)”[68]，其包含300Lf/安瓿，还提供了“用于絮凝试验的白喉类毒素的第一国际基准试剂”[69]，其包含900Lf/安瓿。IU与Lf系统间的转换取决于具体的类毒素制剂。

[0052] 白喉棒状杆菌的培养过程中采用牛材料时，它们应获自未患牛海绵状脑病(BSE)或其他传染性海绵状脑病(TSE)的来源。

[0053] 本发明免疫原性组合物中的白喉类毒素通常以在给予时能够引发免疫应答的量存在。理想上，白喉类毒素能引发保护性免疫应答。本发明免疫原性组合物中的白喉类毒素的量通常是1-50Lf/剂量。用于青少年和成人的加强疫苗通常包含4Lf/ml~8Lf/ml的白喉类毒素，例如，2.5Lf，优选4Lf/0.5ml剂量。小儿疫苗通常包含20~50Lf/ml的白喉类毒素，例如10Lf或25Lf/0.5ml剂量。

[0054] 对于小儿联合疫苗而言，白喉类毒素与破伤风类毒素的比通常大于1(即，小儿疫苗中通常具有过量的白喉类毒素)并且一般是2:1~3:1(以Lf单位计)，例如，2.5:1。相反，对于给予青少年或成人(其通常已经至少一次接受过包含白喉类毒素和破伤风类毒素小儿联合疫苗)的加强疫苗而言，白喉类毒素和破伤风类毒素的比率通常大于1(即，加强疫苗通常具有过量的破伤风类毒素)并且一般是1.5:1~2.5:1，例如2:1。白喉类毒素通常是未偶联的。

[0055] 本领域技术人员应理解，“白喉组分”，换言之是用于引发提供抵抗白喉棒状杆菌的保护的免疫应答的免疫原性组合物的部分，可以以CRM197、白喉类毒素或其组合的形式提供。

[0056] 在一些实施方式中,若CRM197以载体蛋白形式存在,即,作为偶联物的部分,则可减少本发明的组合物中的未偶联的(“游离”)白喉类毒素的量。在其它实施方式中,若CRM197以载体蛋白形式存在,即,作为偶联物的部分,则白喉类毒素不存在并且可以不含在本发明的组合物中,但该免疫原性组合物仍能够引发免疫应答来提供抵抗白喉棒状杆菌的保护。因此,若免疫原性组合物同时包含未偶联的和偶联的白喉类毒素和/或CRM197,则白喉类毒素/CRM197的总量可等于1-50Lf/剂量,浓度在4Lf/ml到8Lf/ml,例如2.5Lf/0.5ml剂量或4Lf/0.5ml剂量,浓度为20~50Lf/ml,例如10Lf/0.5ml剂量或25Lf/0.5ml剂量。在具体实施方式中,若不存在白喉类毒素,则存在的CRM197的量可等于1-50Lf/剂量,浓度为4Lf/ml到8Lf/ml,例如2.5Lf/0.5ml剂量或4Lf/0.5ml剂量,浓度为20~50Lf/ml,例如10Lf/0.5ml剂量或25Lf/0.5ml剂量。

[0057] 可使白喉类毒素吸附至氢氧化铝佐剂上。

[0058] 通常而言,包含白喉类毒素抗原的免疫原性组合物基本不含任何含汞防腐剂。

[0059] 破伤风类毒素

[0060] 破伤风是由破伤风梭菌(*Clostridium tetani*),一种革兰氏阳性出芽孢杆菌产生的。该生物体表达内肽酶(“破伤风毒素”),经处理后得到无毒但保留抗原性的类毒素,能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献1的第27章更详细地公开了破伤风类毒素。优选的破伤风类毒素是通过甲醛处理而制得的那些。采用生长培养基(如衍生自牛酪蛋白的Latham培养基)培养破伤风梭菌(*C. tetani*),然后进行甲醛处理、超滤和沉淀,能够获得破伤风类毒素。然后可通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理此物质。

[0061] 可用国际单位(IU)表示破伤风类毒素的量。例如,NIBSC[70]提供了“吸附的破伤风类毒素的第三国际标准品2000”[71,72],其包含469IU/安瓿。作为IU系统的替代形式,“Lf”单位定义为与一个国际单位的抗毒素混合时,产生最优絮凝混合物的类毒素量[73]。例如,NIBSC提供了“用于絮凝试验的破伤风类毒素的第一国际参比试剂”[74],其含有1000LF/安瓿。IU与Lf系统间的转换取决于具体的类毒素制剂。

[0062] 破伤风梭菌的培养过程中采用牛材料时,它们应获自未患牛海绵状脑病(BSE)或其他传染性海绵状脑病(TSE)的来源。

[0063] 本发明免疫原性组合物中的破伤风类毒素通常以在给予时能够引发免疫应答的量存在。理想上,破伤风类毒素能引发保护性免疫应答。本发明免疫原性组合物中的破伤风类毒素的量通常是1-20Lf/剂量。用于青少年和成人的加强疫苗通常包含5Lf的破伤风类毒素/0.5ml剂量。小儿疫苗通常包含5~10Lf的破伤风类毒素/0.5ml剂量。

[0064] 破伤风类毒素通常是未偶联的。然而,对于本领域技术人员显而易见的是,在一些实施方式中,破伤风类毒素能够同时以游离的(未偶联的)和偶联的形式存在,或主要以偶联形式存在,即多于80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%的破伤风类毒素以偶联形式存在。因此,本发明免疫原性组合物中的破伤风类毒素可指单独的未偶联破伤风类毒素、单独的偶联的破伤风类毒素,或未偶联和偶联的破伤风类毒素的总和。

[0065] 破伤风类毒素可以但不必定吸附于氢氧化铝佐剂(例如,可使用占破伤风类毒素总量0-10%的吸附)。

[0066] 通常而言,包含破伤风类毒素抗原的免疫原性组合物基本不含任何含汞防腐剂。

[0067] 百日咳类毒素

[0068] 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) 是一种可引起百日咳的革兰氏阴性无孢子需氧菌。如参考文献1的第21章中详细记录的那样,抗百日咳博德特菌的疫苗已存在许多年,分为细胞(wP)和非细胞两类(aP)。细胞疫苗包含完整百日咳博德特菌细胞,经杀死和灭活(例如通过用福尔马林和/或加热处理),而非细胞疫苗包含特异性纯化的百日咳博德特菌,从天然细菌纯化或在重组宿主中表达后纯化。

[0069] 细胞百日咳抗原

[0070] 本发明可使用以失活的百日咳博代氏杆菌细胞形式的细胞百日咳抗原。细胞百日咳抗原的制备已有详尽记载(参见例如参考文献1的第21章),例如,可通过热灭活百日咳博德特菌(*B.pertussis*)的I期培养物获得。

[0071] 可用国际单位(IU)表示wP抗原的量。例如,NIBSC提供了'百日咳疫苗的第三国际标准品'[75],其含有46IU/安瓿。各安瓿含有2.0ml水溶液等份的冻干残留物,所述等份取自用8升M/15 Sorensen缓冲液pH 7.0稀释的10升细菌悬液(根据美国不透明标准,等同于180不透明单位)的水溶液。作为IU系统的替代形式,也采用'OU'单位("不透明单位")(如40U可约为1IU)。

[0072] 本发明免疫原性组合物中的细胞百日咳抗原通常以在给予时能够引发免疫应答的量存在。理想上,所述细胞百日咳抗原能引发保护性免疫应答。本发明免疫原性组合物中的wP抗原的量通常是至少4IU/剂量。

[0073] 可使所述细胞百日咳抗原吸附至或与磷酸铝佐剂混合。

[0074] 非细胞百日咳抗原

[0075] 通常本发明的单一疫苗中可采用一种以上的非细胞百日咳(aP)抗原,例如两种或三种下述公知且充分表征的百日咳博德特菌抗原:(1)脱毒的百日咳毒素(百日咳类毒素或"PT");(2)丝状血细胞凝集素("FHA");(3)百日咳杆菌粘附素(也称为"69千道尔顿外膜蛋白")。最优选使用所有三种抗原。优选从改良的Stainer-Scholte液体培养基培养的百日咳博德特菌培养物中分离制备这三种抗原。PT和FHA可从发酵液中分离(如通过吸附于羟基磷灰石凝胶)得到,而百日咳杆菌粘附素可通过加热处理和絮凝(如采用氯化钡)从细胞中提取。可用后续的色谱和/或沉淀步骤纯化抗原。PT和FHA可通过疏水层析法、亲和层析法和尺寸排阻层析法来纯化。百日咳杆菌粘附素可通过离子交换层析、疏水性层析和大小排阻层析来纯化。

[0076] 在根据本发明而使用之前,可用甲醛处理FHA和百日咳杆菌粘附素。优选地,通过用甲醛和/或戊二醛进行处理而使PT脱毒。作为这种化学脱毒方法的替代形式,PT可以通过诱变降低了酶活性的突变PT[76],但优选用化学处理脱毒。

[0077] 可以使用的其他非细胞百日咳抗原包括菌毛(如凝集原2和3)。

[0078] aP抗原可以未吸附状态使用,但优选它们在使用之前吸附在一种或多种铝盐佐剂。aP抗原优选吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0079] 通常而言,包含aP抗原的免疫原性组合物基本不含汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0080] 本发明免疫原性组合物中的非细胞百日咳抗原通常以在给予时能够引发免疫应答的量存在。理想上,所述非细胞百日咳抗原能引发保护性免疫应答。非细胞百日咳抗原的量通常用微克表示。疫苗中PT的浓度通常是5~50 $\mu\text{g/ml}$ 。PT浓度通常是5 $\mu\text{g/ml}$ 、16 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 或50 $\mu\text{g/ml}$ 。疫苗中FHA的浓度通常是10~50 $\mu\text{g/ml}$ 。FHA浓度通常是10 $\mu\text{g/ml}$ 、16 $\mu\text{g/ml}$

或50 μ g/ml。疫苗中百日咳杆菌粘附素的浓度通常是5~16 μ g/ml。百日咳杆菌粘附素的浓度通常是5 μ g/ml、6 μ g/ml或16 μ g/ml。例如,用于青少年和成人的加强疫苗通常每0.5ml剂量包含2.5~8 μ g PT、4~8 μ g FHA和2.5~8 μ g百日咳杆菌粘附素。通常而言,每0.5ml剂量的加强疫苗包含4 μ g PT、4 μ g FHA和8 μ g百日咳杆菌粘附素,更优选地,5 μ g PT、2.5 μ g FHA和2.5 μ g百日咳杆菌粘附素。小儿疫苗通常每0.5ml剂量包含7 μ g PT、10 μ g FHA和10 μ g百日咳杆菌粘附素。

[0081] 若水性组分包含各PT、FHA和百日咳杆菌粘附素,则其重量比是可变的,但可以是例如约16:16:5,约5:10:6,约20:20:3,约25:25:8,或约10:5:3 (PT:FHA:PRN)。

[0082] 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原

[0083] 脊髓灰质炎可由三种类型的脊髓灰质炎病毒中的一种引起。这三种类型是相似的并且引起相同的症状,但它们的抗原性差异很大,被一种类型病毒感染后不能防止免受其它类型病毒的感染。如参考文献1第24章所述,本发明免疫原性组合物优选采用三种脊髓灰质炎病毒抗原:1型脊髓灰质炎病毒(如Mahoney毒株)、2型脊髓灰质炎病毒(如MEF-1毒株)和3型脊髓灰质炎病毒(如Saukett毒株)。

[0084] 本发明的免疫原性组合物可包含失活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0085] 脊髓灰质炎病毒可以在细胞培养物中生长。优选的培养物是Vero细胞系,它是从猴肾中得到的连续细胞系。可方便地将Vero细胞培养成为微载体。病毒感染之前和感染期间的Vero细胞的培养可能涉及使用来自牛的材料,例如小牛血清,使用乳球蛋白水解产物(例如由乳球蛋白酶降解得到的产物)。这些来源于牛的材料应从不患有BSE或其它TSE的来源获取。优选地,使脊髓灰质炎病毒在不含动物源性组分的培养基中培养的细胞中生长。生长后可用诸如超滤、渗滤和层析等技术来纯化病毒颗粒。在给予患者之前,必须将脊髓灰质炎病毒灭活,这可以通过在把病毒用于本发明组合物之前用甲醛处理而实现。

[0086] 优选地对三种脊髓灰质炎病毒单独地进行培养、纯化和灭活,然后合并而得到用于本发明的混合物。

[0087] 可使合并的脊髓灰质炎病毒吸附至铝盐佐剂上。

[0088] 通常而言,包含IPV抗原的免疫原性组合物基本不含汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0089] 一般用“DU”单位(“D-抗原单位”[77])表示IPV抗原的量。本发明免疫原性组合物中的IPV抗原通常以在给予时能够引发免疫应答的量存在。理想上,所述IPV抗原能引发保护性免疫应答。

[0090] 联合疫苗通常包含1-100DU/脊髓灰质炎病毒/类型剂量,例如,约40DU的1型脊髓灰质炎病毒,约8DU的2型脊髓灰质炎病毒和约32DU的3型脊髓灰质炎病毒,但能够采用低于所述这些的剂量[78,79],例如,10-20DU的1型,2-4DU的2型和8-20DU的3型。优选地,本发明的联合疫苗包含“低剂量”的脊髓灰质炎病毒。对于1型脊髓灰质炎病毒,这表示组合物中病毒的浓度 $\leq$ 20DU/ml,例如<18、<16、<14、<12、<10等。对于2型脊髓灰质炎病毒,这表示组合物中病毒的浓度 $\leq$ 4DU/ml,例如<3、<2、<1、<0.5等。对于3型脊髓灰质炎病毒,这表示组合物中病毒的浓度 $\leq$ 16DU/ml,例如<14、<12、<10、<8、<6等。在所有三种1型、2型和3型脊髓灰质炎病毒存在的情况下,这三种抗原可以分别以5:1:4的DU比率或其它任意合适比率而存在,例如当使用Sabin毒株时的比率为15:32:45[80]。低剂量的来源于Sabin毒株的抗原是特别有用的,各单位剂量(通常是0.5ml)中含有 $\leq$ 10DU的1型病毒, $\leq$ 20DU的2型病毒,和 $\leq$ 30DU

的3型病毒。

[0091] 若采用IPV组分并且脊髓灰质炎病毒在Vero细胞上生长,则疫苗组合物优选包含少于10ng/ml,优选 $\leq$ 1ng/ml,例如 $\leq$ 500pg/ml或 $\leq$ 50pg/ml的Vero细胞DNA,例如,少于10ng/ml的Vero细胞DNA,其长度 $\geq$ 50碱基对。

[0092] 本发明的特定免疫原性组合物

[0093] 特定设想的本发明的免疫原性组合物包括:

[0094] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,和(iv) 白喉类毒素。

[0095] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,和(iv) 破伤风类毒素。

[0096] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素和(v) 破伤风类毒素。

[0097] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 细胞百日咳抗原。

[0098] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 非细胞百日咳抗原。

[0099] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 脱毒的百日咳毒素,(vii) 丝状血细胞凝集素和(viii) 百日咳杆菌粘附素。

[0100] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 非细胞百日咳抗原和(vii) 失活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0101] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 脱毒的百日咳毒素,(vii) 丝状血细胞凝集素,(viii) 百日咳杆菌粘附素和(ix) 失活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0102] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白喉类毒素,(v) 破伤风类毒素,(vi) 脱毒的百日咳毒素,(vii) 丝状血细胞凝集素,(viii) 百日咳杆菌粘附素,(ix) 脊髓灰质炎病毒1型毒株的抗原,(x) 脊髓灰质炎病毒2型毒株的抗原和(xi) 脊髓灰质炎3型毒株的抗原。

[0103] • i) GBS血清型Ia的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;ii) GBS血清型Ib的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物;iii) GBS血清型III的荚膜糖与载体蛋白偶联的偶联物,(iv) 白

喉类毒素, (v) 破伤风类毒素, (vi) 非细胞百日咳抗原, (vii) 脊髓灰质炎病毒1型毒株的抗原, (viii) 脊髓灰质炎病毒2型毒株的抗原和 (ix) 脊髓灰质炎3型毒株的抗原。

[0104] 包含来自GBS血清型Ia荚膜糖的荚膜糖的GBS偶联物中的载体蛋白、包含来自GBS血清型Ib荚膜糖的GBS偶联物中的载体蛋白, 和包含GBS血清型III荚膜糖的GBS偶联物中的载体部分通常是CRM197。

[0105] 本发明的其它示例性免疫原性组合物包括:

[0106] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物和 (d) 白喉类毒素, 特别是所述白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖。

[0107] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物和 (d) 破伤风类毒素, 特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖。

[0108] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (d) 白喉类毒素, 特别是通过用甲醛处理白喉毒素制得的白喉类毒素, 特别是白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖, 和 (e) 破伤风类毒素, 特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖。

[0109] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (d) 白喉类毒素, 特别是通过用甲醛处理白喉毒素制得的白喉类毒素, 特别是白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖; (e) 破伤风类毒素, 特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖和 (f) 细胞性百日咳抗原或非细胞性百日咳抗原。

[0110] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (d) 白喉类毒素, 特别是通过用甲醛处理白喉毒素制得的白喉类毒素, 特别是白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖; (e) 破伤风类毒素, 特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖; (f) 脱毒的百日咳毒素, (g) 丝状血细胞凝集素, (h) 百日咳杆菌粘附素, 和可选的 (i) 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0111] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (d) 来自GBS血清型II的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (e) 来自GBS血清型V的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (f) 白喉类毒素, 特别是通过用甲醛处理白喉毒素制得的白喉类毒素, 特别是白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖和/或 (g) 破伤风类毒素, 特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖; 可选的 (h) 细胞性百日咳抗原或非细胞性百日咳抗原; 可选的 (i) 脱毒的百日咳毒素; 可选的 (j) 丝状血细胞凝集素; 可选的 (k) 百日咳杆菌粘附素和可选的 (l) 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0112] 一种组合物, 其包含: (a) 来自GBS血清型Ia的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; b) 来自GBS血清型Ib的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; c) 来自GBS血清型III的荚膜糖与CRM197偶联的偶联物; (d) 来自GBS血清型II的荚膜糖与CRM197或破伤风类毒素偶联的偶联物; (e)

来自GBS血清型V的荚膜糖与CRM197或破伤风类毒素偶联的偶联物；(f) 白喉类毒素,特别是通过用甲醛处理白喉毒素制得的白喉类毒素,特别是白喉类毒素不偶联GBS荚膜多糖和/或(g) 破伤风类毒素,特别是所述破伤风类毒素不偶联GBS荚膜多糖；可选的(h) 细胞性百日咳抗原或非细胞性百日咳抗原；可选的(i) 脱毒的百日咳毒素；可选的(j) 丝状血细胞凝集素；可选的(k) 百日咳杆菌粘附素和可选的(l) 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0113] 药学方法和应用

[0114] 本发明的免疫原性组合物还包含药学可接受的载体。通常“药学上可接受的载体”包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体一般是代谢慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖[81]、海藻糖[82]、乳糖和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。这种载体为本领域普通技术人员熟知。疫苗也可含有稀释剂,如水、盐水、甘油等。此外,也可存在辅助物质,如湿润剂或乳化剂、pH缓冲物质等。无菌、无热原的磷酸盐缓冲生理盐水是一种典型载体。关于药学上可接受赋形剂的全面讨论参见参考文献83。

[0115] 本发明组合物可以是水性形式(即溶液或悬浮液)或干燥形式(如冻干)。如果使用干燥的疫苗,则在注射前将其在液体介质中重建。冻干偶联物疫苗为本领域已知,如所述MenjugateTM产物以冻干形式存在。当本发明免疫原性组合物包括含有来自多于一种GBS血清型的荚膜糖的偶联物时,这些偶联物通常单独制备、混合和然后冻干。以此方式可以制备包含两种、三种或四种等本文所述偶联物的冻干组合物。

[0116] 为使偶联物在冷冻干燥的过程中稳定,可在冷冻干燥之前添加无活性组分(例如,作为稳定剂)。所包含的稳定剂优选地是乳糖、蔗糖和甘露醇及其混合物,如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。因此,通过冻干物质的水性重建得到的最终疫苗可能含有乳糖和/或蔗糖。当制备冻干疫苗时,优选使用无定形赋形剂和/或无定形缓冲液[84]。

[0117] 可能优选在组合物中纳入例如1mg/ml-30mg/ml(如约25mg/ml)的糖醇(如甘露醇)和/或二糖(如蔗糖或海藻糖)。使用蔗糖作为GBS偶联物疫苗的稳定剂已有推荐(参考文献85)。然而,本发明的稳定剂通常是甘露醇。当干燥疫苗在注射前于液体介质中重建时,残留甘露醇的浓度通常是约2-20mg/ml,如3.75mg/ml、7.5mg/ml或15mg/ml。

[0118] 组合物可装在药瓶中,或者可装在填充好的注射器中。注射器可装有或未装有针头。注射器可包含单个组合物剂量,而小瓶可包含单一剂量或多个剂量。

[0119] 优选以0.5ml单位剂量给予患者本发明组合物。应理解,0.5ml的剂量包括正常差异,如0.5ml±0.05ml。对于多剂量的情况,多个剂量的量被共同提取和包装在单个容器中,例如5ml供10剂量的多剂量容器(或5.5ml,超量10%)。

[0120] 本发明的水性组合物也适用于从冻干形式重建其它疫苗。本发明组合物用于所述临用前重建时,本发明提供药盒,其可包括两个药瓶,或可包括一个已填充注射器和一个药瓶,其中在注射前用所述注射器的内容物再活化药瓶的内容物。

[0121] 也可以如下形式制备疫苗,其中所述疫苗可在使用时间/地点通过将两种组分混合在一起临时制备。这种双组分实施方式包括液体/液体混合和液体/固体混合,例如通过混合水性物质和冻干物质。

[0122] 因此,可用于本发明的试剂盒包含含有一种或多种GBS偶联物的第一组分;和含有选自下组的一种或多种抗原的第二部分:a) 细胞或非细胞百日咳抗原,b) 破伤风类毒素,c)

白喉类毒素和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原;其中所述两种组分于分开的容器(例如,小瓶和/或注射剂)中。第一组分中的GBS偶联物可以是冻干的。在一些实施方式中,第一组分不含佐剂。第二组分可包含水性抗原。在一些实施方式中,第二组分包含佐剂,例如,铝盐佐剂。

[0123] 可用于本发明的另一种试剂盒可包含不含抗原的第一成分,从而最终免疫原性组合物中的全部抗原性组分均源自第二组分。例如,试剂盒可包含含有水性抗原的第一组分和含有水性佐剂的第二组分,所述第一组分包含(i)一种或多种GBS偶联物和(ii)选自下组的一种或多种抗原:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原。本发明的免疫原性组合物可通过将第一组分和第二组分混合来制备。

[0124] 本发明还提供一种用于制备本发明免疫原性组合物的方法,所述方法包括:将包含一种或多种GBS偶联物的第一组分和包含一种或多种抗原的第二组分混合,所述一种或多种抗原选自:a)细胞或非细胞百日咳抗原,b)破伤风类毒素,c)白喉类毒素和d)失活的脊髓灰质炎病毒抗原。第一组分中的GBS偶联物可以是冻干的。第二组分可包含水性抗原。所述方法还可包括用第二组分的水性抗原重建第一组分中的冻干的GBS偶联物的步骤。第一组分可不包含佐剂。第二组分可包含佐剂,例如,铝盐佐剂。

[0125] 本发明组合物可以包装成单位剂型或多剂型。就多剂型而言,与预填充注射器相比更优选药瓶。可用常规方法确定有效剂量体积,但组合物的人用注射剂量一般为0.5ml体积,例如用于肌肉注射时。

[0126] 所述组合物的pH优选为6-8,优选约7。可使用缓冲剂来维持稳定的pH。给予患者的水性组合物能具有5.0-7.5的pH,更通常为5.0-6.0以最优化稳定性;在白喉类毒素和/或破伤风类毒素存在的情况下,pH值理想地在6.0和7.0之间。

[0127] 本发明的免疫原性组合物通常包含磷酸二氢钾缓冲液。所述磷酸二氢钾缓冲液可以包含约1-10mM磷酸二氢钾,如1.25mM、2.5mM或5.0mM。当组合物包含氢氧化铝盐时,优选采用组氨酸缓冲液[86]。所述组合物可以是无菌和/或无热原的。本发明的组合物可以与人体等张。

[0128] 本发明组合物有免疫原性,更优选是疫苗组合物。本发明的疫苗可以是预防性(即预防感染)或治疗性(即治疗感染)疫苗,但通常是预防性疫苗。预防性疫苗不保证完全保护免于疾病,因为即便患者发展出抗体,在免疫系统能够击退感染之前也可能有滞后和延迟。因此,为了避免疑问,术语预防性疫苗还可指改善未来感染的影响的疫苗,例如,通过降低此类感染的严重性或缩短感染时间。

[0129] 术语“抵抗感染的保护”和/或“提供保护性免疫力”指的是对象的免疫系统已被引发(例如,通过疫苗接种)来触发免疫应答并击退感染。具体而言,被触发的免疫应答能够击退针对若干病原体,例如不同细菌菌株的感染。因此,经疫苗接种的对象可能被感染,但能够比对照对象更好地击退该感染。用作疫苗的免疫原性组合物包含免疫有效量的抗原,以及需要的任何其它组分。“免疫学有效量”是指以单一剂量或一系列剂量的部分给予个体的对治疗或预防有效的量。一般而言,所需的结果是产生抗原(例如病原体)-特异性的免疫应答,该免疫应答能够保护对象抵抗该病原体。该量根据所治疗个体的健康和身体状况、年龄、所治疗个体的分类组(例如,非人的灵长动物、灵长动物等)、个体免疫系统合成抗体的

能力、所需的保护程度、疫苗配方、治疗医生对医学情况的评估和其它相关因素而变化。预计所述量将落入可通过常规试验可确定的相对较宽范围内。

[0130] 本文所述组合物可以各种形式制备。例如,可将所述组合物制备为液体溶液或悬浮液形式的注射剂。所述组合物可以制备成使用细粉或喷雾的肺部给药制剂,例如吸入剂。所述组合物可制备为栓剂或子宫托。该组合物可制备成用于鼻腔、耳部或眼部给药的制剂,例如喷雾剂、滴剂、凝胶剂或粉末剂[如参考文献87和88]。已报道成功地经鼻给予肺炎球菌糖[89,90]、Hib糖[91]、MenC糖[92]和Hib和MenC糖偶联物的混合物[93]。

[0131] 本发明组合物可包含抗微生物剂,特别是以多剂量形式包装时。

[0132] 本发明组合物可包含去污剂,如吐温(聚山梨酯),如吐温80。去污剂的含量水平通常较低,如<0.01%。

[0133] 本发明组合物可含有钠盐(如氯化钠)以产生张力。NaCl浓度通常为 $10 \pm 2\text{mg/ml}$ 。在一些实施方式中,可以使用浓度为 $4\text{--}10\text{mg/ml}$ 的NaCl,如9.0、7.0、6.75或4.5mg/ml。

[0134] 组合物的渗透压通常为 $200\text{mOsm/kg--}400\text{mOsm/kg}$,优选为 $240\text{--}360\text{mOsm/kg}$,更优选为 $280\text{--}320\text{mOsm/kg}$ 。虽然以前报道过渗透压对疫苗接种引起的疼痛无影响[94],但仍优选地将渗透压保持在此范围内。

[0135] 本发明组合物通常包括缓冲剂。一般是磷酸盐缓冲剂。

[0136] 本发明组合物可与其它免疫调节剂联用。具体说,组合物包括一种或多种佐剂。这类佐剂包括但不限于:

[0137] A. 含有矿物质的组合物

[0138] 适用作本发明佐剂的含有矿物质的组合物包括矿物盐,例如铝盐和钙盐(或其混合物)。钙盐包括磷酸钙(如参考文献95公开的“CAP颗粒”)。铝盐包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等,所述盐可采用任何合适形式(例如凝胶、结晶、无定形等)。优选吸附于这些盐。也可将含有矿物质的组合物制成金属盐的颗粒[96]。

[0139] 可采用称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规名称,但仅为使用方便,因为其均不是出现的实际化合物的精确描述(例如参见参考文献97的第9章)。本发明可采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”的佐剂一般是羟基氧化铝盐(通常至少部分为晶体)。称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝,也常常含有少量硫酸盐(即羟基磷酸硫酸铝)。其可通过沉淀获得,沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中羟基的程度。

[0140] 氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态(例如电子透射显微照片所见的)。氢氧化铝佐剂的pI通常约11,即在生理pH下佐剂本身具有表面正电荷。据报道,在pH7.4时,氢氧化铝佐剂的吸附能力为 $1.8\text{--}2.6\text{mg蛋白质/mg Al}^{+++}$ 。

[0141] 磷酸铝佐剂的 PO_4/Al 摩尔比通常为 $0.3\text{--}1.2$,优选 $0.8\text{--}1.2$,更优选 0.95 ± 0.1 。磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为 $0.84\text{--}0.92$ 的无定形羟基磷酸铝,包含 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。磷酸铝通常是颗粒(如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态)。抗原吸附后颗粒直径一般是 $0.5\text{--}20\mu\text{m}$ (如约 $5\text{--}10\mu\text{m}$)。据报道,pH 7.4时磷酸铝佐剂的吸附容量为 $0.7\text{--}1.5\text{mg蛋白质/mg Al}^{+++}$ 。

[0142] 磷酸铝的零电点(PZC)与磷酸根取代羟基的程度逆相关,且这种取代程度可根据用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度而变化。也通过改变溶液中游离磷酸根离子

的浓度(更多磷酸根=更多酸性PZC)或加入缓冲剂如组氨酸缓冲剂(使PZC碱性更强)来改变PZC。本发明所用的磷酸铝的PZC通常为4.0至7.0,更优选为5.0至6.5,例如约为5.7。

[0143] 用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以但不必需,含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或Tris缓冲液)。优选所述悬浮液是无菌且无热原的。悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子,如存在浓度为1.0–20mM,优选5–15mM,更优选约10mM。所述悬浮液也可含有氯化钠。

[0144] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。在这种情况下,磷酸铝比氢氧化铝多,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。

[0145] 给予患者的组合物中 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至1mg/ml。优选最大值0.85mg/剂量。

[0146] 通常佐剂磷酸铝佐剂是无定形羟基磷酸铝, PO_4/Al 摩尔比为0.84–0.92,包括约0.6mg Al^{3+}/ml 。可采用低剂量磷酸铝吸附,如每剂量50–100 μg Al^{3+} /偶联物。

[0147] B. 皂苷制剂[参考文献97的第22章]

[0148] 皂苷制剂也可以用作本发明的佐剂。皂苷是在许多种类植物的树皮、叶、茎干、根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分离自皂树(*Quillaia saponaria*) Molina树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜(*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、满天星(*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如QS21,以及脂质制剂如ISCOM。

[0149] 已采用HPLC和RP-HPLC纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定纯化组分,包括QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B和QH-C。所述皂苷优选QS21。制备QS21的方法参见参考文献98。皂苷制剂也可包含甾醇,如胆固醇[99]。

[0150] 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97的第23章]。ISCOM通常还包含磷脂,如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任意已知的皂苷均可用于ISCOM中。ISCOM优选包含QuilA、QHA和QHC中的一种或多种。参考文献99–101中进一步描述了ISCOM。任选地,ISCOM可不含其它去污剂[102]。

[0151] 基于皂苷的佐剂开发的综述可参见参考文献103和104。

[0152] C. 病毒小体和病毒样颗粒

[0153] 病毒体和病毒样颗粒(VLP)也可以用作本发明的佐剂。这些结构通常包含任选与磷脂组合或一起配制的一种或多种病毒蛋白质。其通常无病原性,非复制型,且通常不含任意天然病毒基因组。所述病毒蛋白可重组生成或分离自全病毒。这些适用于病毒体或VLP的病毒蛋白包括衍生自流感病毒(例如HA或NA)、乙肝病毒(例如核心蛋白或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺沃克病毒、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、Q β -噬菌体(如外壳蛋白)、GA-噬菌体、fr-噬菌体、AP205噬菌体和Ty(如反转录转座子Ty蛋白p1)的蛋白。参考文献105–110进一步描述了VLP。病毒体在(例如)参考文献111中有进一步描述。

[0154] D. 细菌或微生物衍生物

[0155] 适合用于本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物,例如,免疫刺激性寡核苷酸和ADP-核糖基化毒素及其脱毒化的衍生物。

[0156] 适用作本发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含CpG基序的核苷酸序列(含有通过磷酸键与鸟苷连接的非甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)。含回文或聚(dG)序列的双链RNA

和寡核苷酸也显示具有免疫刺激作用。

[0157] CpG可以包含核苷酸修饰/类似物如硫代磷酸酯修饰,且可以是双链或单链。参考文献112、113和114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115-120中进一步讨论了CpG寡核苷酸的佐剂作用。

[0158] CpG序列可针对TLR9,例如基序GTCGTT或TTCGTT [121]。CpG序列可特异性诱导Th1免疫反应,如CpG-A ODN,或更特异地诱导B细胞反应,如CpG-B ODN。参考文献122-124中讨论了CpG-A和CpG-B ODN。优选CpG为CpG-A ODN。

[0159] 优选构建CpG寡核苷酸从而5'末端可被受体识别。任选将两个CpG寡核苷酸序列的3'端相连接形成“免疫聚体”。参见例如参考文献121和125-127。

[0160] 细菌ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物可以用作本发明的佐剂。优选所述蛋白衍生自大肠杆菌(大肠杆菌不耐热肠毒素“LT”)、霍乱菌(“CT”)或百日咳菌(“PT”)。参考文献128中描述了脱毒的ADP-核糖基化毒素作为粘膜佐剂的应用,参考文献129中描述了其作为胃肠外佐剂的应用。所述毒素或类毒素优选全毒素形式,包含A和B亚基。A亚基优选含有脱毒突变;B亚基优选不突变。佐剂优选脱毒的LT突变体如LT-K63、LT-R72和LT-G192。参考文献130-137中描述了将ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物,尤其是LT-K63和LT-R72用作佐剂。氨基酸取代的数字基准优选是根据参考文献138所示ADP-核糖基化毒素的A和B亚基排列,该参考文献特定通过引用全文纳入本文。

[0161] E. 人免疫调节剂

[0162] 适合作为本发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子,如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 [139]等) [140]、干扰素(如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0163] F. 生物粘着剂和粘膜粘着剂

[0164] 生物粘着剂和粘膜粘着剂也可以用作本发明的佐剂。合适的生物粘着剂包括酯化透明质酸微球 [141] 或粘膜粘着剂如聚(丙烯酸)交联衍生物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素。壳聚糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂 [142]。

[0165] G. 微颗粒

[0166] 微粒也可以用作本发明的佐剂。微粒(即直径 $\sim 100\text{nm}$ 至 $\sim 150\mu\text{m}$,更优选 $\sim 200\text{nm}$ 至 $\sim 30\mu\text{m}$,最优选 $\sim 500\text{nm}$ 至 $\sim 10\mu\text{m}$ 的颗粒)由生物可降解的无毒材料(例如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己内酯等)形成,优选聚(丙交酯-共-乙交酯共聚物),并任选经处理而具有带负电荷的表面(例如用SDS处理)或带正电荷的表面(例如用阳离子去污剂处理,如CTAB)。

[0167] H. 脂质体(参考文献97的第13和14章)

[0168] 适用作佐剂的脂质体制剂的例子见参考文献143-145所述。

[0169] I. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0170] 适用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯 [146]。这种制剂还包括聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯糖醇 [147] 以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯糖醇 [148] 的组合。优选的聚氧乙烯醚选自下组:聚氧乙烯-9-月桂醚(月桂醇聚醚9)、聚氧乙烯-9-硬脂醚、聚氧乙烯-8-硬脂醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

[0171] J. 聚磷腈 (PCPP)

[0172] PCPP制剂描述于例如参考文献149和150。

[0173] K. 胞壁酰肽

[0174] 适合用作本发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺 (正-MDP) 和N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 MTP-PE)。

[0175] L. 咪唑并喹啉化合物

[0176] 适用作本发明佐剂的咪唑并喹啉化合物的例子包括咪唑莫特及其同系物(例如,“瑞喹莫德3M”),其进一步描述于参考文献151和152。

[0177] M. 缩氨基硫脲化合物

[0178] 缩氨基硫脲化合物的例子,以及配制、制造和筛选所有适用作本发明佐剂的化合物的方法包括参考文献153所述内容。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如TNF- α 方面特别有效。

[0179] N. 色胺酮化合物

[0180] 色胺酮化合物的例子,以及配制、制造和筛选所有适用作本发明佐剂的化合物的方法包括参考文献154所述内容。色胺酮化合物在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如TNF- α 方面尤其有效。

[0181] 本发明也可包含以上鉴定的一种或多种佐剂各方面的组合。

[0182] 用作免疫刺激剂的其它物质公开于参考文献97的第7章。

[0183] 特别优选使用铝盐佐剂,抗原通常吸附于这类盐。可本发明组合中使某些抗原吸附于氢氧化铝,而使另一些抗原结合磷酸铝。然而,通常优选只使用一种盐,如氢氧化物或磷酸盐,但二者不同时使用。不需要所有偶联物都被吸附,即某些或全部偶联物可游离在溶液中。

[0184] 治疗方法

[0185] 本发明还提供了一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,包含将本发明的药物组合给予所述哺乳动物。免疫反应优选为保护性,优选涉及抗体。所述方法可以产生加强的应答。优选以0.5ml剂量给予患者本发明组合(如上所述)。

[0186] 所述哺乳动物优选人。当疫苗用于预防性用途时,人优选为儿童(例如,幼童或婴儿,尤其是新生儿)或青少年;当疫苗用于治疗用途时,人优选为成人。意图用于儿童的疫苗也可给予成年人,例如,以评估安全性、剂量、免疫原性等。优选治疗的一类人是育龄女性(如青少年和更大)。另一种优选类别是妊娠女性。老年患者(如大于50、60、70、80或90等年龄特别是大于65岁年龄的那些),特别是生活在GBS感染风险可能增加的疗养院中那些([155]),是另一类优选治疗的人。

[0187] 在一些实施方式中,所述患者已经用白喉类毒素或其衍生物进行预免疫。在其它实施方式中,所述患者已经用破伤风类毒素或其衍生物进行预免疫。

[0188] 本发明也提供用作药物的本发明组合。药物优选能够引起哺乳动物的免疫反应(即它是一种免疫原性组合),并且更优选是疫苗。

[0189] 本发明也提供本发明组合在制备引起哺乳动物免疫反应的药物中的应用。

[0190] 这些应用和方法优选用于预防和/或治疗由无乳链球菌和选自白喉棒状杆菌、破伤风杆菌、百日咳博德特氏菌和脊髓灰质炎病毒中的一种或多种所致的疾病。由无乳链球菌所致的疾病可以是新生儿败血症或菌血症、新生儿肺炎、新生儿脑膜炎、子宫内膜炎、骨髓炎、脓毒性关节炎等。白喉棒状杆菌会导致白喉；破伤风杆菌会导致破伤风；百日咳博德特氏菌会导致百日咳；而脊髓灰质炎病毒会导致脊髓灰质炎。所述预防疾病的对象可以与接受本发明免疫原性组合物的对象不相同。例如，可以给予女性（妊娠前或妊娠期间）免疫原性组合物，以保护后代（所谓的‘母体免疫’ [156-158]）。妊娠女性的免疫通过被动母体免疫来为婴儿提供抗体介导的免疫。当母方抗体通过胎盘转移至胎儿时，自然发生被动免疫。被动免疫对于婴儿特别重要，因为他们出生时不具有任何主动获得的免疫力。向妊娠女性给予本发明的组合物增强该女性的免疫力，并且抗体通过胎盘到达新生儿，使该婴儿具有被动母体免疫力。然而，婴儿的被动免疫仅仅是临时性的，并且在出生最初数周或数月之后开始减少。因为被动免疫仅是暂时性的，婴儿接受给予的本发明的组合物是重要的，以在该被动免疫减少之前诱导婴儿内的主动免疫。在出生后给予婴儿第二次免疫原性组合物诱导该婴儿内的主动免疫，并且延长妊娠过程中从母亲传递过来的免疫力。

[0191] 本文中所述，婴儿是年龄低于一岁的个体（例如，小于1天、1周、2周、3周、4周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、小于12个月）。

[0192] 可对所述妊娠女性在其妊娠过程中的任何时间给予本发明的组合物。例如，可对该女性在其妊娠的第一、第二或第三个三月期给予所述组合物。在一些实施方式中，对所述女性在妊娠的末6-12周（例如，28周孕期、29周孕期、30周孕期、31周孕期、32周孕期、33周孕期、34周孕期、35周孕期、36周孕期、37周孕期、38周孕期、39周孕期）给予该组合物。特别地，在婴儿出生前至少四周将本发明的组合物给予妊娠女性。在一些实施方式中，在第32周~36周孕期给予该妊娠女性一剂量方案。在其它实施方式中，给予该妊娠女性二剂量方案，其中第一剂量在约32周孕期时给予，而第二剂量在约36周孕期时给予。

[0193] 可在出生后第一年的任何时间对婴儿给予所述组合物，之后可按需给予。一般而言，在婴儿出生后第一年中对该婴儿给予一次、两次、三次、四次或更多次所述组合物。例如，可在选自婴儿出生时、2周龄、4周龄、6周龄、2月龄、3月龄、4月龄、6月龄、9月龄和12月龄的一个或多个时间给予该婴儿本发明组合物。具体而言，在母方抗体已减少到非保护效价之前的某一时刻给予婴儿本发明的组合物。可在任何所需的确定时间进行后续给予。

[0194] 在一个实施方式中，提供保护婴儿抵抗由无乳链球菌和选自棒状白喉杆菌、破伤风杆菌、百日咳博德特氏菌和脊髓灰质炎病毒中的一种或多种所致的疾病的方法，所述方法包括如下步骤(a) 向怀有所述婴儿的妊娠期间的女性给予本发明的组合物；和(b) 任选地向由该妊娠出生的婴儿给予本发明的组合物。

[0195] 因此，还提供了保护婴儿抵抗由无乳链球菌和选自白喉、破伤风、百日咳和脊髓灰质炎中的一种或多种所致的疾病的方法，所述方法包括如下步骤(a) 向怀有所述婴儿的妊娠期间的女性给予本发明的组合物；和(b) 任选地向由该妊娠出生的婴儿给予本发明的组合物。

[0196] 本发明中的优选组合物能在可接受百分比的人对象中产生超出各抗原组分血清保护标准的抗体效价。众所周知抗原的关联抗体效价，高于该效价就认为宿主针对所述抗

原发生血清转化,该类效价由诸如WHO的组织公布。优选多于80%的具有统计学显著性的对象样品发生血清转化,更优选多于90%,更优选多于93%,最优选96-100%。

[0197] 本发明的组合物通常直接给予患者。可以通过胃肠外注射(例如,皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或给予到组织间隙),或通过直肠、口服、阴道、外用、透皮、鼻内、眼部、耳部、肺部或其它粘膜给药途径完成直接递送。优选肌肉内给予到大腿或上臂。注射可以通过针头(例如皮下针头)进行,但也可以采用无针注射。肌肉剂量通常是0.5ml。

[0198] 本发明可用来引发全身和/或粘膜免疫。

[0199] 本发明所述免疫原性组合物可以单个或多个剂量给予。本发明中优选单剂量给予。或者,第一单位剂量后接另一个单位剂量可能是有效的。通常,所述第二(或第三、第四、第五等)单位剂量与第一单位剂量相同。本发明的免疫原性组合物通常以三个单位剂量给予。通常,本发明免疫原性组合物能肌肉内给予,例如,肌肉内给予到大腿或上臂。

[0200] 多剂量可用于初次免疫方案和/或加强免疫方案。初次给药方案之后,可以进行加强给药方案。可以常规确定初次剂量之间(例如4-16周)以及初次和加强剂量之间的适当时机。

[0201] 为充分发挥功效,典型的初次免疫方案(特别对于儿童)可包括给予一次以上的剂量。例如,可在以下时间给予:0和6个月(时间0是第一次剂量);在0、1、2和6个月;在0天、21天然后第三次剂量在6和12个月之间;在2、4和6个月;在3、4和5个月;在6、10和14周;在2、3和4个月;或者在0、1、2、6和12个月。小儿组合物还可用作加强剂,例如对儿童而言在出生第二年内使用。

[0202] 组合物还可用作加强剂,例如对儿童而言在出生第二年内使用。本发明的青少年加强疫苗组合物以单剂量给予10岁和更年长的人。本发明的免疫原性组合物可作为加强疫苗给予先前已针对白喉和破伤风(并且优选也针对百日咳)已接种疫苗的患者。可根据对上述疫苗的免疫学记忆应答来分辨这些患者与普通人群。所述患者在接受本发明疫苗之前最近一次接受白喉和/或破伤风疫苗可能已经是至少5年以前。因此,接受疫苗的患者年龄可以是4-65岁,例如11-64岁,10-18岁等。

[0203] 可采用任何合适的给予途径。例如,组合物可肌肉内给予、腹膜内给予、皮下给予、经皮给予或皮内给予。必要时,所述组合物可通过粘膜内途径,例如口内、鼻内、阴道内和直肠内途径给予。对妊娠女性和婴儿的给予可通过相同途径或不同途径。可通过肌肉内注射到例如注射进入手臂或腿中来给予本发明的组合物。

[0204] 本发明制备的疫苗可作为分开疫苗同时给予患者,例如,与肺炎球菌偶联物疫苗例如PREVNAR™同时给予,与流感疫苗同时给予,与轮状病毒疫苗同时给予,与MMR疫苗同时给予等。

[0205] 当本发明组合物包含铝基佐剂时,在贮存过程中组分可能会发生沉淀。因此,在给予患者之前应振荡该混合物。振荡过的组合物是混浊的白色悬液。

[0206] 概述

[0207] 术语“包括”涵盖“包含”以及“由……组成”,例如,“包括”X的组合物可以仅由X组成或可包含其它物质,例如X+Y。

[0208] 术语“由……组成”指“仅由……组成”。组合物“由X组成”可不包含任何其它组分。组合物“基本由X组成”可不包含任何其它活性组分。术语“基本由……组成”意味着组合物、

方法或结构可包括额外的成分、步骤和/或部分,但仅在所述额外成分、步骤和/或部分不会实质性改变所要求的组合物、方法或结构的基本和新颖的特征才可以。

[0209] 与数值x相关的术语“约”表示例如, $x \pm 10\%$ 。

[0210] 术语“基本”不排除“完全”,如“基本不含”Y的组合物可能完全不含Y。必要时,可以从本发明定义中略去词语“基本”。

[0211] 应理解糖环可以是开放或闭合形式,而且虽然本文结构式中显示的是闭合形式,但本发明也包括开放形式。类似的,应理解糖可以吡喃糖和呋喃糖形式存在,而且虽然本文的结构式中显示的是吡喃糖形式,但也包括呋喃糖形式。还可包含糖的不同异头形式。

[0212] 除非另有明确说明,包括混合两种或更多种组分的步骤的工艺不要求任何特定的混合顺序。因此,组分可以任何顺序混合。在有三种组分时,可将两种组分相互合并,然后将组合与第三种组分混合等。

[0213] 抗体通常对于其靶标是特异性的。因此,其对靶标的亲和性高于无关对照蛋白,例如牛血清白蛋白。

[0214] 与数值x相关的术语“约”表示例如, $x \pm 10\%$ 。

[0215] 将描述组分“吸附”至佐剂时,优选该抗原至少被吸附50% (以重量计),例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更多。若组分完全吸附,则在离心后的组合物上清液中应检测不到该组分。

[0216] 除非另有明确说明,包括混合两种或更多种组分的步骤的工艺不要求任何特定的混合顺序。因此,组分可以任何顺序混合。在有三种组分时,可将两种组分相互合并,然后将组合与第三种组分混合等。

[0217] 偶联物的含量通常是以糖质量的形式表示(即,偶联物(载体+糖)作为整体的剂量高于所述剂量),从而避免载体选择引起的变化。

[0218] 在本发明中使用的含磷基团可以多种质子化和去质子化形式存在,取决于周围环境的pH值,例如溶解它们的溶剂的pH值。因此,虽然本文可能表示特定的形式,但应当认识到,除非另外指出,这些说明仅仅是代表性的并且不限定特定的质子化或去质子化形式。例如,在磷酸基的情况下,磷酸基被表示为 $-OP(O)(OH)_2$,但是该定义包含可能在酸性条件下存在的质子化形式 $-[OP(O)(OH)_2(OH)]^+$ 和 $-[OP(O)(OH)_2]^{2+}$ 以及可能在碱性条件下存在的去质子化形式 $-[OP(O)(O)(O)]^-$ 和 $[OP(O)(O)_2]^{2-}$ 。本发明包括所有这些形式。

[0219] 将化合物作为组合物的一部分给予机体时,该化合物或可由合适的前药替代。

[0220] 将动物(且特别是牛)材料用于培养细胞时,其应获自未患传染性海绵状脑病(TSE),特别是未患牛海绵状脑病(BSE)的来源。

附图说明

[0221] 图1显示表1中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的IgG效价。第5组和第6组中的全组小鼠汇集血清。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0222] 图2显示表1中所述的小鼠组中针对(A) 白喉类毒素, (B) 破伤风类毒素, (C) 百日咳类毒素, (D) 百日咳FHA和(E) 百日咳69K的IgG效价。统计学显著性由* ($p < 0.05$) 指示。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0223] 图3显示表1中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的OPK效价。对每次实验,各组(除第5组和第6组)从全组小鼠汇集血清(实验重复两次)。分别汇集第5组和第6组的两次实验的血清。GMT效价由中间短线指示。

[0224] 图4显示表3中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的IgG效价。统计学显著性由* ($p < 0.05$) 指示。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0225] 图5显示表3中所述的小鼠组中针对(A) 白喉类毒素, (B) 破伤风类毒素, (C) 百日咳类毒素, (D) 百日咳FHA和(E) 百日咳69K的IgG效价。统计学显著性由** ($p < 0.01$) 和* ($p < 0.05$) 指示。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0226] 图6显示表3中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的OPK效价。各组中从全组小鼠汇集血清用于各实验。GMT效价由中间短线指示。

[0227] 图7显示表5中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的IgG效价。第5、6和7组各组汇集血清。统计学显著性由** ($p < 0.01$) 指示。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0228] 图8显示表5中所述的小鼠组中针对(A) 破伤风类毒素和(B) 白喉类毒素的IgG效价。统计学显著性由* ($p < 0.05$) 指示。GMT效价由中间短线指示。较高和较低短线指示95%置信区间。

[0229] 图9显示表5中所述小鼠组中针对(A) GBS Ia, (B) GBS Ib和(C) GBS III的OPK效价。各组中从全组小鼠汇集血清用于各实验。GMT效价由中间短线指示。

具体实施方式

[0230] 材料和方法

[0231] 疫苗

[0232] 用于下述实验的GBS三价疫苗具有各自与CRM197偶联的源自三种主要血清型Ia、Ib和III的荚膜多糖。TdaP (H4) 疫苗佐以氢氧化铝并且包含破伤风类毒素、白喉类毒素和非细胞百日咳抗原(PT、FHA和69K)。

[0233] TdaP (H4) -IPV疫苗佐以氢氧化铝并且包含破伤风类毒素、白喉类毒素、非细胞百日咳抗原(PT、FHA和69K) 和脊髓灰质炎抗原(IPV1、IPV2和IPV3)。

[0234] 可采用市售可得的破伤风和破伤风/白喉液体疫苗。

[0235] ELISA

[0236] 来自经免疫小鼠的血清中针对GBS多糖Ia、Ib和III的IgG效价用ELISA检测,如参考文献159所述。ELISA IgG Abs和OPK效价之间一般有良好的关联。

[0237] 调理吞噬杀伤(OPK) 试验

[0238] 评估疫苗功效的一种可行方法是采用保护的替代,在GBS情况中这种替代是血清抗体的调理活性。调理吞噬杀伤试验检测补体存在下血清抗体调理GBS以通过效应细胞杀伤的能力。用于检测在免疫小鼠中针对GBS多糖Ia、Ib和III引发的抗体的功能活性的OPK试验采用HL-60(一种髓细胞白血病前体细胞系,获自美国典型培养物保藏中心(ATCC, CCL-240))进行。菌株GBS 515、GBS H36b和GBS COH1分别用来检测血清型Ia、Ib和III分离物的杀伤。在热失活补体存在下或在抗体或效应细胞不存在时,或采用免疫前或安慰剂血清进

行阴性对照反应。反应铺板于胰酶解酪蛋白大豆琼脂板,并测定细菌计数。杀伤的百分比计算为(T0时的平均CFU-T60时的平均CFU)/(T0时的平均CFU)。OPK效价表达为导致50%细菌杀伤的血清稀释度的倒数。根据参考文献160中所述的基于杀伤的调理吞噬试验(kOPK)方案进行OPK试验。

[0239] 基于Luminex的多通路试验

[0240] 采用对破伤风、白喉和百日咳抗原进行IgG定量的基于Luminex的多通路试验。使白喉类毒素(DT)、破伤风类毒素(TT)、百日咳类毒素(PT)、百日咳FHA和百日咳69K抗原各自共价偶联至微球(德克萨斯州奥斯汀的Luminex公司)。分析小鼠血清样品以评估特异性各抗原特异性的抗体效价。实验以两次重复进行,并且对两次重复实验的值取平均。通过汇集来自用Tdap抗原+铝免疫的CD1小鼠的血清来制备参比血清。

[0241] 研究1:在Tdap和Tdap-IPV中重建GBS

[0242] 该研究考察冻干的GBS三价疫苗(Ia、Ib、III多糖偶联至CRM197)的免疫原性,疫苗用如下物质重建:(i)包含破伤风、白喉和非细胞百日咳抗原的含铝佐剂的液体疫苗(Tdap),和(ii)包含破伤风、白喉、非细胞百日咳和脊髓灰质炎抗原的含铝佐剂的液体疫苗(Tdap-IPV)。

[0243] 该免疫方案报告于表1,并且重复两次。在各次实验中,在第0和21天,采用表1中所示的2剂量所述疫苗对六组各8只CD1雌性小鼠进行腹膜内免疫,并且在第0和35天取血。

[0244] 表1.研究1的免疫方案。

[0245]

组号	疫苗类型	疫苗组合物	体积 途径	抗原剂量	佐剂剂量	小鼠数量
1	GBS + TdaP(H4)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml 铝 2 mg/ml	腹 膜 内 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	铝 400 µg	8
2	GBS + TdaP(H4)-IPV	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml IPV1 80 dU/ml IPV2 16 dU/ml IPV3 64 dU/ml 铝 2 mg/ml	腹 膜 内 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg IPV1 16 dU IPV2 3.2 dU IPV3 12.8 dU	铝 400 µg	8
3	仅GBS	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml 铝 2 mg/ml	腹 膜 内 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	铝 400 µg	8
4	仅GBS	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml 铝 2 mg/ml	腹膜内 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	铝 400 µg	8
5	无抗原	铝 2 mg/ml	腹膜内 200 µl	-	铝 400 µg	8
6	TdaP(H4)-IPV	T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml IPV1 80 dU/ml IPV2 16 dU/ml IPV3 64 dU/ml 铝 2 mg/ml	腹膜内 200 µl	T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg IPV1 16 dU IPV2 3.2 dU IPV3 12.8 dU	铝 400 µg	8

[0246] 通过ELISA分析来自免疫小鼠的血清的针对各GBS血清型特定抗原 (Ia、Ib和III型) 的IgG抗体的存在。通过Luminex试验来定量针对破伤风类毒素 (TT)、白喉类毒素 (DT) 和非细胞百日咳抗原 (PT、FHA和69K) 的抗体。通过调理吞噬杀伤 (OPK) 试验评价针对GBS抗原的抗体的功能活性。

[0247] 图1和2显示研究1中测试的六组小鼠针对不同抗原的IgG效价 (从两次试验中8+8只小鼠获得的合并结果)。GMT效价如下表2中所示。

[0248] 表2: 研究1中测试的小鼠内进行两次免疫之后的GMT血清IgG效价。

[0249]

	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组
GBS Ia	112	97	87	82	13	13
GBS Ib	561	97	229	185	13	13
GBS III	683	537	625	762	13	13
DT	187.55	48.94	N/A	N/A	<LLOQ	89.95
TT	560.67	268.97	N/A	N/A	<LLOQ	626.72
PT	280.43	121.10	N/A	N/A	2.10	232.60
FHA	789.00	450.81	N/A	N/A	<LLOQ	749.95
69K	789.0	450.8	N/A	N/A	<LLOQ	88.6

[0250] <LLOQ=低于定量下限

[0251] 总体而言,全部疫苗制剂均具有与对照可比的免疫原性,并且没有观察到显著的免疫学干扰。对于第二次免疫之后针对GBS Ia、Ib和III的IgG效价而言,通过曼-惠特尼U检验没有检测到疫苗组之间在任何血清型的Ig应答上存在显著差异,这指示不存在干扰。对于第二次免疫之后针对DT、TT、PT、FHA和69K的IgG效价而言,GBS+Tdap引发的GMT效价是GBS+Tdap+IPV的两倍高 ($P<0.05$,通过曼-惠特尼U检验),表明IPV对全部Tdap抗原的较小负面作用。此外,对于TT而言,疫苗Tdap+IPV产生的效价是Tdap+IPV+GBS的两倍高 (U检验, $P<0.026$),表明在IPV存在下GBS对TT具有较小负面作用。

[0252] 图3显示研究1中测试的六组动物的针对GBS Ia、Ib和III的OPK效价。如图所示,对于任何疫苗制剂而言,均没有检测到针对GBS Ia、Ib或III的OPK效价中具有较大差异(在试验和生物变异性范围内)。

[0253] 研究2:Tdap中重建GBS

[0254] 该研究探讨不同量的冻干GBS三价疫苗(与CRM197偶联的Ia、Ib、III多糖)的免疫原性,疫苗用包含破伤风、白喉和非细胞百日咳抗原的含铝佐剂液体疫苗(Tdap)重建。

[0255] 在第0、21和35天,用3剂量疫苗对八组各16只CD1雌性小鼠皮下免疫,并且在第0、35(第2次后)和49(第3次后)天取血。免疫方案见表3。

[0256] 表3. 研究2的免疫方案.

[0257]

组号	疫苗类型	疫苗组合物	体积 途径	抗原剂量	佐剂剂量	小鼠数量
1	GBS + TdaP(H2)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml Alum 2 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 2 Lf D 0.8 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	铝 400 µg	8
2	TdaP(H2)	T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml 铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	T 2 Lf D 0.8 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	铝 400 µg	8
3	GBS + TdaP(L2)	PSIb-CRM 0.25 µg PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 2 µg/ml FHA 2 µg/ml 69K 4 µg/ml 铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	PSIII-CRM 0.25 µg T 2 Lf D 0.8 Lf PT 0.4 µg FHA 0.4 µg 69K 0.8 µg	铝 400 µg	8
4	TdaP(L2)	T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 2 µg/ml FHA 2 µg/ml 69K 4 µg/ml 铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	T 2 Lf D 0.8 Lf PT 0.4 µg FHA 0.4 µg 69K 0.8 µg	铝 400 µg	8
5	GBS (H)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml 铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	铝 400 µg	8
6	GBS (L)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 0.25 µg PSIb-CRM 0.25 µg PSIII-CRM 0.25 µg	铝 400 µg	8
7	无抗原(1)	铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	-	铝 400 µg	8
8	无抗原 (2)	铝 2 mg/ml	皮下 200 µl	-	铝 400 µg	8

[0258] 图4和5显示对研究2中测试的小鼠组进行3次免疫之后,所有组针对不同抗原的IgG效价。GMT效价如下表4中所示。

[0259] 表4:研究2中测试的小鼠内进行三次免疫之后的GMT血清IgG效价。

[0260]

	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组	第7组	第8组
GBS Ia	155.5	12.5	237.0	N/A	598.6	418.3	20.4	12.5
GBS Ib	107.5	15.1	90.6	N/A	250.4	271.7	15.7	12.5
GBS III	588.2	12.5	677.7	N/A	958.9	946.4	23.1	12.5

DT	141.3	164.3	164.5	228.2	N/A	N/A	N/A	0.1
TT	333.6	382.1	457.2	509.6	N/A	N/A	N/A	0.1
PT	191.4	187.1	149.9	128.1	N/A	N/A	N/A	0.2
FHA	423.8	544.6	476.1	314.9	N/A	N/A	N/A	0.1
69K	374.7	435.4	328.2	337.9	N/A	N/A	N/A	0.1

[0261] 对于第三次免疫后针对GBS Ia、Ib和III的IgG效价,首先观察到的是第7组中的两只小鼠可能误接受了疫苗(显示针对全部三种抗原的高IgG效价,在先前的相似安慰剂组中从未观察到该情况)。第二,相较于不采用TdaP的GBS疫苗而言,观察到在用TdaP重建的组中对全部三种GBS抗原具有较低IgG效价的趋势(2-4倍GMT,在一些情况中 $P<0.05$)。对于针对所有血清型的第2次后IgG效价观察到了相同的趋势。

[0262] 对于第三次免疫后分别针对DT、TT、PT、FHA和69K的IgG效价而言,通过曼-惠特尼检验没有检测到任何组之间的IgG应答存在显著差异,指示完全不存在干扰。对于DT和TT而言没有观察到剂量应答,而观察到百日咳PT、FHA和69K抗原的较高剂量具有相比较低剂量略高的效价。

[0263] 当比较第5组和第6组中针对GBS Ia、Ib和III的IgG效价中,比较对GBS 1 μ g(高,L)和0.25 μ g(低,L)疫苗剂量的应答,对GBS Ia和Ib的个体应答中的变异性高于GBS III的情况。对于任何血清型没有观察到低剂量和高剂量之间存在显著差异,而对于所有血清型而言,相较后-2,检测到第3次后相比第2次后的非应答者数量更少且应答显著较高(曼-惠特尼U检验)。

[0264] 图6显示研究2中测试的七组小鼠的针对GBS Ia、Ib和III的OPK效价。相较于单独GBS而言,用TdaP制备的GBS疫苗中有略低效价的趋势。

[0265] 研究3:在破伤风和破伤风/白喉液体疫苗中重建的GBS

[0266] 该研究考察冻干GBS三价疫苗(与CRM197偶联的Ia、Ib、III多糖)的免疫原性,所述疫苗用包含(i)破伤风抗原或(ii)破伤风和白喉抗原的含铝佐剂液体疫苗重建。

[0267] 该免疫方案报告于表5,并且重复两次。

[0268] 在各方案中,采用表5中所示的2剂量所述疫苗在第0和21天对七组各8只CD1雌性小鼠进行皮下免疫,并且在第0和35天取血。

[0269] 表5:研究3的免疫方案。

[0270]

组号	疫苗类型	疫苗组合物	体 积 途 径	抗原剂量	佐剂剂量	小鼠数量
1	GBS + T	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 40 UI/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 8 UI	铝 600 µg	8
2	GBS + TD	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 40 UI/ml D 4 UI/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 8 UI D 0.8 UI	铝 600 µg	8
3	仅GBS (1)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	铝 600 µg	8
4	仅GBS (2)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	铝 600 µg	8
5	无抗原	铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	-	铝 600 µg	8
6	仅T	T 40 UI/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	T 8 UI	铝 600 µg	8
7	仅TD	T 40 UI/ml D 4 UI/ml 铝 3 mg/ml	皮下 200 µl	T 8 UI D 0.8 UI	铝 600 µg	8

[0271] 图7和8显示研究3中测试的全部组小鼠针对不同抗原的IgG效价(从两次试验中8+8只小鼠获得的合并结果)。GMT效价如下表6中所示。

[0272] 表6:研究3中测试的小鼠内进行两次免疫之后的GMT血清IgG效价。

[0273]

	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组	第7组
GBS Ia	65	162	458	235	13	13	13

[0274]

GBS Ib	217	402	550	417	13	13	13
GBS III	854	1018	1186	924	13	13	13
TT	742.00	882.70	N/A	N/A	6.60	1295.00	1038.00
DT	7.49	111.6	N/A	N/A	<LLOQ	<LLOQ	28.52

[0275] <LLOQ=低于定量下限

[0276] 对于由ELISA检测的针对GBS Ia、Ib和III的IgG效价而言,曼-惠特尼检验并未显

示除血清型Ia以外的疫苗组之间存在任何显著差异,对于血清型Ia,由单独GBS建立的疫苗(第3组)产生的效价显著高于包含GBS加破伤风类毒素的疫苗。在OPK试验中,对于任何疫苗制剂而言,针对GBS Ia、Ib或III的OPK效价未检测到较大差异(在试验和生物变异性范围内)。

[0277] 相较于单独TT,在包含GBS疫苗和TT的组中,针对TT的IgG效价显著较低($P=0.03$),尽管GMT效价中的差异小于两倍。对于针对DT的IgG应答而言,在包含GBS疫苗的组中较高,正如由CRM197(脱毒化的DT)的影响所期望的那样。

[0278] 图9显示研究3中测试的全部小鼠组血清中针对GBS Ia、Ib和III的OPK效价。如图所示,对于任何疫苗制剂而言,针对GBS Ia、Ib或III的OPK效价均没有检测到较大差异(在试验和生物变异性范围内)。

[0279] 结论

[0280] 对于在研疫苗制剂的免疫原性得出如下观察结论:

[0281] • GBS三价、白喉、破伤风和百日咳疫苗在用全部在研制剂免疫的小鼠中引发针对相应抗原的特异性抗体。

[0282] • 在研究1(用2个疫苗剂量腹膜内免疫)和2(用2和3个疫苗剂量皮下免疫)中研究了GBS和破伤风/白喉/百日咳/脊髓灰质炎联合疫苗之间的免疫学干扰。研究1中没有观察到干扰,其中对GBS、白喉、破伤风和百日咳抗原的IgG和功能抗体应答各自相当,无论其应用是单独或是联合应用。在研究2中,我们观察到相较于单独GBS,对于用TdaP重建的全部三种GBS抗原的IgG效价具有较低的趋势,尽管GMT效价差异从未高于4倍。

[0283] • GBS和破伤风或破伤风/白喉疫苗之间的免疫学干扰于研究3中探讨。曼-惠特尼检验并未揭示任何疫苗组(血清型Ia除外)之间GBS应答具有显著差异,对于血清型Ia,用单独GBS建立的疫苗产生的效价显著高于包含GBS加破伤风类毒素的疫苗。相同研究显示GBS疫苗对TT稍有干扰(包含GBS疫苗的组相比单独TT而言,两倍GMT差异,对于针对TT的IgG效价中的差异而言 $P=0.03$)。对于针对DT的IgG应答而言,在包含GBS疫苗的组中较高,正如由CRM197(脱毒化的DT)的影响所期望的那样。

[0284] 总而言之,在任何在研疫苗之间没有显示强干扰的证据。

[0285] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,在本发明的范围和构思内可对之进行修改。

[0286] 参考文献

[0287] [1] Vaccines. (《疫苗》) (Plotkin和Orenstein编). 第4版, 2004, ISBN:0-7216-9688-0.

[0288] [2] Paoletti等. (1990) J Biol Chem 265:18278-83.

[0289] [3] Wessels等. (1990) J Clin Invest 86:1428-33.

[0290] [4] Paoletti等. (1992) Infect Immun 60:4009-14.

[0291] [5] Paoletti等. (1992) J Clin Invest 89:203-9.

[0292] [6] Wessels等. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:9170-4.

[0293] [7] Wang等. (2003) Vaccine 21:1112-7.

[0294] [8] Wessels等. (1993) Infect Immun 61:4760-6

[0295] [9] Wessels等. (1995) J Infect Dis 171:879-84.

- [0296] [10] Baker等. (2004) J Infect Dis 189:1103-12.
- [0297] [11] Paoletti和Kasper (2003) Expert Opin Biol Ther 3:975-84.
- [0298] [12] W02012/035519
- [0299] [13] W02006/050341
- [0300] [14] Guttormsen等. (2008) Proc Natl Acad Sci U S A. 105 (15) :5903-8. 电子公开2008年3月31日.
- [0301] [15] W096/40795
- [0302] [16] Michon等. (2006) Clin Vaccine Immunol. 2006年8月;13 (8) :936-43.
- [0303] [17] 美国专利6027733和6274144.
- [0304] [18] www.polymer.de
- [0305] [19] Lewis等. (2004) PNAS USA 101:11123-8.
- [0306] [20] Wessels等. (1989) Infect Immun 57:1089-94.
- [0307] [21] W02006/082527.
- [0308] [22] 美国专利申请US 61/008,941, 名为“FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM (培养链球菌的发酵方法和获得其CPS的纯化方法)”2007年12月20日提交, 和国际专利申请W0 2009/081276.
- [0309] [23] Ramsay等. (2001) Lancet 357 (9251) :195-196.
- [0310] [24] Lindberg (1999) Vaccine 17增刊2:S28-36.
- [0311] [25] Buttery和Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-68.
- [0312] [26] Ahmad和Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii.
- [0313] [27] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-7.
- [0314] [28] 欧洲专利0477508.
- [0315] [29] 美国专利5,306,492.
- [0316] [30] W098/42721.
- [0317] [31] Dick等. 于Conjugate Vaccines (《偶联疫苗》) (Cruse等. 编) Karger出版社, 巴塞尔, 1989, 10:48-114.
- [0318] [32] Hermanson Bioconjugate Techniques (《生物偶联技术》), 学术出版社, 圣迭戈 (1996) ISBN:0123423368.
- [0319] [33] 美国专利4356170.
- [0320] [34] W02006/082530.
- [0321] [35] W02005/000346
- [0322] [36] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
- [0323] [37] Anderson (1983) Infect Immun 39 (1) :233-238.
- [0324] [38] Anderson等. (1985) J Clin Invest 76 (1) :52-59.
- [0325] [39] EP-A-0372501.
- [0326] [40] EP-A-0378881.
- [0327] [41] EP-A-0427347.
- [0328] [42] W093/17712

- [0329] [43] W094/03208.
- [0330] [44] W098/58668.
- [0331] [45] EP-A-0471177.
- [0332] [46] W091/01146
- [0333] [47] Falugi等. (2001) Eur J Immunol 31:3816-24.
- [0334] [48] Baraldo等. (2004) Infect Immun 72:4884-87.
- [0335] [49] EP-A-0594610.
- [0336] [50] W000/56360.
- [0337] [51] W002/091998.
- [0338] [52] Kuo等. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [0339] [53] W001/72337
- [0340] [54] W000/61761.
- [0341] [55] W000/33882
- [0342] [56] W02004/041157.
- [0343] [57] W099/42130.
- [0344] [58] W02004/011027.
- [0345] [59] W096/40242.
- [0346] [60] Lei等. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
- [0347] [61] W000/38711; 美国专利6,146,902.
- [0348] [62] 国际专利申请PCT/IB2008/02690, 'CONJUGATE PURIFICATION (偶联物纯化)', 要求GB-0713880.3的优先权 (诺华公司 (NOVARTIS AG)), 发表为W0 2009/010877.
- [0349] [63] Vaccines. (《疫苗》) (Plotkin和Orenstein编). 第4版, 2004, ISBN:0-7216-9688-0.
- [0350] [64] National Institute for Biological Standards and Control (《生物学标准和对照国家学会》); 英国波特斯巴. www.nibsc.ac.uk
- [0351] [65] Sesardic等. (2001) Biologicals 29:107-22.
- [0352] [66] NIBSC编码:98/560.
- [0353] [67] WHO's The immunological basis for immunization series (世界卫生组织的《免疫的免疫学基础丛书》) 的模块1 (Galazka).
- [0354] [68] NIBSC标准号:69/017.
- [0355] [69] NIBSC标准号:DIFT.
- [0356] [70] National Institute for Biological Standards and Control; (《生物学标准和对照国家学会》); 英国波特斯巴. www.nibsc.ac.uk
- [0357] [71] Sesardic等. (2002) Biologicals 30:49-68.
- [0358] [72] NIBSC标准号:98/552.
- [0359] [73] WHO's The immunological basis for immunization series (世界卫生组织的《免疫的免疫学基础丛书》) 的模块1 (Galazka).
- [0360] [74] NIBSC标准号:TEFT.
- [0361] [75] NIBSC标准号:66/303.

- [0362] [76] Rappuoli等. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [0363] [77] WHO's The immunological basis for immunization series (世界卫生组织的《免疫的免疫学基础丛书》) 的模块6 (Robertson)
- [0364] [78] W02008/028956
- [0365] [79] W02008/028957
- [0366] [80] Liao等. (2012) J Infect Dis. 205:237-43
- [0367] [81] Paoletti等. (2001) Vaccine 19:2118-2126.
- [0368] [82] W000/56365.
- [0369] [83] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. (《雷明顿: 药物科学和实践》) 第20版, ISBN: 0683306472.
- [0370] [84] W001/41800.
- [0371] [85] Paoletti (2001) Vaccine 19 (15-16): 2118-26.
- [0372] [86] W003/009869.
- [0373] [87] Almeida和Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
- [0374] [88] Agarwal和Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37:6-16.
- [0375] [89] W000/53221.
- [0376] [90] Jakobsen等. (2002) Infect Immun 70:1443-1452.
- [0377] [91] Bergquist等. (1998) APMIS 106:800-806.
- [0378] [92] Baudner等. (2002) Infect Immun 70:4785-4790.
- [0379] [93] Ugozzoli等. (2002) J Infect Dis 186:1358-1361.
- [0380] [94] Nony等. (2001) Vaccine 27:3645-51.
- [0381] [95] 美国专利6355271.
- [0382] [96] W000/23105.
- [0383] [97] Vaccine Design... (《疫苗设计》) (1995) Powell和Newman编. ISBN: 030644867X. Plenum出版社.
- [0384] [98] 美国专利5,057,540.
- [0385] [99] W096/33739.
- [0386] [100] EP-A-0109942.
- [0387] [101] W096/11711.
- [0388] [102] W000/07621.
- [0389] [103] Barr等. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [0390] [104] Sjolanderet等. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [0391] [105] Niikura等. (2002) Virology 293:273-280.
- [0392] [106] Lenz等. (2001) J Immunol 166:5346-5355.
- [0393] [107] Pinto等. (2003) J Infect Dis 188:327-338.
- [0394] [108] Gerber等. (2001) Virol 75:4752-4760.
- [0395] [109] W003/024480
- [0396] [110] W003/024481
- [0397] [111] Gluck等. (2002) Vaccine 20:B10-B16.

- [0398] [112] Kandimalla等. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [0399] [113] W002/26757.
- [0400] [114] W099/62923.
- [0401] [115] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [0402] [116] McCluskie等. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.
- [0403] [117] W098/40100.
- [0404] [118] 美国专利6,207,646.
- [0405] [119] 美国专利6,239,116.
- [0406] [120] 美国专利6,429,199.
- [0407] [121] Kandimalla等. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part3): 654-658.
- [0408] [122] Blackwell等. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [0409] [123] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [0410] [124] W001/95935.
- [0411] [125] Kandimalla等. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [0412] [126] Bhagat等. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [0413] [127] W003/035836.
- [0414] [128] W095/17211.
- [0415] [129] W098/42375.
- [0416] [130] Beignon等. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [0417] [131] Pizza等. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [0418] [132] Pizza等. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [0419] [133] Scharton-Kersten等. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [0420] [134] Ryan等. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [0421] [135] Partidos等. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [0422] [136] Peppoloni等. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [0423] [137] Pine等. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [0424] [138] Domenighini等. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [0425] [139] W099/40936.
- [0426] [140] W099/44636.
- [0427] [141] Singh等 (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [0428] [142] W099/27960.
- [0429] [143] 美国专利6,090,406
- [0430] [144] 美国专利5,916,588
- [0431] [145] EP-A-0626169.
- [0432] [146] W099/52549.
- [0433] [147] W001/21207.
- [0434] [148] W001/21152.

- [0435] [149] Andrianov等. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- [0436] [150] Payne等. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
- [0437] [151] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [0438] [152] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [0439] [153] W004/60308
- [0440] [154] W004/64759.
- [0441] [155] Hennings等. (2001) J Infect Dis.183 (7):1138-42. 2001年3月1日电子公开.
- [0442] [156] Glezen和Alpers (1999) Clin. Infect. Dis.28:219-224
- [0443] [157] Madoff等. (1994) J Clin Invest 94:286-92.
- [0444] [158] Paoletti等. (1994) Infect Immun 62:3236-43.
- [0445] [159] GB专利申请号1121301.4
- [0446] [160] Fabbrini等. (2012) J Immun Methods 378:11-19

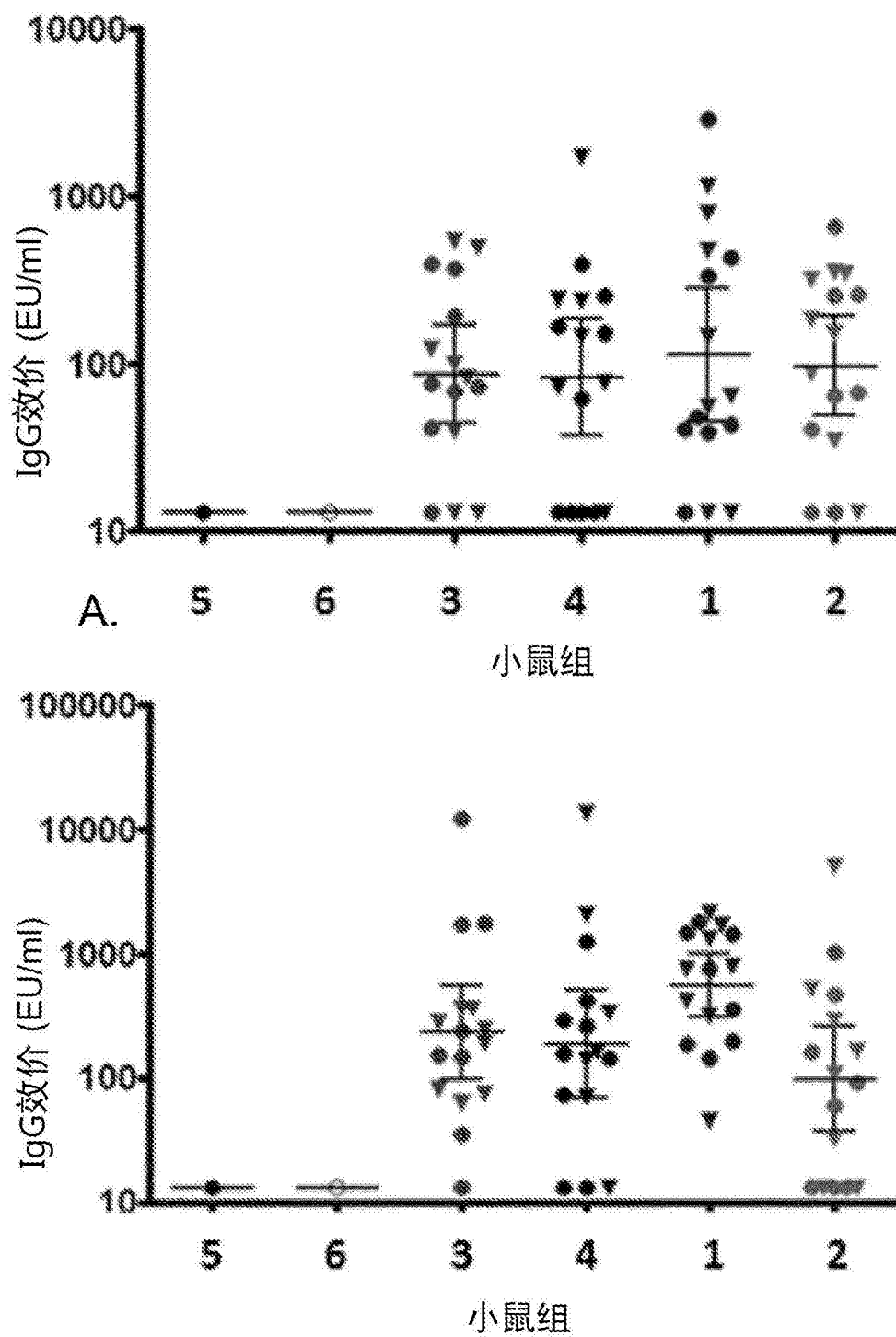


图1

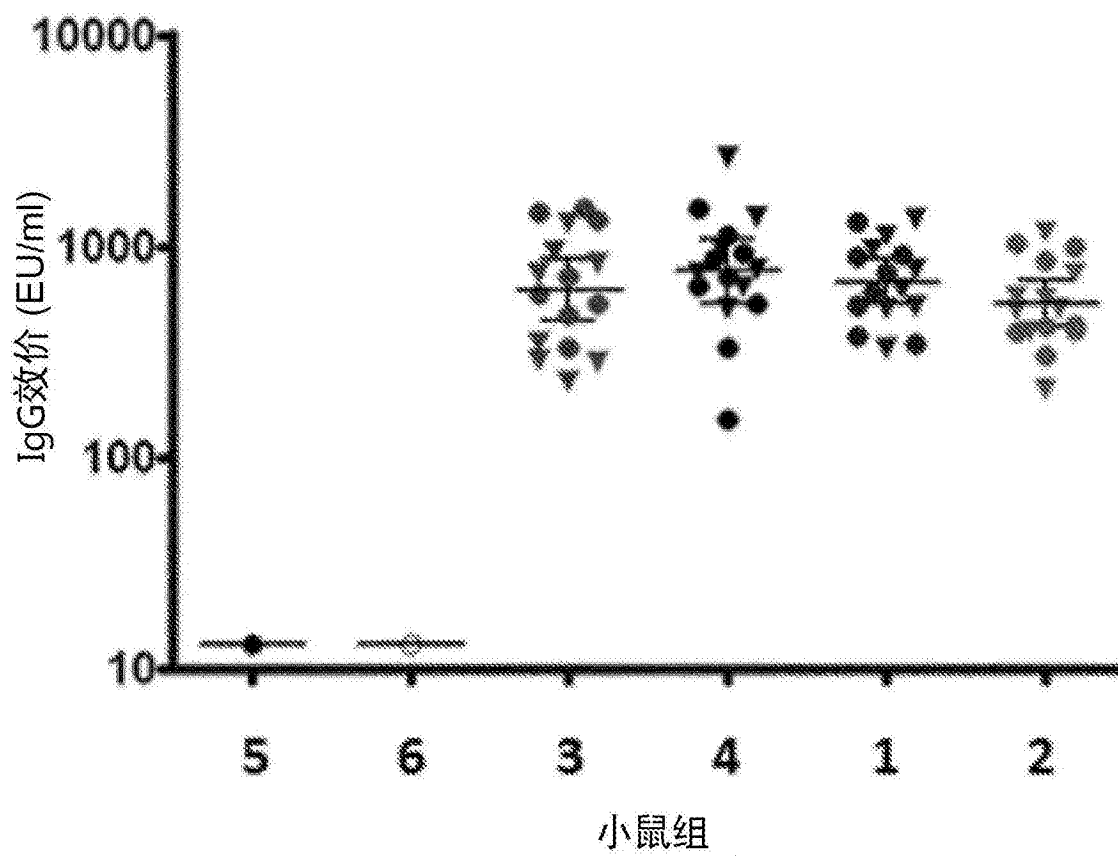


图1 (续)

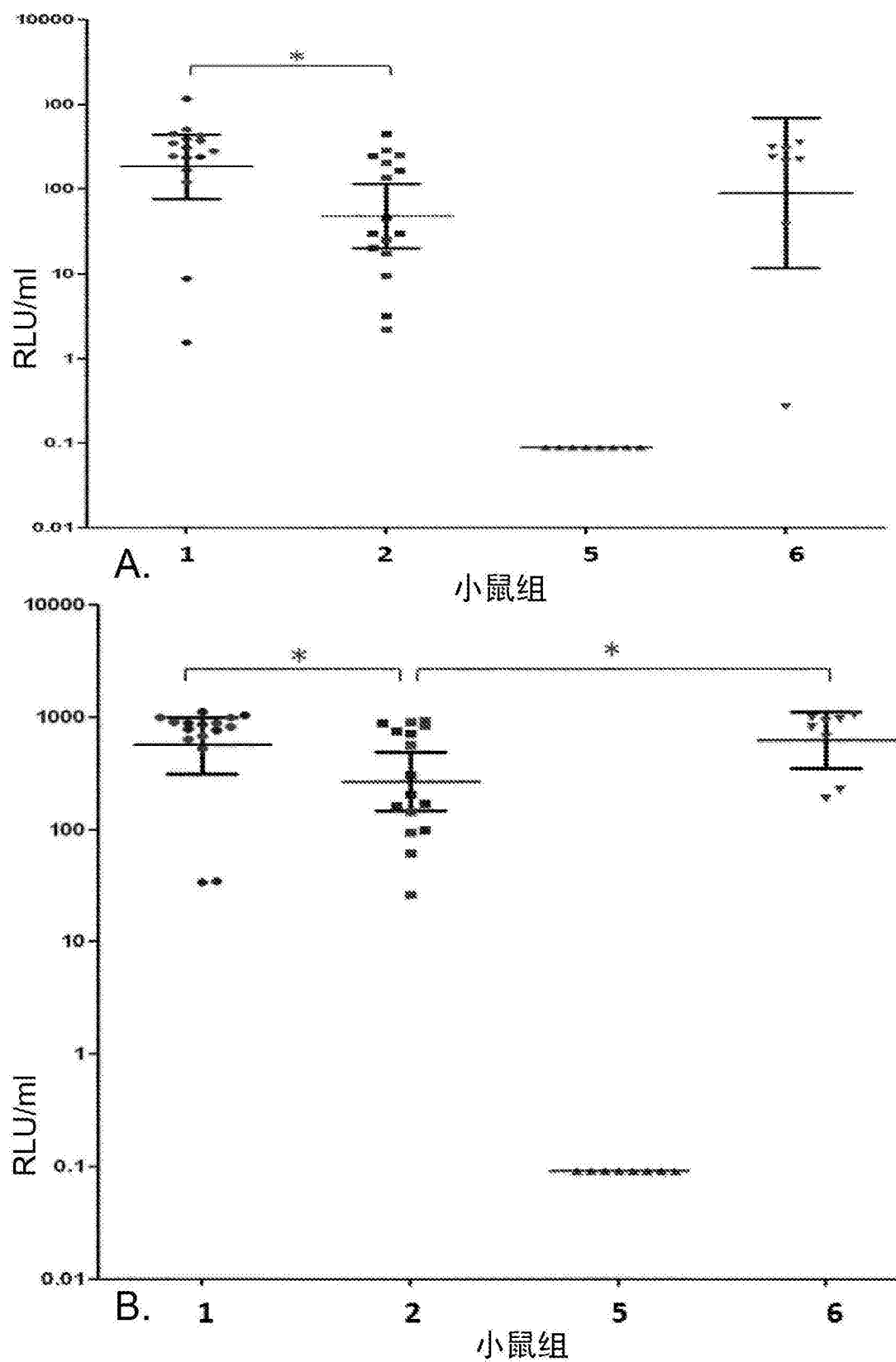


图2

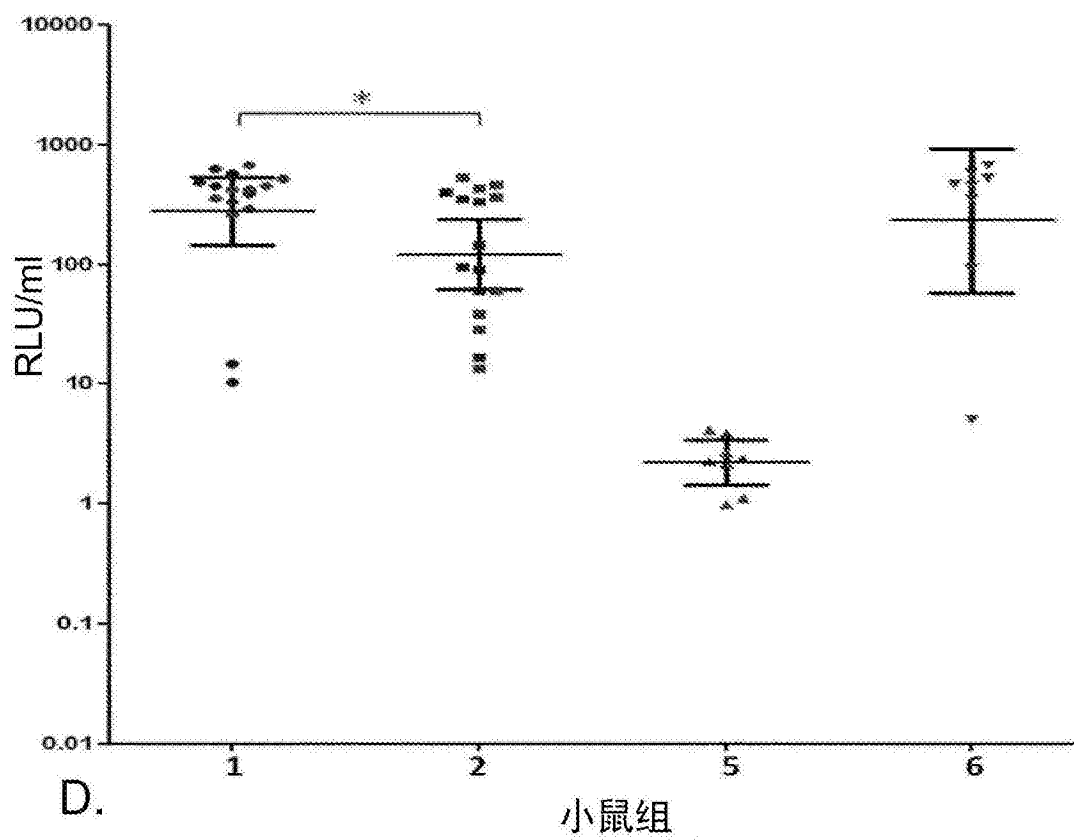
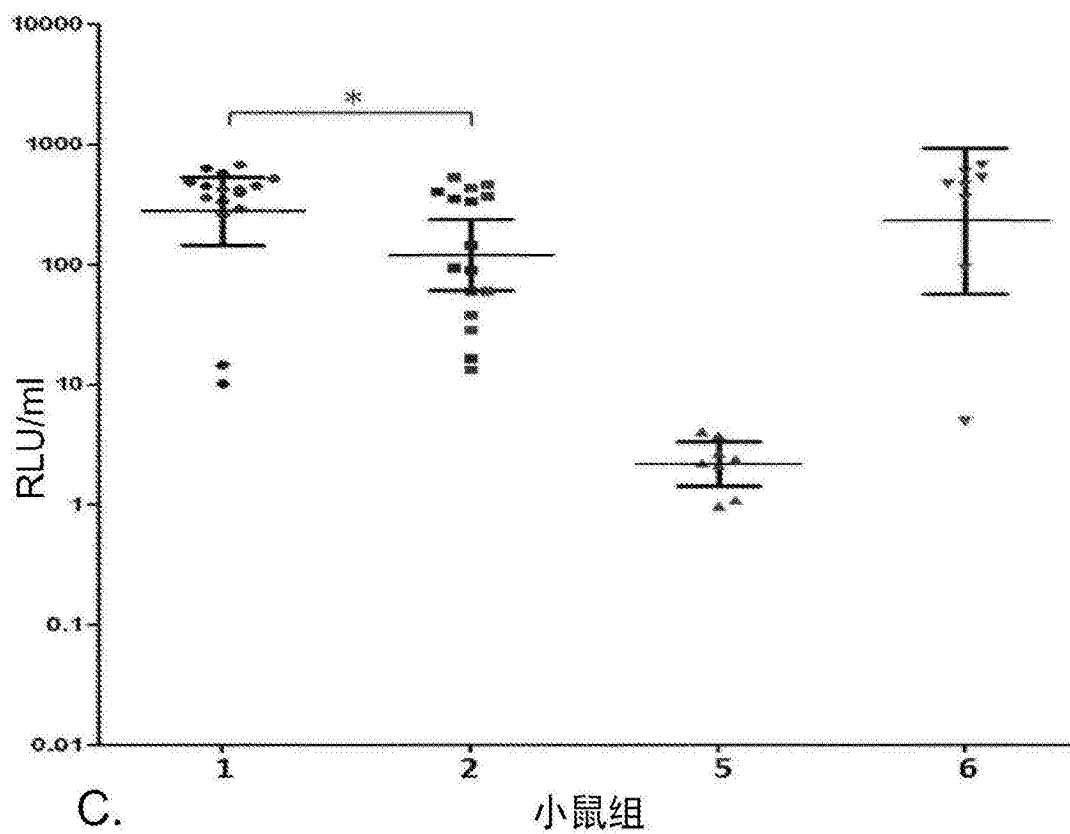


图2(续)

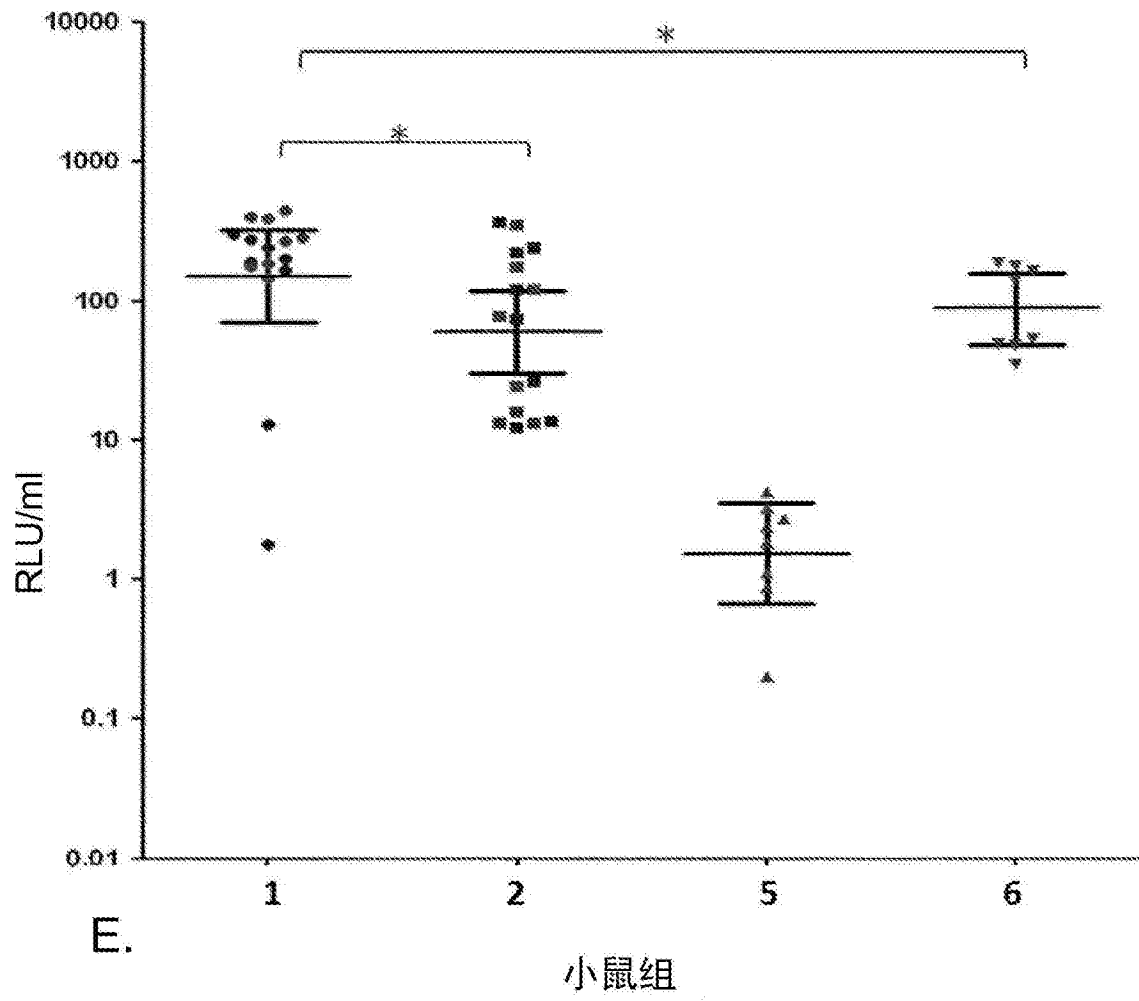


图2(续)

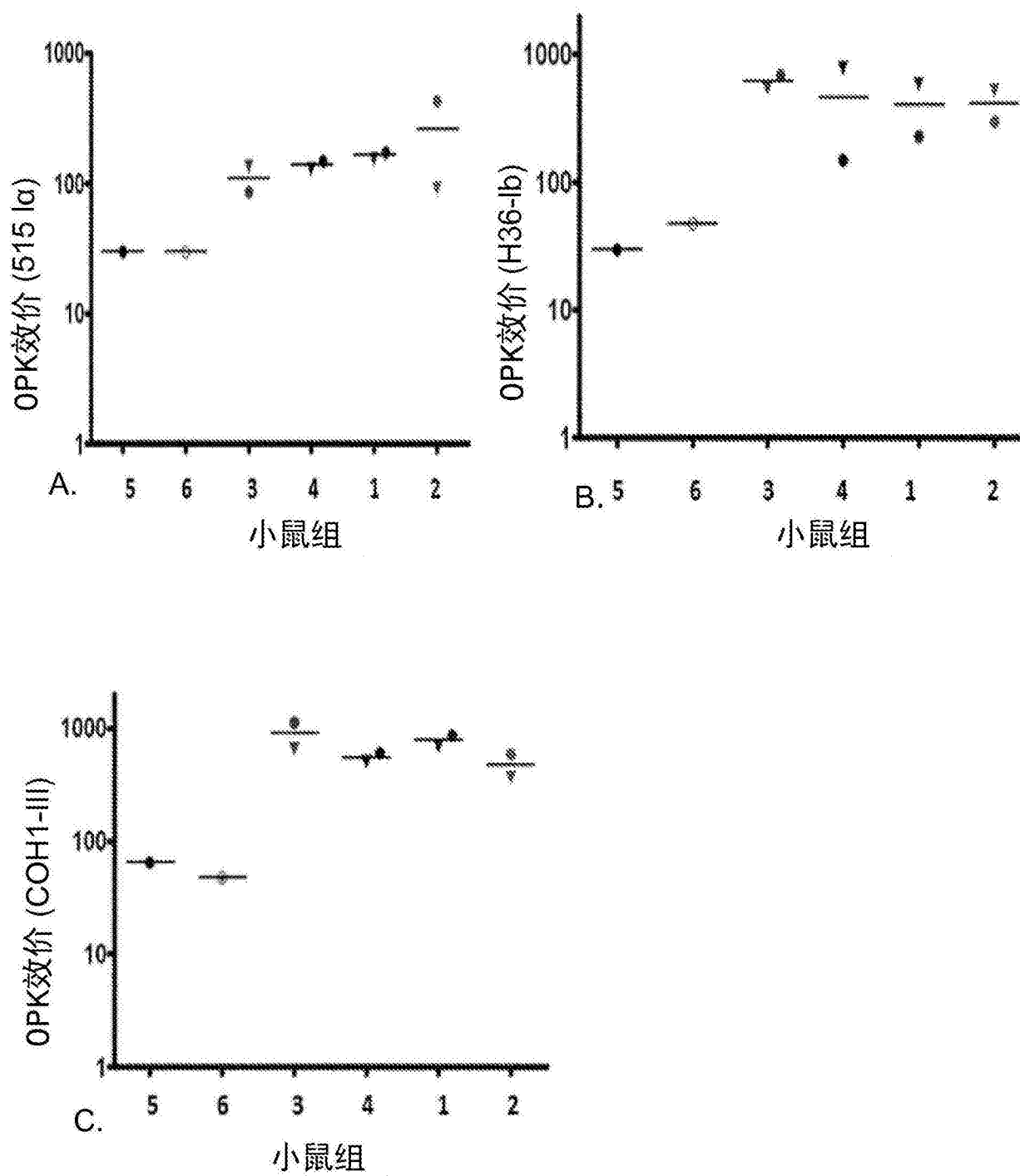


图3

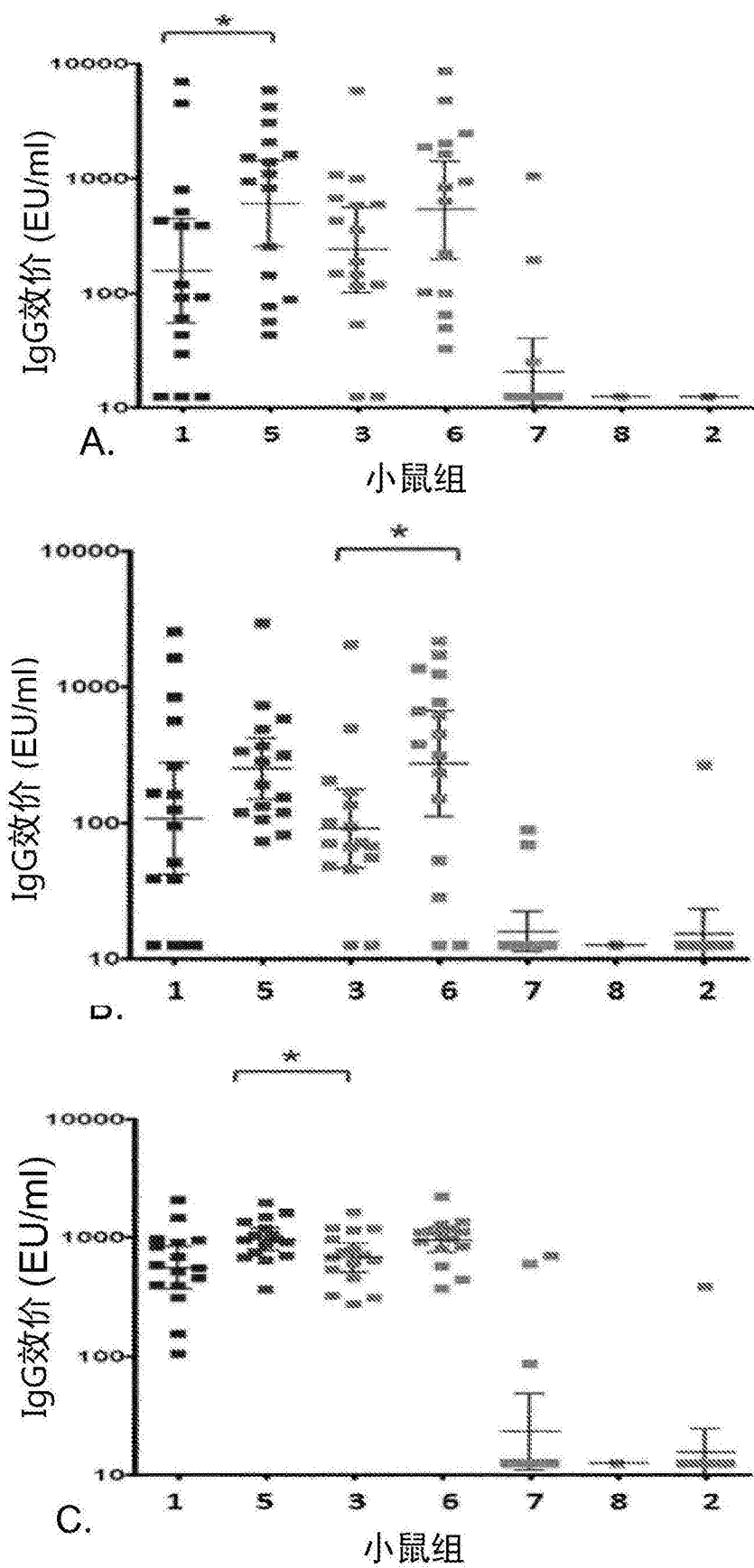


图4

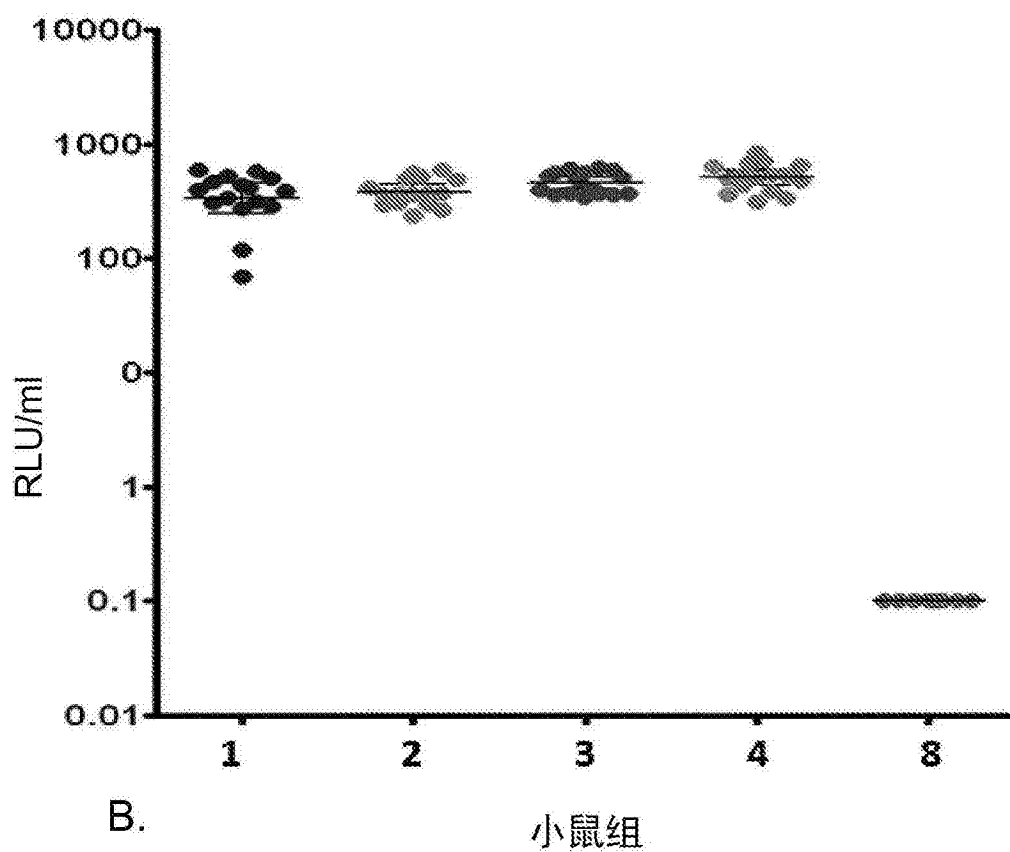
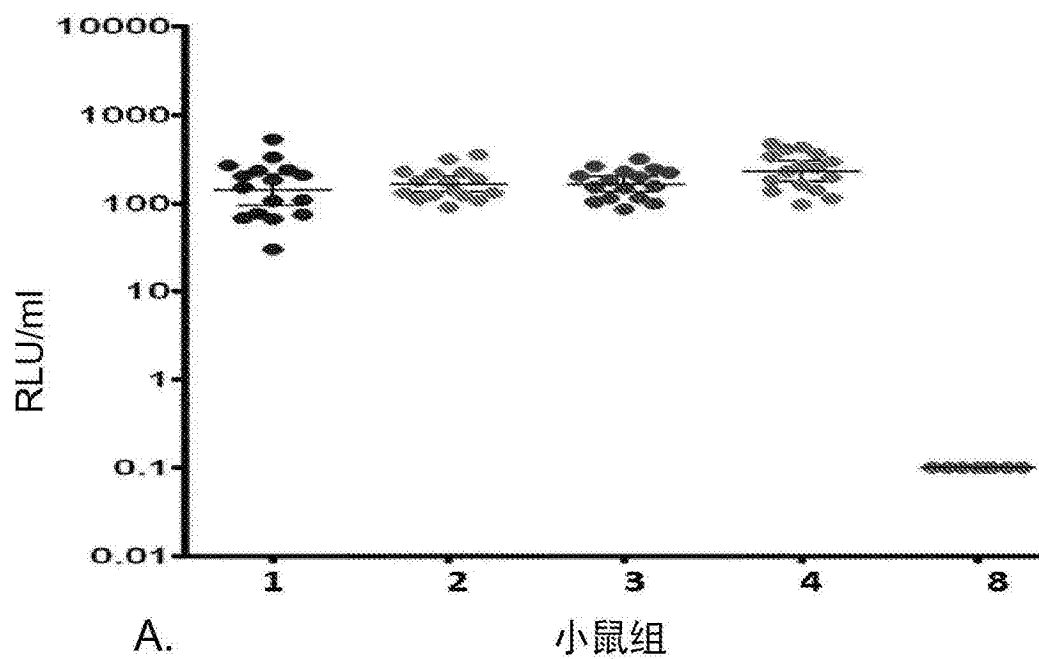


图5

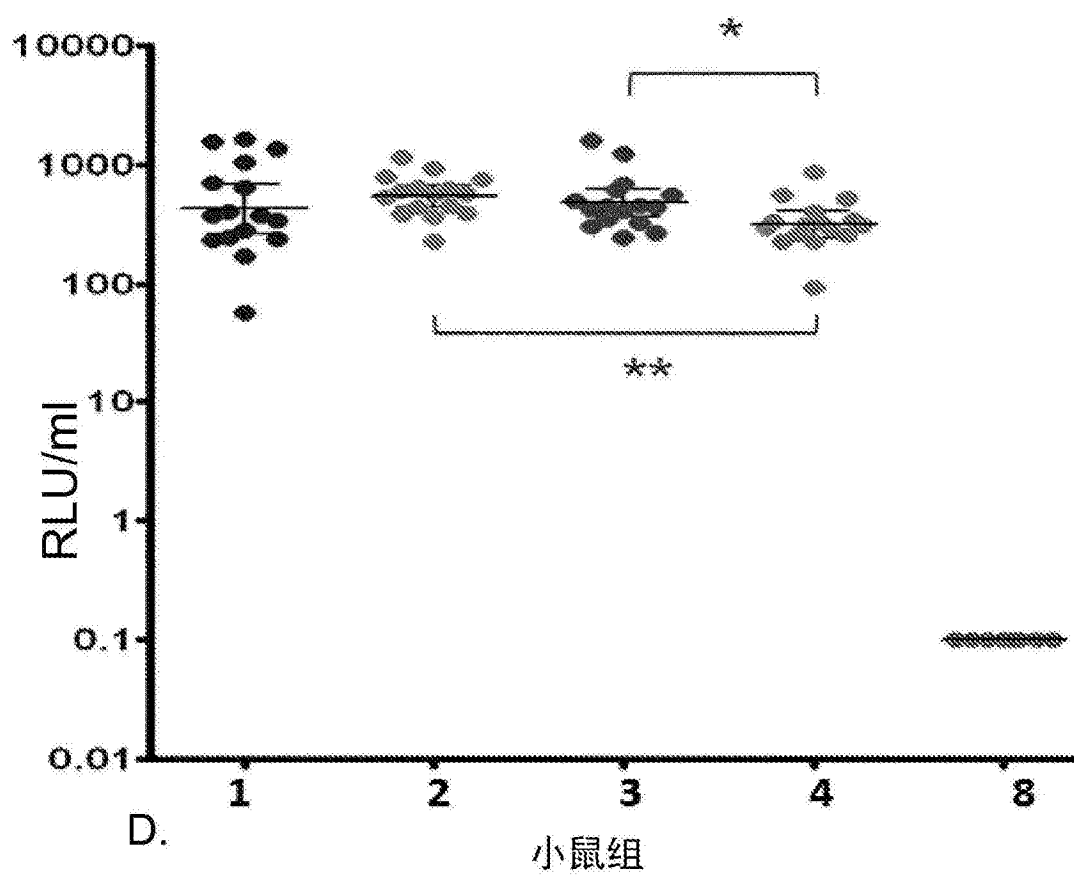
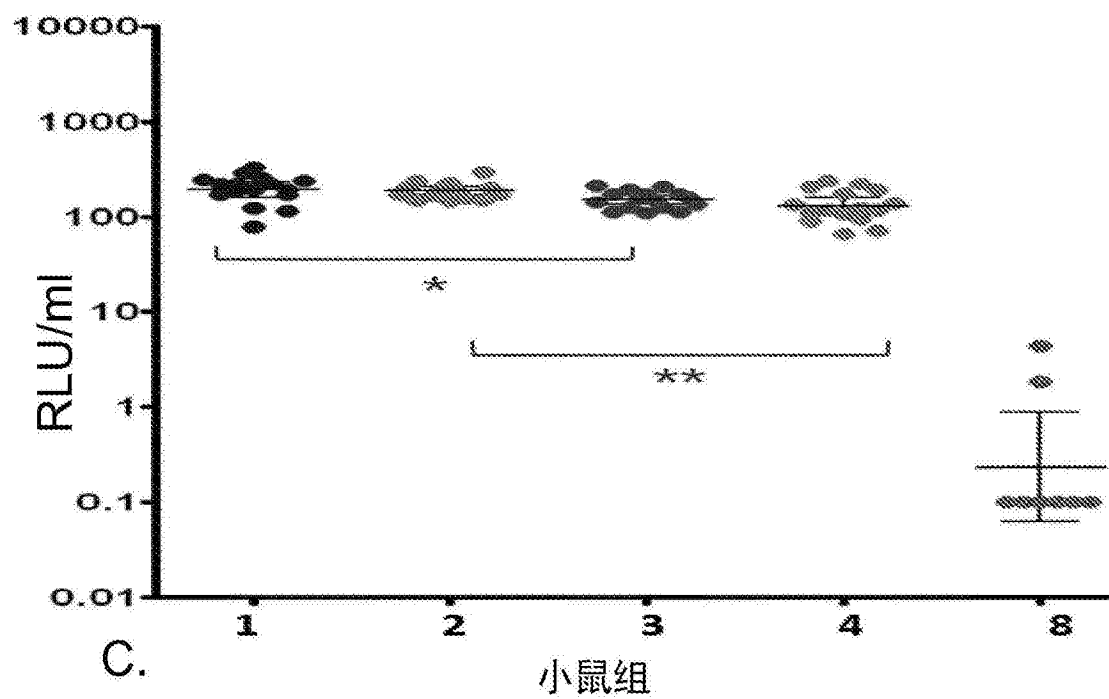


图5(续)

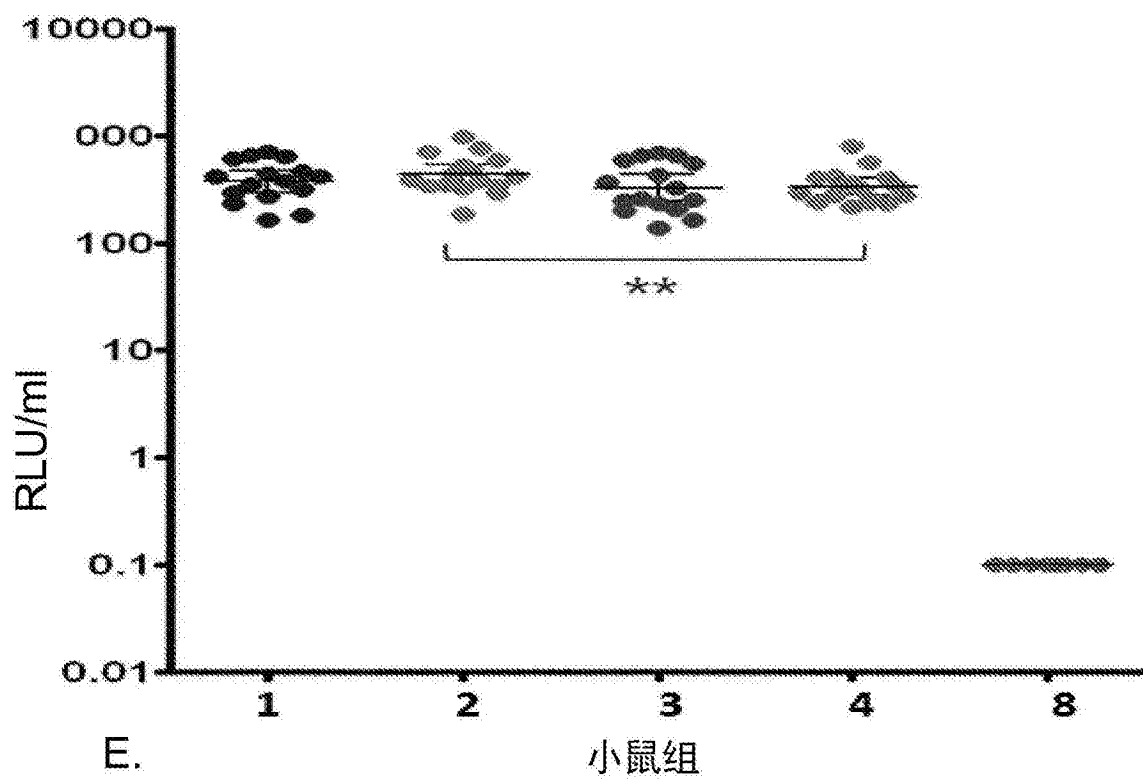


图5(续)

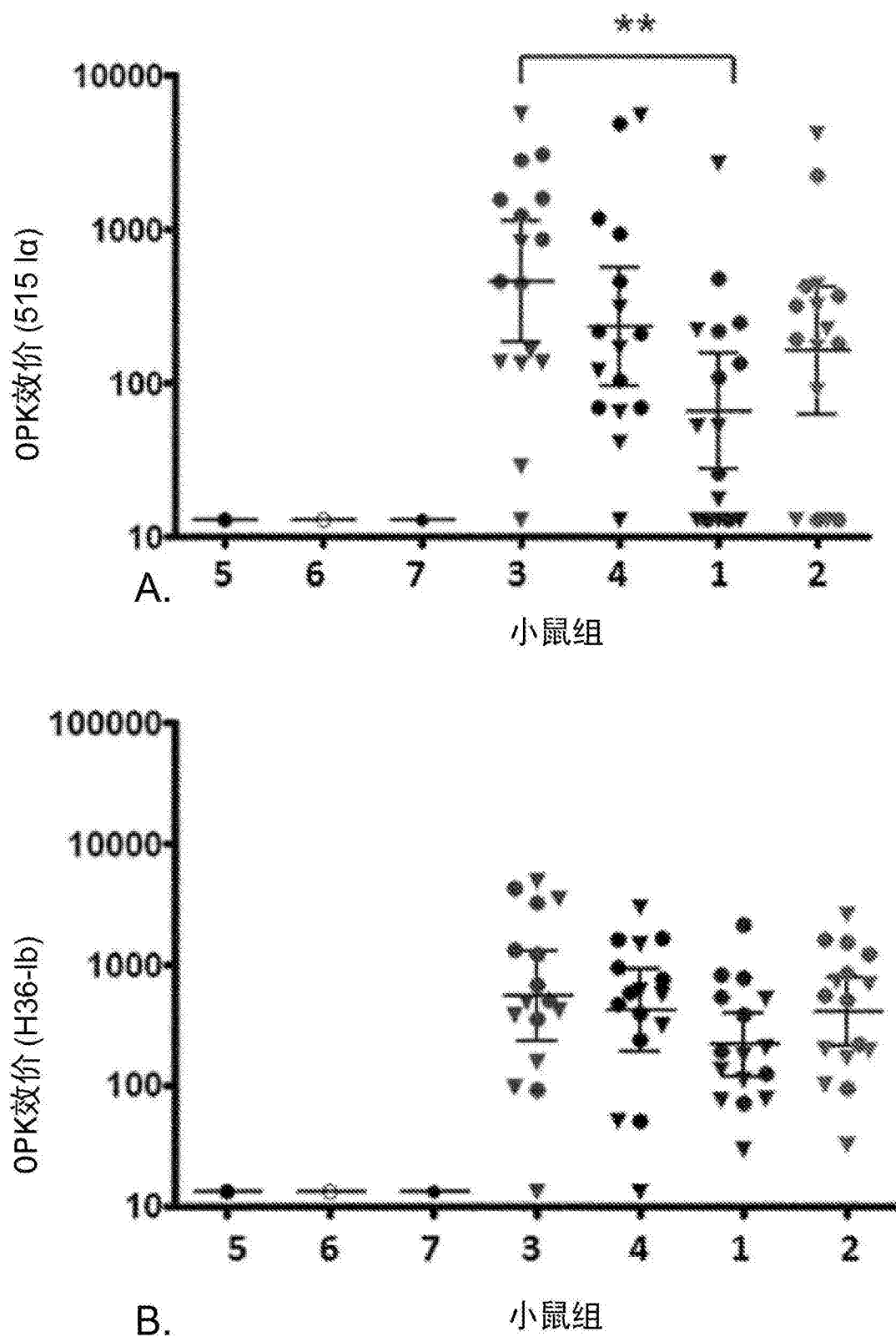


图6

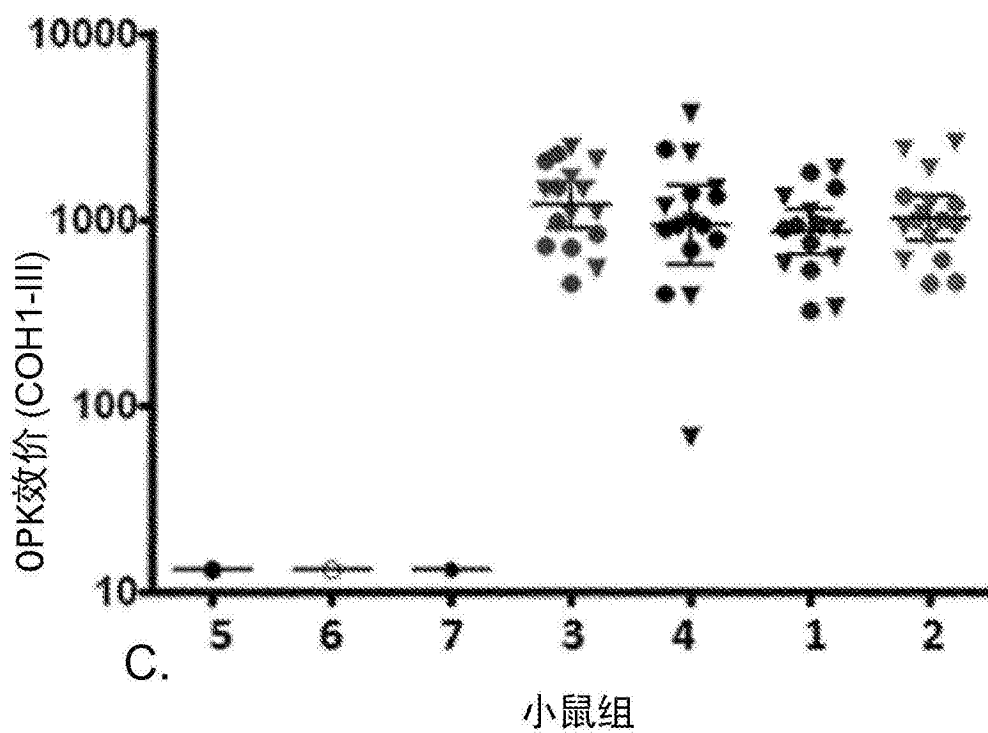


图6 (续)

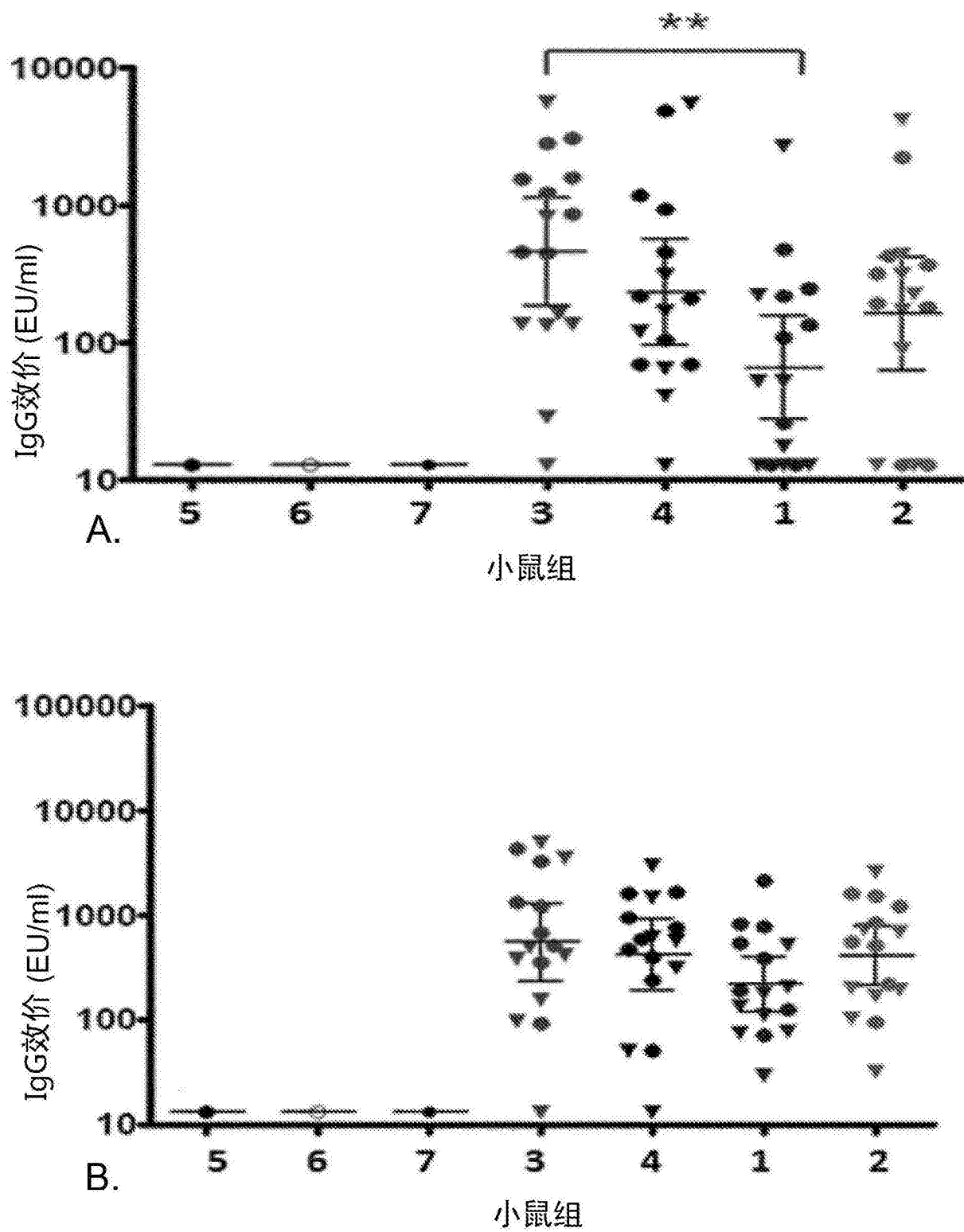


图7

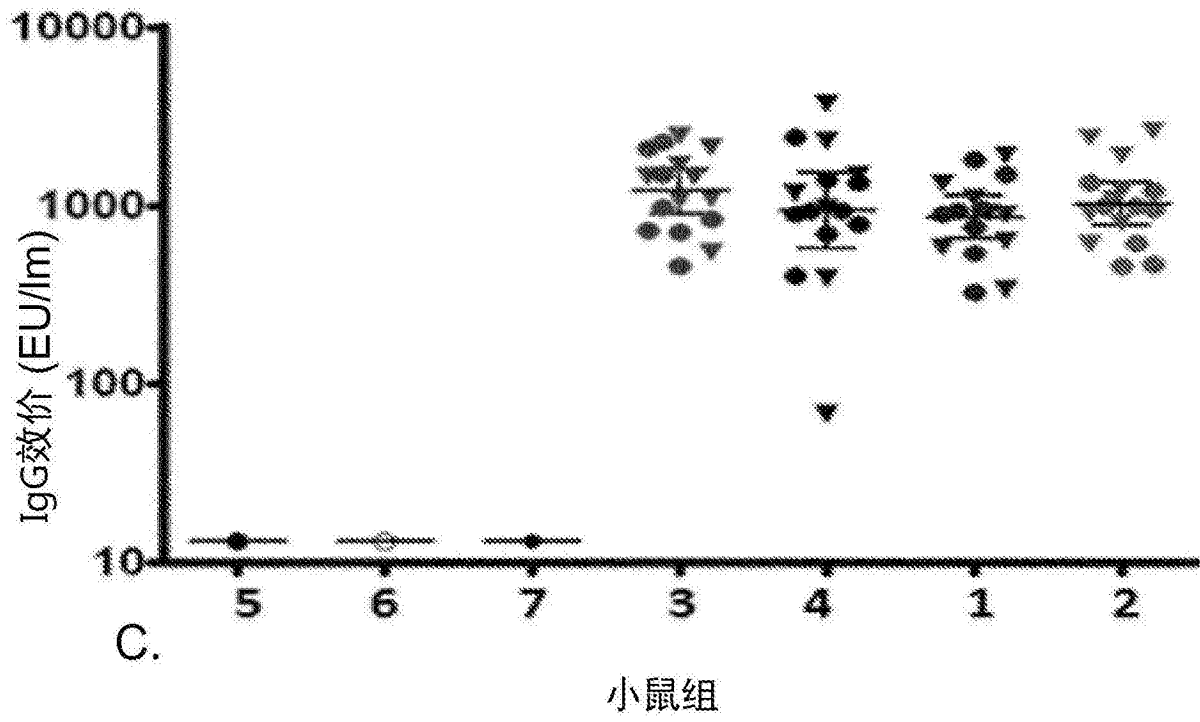


图7(续)

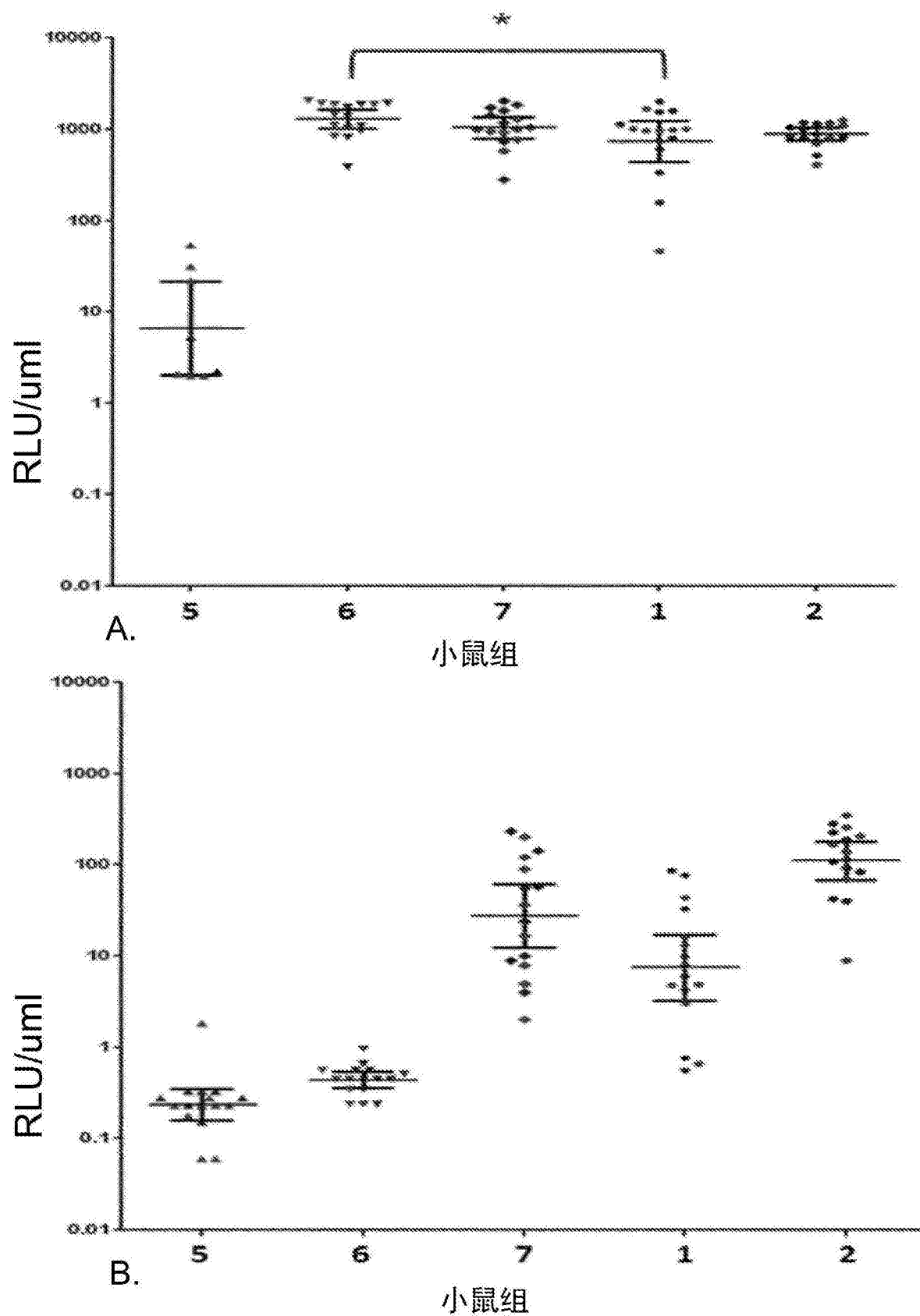


图8

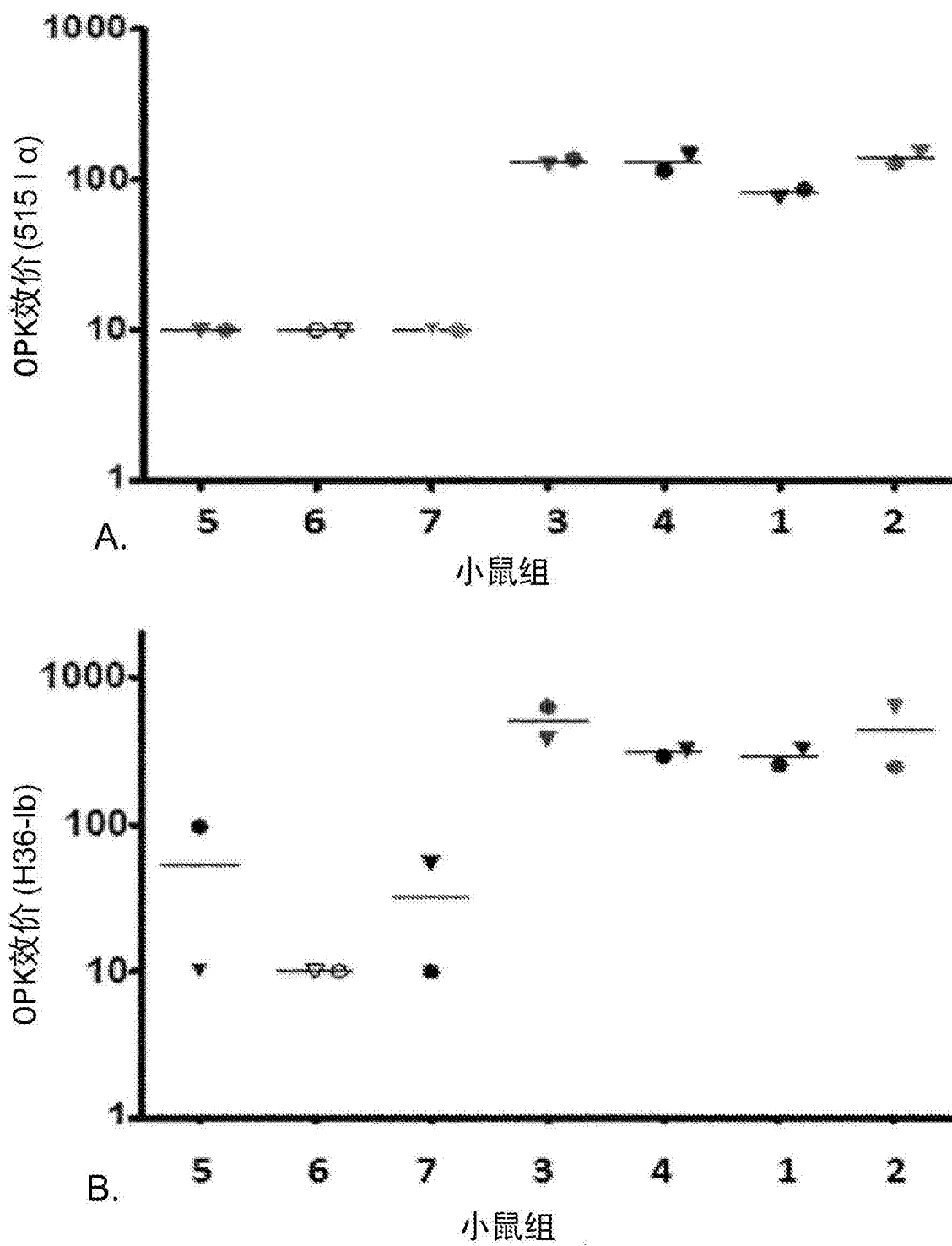


图9

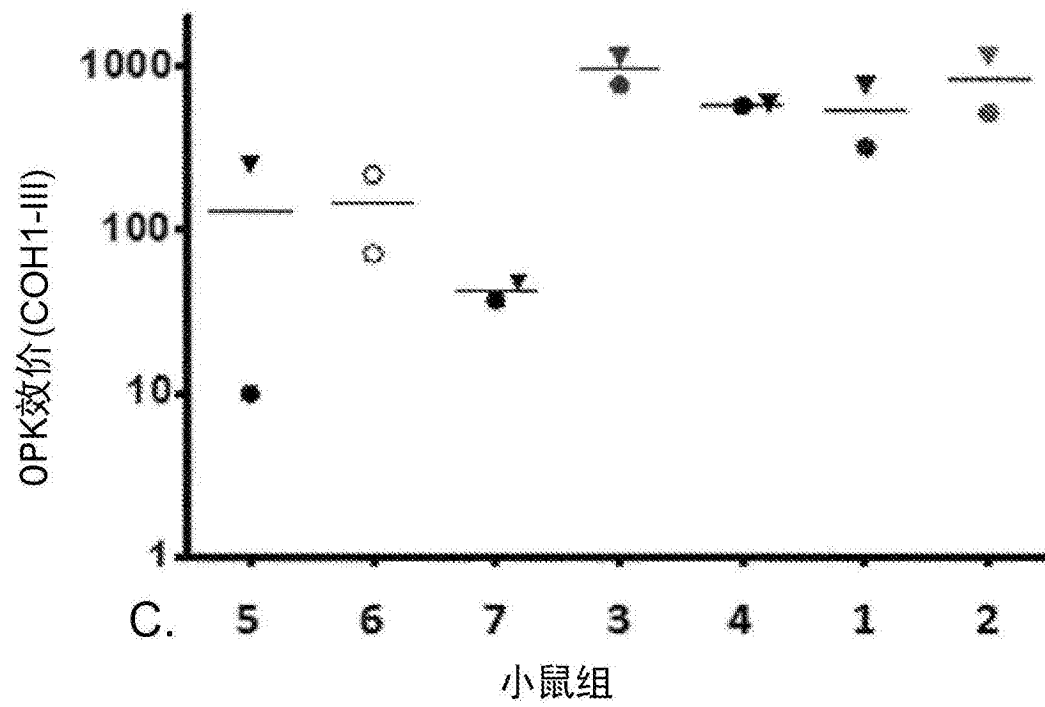


图9 (续)