



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1688343 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 03823724.5

A61K 31/715(2006.01)

(22) 申请日 2003.09.01

C07H 13/12(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(30) 优先权数据

0220198.6 2002.08.30 GB

(56) 对比文件

WO 9831393 A, 1998.07.23, 全文.

WO 9529927 A, 1995.11.09, 全文.

UA 5929049 A, 1999.07.27, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.04.04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2003/004194 2003.09.01

审查员 樊婵娟

(87) PCT申请的公布数据

W02004/019992 EN 2004.03.11

(73) 专利权人 诺华疫苗和诊断有限公司

地址 意大利锡耶纳

(72) 发明人 A·吉亚诺齐 G·阿弗拉尼

F·诺莱利 P·科斯坦蒂诺

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 14 页 附图 3 页

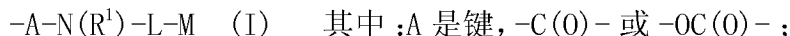
(54) 发明名称

修饰糖、其缀合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明描述具有新型接头的糖-蛋白缀合物。含新接头的该缀合物由修饰糖制得,该修饰糖包含结构式(I)即 $-A-N(R^1)-L-M$ 所示的组成部分,其中,A是 $-C(O)-$ 或 $-OC(O)-$ 键, R^1 选自 H 或 C_1-C_6 烷基;L是 C_1-C_{12} 亚烷基;M是掩蔽醛基。新接头特别适用于制备脑膜炎奈瑟氏球菌(N.meningitidis)A血清群糖的缀合物。具有此新接头的缀合物比其它类型的缀合物具有更强的免疫原性。

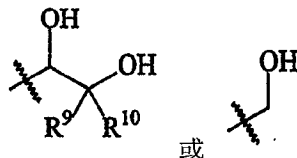
1. 修饰的荚膜糖,它包含结构式 (I) 所述的组成部分:



R^1 选自 H 或 C_1-C_6 烷基;

L 是 C_1-C_{12} 亚烷基;

M 是掩蔽醛基,所述掩蔽醛基选自:

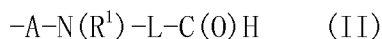


其中: R^9 和 R^{10} 各自选自 H、 C_1-C_{12} 烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_5-C_{12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基;或者, R^9 和 R^{10} 连接成 C_{3-12} 环烷基环;

所述荚膜糖是脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖。

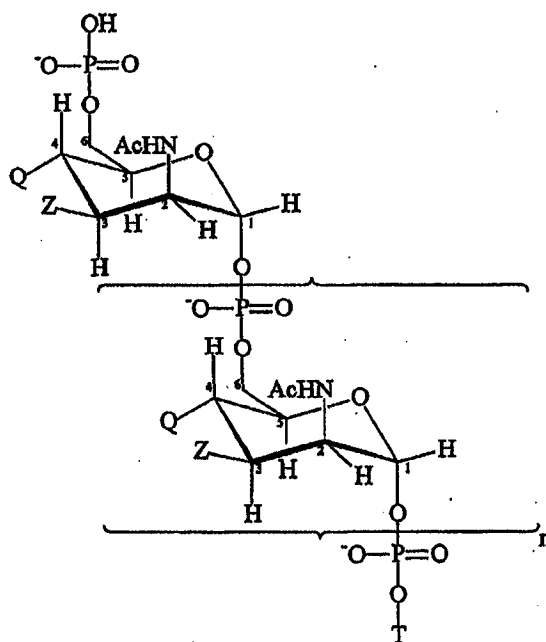
2. 如权利要求 1 所述的修饰荚膜糖, A 是 $-OC(O)-$ 。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的修饰荚膜糖, R^1 是 H。
4. 如前述权利要求中任一项所述的修饰荚膜糖, L 是 C_1-C_6 亚烷基。
5. 如权利要求 4 所述的修饰荚膜糖, L 是 $-CH_2CH_2CH_2-$ 。
6. 如权利要求 1 所述的修饰荚膜糖,所述掩蔽醛基 M 是 $-CH(OH)CH_2OH$ 。
7. 如权利要求 1 或权利要求 3 至 6 中任一项所述的修饰荚膜糖,包含 $-NH(CH_2)_3CH(OH)CH_2OH$ 所示的组成部分。
8. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的修饰荚膜糖,包含 $-OC(O)NH(CH_2)_3CH(OH)CH_2OH$ 所示的组成部分。

9. 修饰的荚膜糖,它包含结构式 (II) 所示的组成部分:

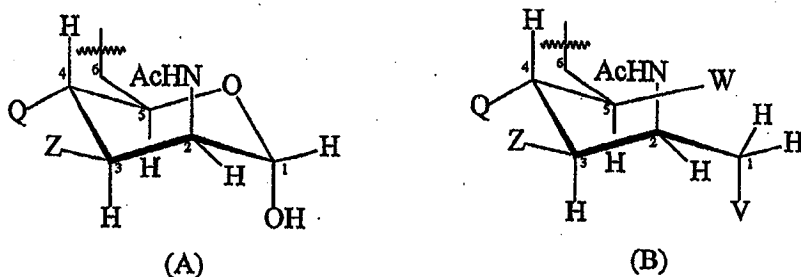


其中,A、 R^1 和 L 如权利要求 1 至 5 中任一项所定义,所述荚膜糖是脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖。

10. 如权利要求 9 所述的修饰荚膜糖, A 是 $-OC(O)-$ 。
11. 如权利要求 9 所述的修饰荚膜糖,包含 $-NH(CH_2)_3C(O)H$ 所示的组成部分。
12. 如权利要求 9 或 10 所述的修饰荚膜糖,包含 $-OC(O)NH(CH_2)_3C(O)H$ 所示的组成部分。
13. 一种糖,具有以下结构式:



其中：T 如结构式 (A) 或 (B) 所示：



其中，n 是 1 到 100 的整数；

各 Z 基团各自选自： $-\text{OH}$ 、 $-\text{OAc}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ ；

各 Q 基团各自选自： $-\text{OH}$ 、 $-\text{OAc}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ ；

W 选自： $-\text{OH}$ 、 $-\text{OAc}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ ；

V 是 $-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ ；其中 R^1 、L 和 M 如权利要求 1 至 6 中任一项所定义，

条件是，所述糖包含以下所示组成部分之一： $-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 。

14. 如权利要求 13 所述的糖，n 是 15 到 25 的整数。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的糖，其中，T 具有结构式 (A)。

16. 如权利要求 13 至 15 中任一项所述的糖，其中，Q 和 Z 是 OH 和 OAc 基团的混合物，两者之比与天然脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖中的比例相同，所不同的是，Q 基团之一或 Z 基团之一是 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 。

17. 如权利要求 16 所述的糖，其特征在于，Q 基团之一是 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 或 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 。

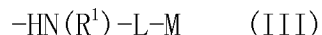
18. 修饰荚膜糖的方法，包括步骤：

(a) 提供具有羟基的荚膜糖，所述荚膜糖是脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖；

(b) 所述羟基与双官能试剂在有机溶剂中反应，所述双官能试剂选自 1,1-羰基二咪唑

(CDI)、羰基二-1,2,4-三唑(CDT)、羰基二-1,2,3-苯并三唑(CDB)、碳酸二苯酯、溴化氰、光气或三光气,所述有机溶剂是非质子溶剂;

(c) 步骤(b)的产物与结构式(III)所示氨基化合物反应;



其中, R^1 、L 和 M 如权利要求 1 至 6 中任一项所定义。

19. 如权利要求 18 所述的方法,所述非质子溶剂选自二甲亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、甲酰胺、六甲基磷酰胺(HMPA)、六甲基三磷酰胺(HMPT)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(DMPU)或二甲基乙酰胺(DMAC)。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法,所述非质子溶剂是 DMSO。

21. 如权利要求 18 所述的方法,所述双官能试剂是 CDI。

22. 如权利要求 18 至 21 中任一项所述的方法,步骤(c)中的氨基化合物是 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 。

23. 如权利要求 18 至 22 中任一项所述的方法,还包括步骤(d)将掩蔽醛基 M 解蔽,产生醛化合物。

24. 如权利要求 23 所述的方法,所述掩蔽醛基 M 是 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$,解蔽步骤是高碘酸盐剪切。

25. 如权利要求 23 或 24 所述的方法,还包括步骤(e)通过还原氨基化 n 反应将所述醛化合物与蛋白质相连。

26. 如权利要求 25 所述的方法,所述还原氨基化反应中的还原剂是 NaBH_3CN 。

27. 修饰脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖的方法,包括步骤:

(a) 提供脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖;

(b) 所述糖上的羟基与 CDI 在 DMSO 溶剂中反应;

(c) 步骤(b)所得产物与 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 反应;

(d) 用高碘酸盐剪切步骤(c)所得产物,产生醛化合物;

(e) 通过采用 NaBH_3CN 的还原氨基化反应将步骤(d)所得醛化合物与蛋白质相连。

28. 糖-蛋白缀合物,其中,糖部分和蛋白质部分由结构式(IV)所示基团相连:



其中 A、 R^1 和 L 如权利要求 1 至 4 中任一项所定义,所述糖是脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖。

29. 如权利要求 28 所述的糖-蛋白缀合物, R^1 是 H, A 是 $-\text{OC}(\text{O})$ 且 L 是 $-(\text{CH}_2)_4-$,所述糖是脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖。

30. 如权利要求 25 至 27 中任一项所述的方法,所述蛋白质是细菌毒素或类毒素。

31. 如权利要求 28 或 29 所述的缀合物,所述蛋白质是细菌毒素或类毒素。

32. 如权利要求 30 所述的方法,所述细菌毒素或类毒素是白喉毒素或类毒素。

33. 如权利要求 31 所述的缀合物,所述细菌毒素或类毒素是白喉毒素或类毒素。

34. 如权利要求 25 至 27 中任一项所述的方法,所述细菌毒素或类毒素是 CRM₁₉₇。

35. 如 31 所述的缀合物,所述细菌毒素或类毒素是 CRM₁₉₇。

36. 药物组合物,包含权利要求 28、29、31、33 和 35 中任一项所述的糖-蛋白缀合物和/或权利要求 1 至 17 中任一项所述的修饰糖,和(b)药学上认可的载体。

37. 如权利要求 36 所述的组合物,还包含疫苗佐剂。
38. 如权利要求 37 所述的组合物,所述组合物是抗脑膜炎奈瑟氏球菌所致疾病的疫苗。
39. 权利要求 28、29、31、33 和 35 中任一项所述的缀合物或权利要求 1 至 17 中任一项所述的糖用于制造预防或治疗脑膜炎奈瑟氏球菌所致疾病的药物的用途。
40. 如权利要求 39 所述的用途,所述疾病是细菌性脑膜炎。

修饰糖、其缀合物及其制备方法

[0001] 本文对所引用的文献进行了全面的参考。

[0002] 技术领域

[0003] 本发明涉及糖化学领域,是关于修饰糖、其制备方法以及缀合衍生物。具体地说,本发明涉及含有接头部分的修饰糖,所述接头用于连接糖与蛋白质。

[0004] 背景技术

[0005] 多糖是重要的生物分子,它们广泛用于制药,用于预防和治疗疾病。例如,荚膜多糖多年来被用于抗荚膜细菌如脑膜炎球菌(脑膜炎奈瑟氏球菌)、肺炎球菌(肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*))和Hib(流感嗜血杆菌B型(*Haemophilus influenzae* type B))的疫苗,。

[0006] 为增强这些多糖的免疫原性,特别是在儿童中的免疫原性,开发出了缀合物疫苗。其中,荚膜多糖与载体蛋白缀合[例如美国专利 4,711,779、4,761,283 和 4,882,317]。缀合分子中,多糖与蛋白质可以直接相连,也可以通过接头连接。

[0007] 尽管已经开发出了多种不同类型的接头,但仍然需要多功能的,以简单、可靠的化学作用即可与多糖和蛋白质偶联的新型接头。而且,还需要无毒的,无需强酸强碱之类苛性试剂在温和条件下即可形成的新型接头。。

[0008] 发明内容

[0009] 本发明的修饰糖

[0010] 发明所提供修饰糖包含结构式(I)所示的组成部分:

[0011] $-A-N(R^1)-L-M(I)$

[0012] 其中:A是键, $-C(O)-$ 或 $-OC(O)-$;

[0013] R^1 选自H或 C_1-C_6 烷基;

[0014] L是 C_1-C_{12} 亚烷基;

[0015] M是掩蔽醛基。

[0016] “修饰的荚膜糖”指由天然荚膜糖经适当修饰而获得的糖。因此,本发明的修饰荚膜糖保留了天然荚膜糖中基本的单糖单元重复序列。

[0017] “糖”包括寡糖(例如含2-39个单糖单元)和多糖(例如含40个或更多单糖单元)。细菌中的天然荚膜糖一般为多糖。多糖经处理可产生较短的寡糖。获得寡糖可通过对天然多糖进行纯化和/或分级(例如弱酸水解、加热、大小排阻层析等)。

[0018] 通常,本发明的修饰糖是寡糖。寡糖可用上述任一种分级方法由多糖获得。

[0019] 本发明的修饰荚膜糖可由天然荚膜糖获得。然而,本发明不限于得自天然荚膜糖的修饰糖。本发明修饰荚膜糖还可由其它方法获得,如全合成或部分合成。

[0020] 在本发明的修饰荚膜糖中,结构式(I)部分可由荚膜糖的非末端羟基形成,或由荚膜糖的末端异构羟基形成。

[0021] 当结构式(I)部分由末端异构羟基形成时,较好的是,它通过例如还原氨基化反应取代末端异构羟基。糖末端羟基上的还原氨基化反应是本领域熟知的。

[0022] 当结构式(I)部分由非末端羟基形成时,较好的是,它经例如氨基甲酸酯基团与

非末端羟基相连。因此,实施方式之一中,本发明的修饰荚膜糖包括结构式 (Ia) 所示的组成部分:

[0023] $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ (Ia)

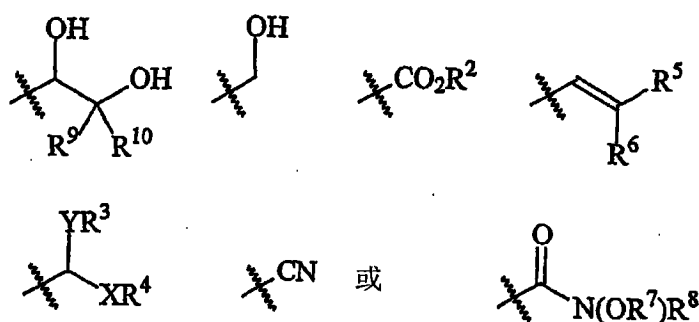
[0024] 其中 R^1 、L 和 M 如前所述。

[0025] 制备这种化合物可通过:对糖上的游离羟基进行例如 CDI 衍生,随后将该氨基甲酸酯中间体与结构式 $\text{HN}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{M}$ 所示的胺反应。

[0026] R^1 优选 H。L 优选 C_1-C_{12} 亚烷基, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 更好。当结构式 (I) 所示组成部分用于将糖与蛋白质连接成糖-蛋白缀合物时, L 基团的作用是间隔基。据信,糖和蛋白质之间的间隔基可提高缀合物的稳定性。

[0027] 本领域技术人员知道许多不同的易转变成醛基的官能团。此类官能团都适合作为掩蔽醛基 M。掩蔽醛基 M 优选:

[0028]



[0029] 其中: R^2 选自 H、 C_1-C_{12} 烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_5-C_{12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基 (R^2 不宜为 H);

[0030] X 和 Y 相同或不同,各自选自 O 或 S;

[0031] R^3 和 R^4 各自选自 C_1-C_{12} 烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_5-C_{12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基;或者, R^3 与 R^4 连接成含杂原子 X 和 Y 的 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 或 C_8 环烷基环;

[0032] R^5 和 R^6 各自选自 H、 C_1-C_{12} 烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_5-C_{12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基;或者, R^5 和 R^6 连接成 C_3 或 C_{12} 环烷基环;

[0033] R^9 和 R^{10} 各自选自 H、 C_1-C_{12} 烷基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_5-C_{12} 芳基或 C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基;或者, R^9 和 R^{10} 连接成 C_{3-12} 环烷基环;

[0034] R^7 和 R^8 各自选自 C_1-C_{12} 烷基或 C_3-C_{12} 环烷基。

[0035] “烷基”在此指直连和支链烷基,烷基内可内含 1、2 或 3 个杂原子,所述杂原子选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{S}-$ 。烷基还可含 1、2 或 3 个双键和 / 或三键。然而,“烷基”一词通常指不含杂原子也不含双键或三键的烷基。 C_{1-12} 烷基指所含碳原子数为 1 至 12 中任一个 (例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12}) 的烷基。类似的, C_{1-6} 烷基指所含碳原子数为 1 至 6 中任一个的 (例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6) 的烷基。

[0036] “亚烷基”在此指直连或支链亚烷基。亚烷基可含 1、2 或 3 个杂原子,所述杂原子选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{S}-$ 。亚烷基还可含 1、2 或 3 个双键和 / 或三键。然而,“亚烷基”一词通常指不含杂原子或双键或三键的亚烷基。 C_{1-12} 亚烷基指所含碳原子数为 1 至 12 中任一个 (例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12}) 的亚烷基。类似的, C_{1-6} 亚烷基指所含碳原子数为 1 至 6 中任一个的 (例如 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6) 的亚烷基。

[0037] “环烷基”在此包括环烷基、聚环烷基和环烯基,以及它们与烷基的组合,如环烷基烷基。环烷基可含 1、2 或 3 个杂原子,所述杂原子选自 -O-、-NH- 或 -S-。“环烷基”通常指不含杂原子的环烷基。环烷基的例子包括环戊基、环己基、环己烯基、环己基甲基和金刚烷基。 C_3 - C_{12} 环烷基指所含碳原子数为 3 至 12 中任一个(例如 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12})的环烷基。

[0038] “芳基”在此指含碳和氢的芳族基团,如苯基或萘基。 C_5 - C_{12} 芳基指所含碳原子数为 5 至 12 中任一个(例如 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12})的芳基。

[0039] “ C_{5-12} 芳基- C_{1-6} 烷基”指例如苄基、苄乙基和萘甲基之类基团。

[0040] 掩蔽醛基优选 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 。较好的是,本发明的修饰荚膜糖优选包含结构式 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 所示的部分,更好的是 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 所示的部分。

[0041] 本发明提供具有掩蔽醛基的化合物。掩蔽醛基的益处在于避免荚膜糖修饰期间的不利副反应。此外,当醛基解蔽后,它可与例如蛋白质上的氨基发生还原氨基化反应而与之偶联。

[0042] 一般说来,结构式 (I) 或 (Ia) 部分功能是供随后与蛋白质上氨基反应所需。因此,结构式 (I) 或 (Ia) 部分常用于形成糖-蛋白缀合物中的接头基团。

[0043] 然而,结构式 (I) 或 (Ia) 部分,尤其是 (Ia) 部分,可用作保护基团以稳定糖而抵抗降解,特别是酸解。结构式 (Ia) 部分可改作这一用途,也可在作为连接基团之外兼顾这一用途。国际专利申请 PCT/IB03/01436 就描述了其作为保护基团用来稳定荚膜糖的用途。

[0044] 当结构式 (Ia) 部分用作稳定保护基团时,修饰糖优选含有一个以上该组成部分以获得稳定效果。例如,修饰糖中的所有或几乎所有单糖单元都具有含结构式 (Ia) 的保护基团。或者,至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% 的单糖单元具有含结构式 (I) 的保护基团。修饰糖中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个单糖单元具有所述保护基团。

[0045] 类似的,各单糖单元上保护基团的数量可以不同。例如,单糖单元上保护基团的数量可以是 1、2、3、4、5 或 6 个,优选 1 到 4,更优选 1 或 2。

[0046] 较好的是,本发明的修饰糖包含结构式 (I) 或 (Ia) 部分,该部分后来可转变成醛。因此,本发明还提供具有结构式 (II),优选 (IIa) 所示组成部分的修饰糖:

[0047] $-\text{A}-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ (II)

[0048] $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{H}$ (IIa)

[0049] 其中 A、 R^1 和 L 如前所述。

[0050] 结构式 (I) 或 (Ia) 中掩蔽醛转变成结构式 (II) 或 (IIa) 中的醛用到一个简单的合成步骤。例如,二元醇可经氧化剪切转变成醛(如用 NaIO_4 、 $\text{PB}(\text{OAc})_4$ 等);醇可氧化转变成醛(如 Swern 氧化、Dess-Martin 氧化、 Cr^{VI} 氧化等);烯烃可经双键的氧化剪切转变成醛(如先臭氧分解后再还原, $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ 、 $\text{OsO}_4/\text{PB}(\text{OAc})_4$ 等);乙缩醛可酸解转变成醛;硫缩醛可通过金属配位、烷化或氧化转变成醛(如 Hg^{II} 、 Ag^{I} 、 Ag^{II} 、 Cu^{II} 、 MeI 、N-溴代琥珀酰亚胺等);羧酸酯、腈化合物和 Weinreb 酰胺可适当还原成醛(如用 NaBH_4 、DIBAL 等)。

[0051] 较好的是,掩蔽醛 M 是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 。此二醇的优点在于可用温和的高碘酸盐氧化剂转变成对应的醛。据信,高碘酸盐氧化剂,如 NaIO_4 ,能选择性地形成醛而不影响荚膜糖上的其它敏感官能团。

[0052] 因此,实施方式之一中,修饰糖包括结构式 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{H}$ 所示的部分,更优选 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{H}$ 。

[0053] 糖-蛋白缀合物

[0054] 含结构式 (II) 或 (IIa) 部分的修饰糖可用于将该糖与载体蛋白偶联。较好的是,所述偶联通过蛋白质上的氨基与包含结构式 (II) 或 (IIa) 所示部分的修饰糖上的醛基之间的还原氨基化反应而实现。还原氨基化反应是公认的将糖与蛋白质偶联的可靠方法。该反应一般用 NaBH_3CN 进行,但也可采用其它适当的还原剂。

[0055] 因此,本发明提供糖-蛋白缀合物,其中糖和蛋白质部分经结构式 (IV) 或优选的 (IVa) 所示基团相连:

[0056] $-\text{A}-\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{NH}$ (IV)

[0057] $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-\text{L}-\text{NH}$ (IVa)

[0058] 其中 A、 R^1 和 L 如前所述。在本发明缀合物中, L 优选 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。实施方式之一中,糖和蛋白质部分由 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$ 相连。其中的 $-\text{NH}-$ 通常由蛋白质上已有的例如在赖氨酸残基中的胺基团形成,。

[0059] 在本发明的蛋白质-糖缀合物中,蛋白质优选细菌毒素或类毒素,更优选白喉或破伤风毒素或类毒素。它们是缀合物疫苗的常用组分。尤其好的是 CRM₁₉₇ 白喉类毒素 [1]。其它合适的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白质 [2]、合成肽 [3,4]、热休克蛋白质 [5,6]、百日咳蛋白质 [7,8]、流感嗜血杆菌的蛋白 D [9]、细胞因子 [10]、淋巴因子 [10]、激素 [10]、生长因子 [10]、艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或毒素 B [11]、铁吸收蛋白 [12] 等。可以使用载体蛋白的混合物。

[0060] 缀合后,游离糖和缀合糖能够被分开。为此有许多合适的方法,包括疏水层析、切向超滤 (tangential ultrafiltration)、渗滤等 [参见文献 13、14 等]。

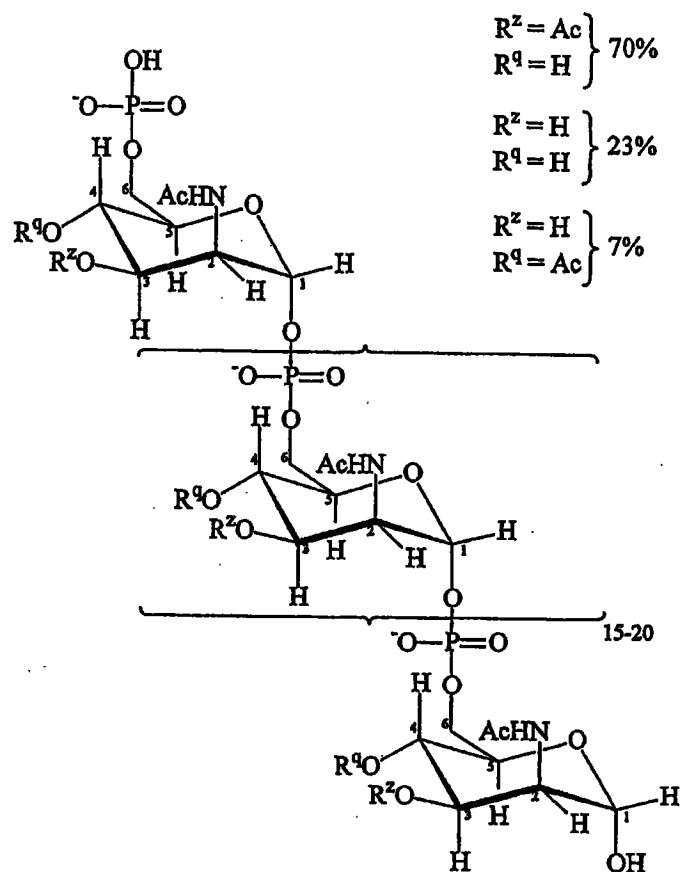
[0061] 同一载体蛋白可携带多种不同的糖 [15]。

[0062] 修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖

[0063] 在上述所有实施方式中,所述修饰荚膜糖优选修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌糖,更好的是修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖。

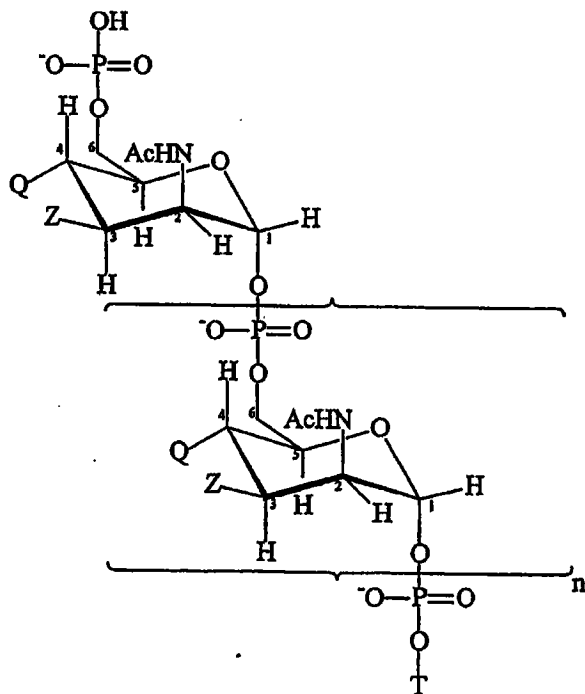
[0064] 修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖有下列结构:

[0065]



[0066] 因此,本发明提供的如下所示的糖:

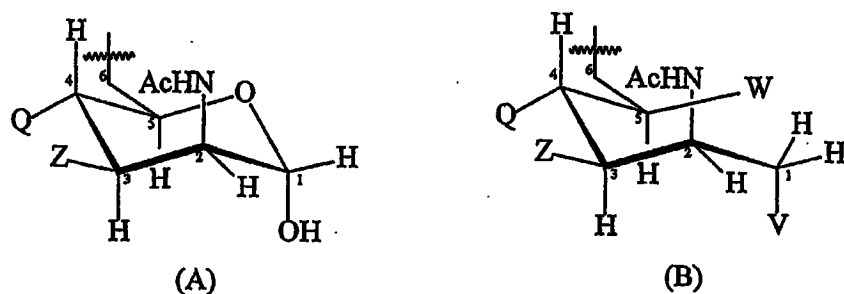
[0067]



[0068] 其中:

[0069] T 如结构式 (A) 或 (B) 所示:

[0070]



[0071] n 是 1 到 100 的整数；

[0072] 各 Z 基团各自选自 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ ；

[0073] 各 Q 基团各自选自 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ ；

[0074] W 选自 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ (W 优选 $-OH$)；

[0075] V 是 $-N(R^1)-L-M$ 或 $-N(R^1)-L-C(O)H$ ；

[0076] 其中 R^1 、 L 和 M 如前所述；

[0077] 条件是，所述糖包含结构式 $-N(R^1)-L-M$ 、 $-N(R^1)-L-C(O)H$ 、 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ 所示的组成部分中至少其一。

[0078] n 优选 15 到 25 的整数。

[0079] T 优选结构式 (A)。所述糖优选包括结构式 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ 所示组成部分至少其一。

[0080] Q 和 Z 优选是 OH 和 OAc 基团的混合物，两者之比与天然脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖中的比例基本相同，所不同的是， Q 基团之一或 Z 基团之一，优选 Q 基团之一，是 $-OC(O)N(R^1)-L-M$ 或 $-OC(O)N(R^1)-L-C(O)H$ 。

[0081] 生成修饰糖的方法

[0082] 本发明还提供修饰荚膜糖的方法，包括：

[0083] (a) 提供含羟基的荚膜糖；

[0084] (b) 羟基与双官能试剂在有机溶剂中反应；

[0085] (c) 步骤 (b) 所得产物与结构式 (III) 所示氨基化合物反应，

[0086] $-HN(R^1)-L-M$ (III)

[0087] 其中 R^1 、 L 和 M 如前所述。

[0088] 所述荚膜糖可以是天然荚膜糖（寡糖或多糖）。或者，所述荚膜糖可以是例如脱-O-乙酰化荚膜糖、封闭荚膜糖（如 PCT/IB03/01436 所述）或含末端氨基的荚膜糖（如还原氨基化反应所得的荚膜糖）。

[0089] “双官能试剂”在此指能够行使以下双重功能的任何试剂：(i) 提供第一亲电碳原子用于与糖上的羟基偶联；(ii) 提供第二亲电碳原子用于与步骤 (b2) 所用的氨基偶联。一般，第二亲电碳原子是由第一亲电碳原子在步骤 (b) 中再生而成。双官能试剂在多糖与氨基化合物之间形成 $-C(O)-$ 键。

[0090] 本发明所用双官能试剂包括但不限于 1,1'-羰基二咪唑 (CDI)、羰基二-1,2,4-三唑 (CDT)、羰基二-1,2,3-苯并三唑 (CDB)、碳酸二苯酯、溴化氰、光气或三光气。本领域技术人员可以看出，还有其它双官能试剂与以上这些具有相同的功能。本发明优选 CDI，因为它是特别温和的试剂，能够避免产生强酸性气体如 HCl 或 HBr 。

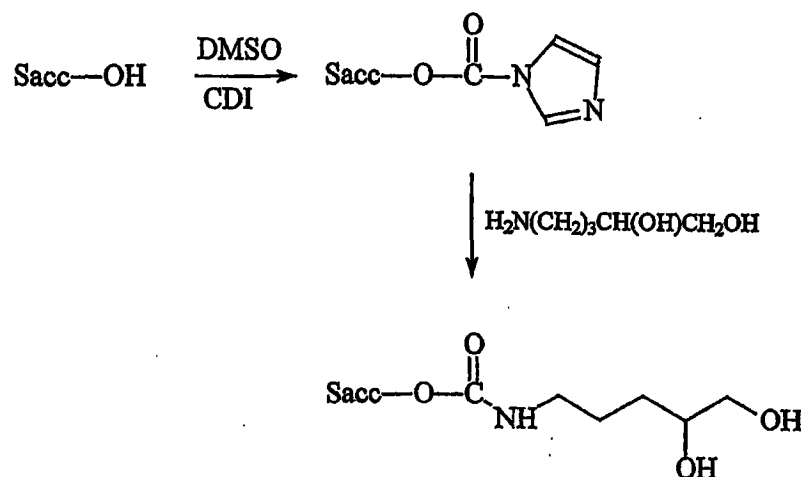
[0091] 有机溶剂优选非质子溶剂。非质子溶剂对本领域技术人员是熟知的，其不包含任

何离子化的氢原子。此类溶剂的好处在于,它们通过增强羟基的亲核性从而促进糖上的羟基与双官能试剂反应。合适的非质子溶剂包括但不限于二甲亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)、甲酰胺、六甲基磷酰胺 (HMPA)、六甲基三磷酰胺 (HMPT)、1,3-二甲氧基-2-丙醇-4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮 (DMPU) 或二甲基乙酰胺 (DMAC), 优选 DMSO。

[0092] 步骤 (c) 中,步骤 (b) 产生的氨基甲酸酯化合物中间体与式 (III) 所示的胺反应。式 (III) 所示的胺优选 tris-亲核 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 。

[0093] 本发明的优选方法如以下方案 1 所示:

[0094]



[0095] Sacc = 多糖部分

[0096] 方案 1

[0097] 方案 1 中,糖 (例如 Men A 多糖或寡糖) 首先在 DMSO 溶剂中用 CDI 通过其羟基之一被活化。所得咪唑氨基甲酸酯被 tris-亲核 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 截获,形成含掩蔽醛官能团的修饰糖。图 2 显示脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖的活化步骤。

[0098] 或者,修饰糖也可一步制得:荚膜糖上的一个或多个羟基与试剂 $\text{X}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)\text{-L-M}$ 反应,其中 X 是离去基团, R^1 、L 和 M 如前所述。合适的离去基团包括但不限于 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OC}_6\text{H}_5$ 或 CCl_3 。

[0099] 优选实施方式中,糖的修饰方法除以上所述之外还包括:步骤 (d) 将掩蔽醛基 M 解蔽,产生醛化合物;(e) 通过还原氨基化反应将醛化合物与蛋白质相连。在这样的方法中,掩蔽醛基 M 优选是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$,解蔽步骤优选高碘酸盐剪切,还原氨基化反应中的还原剂优选 NaBH_3CN 。图 1 展示了这一优选实施方式。图 1 中,PS 代表天然脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖产生的多糖或寡糖。

[0100] 药物组合物和方法

[0101] 发明提供的药物组合物包含 (a) 发明的修饰糖和 / 或发明缀合物和 (b) 药学上认可的载体。包含缀合物时,组合物还可包含游离载体蛋白 [16]。

[0102] “药学上认可的载体”包括各种载体,只要它本身不诱导产生对受主有害的抗体。合适的载体通常是代谢速度慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物、海藻糖 [17] 脂类聚集体 (如油滴或脂质体) 和灭活病毒粒子。这些载体是本领域普通技术人员熟知的。疫苗还可以包含稀释液,如水、盐水、甘油等。此外,还可以包含辅助物质如润湿剂或乳化剂,pH 缓冲物质等。关于药学上认可的赋形剂的全面讨论可

参见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science), 例如 2000 版 (ISBN: 0683306472)。

[0103] 通常, 将本发明组合物制成液体溶液或悬浮液形式的注射剂; 也可制成适合的固体形式, 在注射前溶解或悬浮于液体载体中。还可以将本发明制剂以脂质体乳化或包裹获得增强的佐剂效应。本发明组合物的直接传递一般是肠胃外传递 (例如通过注射, 皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射, 或者传递到组织间质间隙。本发明组合物也可以通过创伤给药。其它给药方式包括经口和经肺给药、直肠 (栓剂), 透皮或经皮给药 [例如文献 18]、针和无针注射器 (hyposprays)。给药可以是单剂次, 也可以是多剂次 (例如包括增强剂次)。

[0104] 较好的是, 本发明组合物无菌、经缓冲且 / 或无热原。

[0105] 较好的是, 本发明组合物是免疫原性组合物 (例如疫苗)。以糖或糖-蛋白缀合物为基础的疫苗是本领域所熟知的。

[0106] 本发明免疫原性组合物包含免疫学有效量的糖抗原以及任何其它所需成分。“免疫学有效量”指给剂量作为单剂次或多剂次中的部分剂次给予个体后具有治疗或预防效果。此量不固定, 取决于待治疗个体的健康和身体状况、年龄、物种分类 (如非人的灵长类动物、灵长类动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需保护程度、疫苗制剂配方、主治医生对情况的评估, 以及其它相关因素。该量具有较宽的范围, 通过常规试验即可确定。给药可以是单剂次, 也可以是多剂次 (例如包括增强剂次)。疫苗可以与其它免疫调节剂联用。

[0107] 本发明组合物可以包含佐剂。提高组合物有效性的优选佐剂包括但不限于: (A) 铝化合物 (例如氢氧化铝、磷酸铝、羟基磷酸铝、羟基氢氧化铝、正磷酸铝、硫酸铝等 [参见文献 19 的第 8, 9 章]) 或不同铝化合物的混合物, 这些化合物可以是任何适当的形式 (如凝胶、晶体、无定形等), 且具有良好的吸收性; (B) MF59 (5% 鲨烯、0.5% 土温 80 和 0.5% Span 85, 用微流化器制成亚微粒子) [参见文献 19 的第 10 章; 另可参见文献 20]; (C) 脂质体 [参见文献 19 的第 13 和 14 章]; (D) ISCOMs [参见文献 19 的第 23 章], 它可以不含其它洗涤剂 [21]; (E) SAF, 含 10% 鲨烯、0.4% 土温 80、5% pluronic-嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP, 微流化成亚微乳剂或旋涡搅拌成较大颗粒的乳剂 [参见文献 19 的第 12 章]; (F) Ribi™ 佐剂系统 (RAS) (Ribi Immunochem), 含 2% 鲨烯、0.2% 土温 80 和选自单磷酸脂 A (MPL)、双分枝菌酸藻糖 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 的一种或多种细菌细胞壁成分, 优选 MPL+CWS (Detox™); (G) 皂角苷佐剂, 如 QuilA 或 QS21 [参见文献 19 的第 22 章], 也称为 Stimulon™; (H) 壳聚糖 [例如 22]; (I) 完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA); (J) 细胞因子如白介素 (例如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 等)、干扰素 (例如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等 [参见文献 19 的第 27 和 28 章]; (K) 可生物降解和无毒材料 (例如聚 (α -羟酸)、多羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等) 微粒 (即直径约 100nm-150 μ m 的颗粒, 更优选约 200nm-30 μ m, 最优选约 500nm-10 μ m); (L) 单磷酸脂 A (MPL) 或 3-O-脱酰 MPL (3dMPL) [例如文献 19 的第 21 章]; (M) 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳剂的组合 [23]; (N) 含 CpG 基序的寡核苷酸 [24], 即含至少一个 CG 二核苷酸, 以 5-甲基胞苷取代胞嘧啶; (O) 聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯 [25]; (P) 聚氧乙烯山梨糖酯表面活性剂与辛苯聚醇 (octoxynol) 的组合物 [26] 或者聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂与至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯聚醇的组合物 [27]; (Q) 免疫刺激性寡核苷酸 (例如 CpG 寡核

苷酸)和皂角苷[28];(R)免疫刺激剂和金属盐颗粒[29];(S)皂角苷和水包油乳剂[30];(T)皂角苷(例如QS21)+3dMPL+IL-12(可选+固醇)[31];(U)大肠杆菌(*E. coli*)热不稳定肠毒素(“LT”)或其去毒突变体,如K63或R72突变体[例如文献32的第5章];(V)霍乱毒素(“CT”)或其去毒突变体[例如文献32的第5章];(W)双链RNA;(X)单磷酸脂A模拟物,如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯(aminoalkyl glucosaminide phosphate)衍生物,如RC-529[33];(Y)聚磷腈(PCPP);或(Z)生物粘合剂[34]如酯化透明质酸微球[35]或粘膜粘着剂(mucoadhesive),选自聚(丙烯酸)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。也可采用能够增强组合物效果的其它免疫刺激剂[例如参见文献19的第7章]。铝盐(特别是磷酸铝和/或氢氧化铝)是肠胃外免疫的优选佐剂。突变毒素是优选的粘膜佐剂。

[0108] 胞壁酰肽包括N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸基氧基)-乙胺(MTP-PE)等。

[0109] 制成的本发明组合物可直接给予待治者,所述待治者可以是动物,尤其是人。本发明疫苗特别适用于给儿童和青少年免疫接种。

[0110] 本发明疫苗可以是预防型(即用于预防感染),也可以是治疗型(即用于治疗感染后的疾病),但通常是预防型。

[0111] 除修饰糖之外,本发明组合物还可包含抗原成分。例如,本发明组合物可包含一种或多种其他糖(非修饰或如本发明所述经修饰)。例如,所述组合物可包含脑膜炎奈瑟氏球菌血清群C、W135和Y的糖(如,在经修饰的MenA糖之外)。它们通常与载体蛋白缀合,脑膜炎奈瑟氏球菌不同血清群的糖可与相同或不同的载体蛋白缀合。如果混合物包括血清群A和C的荚膜糖,MenA糖:MenC糖之比(w/w)优选大于1(例如2:1、3:1、4:1、5:1、10:1或更高)。当MenA组分超过(质量/剂量)MenC组分时,MenA组分的免疫原性提高。

[0112] 本发明组合物还可包含蛋白抗原。

[0113] 本发明组合物可包含的抗原包含:

[0114] - 来自幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)的抗原,如CagA[36-39]、VacA[40, 41]、NAP[42, 43, 44]、HopX[例如45]、HopY[例如45]和/或脲酶。

[0115] - 来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群B的蛋白抗原,如文献46至52所述的抗原,优选蛋白质‘287’(见后文)及其衍生物(例如‘ Δ G287’)。

[0116] - 来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群B的外膜囊泡(OMV)制品,如文献53、54、55、56等所述。

[0117] - 来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群C的糖抗原,如文献57所述的血清群C寡糖[另见文献58]。

[0118] - 来自肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的糖抗原[例如59、60、61]。

[0119] - 来自甲肝病毒的抗原,如灭活病毒[例如62、63]。

[0120] - 来自乙肝病毒的抗原,如表面和/或核心抗原[例如63、64]。

[0121] - 来自丙肝病毒的抗原[例如65]。

[0122] - 来自百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)的抗原,如来自百日咳博德特

氏菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA), 可以与百日咳杆菌粘附素 (pertactin) 和 / 或凝集原 2 和 3 [例如文献 66 和 67]。

[0123] - 白喉抗原, 如白喉类毒素 [例如文献 68 第 3 章], 如 CRM₁₉₇ 突变体 [例如文献 69]。

[0124] - 破伤风抗原, 如破伤风类毒素 [例如文献 68 第 4 章]。

[0125] - 来自流感嗜血杆菌 B 的糖抗原 [例如 58]。

[0126] - 来自淋病奈瑟氏球菌 (*N. gonorrhoeae*) 的抗原 [例如 46、47、48]。

[0127] - 来自肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 的抗原 [例如 70、71、72、73、74、75、76]。

[0128] - 来自沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 的抗原 [例如 77]。

[0129] - 来自牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的抗原 [例如 78]。

[0130] - 脊髓灰质炎抗原 [例如 79、80], 如 IPV 或 OPV。

[0131] - 狂犬病抗原 [例如 81], 如冻干灭活病毒 [例如 82, RabAvert™]。

[0132] - 麻疹、腮腺炎和 / 或风疹抗原 [例如文献 68 第 9、10 和 11 章]。

[0133] - 流感抗原 [例如文献 68 第 19 章], 如血凝素和 / 或神经氨酸酶表面蛋白质。

[0134] - 来自粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) 的抗原 [例如 83]。

[0135] - 来自无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 组链球菌) 的抗原 [例如 84、85]。

[0136] - 来自无乳链球菌 (B 组链球菌) 的糖抗原。

[0137] - 来自脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌) 的抗原 [例如 85、86、87]。

[0138] - 来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抗原 [例如 88]。

[0139] - 来自炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) [例如 89、90、91] 的抗原。

[0140] - 来自黄病毒家族 (黄病毒属) 病毒的抗原, 如来自黄热病病毒、日本脑炎病毒、四种登革热病毒亚型、蝉传脑炎病毒、西尼罗河病毒的抗原。

[0141] - 瘟疫病毒抗原, 如来自经典猪瘟疫病毒、牛病毒性腹泻病毒和 / 或羊边界病毒 (border disease virus)。

[0142] - 细小病毒抗原, 例如来自细小病毒 B19。

[0143] - 朊病毒蛋白质 (例如 CJD 朊病毒蛋白质)

[0144] - 淀粉样蛋白质, 如 β 肽 [92]

[0145] - 癌抗原, 如文献 93 表 1 或文献 94 表 3 和 4 所列。

[0146] 组合物可包括一种或多种上述其他抗原。

[0147] 可视必要将有毒蛋白抗原去毒 (例如通过化学和 / 或遗传方法将百日咳毒素去毒 [67])。

[0148] 当组合物包含白喉抗原时, 宜同时包含破伤风抗原和百日咳抗原。同样, 当组合物包含破伤风抗原时, 宜同时包含白喉抗原和百日咳抗原。同样, 当组合物包含百日咳抗原时, 宜同时包含白喉抗原和破伤风抗原。

[0149] 较好的是, 抗原吸附于铝盐。

[0150] 组合物中抗原各自的浓度通常至少 $1 \mu\text{g/ml}$ 。一般说来, 任一特定抗原的浓度都足

以引发针对该抗原的免疫反应。

[0151] 本发明组合中也可以用编码抗原的核酸代替蛋白抗原 [例如文献 95-103]。因此,本发明组合物的蛋白类成分可由编码这些蛋白质的核酸(优选 DNA,例如质粒 DNA)取代。

[0152] 本发明还提供增强哺乳动物抗体反应的方法,包括将本发明药物组合物给予哺乳动物,最好是人,例如成人或儿童,优选儿童。所述抗体反应最好是抗脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群感染的保护性反应。

[0153] 本发明还提供免疫哺乳动物的方法,包括将本发明药物组合物给予哺乳动物。

[0154] 本发明还提供用作药物的本发明修饰糖或缀合物。

[0155] 本发明还提供本发明修饰糖或缀合物用于制造预防或治疗荚膜细菌(capsulate bacteria)所致疾病的药物的用途。奈瑟氏球菌所致疾病包括例如脑膜炎、败血病和淋病。流感嗜血杆菌所致疾病包括中耳炎、支气管炎、肺炎、蜂窝织炎、心包炎和脑膜炎。肺炎球菌所致疾病包括脑膜炎、脓毒病和肺炎。因此优选预防和/或治疗细菌性脑膜炎。

[0156] 附图的概述

[0157] 图 1 显示由 CDI-活化糖开始合成糖-蛋白缀合物。

[0158] 图 2 显示脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群糖上的羟基与 CDI 的反应。

[0159] 图 3 显示比较免疫原性研究的结果。图表显示(A)到(E)五种不同糖免疫原的 GMT 值,表格列出了抗 A 血清群菌株 F8238 的血清杀菌效价。

[0160] 本发明实施方式

[0161] 免疫原性比较研究

[0162] 本发明提供改良型的糖-蛋白键。另外,本发明的糖-蛋白缀合物比其它类型糖-蛋白缀合物具有更强的免疫原性。

[0163] 为了进行比较,制备了含其它键的糖-蛋白缀合物。制备修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群多糖:对糖上的羟基进行 CDI-活化,接着用 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}_2\text{H}$ 淬灭 CDI 氨基甲酸酯中间体。用该修饰多糖通过 EDAC-激活的羧基与 CRM₁₉₇ 偶联制备糖-蛋白缀合物。这样,该多糖与 CRM₁₉₇ 通过接头基团 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 偶联。在本次比较研究中,制备糖-蛋白缀合物的这一方法称为“碳二亚胺法”。

[0164] 将碳二亚胺法制得的糖-蛋白缀合物与本发明的糖-蛋白缀合物比较。所以,制备修饰的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 血清群多糖:CDI-活化多糖上的羟基,接着用 tris-亲核体 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 淬灭 CDI 氨基甲酸酯中间体。高碘酸盐剪切暴露醛基后,通过还原氨基化将该修饰多糖与 CRM₁₉₇ 偶联(如图 1 所示)。这样,该多糖与 CRM₁₉₇ 通过接头基团 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$ 偶联。在本次比较研究中,制备糖-蛋白缀合物的这一方法称为“还原氨基化法”。

[0165] 在 Balb/c 小鼠中确定碳二亚胺法和还原氨基化法制备的缀合物(两种不同比例)的免疫原性。缀合物分 2 次给予(0 和 14 天),每次 $2\mu\text{g}/\text{剂}$ (以糖的质量计)。在第二天放血,测定 IgG 效价(GMT)。另外,评估抗 MenA 菌株 F8238 的血清杀菌抗体(SBA)效价。为了比较,还测试本发明的寡糖缀合物和非缀合多糖。

[0166] 结果示于图 3。寡糖缀合物(C)具有最佳 GMT 值,SBA 效价为 1024。相比之下,纯多糖(E)的 GMT 效价较低(与盐水对照相当),SBA 效价也较低(< 4)。用碳二亚胺法与

CRM197 缀合后 (D), 两效价都升高 (SBA :128)。用还原氨基化法缀合 CRM197 后 (E), GMT 和 SBA 效价都升高 (SBA :512-1024)。还原氨基化法所制缀合物的 SBA 效价与寡糖缀合物的效价相当。

[0167] 用豚鼠模型进行的比较 ELISA 确认了用 Balb/c 小鼠所得的结果。

[0168] 以上只是为描述本发明所举的例子, 本发明的范围和精神涵盖了对所举实施例的各种改动。

[0169] 文献 (本发明对其内容进行了全面参考)

[0170] [1] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)

[0171] [2] EP-A-0372501

[0172] [3] EP-A-0378881

[0173] [4] EP-A-0427347

[0174] [5] W093/17712

[0175] [6] W094/03208

[0176] [7] W098/58668

[0177] [8] EP-A-0471177

[0178] [9] W000/56360

[0179] [10] W091/01146

[0180] [11] W000/61761

[0181] [12] W001/72337

[0182] [13] Lei et al. (2000) Dev Biol (Basel) 103 :259-264

[0183] [14] W000/38711

[0184] [15] W099/42130

[0185] [16] W096/40242

[0186] [17] W000/56365

[0187] [18] W098/20734

[0188] [19] Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum 出版社, 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[0189] [20] W090/14837.

[0190] [21] W000/07621.

[0191] [22] W099/27960.

[0192] [23] 欧洲专利申请 0835318, 0735898 和 0761231.

[0193] [24] Krieg (2000) Vaccine 19 :618-622 ; Krieg (2001) Curr optn Mol Ther 2001 3 :15-24 ; W096/02555, W098/16247, W098/18810, W098/40100, W098/55495, W098/37919 和 W098/52581 等

[0194] [25] W099/52549.

[0195] [26] W001/21207.

[0196] [27] W001/21152.

[0197] [28] W000/62800.

[0198] [29] W000/23105.

- [0199] [30]W099/11241.
- [0200] [31]W098/57659.
- [0201] [32]Del Giudice et al. (1998)Molecular Aspects of Medicine,vol.19,No.1.
- [0202] [33]Johnson et al. (1999)Bioorg Med Cheem Lett 9 :2273-2278.
- [0203] [34]W000/50078.
- [0204] [35]Singh et al. (2001)J. Cont. Rele. 70 :267-276.
- [0205] [36]Covacci& Rappuoli (2000)J. Exp. Med. 19 :587-592.
- [0206] [37]W093/18150.
- [0207] [38]Covacci et al. (1993)proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5791-5795.
- [0208] [39]Tunimuru et al. (1994)Infect. Immun. 61 :1799-1809.
- [0209] [40]Marchetti et al. (1998)Vaccine 16 :33-37.
- [0210] [41]Telford et al. (1994)J. Exp. Med. 179 :1653-1658.
- [0211] [42]Evans et al. (1995)Gene 153 :123-127.
- [0212] [43]W096/01272&W096/01273,尤其是 SEQ ID NO :6.
- [0213] [44]W097/25429.
- [0214] [45]W098/04702.
- [0215] [46]W099/24578.
- [0216] [47]W099/36544.
- [0217] [48]W099/57280.
- [0218] [49]W000/22430.
- [0219] [50]Tettelin et al. (2000)Science 287 :1809-1815.
- [0220] [51]W096/29412.
- [0221] [52]Pizza et al. (2000)Science 287 :1816-1820.
- [0222] [53]W001/52885.
- [0223] [54]Bjune et al. (1991)Lancet 338(8775) :1093-1096.
- [0224] [55]Fukasawa et al. (1999)Vaccine 17 :2951-2958.
- [0225] [56]Rosenqvist et al. (1998)Dev. Bio. Stand. 92 :323-333.
- [0226] [57]Costantino et al (1992)Vaccine 10 :691-698.
- [0227] [58]Costantino et al. (1999)Vaccine 17 :1251-1263.
- [0228] [59]Watson (2000)Pediatr Infect Dis J 19 :331-332.
- [0229] [60]Rubin (2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-28 5, v.
- [0230] [61]Jedrzejewski (2001)Microbial Mol Biol Rev 65 :187-207.
- [0231] [62]Bell (2000)Pediatr Infect Dis J 19 :1187-1188.
- [0232] [63]Iwarson (1995)APMIS 103 :321-326.
- [0233] [64]Gerlich et al. (1990)Vaccine 8 增刊 :S63-68&79-80.
- [0234] [65]Hsu et al. (1999)Clin Liver Dis 3 :901-915.
- [0235] [66]Gustafsson et al. (1996)N Engl. J. Med. 334 :349-355.
- [0236] [67]Rappuoli et al. (1991)TIBTECH 9 :232-238.
- [0237] [68]Vaccines (1988)eds. Plotkin&Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.

- [0238] [69]Del Guidice et al. (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70.
- [0239] [70]W002/02606.
- [0240] [71]Kalman et al. (1999)Nature Genetics 21 :385-389.
- [0241] [72]Read et al. (2000)Nucleic Acids Res 28 :1397-406.
- [0242] [73]Shirai et al. (2000)J. Infect. Dis. 181(增 3) :S524-S527.
- [0243] [74]W099/27105.
- [0244] [75]W000/27994.
- [0245] [76]W000/37494.
- [0246] [77]W099/28475.
- [0247] [78]Ross et al. (2001)Vaccine 19 :4135-4142.
- [0248] [79]Sutter et al. (2000)Pediatr Clin North Am 47 :287-308.
- [0249] [80]Zimmerman&Spann(1999)Am Fam Physician 59 :113-118,125-126.
- [0250] [81]Dreesen(1997)Vaccine 15 增刊 :S2-6.
- [0251] [82]MMWR Morb MortalWkly Rep 1998 年 1 月 16 日 ;47(1) :12,19.
- [0252] [83]McMichael(2000)Vaccine 19 增 1 :S101-107.
- [0253] [84]Schuchat(1999)Lancet 353(9146) :5 1-6.
- [0254] [85]W002/34771.
- [0255] [86]Dale(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :227-43, viii.
- [0256] [87]Ferretti et al. (2001)PNAS USA 98 :4658-4663.
- [0257] [88]Kuroda et al. (2001)Lancet 357(9264) :1225-1240 ;另见 ps. 1218-1219.
- [0258] [89]J Toxicol Clin Toxicol(2001)39 :85-100.
- [0259] [90]Demicheli et al. (1998)Vaccine 16 :880-884.
- [0260] [91]Stepanov et al. (1996)J Biotechnol 44 :155-160.
- [0261] [92]Ingram(2001)Trends Neurosci 24 :305-307.
- [0262] [93]Rosenberg(2001)Nature 411 :380-384.
- [0263] [94]Moingeon(2001)Vaccine 19 :1305-1326.
- [0264] [95]Robinson&Torres(1997)Seminars in Immunology 9 :271-283.
- [0265] [96]Donnelly et al. (1997)Annu Rev Immunol 15 :617-648.
- [0266] [97]Scott-Taylor&Dalgleish(2000)Expert Opin Investig Drugs 9 :471-480.
- [0267] [98]Apostolopoulos&Plebanski(2000)Curr Opin Mol Ther 2 :441-447.
- [0268] [99]Han(1999)Curr Opin Mol Ther 1 :116-120.
- [0269] [100]Dubensky et al. (2000)Mol Med 6 :723-732.
- [0270] [101]Robinson&Pertmer(2000)Adv Virus Res 55 :1-74.
- [0271] [102]Donnelly et al. (2000)Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2) : S190-193.
- [0272] [103]Davis(1999)Mt. Sinai. J. Med. 66 :84-90.

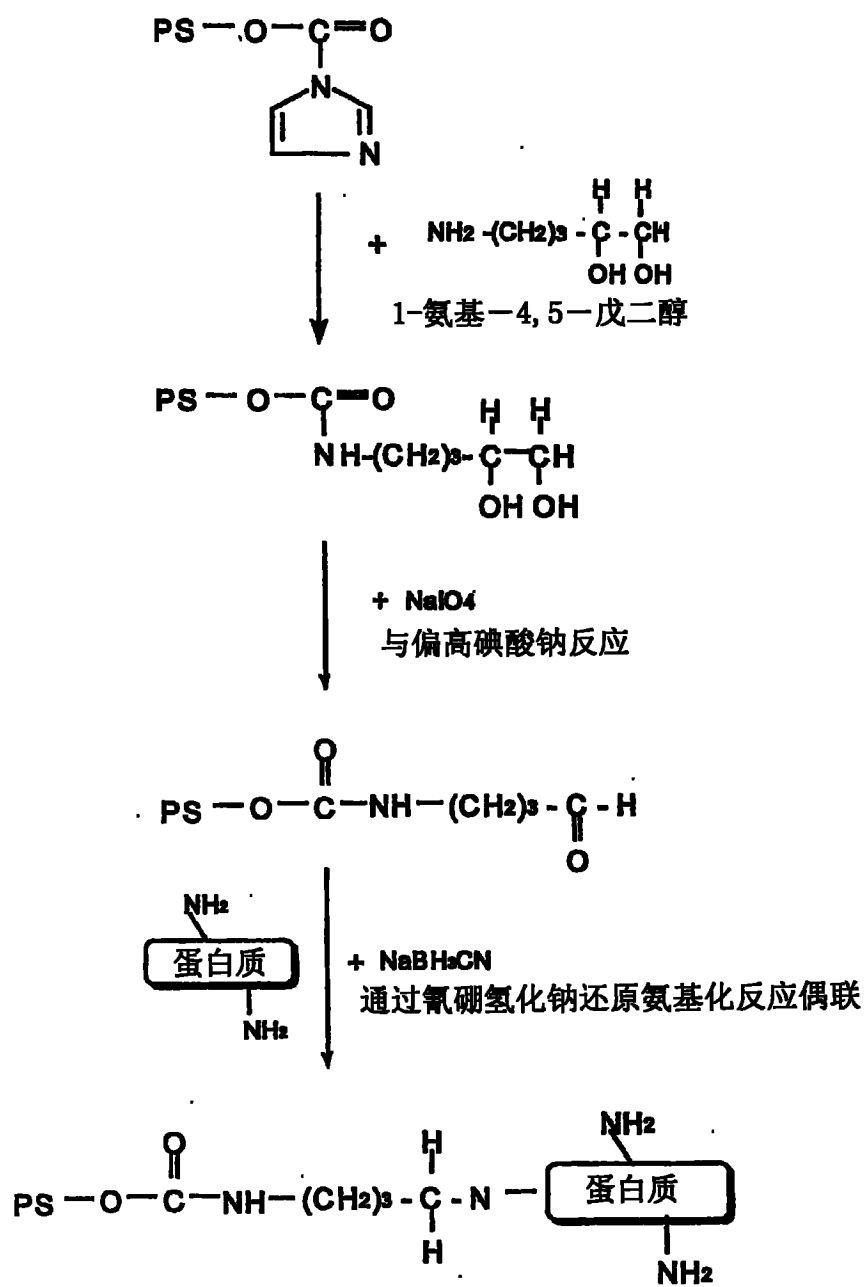


图 1

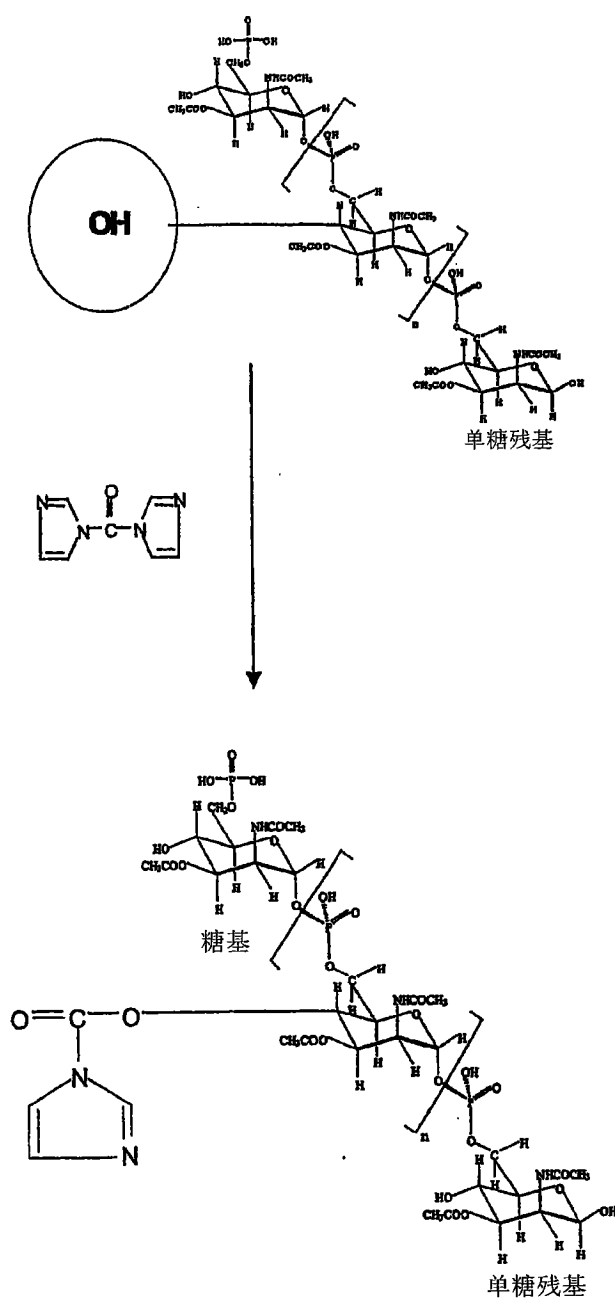


图 2

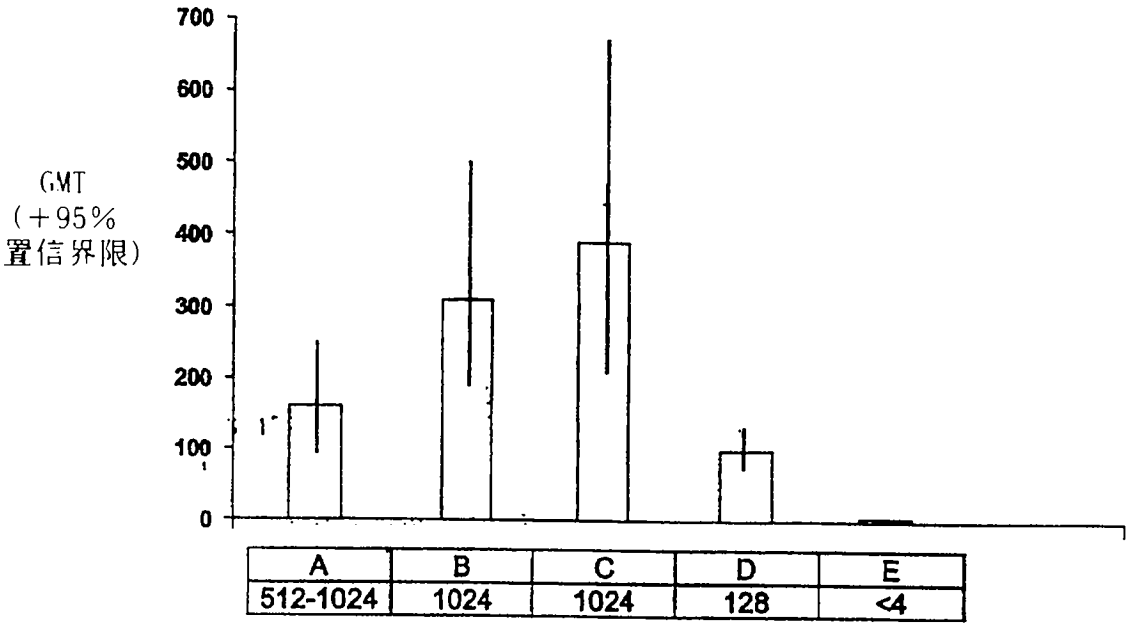


图 3