



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101784282 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 200880104210.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.24

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

0712420.9 2007.06.26 GB

0712435.7 2007.06.26 GB

0712428.2 2007.06.26 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/057997 2008.06.24

(87) PCT申请的公布数据

W02009/000824 EN 2008.12.31

(71) 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 R·L·比曼斯 P·V·赫尔曼

J·普尔曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 李连涛

权利要求书 7 页 说明书 72 页 序列表 2 页

附图 11 页

(54) 发明名称

包含肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的疫苗

(57) 摘要

本发明披露了包含来自血清型 19A 和 19F 的肺炎链球菌荚膜糖缀合物 (capsular saccharide conjugates) 的免疫原性组合物, 其中 19A 与第一细菌类毒素缀合, 19F 与第二细菌类毒素缀合。本发明还描述了疫苗、制备疫苗的方法以及该疫苗的用途。

1. 包含至少 7 种肺炎链球菌荚膜糖缀合物的免疫原性组合物,所述肺炎链球菌荚膜糖缀合物包括来自血清型 19A 和 19F 的荚膜糖缀合物,其中 19A 与第一细菌类毒素缀合,19F 与第二细菌类毒素缀合,而 2-9 种肺炎链球菌荚膜糖与蛋白 D 缀合。

2. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物,其中所述第一细菌类毒素是不同于所述第二细菌类毒素的蛋白。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫原性组合物,其中所述第一细菌类毒素选自破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、百日咳类毒素、细菌溶细胞素以及肺炎球菌溶血素。

4. 如权利要求 1-3 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述第二细菌类毒素选自破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、百日咳类毒素、细菌溶细胞素和肺炎球菌溶血素。

5. 如权利要求 1-4 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述第一细菌类毒素为肺炎球菌溶血素。

6. 如权利要求 1-5 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述第二细菌类毒素为白喉类毒素。

7. 如权利要求 1-6 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含肺炎链球菌血清型 4、6B、9V、14、18C 和 23F 荚膜糖缀合物。

8. 如权利要求 1-7 所述的免疫原性组合物,其包含肺炎链球菌血清型 1、5 和 7F 荚膜糖缀合物。

9. 如权利要求 1-8 所述的免疫原性组合物,其包含肺炎链球菌血清型 22F 荚膜糖缀合物。

10. 如权利要求 1-9 所述的免疫原性组合物,其包含肺炎链球菌荚膜糖 3 缀合物。

11. 如权利要求 1-10 所述的免疫原性组合物,其包含肺炎链球菌荚膜糖 6A 缀合物。

12. 如权利要求 1-11 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述荚膜糖中的第 3、4 或 5 型与蛋白 D 缀合。

13. 如权利要求 7-12 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 4 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

14. 如权利要求 8-13 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 5 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

15. 如权利要求 8-14 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 7F 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

16. 如权利要求 7-15 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 9V 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

17. 如权利要求 7-16 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 14 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

18. 如权利要求 9-17 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 22F 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

19. 如权利要求 7-18 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述血清型 23F 荚膜糖与蛋白 D 缀合。

20. 如权利要求 1-19 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述荚膜糖中的少数与蛋白 D 缀合。

21. 如权利要求 1-20 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 3 种不同的载体蛋白分别与至少 3 种不同的肺炎链球菌荚膜糖血清型缀合。

22. 如权利要求 1-21 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 4 种不同的载体蛋白分别与至少 4 种不同的肺炎链球菌荚膜糖血清型缀合。

23. 如权利要求 1-22 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 5 种不同的载体蛋白分别与至少 5 种不同的肺炎链球菌荚膜糖血清型缀合。

24. 如权利要求 1-22 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 6 种不同的载体蛋白分别与至少 6 种不同的肺炎链球菌荚膜糖血清型缀合。

25. 如权利要求 21-24 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含了选自如下的 3、4、5 或 6 种载体蛋白:破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM197、肺炎球菌溶血素、蛋白 D 和 PhtD 或其融合蛋白。

26. 如权利要求 1-25 所述的免疫原性组合物,其包含与破伤风类毒素缀合的肺炎链球菌荚膜糖 18C。

27. 如权利要求 1-26 所述的免疫原性组合物,其包含与肺炎球菌溶血素缀合的肺炎链球菌荚膜糖 19A。

28. 如权利要求 1-27 所述的免疫原性组合物,其包含与 PhtD 或其融合蛋白缀合的肺炎链球菌荚膜糖 22F。

29. 如权利要求 1-28 所述的免疫原性组合物,其包含与肺炎球菌溶血素或流感嗜血杆菌蛋白,可选的蛋白 D 或 PhtD 或其融合蛋白缀合的肺炎链球菌荚膜糖 6A。

30. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中 19A 荚膜糖直接与所述载体蛋白缀合。

31. 如权利要求 1-29 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 19A 荚膜糖通过接头与所述载体蛋白缀合。

32. 如权利要求 31 所述的免疫原性组合物,其中所述接头为 ADH。

33. 如权利要求 31 或 32 所述的免疫原性组合物,其中所述接头通过碳二亚胺化学,可选地采用 EDAC 与所述载体蛋白连接。

34. 如权利要求 30-33 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述 19A 糖与所述载体蛋白缀合或用 CDAP 化学与接头缀合。

35. 如权利要求 1-30 任意一项所述的免疫原性组合物,其中载体蛋白与 19A 糖的比例介于 5 : 1 和 1 : 5、4 : 1 和 1 : 1 或 3.5 : 1 和 2.5 : 1(w/w) 之间。

36. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中 19F 荚膜糖直接与所述载体蛋白缀合。

37. 如权利要求 1-35 任意一项所述的免疫原性组合物,其中 19F 荚膜糖通过接头与所述载体蛋白缀合。

38. 如权利要求 37 所述的免疫原性组合物,其中所述接头为 ADH。

39. 如权利要求 37 或 38 所述的免疫原性组合物,其中所述接头通过碳二亚胺化学,可选地采用 EDAC 与所述载体蛋白连接。

40. 如权利要求 36-39 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述 19F 糖与所述载体蛋白缀合或通过 CDAP 化学与所述接头缀合。

41. 如权利要求 1-40 任意一项所述的免疫原性组合物,其中载体蛋白与 19F 糖的比例介于 5 : 1 和 1 : 5、4 : 1 和 1 : 1 或 2 : 1 和 1 : 1(w/w) 之间。

42. 如权利要求 1-41 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含与所述载体蛋白直接缀合的 22F 荚膜糖。

43. 如权利要求 1-41 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含与所述载体蛋白通过接头缀合的 22F 荚膜糖。

44. 如权利要求 43 所述的免疫原性组合物,其中所述接头为 ADH。

45. 如权利要求 43 或 44 所述的免疫原性组合物,其中所述接头通过碳二亚胺化学,可选地采用 EDAC 与所述载体蛋白连接。

46. 如权利要求 42-45 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述 22F 糖与所述载体蛋白缀合或使用 CDAP 化学与所述接头缀合。

47. 如权利要求 1-46 任意一项所述的免疫原性组合物,其中载体蛋白与 22F 糖的比例介于 5 : 1 和 1 : 5、4 : 1 和 1 : 1 或 2 : 1 和 1 : 1(w/w) 之间。

48. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中 19A 糖的平均大小在 100kDa 以上。

49. 如权利要求 48 所述的免疫原性组合物,其中 19A 糖的平均大小介于 110-700kDa、110-300、120-200、130-180 或 140-160kDa 之间。

50. 如权利要求 48 或 49 所述的免疫原性组合物,其中所述 19A 糖为天然多糖或以不超过 x5 的因子进行大小处理。

51. 如权利要求 48、49 或 50 所述的免疫原性组合物,其中所述 19A 糖已通过微射流进行大小处理。

52. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中所述 19A 糖缀合物的剂量为介于 1-10 μ g、2-8 μ g 或 3-7 μ g 的糖之间。

53. 如权利要求 52 所述的免疫原性组合物,其中所述 19A 糖缀合物的剂量为 5 μ g 的糖。

54. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含 22F 糖缀合物,其中所述 22F 糖的平均大小在 100kDa 以上。

55. 如权利要求 54 所述的免疫原性组合物,其中 22F 糖的平均大小介于 110-700kDa、110-300、120-200、130-180 或 150-170kDa 之间。

56. 如权利要求 54 或 55 所述的免疫原性组合物,其中 22F 糖为天然多糖或以不超过 x5 的因子进行大小处理。

57. 如权利要求 54、55 或 56 所述的免疫原性组合物,其中 22F 糖已通过微射流进行大小处理。

58. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含 22F 糖缀合物,其中所述 22F 糖缀合物的剂量为介于 1-10 μ g、2-8 μ g 或 3-7 μ g 的糖之间。

59. 如权利要求 58 所述的免疫原性组合物,其中 22F 糖缀合物的剂量为 5 μ g 的糖。

60. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中所述糖的平均大小在 50kDa 以上。

61. 如权利要求 60 所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 300 和 400kDa 之间

的血清型 1。

62. 如权利要求 60 和 61 所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 75 和 125kDa 之间的血清型 4。

63. 如权利要求 60、61 和 62 所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 350 和 450kDa 之间的血清型 5。

64. 如权利要求 60-63 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 1000 和 1400kDa 之间的血清型 6B。

65. 如权利要求 60-64 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 200 和 300kDa 之间的血清型 7F。

66. 如权利要求 60-65 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 250 和 300kDa 之间的血清型 9V。

67. 如权利要求 60-66 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 200 和 250kDa 之间的血清型 14。

68. 如权利要求 60-67 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含平均糖大小介于 900 和 1000kDa 之间的血清型 23F。

69. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含作为天然糖的血清型 5、6B 和 23F(以及可选的 6A)。

70. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其中所述荚膜糖缀合物的剂量为每种缀合物介于 1-10 μ g、1-5 μ g 或 1-3 μ g 的糖之间。

71. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含每种缀合物的剂量为 3 μ g 糖的血清型 4、18C 和 19F(以及可选的 19A 和 22F)。

72. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含每种缀合物的剂量为 1 μ g 糖的血清型 1、5、6B、7F、9V、14 和 23F(以及可选的 6A 和 / 或 3)。

73. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其进一步包含血清型不同于缀合的血清型的未缀合肺炎链球菌糖,使得缀合和未缀合糖血清型的数量少于或等于 23。

74. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其进一步包含一种或多种未缀合或缀合的肺炎链球菌蛋白。

75. 如权利要求 74 所述的免疫原性组合物,其包含一种或多种未缀合的肺炎链球菌蛋白。

76. 如权利要求 74 或 75 所述的免疫原性组合物,其中所述一种或多种肺炎链球菌蛋白选自聚组氨酸三联体家族 (PhtX)、胆碱结合蛋白家族 (CbpX)、截短 CbpX、LytX 家族、截短 LytX、截短 CbpX- 截短 LytX 嵌合蛋白、解毒肺炎球菌溶血素 (Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125 和 Sp133。

77. 如权利要求 74、75 或 76 所述的免疫原性组合物,其包含肺炎球菌溶血素。

78. 如权利要求 74-77 任意一项所述的免疫原性组合物,其包含 PhtX 蛋白。

79. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含作为游离或载体蛋白的肺炎球菌溶血素。

80. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其包含作为游离或载体蛋白的 PhtX 蛋白。

81. 如权利要求 80 所述的免疫原性组合物,其中所述 PhtX 蛋白为 PhtD,或者,PhtBD 或 PhtDE 融合蛋白。

82. 如前述任意一项权利要求所述的免疫原性组合物,其进一步包含佐剂。

83. 如权利要求 82 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含脂质体载体。

84. 如权利要求 83 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.1-10mg、0.2-7、0.3-5、0.4-2 或 0.5-1mg(如 0.4-0.6、0.9-1.1、0.5 或 1mg)磷脂(例如 DOPC)。

85. 如权利要求 83 或 84 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3 或 0.125-0.25mg(如 0.2-0.3、0.1-0.15、0.25 或 0.125mg)固醇(例如胆固醇)。

86. 如权利要求 83-85 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)5-60、10-50 或 20-30 μ g(如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g)脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

87. 如权利要求 83-86 任意一项所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)5-60、10-50 或 20-30 μ g(如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g)皂甙(例如 QS21)。

88. 如权利要求 82 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含水包油乳液。

89. 如权利要求 88 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.5-15、1-13、2-11、4-8 或 5-6mg(如 2-3、5-6 或 10-11mg)可代谢的油(例如角鲨烯)。

90. 如权利要求 88 或 89 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.1-10、0.3-8、0.6-6、0.9-5、1-4 或 2-3mg(如 0.9-1.1、2-3 或 4-5mg)乳化剂(例如 Tween 80)。

91. 如权利要求 88-90 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.5-20、1-15、2-12、4-10、5-7mg(如 11-13、5-6 或 2-3mg)母育酚(例如 α 生育酚)。

92. 如权利要求 88-91 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)5-60、10-50 或 20-30 μ g(如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g)脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

93. 如权利要求 88-92 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3 或 0.125-0.25mg(如 0.2-0.3、0.1-0.15、0.25 或 0.125mg)固醇(例如胆固醇)。

94. 如权利要求 88-93 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)5-60、10-50 或 20-30 μ g(如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g)皂甙(例如 QS21)。

95. 如权利要求 82 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含金属盐和脂质 A 衍生物。

96. 如权利要求 95 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)100-750、200-500 或 300-400 μ g 磷酸铝形式的 Al₁。

97. 如权利要求 95 或 96 所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含(每 0.5mL 剂量)5-60、10-50 或 20-30 μ g(如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g)脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

98. 如权利要求 1-97 任意一项所述的免疫原性组合物,其至少或恰好包含与 PhtD 或其融合蛋白缀合的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 13 种肺炎链球菌荚膜糖。

99. 如权利要求 1-97 任意一项所述的免疫原性组合物,其至少或恰好包含与肺炎球菌溶血素缀合的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 13 种肺炎链球菌荚膜糖。

100. 疫苗试剂盒,其包含如权利要求 1-97 任意一项所述的免疫原性组合物,并进一步包含用于同时或依次施用的如权利要求 83-99 任意一项所定义的佐剂。

101. 疫苗,其包含如权利要求 1-99 任意一项所述的免疫原性组合物及药学上可接受的赋形剂。

102. 制备如权利要求 101 所述的疫苗的方法,其包括将如权利要求 1-99 任意一项所述的免疫原性组合物与药学上可接受的赋形剂相混合的步骤。

103. 对人类宿主进行免疫以对抗肺炎链球菌感染引起的疾病的方法,其包括向所述宿主施用免疫保护剂量的如权利要求 1-99 任意一项所述的组合物或如权利要求 101 所述的疫苗。

104. 如权利要求 103 所述的方法,其中所述人类宿主为老年人,且所述疾病是肺炎或侵袭性肺炎球菌性疾病 (IPD) 之一或两者。

105. 如权利要求 103 或 104 所述的方法,其中所述人类宿主为老年人,且所述疾病是慢性阻塞性肺病 (COPD) 的恶化。

106. 如权利要求 103 所述的方法,其中所述人类宿主为婴儿,且所述疾病为中耳炎。

107. 如权利要求 103 或 106 所述的方法,其中所述人类宿主为婴儿,且所述疾病为脑膜炎和 / 或菌血症。

108. 如权利要求 103、106 或 107 所述的方法,其中所述人类宿主为婴儿,且所述疾病为肺炎和 / 或结膜炎。

109. 如权利要求 1-99 所述的免疫原性组合物或如权利要求 101 所述的疫苗,其用于预防治疗由肺炎链球菌感染引起的疾病。

110. 如权利要求 1-99 所述的免疫原性组合物或疫苗或如权利要求 101 所述的疫苗在生产用于治疗或预防由肺炎链球菌感染引起的疾病的药物中的用途。

111. 如权利要求 110 所述的用途,其中所述疾病是老年人的肺炎或侵袭性肺炎球菌性疾病 (IPD) 之一或两者。

112. 如权利要求 110 或 111 所述的用途,其中所述疾病是老年人慢性阻塞性肺病 (COPD) 的恶化。

113. 如权利要求 110 所述的用途,其中所述疾病是人类婴儿的中耳炎。

114. 如权利要求 110 或 113 所述的用途,其中所述疾病是人类婴儿的脑膜炎和 / 或菌血症。

115. 如权利要求 110、113 或 114 所述的用途,其中所述疾病是人类婴儿的肺炎和 / 或结膜炎。

116. 在婴儿体内引发对抗中耳炎的保护性免疫应答的方法,其包括作为单独或组合成分相继或同时施用 (i) 如权利要求 1-99 任意一项所述的免疫原性组合物或疫苗和 (ii) 来自流感嗜血杆菌的蛋白 D,其中所述蛋白 D 可以是游离的和 / 或缀合的。

117. 通过施用任意前述权利要求的免疫原性组合物或疫苗在婴儿体内引发对抗肺炎链球菌的保护性免疫应答的方法。

118. 引发老年患者对抗肺炎链球菌的保护性免疫应答的方法,其通过相继或同时联

合施用如下成分:(i) 如前述任意权利要求所述的免疫原性组合物或疫苗,(ii) 选自 PhtX 家族和肺炎球菌溶血素的一种或多种肺炎链球菌表面蛋白。

119. 如权利要求 1-99 所述的免疫原性组合物或权利要求 101 所述的疫苗,其包含由至少所有如下血清型衍生的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F,其中在人类疫苗接种者中针对一种或多种疫苗成分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

120. 如权利要求 119 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 4 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

121. 如权利要求 119 或 120 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 6B 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

122. 如权利要求 119-121 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 9V 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

123. 如权利要求 119-122 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 14 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

124. 如权利要求 119-123 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 18C 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

125. 如权利要求 119-124 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 19F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

126. 如权利要求 119-125 所述的免疫原性组合物,其中在人类疫苗接种者中针对血清型 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的 GMC 抗体效价。

127. 如权利要求 119-126 所述的免疫原性组合物,其包含血清型 3 糖缀合物。

128. 如权利要求 119-127 所述的免疫原性组合物,其包含血清型 6A 糖缀合物。

129. 如权利要求 119-128 所述的免疫原性组合物,其包含血清型 19A 糖缀合物。

130. 如权利要求 119-129 所述的免疫原性组合物,其包含血清型 22F 糖缀合物。

131. 如权利要求 119-130 所述的免疫原性组合物,其包含结晶填充剂,任选甘露糖醇。

132. 如权利要求 131 所述的免疫原性组合物,其含糖,任选蔗糖。

133. 免疫原性组合物,其包含至少四种肺炎链球菌荚膜糖缀合物,其含有来自不同肺炎链球菌血清型的糖,其中至少一种糖缀合 PhtD 或其融合蛋白,且所述免疫原性组合物能够引发针对 PhtD 的有效免疫应答。

包含肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及改良的肺炎链球菌疫苗。

背景技术

[0002] 2岁以下的儿童不能形成对大多数多糖疫苗的免疫应答,因此需要通过蛋白载体化学缀合使多糖具有免疫原性。将多糖(T非依赖性抗原)与蛋白(T依赖性抗原)偶联,使该多糖具有包括同种型转换、亲和成熟和记忆诱导的T依赖性特性。

[0003] 然而,在重复施用多糖-蛋白缀合物或多糖-蛋白缀合物的组合以形成多价疫苗时可能存在问题。例如,已报道了使用破伤风类毒素(TT)作为蛋白载体的流感嗜血杆菌b型多糖(PRP)疫苗在剂量范围内进行测试,其根据标准婴儿方案同时以(游离)TT和肺炎球菌多糖-TT缀合物疫苗进行免疫。随着肺炎球菌疫苗的剂量上升,对Hib缀合物疫苗的多糖部分的免疫应答下降,提示多糖的免疫干扰,这可能是由于相同载体蛋白的使用(Dagan等人, *Infect Immun.* (1998); 66:2093-2098)。

[0004] 载体蛋白剂量对于针对蛋白本身的体液应答的效应也被证明具有多面性。据报道,在人类婴儿体内四价破伤风类毒素缀合物剂量的上升导致对破伤风载体的应答的下降(Dagan等人,见上文)。对组合疫苗这些效应的经典分析已被描述为载体诱导的表位抑制,这尚未被完全理解,但被认为是载体蛋白的过量所导致(Fattom, *Vaccine* 17:126(1999))。这表现为导致针对载体蛋白的B-细胞和针对多糖的B-细胞对Th-细胞的竞争。如果针对载体蛋白的B-细胞占优,则没有足够的Th-细胞可对特异性针对多糖的B-细胞提供必要的帮助。然而,观察到的免疫效应并不一致,在某些情况下载体蛋白的总量提高了免疫应答,在其它情况下则减少了免疫应答。

[0005] 因此,将多个多糖缀合物组合为单个、有效的疫苗制剂存在着技术难题。

[0006] 肺炎链球菌是一种革兰氏阳性细菌,其造成了相当大的致病率和死亡率(特别是在青年和老年人中),引起了侵袭性疾病如肺炎、菌血症和脑膜炎,以及与移生有关的疾病,如急性中耳炎。据估计在美国60岁以上人群中肺炎球菌肺炎的发病率为每100,000人中3至8人。在20%的情况下其导致了菌血症,以及其它表现如脑膜炎,即使接受抗菌治疗,其死亡率仍然接近30%。

[0007] 肺炎球菌被化学连接的多糖包封,该多糖带来了血清型特异性。肺炎球菌具有90种已知的血清型,而荚膜是肺炎球菌主要的毒性决定因子,因为荚膜不仅针对补体保护该细菌的内部表面,其本身免疫原性也较差。多糖是T-非依赖性抗原,且不能在MHC分子上加工或呈现以与T-细胞相互作用。然而,它们可以通过替代性的机制刺激免疫系统,该机制包括B细胞上表面受体的交联。

[0008] 在多个实验中显示,针对侵袭性肺炎双球菌疾病的保护很大程度上与特异性针对该荚膜的抗体相关,所述保护具有血清型特异性。

[0009] 肺炎链球菌是婴儿和幼儿的侵袭性细菌性疾病和中耳炎最常见的诱因。同样地,老年人对肺炎球菌疫苗具有较差的应答[Roghmann等人,(1987), *J. Gerontol.* 42:

265-270], 因此增加了在该人群中细菌性肺炎的发病率 [Vergheese 和 Berk, (1983) Medicine(Baltimore)62 :271-285]。

[0010] 因此, 本发明的一个目标在于开发一种改良的多重血清型肺炎链球菌多糖缀合物疫苗的制剂。

[0011] 附图简述

[0012] 图 1 在老年恒河猴中的缀合物免疫原性 (II 期后的抗 -PS IgG 水平)

[0013] 柱形图显示了在老年恒河猴中 11 价缀合物的免疫原性。浅色条棒表示用在磷酸铝佐剂中的 11 价缀合物两次接种后的 GMC。深色条棒表示用在佐剂 C 中的 11 价缀合物两次接种后的 GMC。

[0014] 图 2 在老年恒河猴中的缀合物免疫原性 (II 期后抗 -PS3 记忆 B 细胞频率)

[0015] 柱形图显示了在用佐剂 C 或磷酸铝佐剂中的 11 价缀合物接种后针对 PS3 的记忆 B 细胞。

[0016] 图 3 在 Balb/c 小鼠中 PS19F 的免疫原性 (III 期后 IgG 水平)

[0017] 柱形图显示了 4 价纯多糖和 4 价 dPly 缀合物在 Balb/C 小鼠中的抗多糖 19F 免疫原性。

[0018] 图 4 在 Balb/c 小鼠中 PS22F 的免疫原性 (III 期后 IgG 水平)

[0019] 柱形图显示了 4 价纯多糖和 4 价 PhtD 缀合物在 Balb/C 小鼠中的抗多糖 22F 免疫原性。

[0020] 图 5 血清抗 -PS IgG 抗体水平

[0021] 柱形图显示了在 Balb/c 小鼠中的抗 -22F IgG 应答。

[0022] 图 6 在 Balb/c 小鼠中的抗 -22F 调理 - 吞噬效价

[0023] 柱形图显示了在 Balb/c 小鼠中的抗 -22F 调理 - 吞噬效价。

[0024] 图 7 在幼年 C57BI 小鼠 III 期后以新型佐剂或 AlPO4 免疫诱导的 IgG 应答的比较

[0025] 柱形图比较了在幼年 C57BI 小鼠中以与不同佐剂制成的 13 价缀合物疫苗免疫后的 IgG 应答。所述柱与右侧栏所示的顺序相同。

[0026] 图 8 PhtD 和 dPly 蛋白组合在恒河猴中针对 19F 型肺部移生的保护效力

[0027] 柱形图显示不同疫苗组合在猴肺炎模型中的保护效力。“死亡”组包括将死亡但施用了抗生素处理的猴。

[0028] 图 9 血清抗 -PhtD IgG 应答

[0029] 柱形图显示在 Balb/c 小鼠中以 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD 缀合物免疫后的抗 PhtD IgG 应答。

[0030] 图 10 在小鼠中针对 4 型肺炎球菌攻击的保护

[0031] 在小鼠中以 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD 免疫后针对 4 型肺炎球菌攻击的保护。

[0032] 图 11 在以 PhtD 免疫和以针对血清型 3 多糖的抗体被动免疫后针对肺炎链球菌菌株 3/43 的致命攻击的保护。

[0033] 图 12 在以 PhtD 免疫和以针对血清型 1 多糖的抗体被动免疫后针对肺炎链球菌菌株 1/57 的致命攻击的保护。

[0034] 图 13 在以多价缀合物疫苗免疫的老年 C57 黑色小鼠中针对血清型 19A 的调理吞噬效价。

[0035] 图 14 在以多价缀合物疫苗免疫的老年 C57 黑色小鼠中针对血清型 22F 的调理吞噬效价。

[0036] 图 15 在以多价缀合物疫苗免疫的 Balb/c 小鼠中针对血清型 19A 的调理吞噬效价。

[0037] 柱 2-11V+19A-dPly gmbS+22F-PhtD 0.1 μ g/50 μ l; 柱 4-11V+19A-dPly gmbS+22F-PhtD-E 0.1 μ g/50 μ l; 柱 62-11V+19A-DT+22F-PD0.1 μ g/50 μ l

[0038] 图 16 在以多价缀合物疫苗免疫的 Balb/c 小鼠中针对血清型 22F 的调理吞噬效价。

[0039] 图 17 在以多价缀合物疫苗免疫的豚鼠中针对血清型 19A 的调理吞噬效价。

[0040] 图 18 在以多价缀合物疫苗免疫的豚鼠中针对血清型 22F 的调理吞噬效价。

[0041] 图 19 在以多价缀合物疫苗免疫的 Balb/c 小鼠中针对血清型 19A 的调理吞噬效价。

[0042] 图 20 在以多价缀合物疫苗免疫的 Balb/c 小鼠中针对血清型 22F 的调理吞噬效价。

[0043] 图 21 在以多价缀合物疫苗免疫的 OF1 小鼠中针对血清型 19A 的调理吞噬效价。

[0044] 图 22 在以多价缀合物疫苗免疫的 OF1 小鼠中针对血清型 22F 的调理吞噬效价。

[0045] 发明详述

[0046] 本发明提供了包含来自血清型 19A 和 19F 的肺炎链球菌荚膜糖缀合物的免疫原性组合物,其中 19A 与作为第一细菌类毒素的载体蛋白缀合,19F 与作为第二细菌类毒素的载体蛋白缀合,且该肺炎链球菌荚膜糖中的 2-8 种与蛋白 D 缀合。

[0047] 术语荚膜糖包括荚膜多糖和由荚膜多糖衍生的寡糖。寡糖包含至少 4 个糖残基。术语缀合物和缀合的涉及与载体蛋白共价结合的荚膜糖。

[0048] 针对本发明的目的,“免疫人类宿主抗 COPD 的恶化”或“治疗或预防 COPD 的恶化”或“减少 COPD 的恶化的严重性”指降低 COPD 的恶化的发生率或比例(例如减少 0.1、0.5、1、2、5、10、20%或更多的比例),例如在以本发明的组合物或疫苗免疫的患者组中。

[0049] 术语细菌类毒素包括通过遗传突变、通过化学处理或通过缀合失活的细菌毒素。合适的细菌类毒素包括破伤风类毒素、白喉类毒素、百日咳类毒素、细菌溶细胞素或肺炎球菌溶血素。肺炎球菌溶血素(Ply)的突变已被描述减弱了肺炎球菌溶血素的毒性(WO 90/06951, WO 99/03884)。类似地,已知降低毒性的白喉毒素遗传突变(参见下文)。白喉毒素的遗传解毒类似物包括 CRM197 和在 US 4,709,017、US 5,843,711、US 5,601,827 和 US 5,917,017 中描述的其它突变体。CRM197 是白喉毒素的非毒性形式,但与白喉毒素在免疫学上无法区分。CRM197 可由通过产毒素的棒状杆菌噬菌体 b 的亚硝基胍突变生成的无产毒相 β 197tox 感染的白喉杆菌生成(Uchida 等人.Nature NewBiology(1971)233; 8-11)。CRM197 蛋白与白喉毒素具有相同的分子量,但因在结构基因中具有单个碱基变化而与之不同。这导致在 52 号位上由甘氨酸转变为谷氨酰胺的变化,使得片段 A 不能结合 NAD,从而不具毒性(Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46 ;69-94, Rappuoli Applied andEnvironmental Microbiology Sept 1983 p560-564)。

[0050] 第一和第二细菌类毒素可相同或不同。当第一和第二细菌类毒素不同时,意味着它们具有不同的氨基酸序列。

[0051] 例如,19A 和 19F 可被分别缀合至破伤风类毒素和破伤风类毒素;白喉类毒素和白喉类毒素;Crm197 和 CRM197、肺炎球菌溶血素和肺炎球菌溶血素、破伤风类毒素和白喉类毒素;破伤风类毒素和 CRM197;破伤风类毒素和肺炎球菌溶血素;白喉类毒素和破伤风类毒素;白喉类毒素和 CRM197、白喉类毒素和肺炎球菌溶血素;CRM197 和破伤风类毒素、CRM197 和白喉类毒素;CRM197 和肺炎球菌溶血素;肺炎球菌溶血素和破伤风类毒素;肺炎球菌溶血素和白喉类毒素;或肺炎球菌溶血素和 CRM197。

[0052] 本发明的免疫原性组合物包含 2-8、2-7、2-6、2-5、3-5、4-5、2-4、2-3、3-4 或 2、3、4、5、6、7 或 8 种荚膜糖缀合物,其中蛋白 D 为载体蛋白。例如,来自血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 或 23F 的糖被缀合至蛋白 D。例如,选自血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F 的 2-8、2-7、2-6、2-5、3-5、4-5、2-4、2-3、3-4 或 2、3、4、5、6、7 或 8 种糖被缀合至蛋白 D。

[0053] 在一个实施方式中,来自至少血清型 1 和 3、1 和 4、1 和 5、1 和 6A、1 和 6B、1 和 7、1 和 9V、1 和 14、1 和 22F、1 和 23F、3 和 4、3 和 5、3 和 6A、3 和 6B、3 和 7F、3 和 9V、3 和 14、3 和 22F、3 和 23F、4 和 5、4 和 6A、4 和 6B、4 和 7F、4 和 9V、4 和 14、4 和 22F、4 和 23F、5 和 6A、5 和 6B、5 和 7F、5 和 9V、5 和 14、5 和 22F、5 和 23F、6A 和 6B、6A 和 7F、6A 和 9V、6A 和 14、6A 和 22F、6A 和 23F、6B 和 7F、6B 和 9V、6B 和 14、6B 和 22F、6B 和 23F、7F 和 9V、7F 和 14、7F 和 22F、7F 和 23F、9V 和 14、9V 和 22F、9V 和 23F、14 和 22F、14 和 23F 或者 22F 和 23F 的糖被缀合至蛋白 D。

[0054] 在一个实施方式中,来自至少血清型 1、3 和 4;1、3 和 5;1、3 和 6A;1、3 和 6B;1、3 和 7F;1、3 和 9V;1、3 和 14;3、4 和 7F;3、4 和 5;3、4 和 7F;3、4 和 9V;3、4 和 14;4、5 和 7F;4、5 和 9V;4、5 和 14;5、7F 和 9V;5、7F 和 14;7F、9V 和 14;1、3、4 和 5;3、4、5 和 7F;4、5、7F 和 9V;4、5、7F 和 14;4、5、9V 和 14;4、7F、9V 和 14;5、7F、9V 和 14;或者 4、5、7F、9V 和 14 的糖被缀合至蛋白 D。

[0055] 在一个实施方式中,在本发明的免疫原性组合物中存在的荚膜糖缀合物中的一半或少于一半或少数包含作为载体蛋白的蛋白 D。例如,在 10 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4 或 5 种与蛋白 D 缀合。例如,在 11 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4 或 5 种与蛋白 D 缀合。例如,在 12 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5 或 6 种与蛋白 D 缀合。例如,在 13 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5 或 6 种与蛋白 D 缀合。例如,在 14 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6 或 7 种与蛋白 D 缀合。例如,在 15 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6 或 7 种与蛋白 D 缀合。例如,在 16 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6、7 或 8 种与蛋白 D 缀合。例如,在 17 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6、7 或 8 种与蛋白 D 缀合。例如,在 18 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6、7、8 或 9 种与蛋白 D 缀合。例如,在 19 价肺炎链球菌疫苗中,来自不同血清型的荚膜糖中的 2、3、4、5、6、7、8 或 9 种与蛋白 D 缀合。可选地,与蛋白 D 缀合的血清型选自上述的组。

[0056] 在一个实施方式中,除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物外,该免疫原性组合物进一步包含肺炎链球菌荚膜糖 4、6B、9V、14、18C 和 23F 的缀合物。

[0057] 在一个实施方式中,除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物外,该免疫原性组合物

进一步包括肺炎链球菌荚膜糖 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C 和 23F 的缀合物。

[0058] 在一个实施方式中,除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物外,该免疫原性组合物进一步包括肺炎链球菌荚膜糖 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0059] 在一个实施方式中,除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物外,该免疫原性组合物进一步包括肺炎链球菌荚膜糖 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0060] 在一个实施方式中,除了 19A 和 19F 的肺炎链球菌糖缀合物外,该免疫原性组合物进一步包括肺炎链球菌荚膜糖 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、22F 和 23F 的缀合物。

[0061] 本发明的肺炎链球菌疫苗通常将包含荚膜糖抗原(可选地缀合),其中所述糖来自至少十种肺炎链球菌血清型。肺炎链球菌荚膜糖的数量范围可从 10 种不同血清型(或“v”,价)至 23 种不同血清型(23v)。在一个实施方式中,具有 10、11、12、13、14 或 15 种不同血清型。在本发明另一实施方式中,该疫苗可包含缀合的肺炎链球菌糖和未缀合的肺炎链球菌糖。任选地,糖血清型的总数少于或等于 23。例如,本发明可包含 10 种缀合血清型和 13 种未缀合糖。该疫苗可以类似的方式包含 11、12、13、14 或 16 种缀合糖和分别 12、11、10、9 或 7 种未缀合糖。

[0062] 在一个实施方式中,本发明的多价肺炎球菌疫苗将选自如下血清型:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F,尽管可以理解,根据接受该疫苗的接受者的年龄以及该疫苗将施用的地理位置,一种或两种其它血清型可被取代。例如,10 价疫苗可包含来自血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的多糖。11 价疫苗还可包含来自血清型 3 或 19A 的糖。12 或 13 价儿童(婴儿)疫苗还可包括添加了血清型 6A 和 19A,或者 6A 和 22F,或者 19A 和 22F,或者 6A 和 15,或者 19A 和 15,或者 22F 和 15 的 11 价制剂(包含来自血清型 3 的糖),而 13 价老年疫苗可包括添加了血清型 19A 和 22F、8 和 12F,或者 8 和 15,或者 8 和 19A,或者 8 和 22F,或者 12F 和 15,或者 12F 和 19A,或者 12F 和 22F,或者 15 和 19A,或者 15 和 22F 的 10 或 11 价制剂。14 价儿童疫苗可包括添加了血清型 3、6A、19A 和 22F;血清型 6A、8、19A 和 22F;血清型 6A、12F、19A 和 22F;血清型 6A、15、19A 和 22F;血清型 3、8、19A 和 22F;血清型 3、12F、19A 和 22F;血清型 3、15、19A 和 22F;血清型 3、6A、8 和 22F;血清型 3、6A、12F 和 22F;或者血清型 3、6A、15 和 22F 的上述 10 价制剂。

[0063] 在一个实施方式中该组合物包含来自血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F(任选地缀合)的荚膜糖。在本发明进一步的实施方式中包括至少 11 种糖抗原(任选地缀合),例如,来自血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的荚膜糖。在本发明进一步的实施方式中包括至少 12 或 13 种糖抗原,例如,疫苗可包含来自血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 的荚膜糖或者来自血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F 的荚膜糖,尽管本发明还可预期其它的糖抗原,例如 23 价(例如血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F)。

[0064] 本发明的免疫原性组合物包含来自流感嗜血杆菌的蛋白 D(PD)(参见 EP0594610 图 9)。流感嗜血杆菌是中耳炎的关键引发微生物,本发明人已显示在肺炎链球菌疫苗中包含该蛋白将提供针对与中耳炎相关的流感嗜血杆菌的保护水平(Pyrrmula 等人 Lancet 367;740-748(2006))。一方面,PD 作为一种或多种糖的载体蛋白存在。在另一方面,蛋白 D 可作为游离蛋白存在于疫苗组合物中。在进一步方面,蛋白 D 同时作为载体蛋白和作为游

离蛋白存在。蛋白 D 可以全长蛋白或片段使用 (W00056360)。在其它方面,蛋白 D 作为多数糖的载体蛋白存在,例如糖中的 6、7、8、9 或更多种可与蛋白 D 缀合。在该方面,蛋白 D 还可作为游离蛋白存在。

[0065] 本发明的疫苗将包含两种或两种以上不同类型的载体蛋白。每种类型的载体蛋白可作为一种以上糖的载体,该糖可以相同或不同。例如,血清型 3 和 4 可被缀合至相同的载体蛋白,缀合至载体蛋白的相同分子或相同载体蛋白的不同分子。在一个实施方式中,两种或两种以上不同的糖可被缀合至相同的载体蛋白,缀合至载体蛋白的相同分子或相同载体蛋白的不同分子。

[0066] 在本发明的免疫原性组合中存在的除了 19A 和 19F 以外的任意肺炎链球菌荚膜糖可被缀合至载体蛋白,所述载体蛋白独立选自 TT、DT、CRM197、TT 的片段 C、PhtD、PhtBE 或 PhtDE 融合体(特别是 W001/98334 和 WO 03/54007 中描述的那些)、解毒肺炎链球菌溶血素和蛋白 D。下文显示了可用于本发明缀合物的蛋白载体的更完整清单。

[0067] 缀合至本发明的免疫原性组合中存在的缀合物中的一种或多种肺炎链球菌荚膜糖的载体蛋白任选地是聚组氨酸三联体家族(Pht)蛋白成员,其片段或融合蛋白。PhtA、PhtB、PhtD 或 PhtE 蛋白可与 WO 00/37105 或 W000/39299 中披露的序列(例如,与 WO 00/37105 中 PhtD 的 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列 1-838 或 21-838)具有 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 一致性。例如,融合蛋白由全长 PhtA、PhtB、PhtD、PhtE 或其 2、3 或 4 个片段组成。融合蛋白的范例为 PhtA/B、PhtA/D、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/D、PhtB/E、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/E、PhtE/A、PhtE/B 和 PhtE/D,其中该蛋白与首先提及的蛋白在 N 末端连接(例如参见 W001/98334)。

[0068] 在使用 Pht 蛋白片段时(单独或作为融合蛋白的部分),每个片段可选地包含该种多肽的一个或多个组氨酸三联体基序和/或卷曲螺旋区。组氨酸三联体基序是多肽的部分,其具有序列 HxxHxH,其中 H 为组氨酸,x 为非组氨酸的氨基酸。卷曲螺旋区是通过“卷曲”算法预测的区域 Lupus, A 等人 (1991) Science 252:1162-1164。在一个实施方式中,该片段或每个片段包含一个或多个组氨酸三联体基序和至少一个卷曲螺旋区。在一个实施方式中,该片段或每个片段包含恰好或至少 2、3、4 或 5 个组氨酸三联体基序(任选地,具有介于 2 或 2 个以上三联体的天然 Pht 序列,或者与天然肺炎球菌内三联体 Pht 序列具有超过 50、60、70、80、90 或 100% 一致性的内三联体序列 - 例如, W000/37105 中 PhtD 的 SEQ ID NO:4 中所示的内三联体序列)。在一个实施方式中,该片段或每个片段包含恰好或至少 2、3 或 4 个卷曲螺旋区。在一个实施方式中,此处披露的 Pht 蛋白包含连接信号序列的全长蛋白,去除信号肽(例如在 N 末端的 20 个氨基酸)的成熟全长蛋白, Pht 蛋白的天然存在变体以及 Pht 蛋白的免疫原性片段(例如,如上所述的片段或者包含来自 W000/37105 (SEQ ID NOs 4, 6, 8 或 10) 或 W000/39299 (SEQ ID NOs 2, 4, 6, 8, 10 或 14) 的氨基酸序列的至少 15 或 20 个连续氨基酸的多肽,其中所述多肽能够引发特异性针对 W000/37105 或 W000/39299 所述氨基酸序列的免疫应答)。

[0069] 具体而言,此处所用的“PhtD”包含连接信号序列的全长蛋白,去除信号肽(例如在 N 末端的 20 个氨基酸)的成熟全长蛋白, PhtD 的天然存在变体以及 PhtD 的免疫原性片段(例如,如上所述的片段或者包含来自 W000/37105 或 W000/39299 的 PhtD 氨基酸序列的至少 15 或 20 个连续氨基酸的多肽,其中所述多肽能够引发特异性针对 W000/37105 或

WO00/39299 所述 PhtD 氨基酸序列 (例如, 针对 PhtD 的 WO 00/37105 的 SEQ ID NO :4 或 WO 00/39299 的 SEQ ID NO :14) 的免疫应答)。上述 PhtD 的所有形式均可用于本发明。

[0070] 如果该组合物中蛋白载体有 2 种或 2 种以上的糖相同, 该糖可被缀合至该蛋白载体的相同分子 (载体分子具有另外 2 种与之缀合的不同的糖) [例如参见 WO 04/083251]。替代性地, 该糖可各自独立地缀合至该蛋白载体的不同分子 (每个蛋白载体分子仅具有一种类型的糖与之缀合)。

[0071] 可用于本发明的载体蛋白的范例为 DT (白喉类毒素), TT (破伤风类毒素) 或 TT 的片段 C, DT CRM197 (一种 DT 突变体), 其它 DT 点突变体如 CRM176、CRM228、CRM 45 (Uchida 等人 J. Biol. Chem. 218 ;3838-3844, 1973) ;CRM 9、CRM 45、CRM102、CRM 103 和 CRM107 以及 Nicholls 和 Youle 在 Genetically Engineered Toxins, Ed :Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992 中所述的其它突变体 ;Glu-148 缺失或突变为 Asp、Gln 或 Ser 和 / 或 Ala 158 删除或突变为 Gly 以及 US 4709017 或 US 4950740 中披露的其它突变 ;在至少一个或多个残基 Lys 516、Lys 526、Phe 530 和 / 或 Lys 534 的突变以及 US5917017 或 US 6455673 中披露的其它突变 ;或者 US 5843711 中披露的片段, 肺炎球菌肺炎球菌溶血素 (Kuo 等人 (1995) Infect Immun 63 ;2706-13), 其包括以某些方式解毒的 ply 例如 dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) 或 dPLY-formol, PhtX, 其包括 PhtA、PhtB、PhtD、PhtE 以及 Pht 蛋白融合体如 PhtDE 融合体、PhtBE 融合体 (WO 01/98334 和 WO 03/54007), (Pht A-E 在下文更加具体描述), OMPC (脑膜炎球菌外膜蛋白 - 通常由脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B 提取 -EP0372501), PorB (来自脑膜炎奈瑟氏球菌)、PD (流感嗜血杆菌蛋白 D- 参见, 例如 EP 0 594 610 B), 或其免疫学功能等同物, 合成肽 (EP0378881, EP0427347), 热休克蛋白 (WO 93/17712, WO 94/03208), 百日咳蛋白 (WO 98/58668, EP0471177), 细胞因子, 淋巴因子, 生长因子或激素 (WO 91/01146), 包含多个来自不同病原体衍生抗原的人 CD4+T 细胞表位的人工蛋白 (Falugi 等人 (2001) Eur J Immunol 31 ;3816-3824), 例如 N19 蛋白 (Baraldoi 等人 (2004) Infect Immun 72 ;4884-7) 肺炎球菌表面蛋白 PspA (WO 02/091998), 铁摄取蛋白 (WO 01/72337), 艰难梭菌的毒素 A 或 B (WO 00/61761)。

[0072] Nurkka 等人 Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11) :1008-14, 2004Nov 描述了所有血清型缀合至 PD 的 11 价肺炎球菌疫苗。然而本发明人显示与缀合至 PD 的 19F 相比, 具有与 DT 缀合的 19F 缀合物诱导的抗体的调理吞噬活性更高。此外, 本发明人显示与 DT 缀合的 19F 具有对 19A 更大的交叉反应。因此, 本发明的组合物的一个特征是血清型 19F 被缀合至细菌类毒素, 例如, TT、肺炎球菌溶血素、DT 或 CRM197。一方面, 血清型 19F 被缀合至 DT。本发明的另一特征是血清型 19A 被缀合至细菌类毒素, 例如, TT、肺炎球菌溶血素、DT 或 CRM197。该免疫原性组合物剩余的糖血清型可全部缀合至一种或多种非 DT 载体蛋白 (即, 仅 19F 缀合至 DT), 或者可部分缀合至非 DT 载体蛋白, 部分 DT 缀合至 DT。在一个实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 剩余的血清型分别缀合至 PD, 以及 TT 或 DT 或 CRM197。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 且不超过一种糖缀合至 TT。在该实施方式的一个方面, 所述的一种糖为 18C 或 12F。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 且不超过两种糖缀合至 TT。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 剩余的血清型分别缀合至 PD, TT 和 DT 或 CRM197。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 剩余的血清型分别缀合至 PD, TT 和肺炎球菌溶血素。在进一步的实施方式中, 19F

缀合至 DT 或 CRM197, 剩余的血清型分别缀合至 PD, TT 和 CRM197。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 剩余的血清型分别缀合至 PD, TT, 肺炎球菌溶血素和任选地 PhtD 或 PhtD/E 融合蛋白。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 19A 缀合至肺炎球菌溶血素或 TT, 剩余的血清型分别缀合至 PD, TT, 肺炎球菌溶血素和任选地 PhtD 或 PhtD/E 融合蛋白。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 19A 缀合至肺炎球菌溶血素或 TT, 一种其它的糖缀合至 TT, 一种其它的糖缀合至 PhtD 或 PhtD/E, 且所有其它的糖缀合至 PD。在进一步的实施方式中, 19F 缀合至 DT 或 CRM197, 19A 缀合至肺炎球菌溶血素, 一种其它的糖缀合至 TT, 一种其它的糖缀合至肺炎球菌溶血素, 2 种其它的糖缀合至 PhtD 或 PhtD/E, 且所有其它的糖缀合至 PD。

[0073] 在整个说明书中术语“糖”可指多糖或寡糖, 并同时包括两者。多糖可从细菌分离并可通过已知的方法(例如参见 EP497524 和 EP497525) 和可选地通过微射流(microfluidisation) 进行一定程度的大小处理。可对多糖进行大小处理(sized) 以减少多糖样本的粘度和/或提高缀合产物的可滤过性。寡糖具有少量的重复单元(通常 5-30 重复单元), 并通常为水解的多糖。

[0074] 肺炎链球菌的荚膜多糖包含重复的寡糖单元, 该寡糖单元可包含多达 8 个糖残基。关键肺炎链球菌血清型的寡糖单元可参见综述 JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciênc., 2005 年 6 月, 第 77 卷, 第 2 期, 第 293-324 页. 表 II ISSN0001-3765。在一个实施方式中, 荚膜糖抗原可以是全长多糖, 然而在其它实施方式中, 它可以是一个寡糖单元或短于天然长度的重复寡糖单元的糖链。在一个实施方式中, 在疫苗中存在的所有糖都是多糖。全长多糖可被“大小处理(sized)”, 即, 它们的大小可通过各种方法减小, 所述方法例如酸水解处理、过氧化氢处理、通过 **emulsiflex®** 大小处理后以过氧化氢处理以生成寡糖片段或者微射流。

[0075] 本发明人还注意到本领域曾关注采用寡糖以便于缀合物生成。本发明人已发现通过采用天然或略微进行大小处理的多糖缀合物, 可实现以下一种或多种优点: 1) 具有高免疫原性的可滤过缀合物, 2) 可改变多糖与蛋白在缀合物中的比例, 使得在缀合物中多糖与蛋白的比例(w/w) 增加(这可对载体抑制作用具有影响), 3) 可通过使用更大的糖进行缀合来稳定易于水解的免疫原性缀合物。更大的多糖的使用可导致与缀合物载体的更多交联, 并可减少游离糖从缀合物的释放。在现有技术中描述的缀合物疫苗倾向于在缀合前将多糖解聚以改善缀合。本发明人已发现保留更大大小的糖的糖缀合物疫苗可提供针对肺炎球菌疾病的良好免疫应答。

[0076] 本发明的免疫原性组合物因而可包含一种或多种糖缀合物, 其中在缀合前每种糖的平均大小(重均分子量; Mw) 在 80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa 或 1000kDa 以上。在一个实施方式中, 该缀合后的缀合物应当易于通过 0.2 微米过滤器, 从而与过滤前样本相比, 在过滤后可得到 50、60、70、80、90 或 95% 以上的产率。

[0077] 为了本发明的目的, “天然多糖”指未经过加工的糖, 该加工过程在于减小该糖的大小。在常规纯化步骤中多糖可能会被略微减小。这种糖仍然是天然的。仅当多糖采用了大小处理技术后, 该多糖会被认为不是天然的。天然多糖的大小例如介于 250kDa-2, 000kDa、400-1, 500kDa、750kDa-1, 250kDa、300kDa-600kDa、500-1, 000kDa 或 1, 000-1, 500kDa, 如本

领域技术人员将理解,不同的血清型具有不同大小的天然多糖。

[0078] 针对本发明的目的,“以最大 x_2 的因子进行大小处理”表示该糖通过加工意图减小糖的大小,但保留天然多糖一半以上的大小。 x_3 、 x_4 等可以相同方式解释,即,该糖通过加工减小多糖的大小,但保留天然多糖三分之一、四分之一等以上的大小。

[0079] 在本发明的一个方面,该免疫原性组合物包含与载体蛋白缀合的来自至少 10 种血清型的肺炎链球菌糖,其中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或每一种肺炎链球菌糖是天然多糖。

[0080] 在本发明的一个方面,该免疫原性组合物包含与载体蛋白缀合的来自至少 10 种血清型的肺炎链球菌糖,其中至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或每一种肺炎链球菌糖以最多 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 、 x_6 、 x_7 、 x_8 、 x_9 或 x_{10} 的因子进行大小处理。在该方面的一个实施方式中,大部分糖(例如,6、7、8 或更多种糖)以多达 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 、 x_6 、 x_7 、 x_8 、 x_9 或 x_{10} 的因子进行大小处理。

[0081] 本文的糖的分子量或平均分子量指在缀合前通过 MALLS 测量的糖的重均分子量(Mw)。

[0082] MALLS 技术已为本领域公知,并通常可按实施例 2 所述进行。为对肺炎球菌糖进行 MALLS 分析,可联合使用两根柱(TSKG6000 和 5000PWx1)并在水中洗脱糖。糖可采用光散射检测器(例如配置 10mW 氩激光器的 WyattDawn DSP 以 488nm)和干涉折射仪(例如装备 P100 池和红色滤光器的 Wyatt Otilab DSP 以 498nm)进行检测。

[0083] 在一个实施方式中,该肺炎链球菌糖为天然的多糖或在常规提取过程中大小减小的天然多糖。

[0084] 在一个实施方式中,该肺炎链球菌糖通过机械切割进行大小处理,例如可通过微射流或超声。微射流和超声具有能够减小更大的天然多糖的大小,从而足以提供可滤过缀合物的优势。大小处理的因子不超过 x_{20} 、 x_{10} 、 x_8 、 x_6 、 x_5 、 x_4 、 x_3 或 x_2 。

[0085] 在一个实施方式中,该免疫原性组合物包含肺炎链球菌缀合物,其由通过以不超过 x_{20} 的因子进行大小处理的天然多糖和糖的混合物制成。在该实施方式的一个方面,大部分糖(例如,6、7、8 或更多种糖)以多达 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 或 x_6 的因子进行大小处理。

[0086] 在一个实施方式中,该肺炎链球菌糖通过接头(例如,双功能接头)缀合至载体蛋白。该接头可选地为异双功能或同双功能的,其具有例如一个反应性氨基基团和一个反应性羧酸基团,2 个反应性氨基基团或两个反应性羧酸基团。该接头具有例如介于 4 和 20、4 和 12、5 和 10 个碳原子。一种可能的接头是 ADH。其它的接头包括 B-丙酰胺基(WO 00/10599)、硝基苯基-乙胺(Gever 等人(1979)Med. Microbiol. Immunol. 165 ;171-288)、卤烷基卤化物(US4057685)、糖苷键(US4673574,US4808700)、己二胺和 6-氨基己酸(US4459286)。在一个实施方式中,ADH 被用作缀合来自血清型 18C 的糖的接头。

[0087] 本发明的免疫原性组合物中存在的糖缀合物可通过任意已知的偶联技术制备。该缀合方法可依赖于以 1-氰基-4-二甲氨基四氟硼酸吡啶(CDAP)活化糖形成氰酸酯。该活化的糖可由此直接地或通过间隔(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,该间隔基可以是脒胺或半脒胺以得到硫醇多糖,后者可通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如采用 GMBS)或者卤代乙酰化载体蛋白(例如采用碘乙酰亚胺[例如,乙基碘乙酰亚胺 HCl]或 N-溴乙酸琥珀酰亚胺酯或 SIAB,或 SIA,或 SBAP)反应后获得的硫醚键偶联至载体。任选

地,该氰酸酯(任选地通过 CDAP 化学制备)与己二胺或 ADH 偶联,且该氨基衍生的糖采用碳二亚胺(例如 EDAC 或 EDC)化学通过蛋白载体上的羧基基团被缀合至载体蛋白。该种缀合物描述于 PCT 公布申请 Uniformed Services University 的 WO 93/15760 以及 WO 95/08348 和 WO 96/29094。

[0088] 其它合适的技术采用碳二亚胺、碳亚胺、肼、活性酯、降苾烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多描述于 W098/42721。缀合可涉及羰基接头,其可通过糖的游离羟基基团与 CDI 反应 (Bethell 等人 J. Biol. Chem. 1979, 254 ;2572-4, Hearn 等人 J. Chromatogr. 1981. 218 ;509-18), 然后与蛋白反应形成氨基甲酸酯键而形成。这可包括将还原为伯羟基基团的末端异构反应, 任选地在伯羟基基团与 CDI 的反应中保护 / 脱保护该伯羟基基团以形成 CDI 氨基甲酸酯中间体, 并将该 CDI 氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团缀合。

[0089] 该缀合物可通过 US 4365170 (Jennings) 和 US 4673574 (Anderson) 所述的直接还原胺化法制备得到。其它方法描述于 EP-0-161-188、EP-208375 和 EP-0-477508。

[0090] 其它方法包括将溴化氰(或 CDAP)活化的糖的己二酸双肼(ADH)衍生物通过碳二亚胺缩合(例如采用 EDAC)缀合至蛋白载体 (Chu C. 等人 Infect. Immunity, 1983 245256)。

[0091] 在一个实施方式中,糖上的羟基基团(任选地活化羟基基团,例如 [如采用 CDAP] 活化制备氰酸酯的羟基基团)被直接或间接(通过接头)连接至蛋白上的氨基或羧基基团。当接头存在时,糖上的羟基基团任选地连接至接头上的氨基基团,例如,通过 CDAP 缀合连接。在接头如 ADH 中的其它氨基基团可被缀合至蛋白上的羧基基团,例如,可采用碳二亚胺化学,例如采用 EDAC 进行缀合。在一个实施方式中,该肺炎球菌荚膜糖在缀合至载体蛋白前先背缀合至接头。替代性地,该接头可在缀合至糖之前被缀合至载体。

[0092] 也可采用组合技术,其中部分糖-蛋白缀合物通过 CDAP 制备,部分通过还原胺化制备。

[0093] 总体而言,在蛋白载体上的以下类型的化学基团可用于缀合 / 结合:

[0094] A) 羧基(例如通过天冬氨酸或谷氨酸)。在一个实施方式中该基团被直接连接至糖上的氨基基团或通过碳二亚胺化学(例如通过 EDAC)连接至接头上的氨基基团。

[0095] B) 氨基基团(例如通过赖氨酸)。在一个实施方式中该基团被直接连接至糖上的羧基基团或通过碳二亚胺化学(例如通过 EDAC)连接至接头上的羧基基团。在另一实施方式中该基团直接连接至糖上以 CDAP 或 CNBr 活化的羟基基团或者连接至接头上的该种基团;连接至具有醛基团的糖或接头;连接至具有丁二酰亚胺酯基团的糖或接头。

[0096] C) 巯基(例如通过半胱氨酸)。在一个实施方式中,该基团被连接至溴或氯乙酰化的糖或具有马来酰亚胺化学的接头。在一个实施方式中,该基团通过双重氮联苯胺活化 / 修饰。

[0097] D) 羟基基团(例如通过酪氨酸)。在一个实施方式中,该基团通过双重氮联苯胺活化 / 修饰。

[0098] E) 咪唑基基团(例如通过组氨酸)。在一个实施方式中,该基团通过双重氮联苯胺活化 / 修饰。

[0099] F) 胍基基团(例如通过精氨酸)。

[0100] G) 吲哚基基团(例如通过色氨酸)。

[0101] 在糖上,总体而言如下基团可用于缀合:OH、COOH 或 NH₂。醛基团可本领域已知的不同处理后生成,例如:高碘酸、酸解、过氧化氢等。

[0102] 直接缀合方法:

[0103] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----- > 氰酸酯 +NH₂-Prot----- > 缀合物

[0104] 糖-醛 +NH₂-Prot----- > Schiff 碱 +NaCNBH₃----- > 缀合物

[0105] 糖-COOH+NH₂-Prot+EDAC----- > 缀合物

[0106] 糖-NH₂+COOH-Prot+EDAC----- > 缀合物

[0107] 通过间隔(接头)间接缀合法:

[0108] 糖-OH+CNBr 或 CDAP---- > 氰酸酯 +NH₂-----NH₂----- > 糖-----NH₂+COOH-Prot+EDAC----- > 缀合物

[0109] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----- > 氰酸酯 +NH₂-----SH----- > 糖-----SH+SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白或通过例如 SPDP 对蛋白的氨基基团修饰后获得)----- > 糖-S-S-Prot

[0110] 糖-OH+CNBr 或 CDAP---- > 氰酸酯 +NH₂-----SH----- > 糖-----SH+马来酰亚胺-Prot(氨基基团的修饰)----- > 缀合物

[0111] 糖-OH+CNBr 或 CDAP---- > 氰酸酯 +NH₂-----SH---- > 糖-SH+卤代乙酰化-Prot----- > 缀合物

[0112] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----NH₂---- > 糖-----NH₂+EDAC+COOH-Prot----- > 缀合物

[0113] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----SH----- > 糖-----SH+SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白或通过例如 SPDP 对蛋白的氨基基团修饰后获得)----- > 糖-S-S-Prot

[0114] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----SH----- > 糖-----SH+马来酰亚胺-Prot(氨基基团的修饰)----- > 缀合物

[0115] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----SH---- > 糖-SH+卤代乙酰化-Prot----- > 缀合物

[0116] 糖-醛 +NH₂-----NH₂----- > 糖---NH₂+EDAC+COOH-Prot----- > 缀合物

[0117] 注意:任意合适的碳二亚胺可用于替代上述 EDAC。

[0118] 综上,通常可用于与糖缀合的蛋白载体化学基团的类型为氨基基团(例如在赖氨酸残基上)、COOH 基团(例如在天冬氨酸和谷氨酸残基上)和 SH 基团(如可及)(例如在半胱氨酸残基上)。

[0119] 任选地载体蛋白与肺炎链球菌糖的比例介于 1:5 和 5:1;1:2 和 2.5:1;1:1 和 2:1(w/w)。在一个实施方式中,大部分缀合物,例如 6、7、8、9 或更多种缀合物中载体蛋白和糖的比例大于 1:1,例如 1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1 或 1.6:1。

[0120] 在一个实施方式中,至少一种肺炎链球菌糖采用 CDAP 和 EDAC 经接头缀合至载体蛋白。例如,18C 可按如上所述采用 CDAP 和 EDAC 经接头(例如具有两个末端胍基基团的接头,如 ADH)缀合至载体蛋白。在使用接头时,CDAP 可用于将糖缀合至接头,而 EDAC 可随后用于将接头缀合至蛋白,或者替代性地 EDAC 可用于首先将接头缀合至蛋白,然后 CDAP 可用于将接头缀合至糖。

[0121] 总体而言,本发明的免疫原性组合物可包含剂量介于 0.1 和 20 μg、1 和 10 μg 或者 1 和 3 μg 之间的每种糖缀合物。

[0122] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含剂量介于 0.1-20 μ g、0.5-10 μ g、0.5-5 μ g 或者 1-3 μ g 糖之间的每种肺炎链球菌荚膜糖。在一个实施方式中,荚膜糖可以不同剂量存在,例如,部分荚膜糖可以大约或正好 1 μ g 的剂量存在,或者部分荚膜糖可以大约或正好 3 μ g 的剂量存在。在一个实施方式中,来自血清型 3、18C 和 19F(或者 4、18C 和 19F) 的糖以比其它糖更高的剂量存在。在该实施方式的一个方面,血清型 3、18C 和 19F(或者 4、18C 和 19F) 以大约或正好 3 μ g 的剂量存在,而免疫原性组合物中的其它糖以大约或正好 1 μ g 的剂量存在。

[0123] “约”或“大约”针对本发明的目的定义为比给定数值多或少 10% 以内。

[0124] 在一个实施方式中,肺炎链球菌荚膜糖中至少一种与载体蛋白直接缀合。任选地,肺炎链球菌荚膜糖中至少一种通过 CDAP 直接缀合。在一个实施方式中,荚膜糖中的大部分例如 5、6、7、8、9 或更多种通过 CDAP 直接连接至该载体蛋白(参见 WO 95/08348 和 WO 96/29094)。

[0125] 该免疫原性组合物可包含肺炎链球菌蛋白,此处称为本发明的肺炎链球菌蛋白。该种蛋白可用作载体蛋白,或者可作为游离蛋白存在,或者可同时作为载体蛋白和游离蛋白存在。本发明的肺炎链球菌蛋白可至少在肺炎球菌生命周期的一部分中暴露在表面,或者可作为由肺炎球菌分泌或释放的蛋白。任选地,本发明的蛋白选自如下类别,例如具有 LXXC II 型信号序列基序的蛋白(其中 X 为任意氨基酸,例如,聚组氨酸三联体家族(PhtX)),胆碱结合蛋白,具有 I 型信号序列基序的蛋白(如,Sp101),具有 LPXTG 基序的蛋白(其中 X 为任意氨基酸,例如,Sp128, Sp130),以及毒素(例如,Ply)。这些类别(或基序)中的范例为如下蛋白,或者其免疫学功能等同物。

[0126] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含至少 1 种选自如下组合的蛋白:聚组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、截短 CbpX、LytX 家族、截短 LytX、截短 CbpX-截短 LytX 嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125 和 Sp133。在进一步的实施方式中,该免疫原性组合物包含 2 种或多种选自如下组合的蛋白:聚组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、截短 CbpX、LytX 家族、截短 LytX、截短 CbpX-截短 LytX 嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA 和 Sp128。在进一步的实施方式中,该免疫原性组合物包含 2 种或多种选自如下组合的蛋白:聚组氨酸三联体家族(PhtX)、胆碱结合蛋白家族(CbpX)、截短 CbpX、LytX 家族、截短 LytX、截短 CbpX-截短 LytX 嵌合蛋白(或融合体)、肺炎球菌溶血素(Ply)和 Sp128。

[0127] 该 Pht(聚组氨酸三联体)家族包含蛋白 PhtA、PhtB、PhtD 和 PhtE。该家族的特征在于脂酶序列、被富脯氨酸区分离的两个结构域和多个组氨酸三联体,可能涉及金属或核苷结合或酶催化活性、(3-5) 卷曲螺旋区、保守 N 末端和异种 C 末端。它存在于所有测试的肺炎双球菌菌株中。在链球菌和奈瑟菌中也曾发现了同源蛋白。在本发明的一个实施方式中,本发明的 Pht 蛋白为 PhtD。然而,可以理解,术语 Pht A、B、D 和 E 指具有下文引用文献中披露的序列的蛋白以及与该参考蛋白具有至少 90% 一致性的序列同源性的天然存在(和人工)变体。任选地,具有至少 95% 一致性或至少 97% 一致性。

[0128] 对于 PhtX 蛋白,PhtA 披露于 WO 98/18930,也被称为 Sp36。如上文指出,它是一种来自聚组氨酸三联体家族的蛋白,并具有 LXXC 的 II 型信号基序。PhtD 披露于 WO

00/37105,也被称为 Sp036D。如上文指出,它也是一种来自聚组氨酸三联体家族的蛋白,并具有 II 型 LXXC 信号基序。PhtB 披露于 WO 00/37105,也被称为 Sp036B。PhtB 家族的另一成员为 C3- 降解多肽,披露于 WO 00/17370。该蛋白也来自于聚组氨酸三联体家族,并具有 II 型 LXXC 信号基序。例如,一种免疫原性功能等同物是披露于 WO 98/18930 的蛋白 Sp42。一种截短 PhtB(约 79kD)披露于 W099/15675,也被认为是 PhtX 家族的一元。PhtE 披露于 W000/30299 并被称为 BVH-3。此处提及 Pht 蛋白时表示可使用 Pht 蛋白的免疫原性片段或其融合体。例如,提及 PhtX 时包括任意 Pht 蛋白的免疫原性片段或其融合体。提及 PhtD 时也表示提及在例如 W00198334 中发现的 PhtDE 或 PhtBE 融合体。

[0129] 肺炎球菌溶血素是一种多功能毒素,其具有明显的细胞溶解性(溶血性)和补体激活活性(Rubins 等人, *Am. Respi. Cit Care Med*, 153 :1339-1346 (1996))。该毒素不由肺炎双球菌分泌,但在自溶素影响下在肺炎双球菌溶解时释放。它的影响包括,例如,刺激人单核细胞生成炎症性细胞因子,抑制纤毛对人呼吸道上皮的拍打,以及减少细菌活性和嗜中性白血球迁移。肺炎球菌溶血素最明显的影响是在红血细胞的溶解,其涉及与胆固醇结合。由于它是一种毒素,它需要在体内施用前被解毒(在适于保护的剂量下提供时对人体无毒)。野生型或天然肺炎球菌溶血素的表达和克隆已为本领域所知。例如,参见 Walker 等人 (*Infect Immun*, 55 :1184-1189 (1987))、Mitchell 等人 (*BiochimBiophys Acta*, 1007 : 67-72 (1989) 和 Mitchell 等人 (*NAR*, 18 :4010 (1990))。ply 的解毒可通过化学手段实现,例如,进行甲醛或戊二醛处理或两者的组合 (WO 04081515, PCT/EP2005/010258)。该方法在本领域中公知由于各种毒素。替代性地,ply 可遗传解毒。因此,本发明包括可以是例如突变蛋白的肺炎球菌蛋白衍生物。此处所用的术语“突变的”表示采用公知的定点突变技术或其它常规方法进行了一个或多个氨基酸的删除、添加或替换的分子。例如,如上所述,突变体 ply 蛋白可被改变为生物失活,同时保持其免疫原性表位,例如参见 W090/06951, Berry 等人 (*Infect Immun*, 67 :981-985 (1999)) 和 W099/03884。

[0130] 此处所用的术语“Ply”应理解为适于医学用途的突变或解毒肺炎球菌溶血素(即,无毒的)。

[0131] 对于胆碱结合蛋白家族(CbpX),该家族的成员最初被鉴定为可通过胆碱亲和层析纯化的肺炎球菌蛋白。所有的胆碱结合蛋白为非共价结合至细胞壁磷壁酸和膜关联脂磷壁酸的磷酸胆碱部分。这整个家族在结构上具有多个共同区域,尽管这些蛋白的确切性质(氨基酸序列、长度等)可能不同。总体而言,胆碱结合蛋白包含 N 末端区(N)、保守重复区(R1 和 / 或 R2)、脯氨酸富集区(P)和保守胆碱结合区(C),由多个重复单元组成,构成了该蛋白的约一半。本申请中所用的术语“胆碱结合蛋白家族(CbpX)”选自在 W097/41151 中鉴定的胆碱结合蛋白 PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD 和 CbpG。CbpA 披露于 W097/41151。CbpD 和 CbpG 披露于 W000/29434。PspC 披露于 W097/09994。PbcA 披露于 W098/21337。SpsA 是一种披露于 WO 98/39450 的胆碱结合蛋白。任选地胆碱结合蛋白选自 CbpA、PbcA、SpsA 和 PspC。

[0132] 本发明的一个实施方式包括截短 CbpX,其中“CbpX”如上定义,而“截短”指 CbpX 蛋白缺失了 50% 或更多的胆碱结合区(C)。任选地,该种蛋白缺失了整个胆碱结合区。任选地,该种截短蛋白缺失了(i)胆碱结合区和(ii)N 末端一部分以及该蛋白的一半,并保留了至少一个重复区(R1 或 R2)。任选地,该截短物具有 2 个重复区(R1 或 R2)。该种实施方

式的范例为 W099/51266 或 W099/51188 中所示的 NR1xR2 和 R1xR2, 然而, 缺失了类似胆碱结合区的其它胆碱结合蛋白通常在本发明的范围之内。

[0133] LytX 家族是与细胞溶解相关的膜相关蛋白。N 末端结构与包含胆碱结合结构域, 然而, LytX 家族并不具有上述指出的 CbpA 家族中发现的所有特征, 因此对于本发明, LytX 家族被认为不同于 CbpX 家族。与 CbpX 家族相反, C 末端结构域包含 LytX 蛋白家族的催化结构域。该家族包括了 LytA、B 和 C。对于 LytX 家族, LytA 披露于 Ronda 等人, Eur J Biochem, 164 :621-624(1987)。LytB 披露于 W0 98/18930, 也被称为 Sp46。LytC 也披露于 W098/18930, 也被称为 Sp9。本发明的一个实施方式包括 LytC。

[0134] 另一实施方式包括截短 LytX, 其中“LytX”如上定义, 而“截短”指缺失了胆碱结合区 50% 或更多的 LytX 蛋白。任选地, 该种蛋白缺失了整个胆碱结合区。本发明的另一实施方式包括了截短 CbpX- 截短 LytX 嵌合蛋白 (或融合体)。任选地, 其包含了 CbpX 的 NR1xR2 (或 R1xR2) 和 LytX 的 C 末端部分 (Cterm, 即, 缺失了胆碱结合结构域) (例如, LytCCterm 或 Sp91Cterm)。任选地, CbpX 选自 CbpA、PbcA、SpsA 和 PspC。任选地, 它是 CbpA。任选地, LytX 是 LytC (也称为 Sp91)。本发明的另一实施方式是缺失了胆碱结合结构域 (C) 并作为具有 LytX 的融合蛋白表达截短的 PspA 或 PsaA。任选地, LytX 为 LytC。

[0135] PsaA 和 PspA 均为本领域所知。例如, PsaA 及其跨膜删除变体已被 Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec ;64(12) :5255-62 描述。PspA 及其跨膜删除变体已被例如 US 5804193、W0 92/14488 和 W0 99/53940 所披露。

[0136] Sp128 和 Sp130 披露于 W000/76540。Sp125 是具有 LPXTG 细胞壁锚定基序的肺炎球菌表面蛋白的范例 (其中 X 为任意氨基酸)。在具有该基序的该类肺炎球菌表面蛋白中的任意蛋白已被发现可用于本发明的背景中, 因此被认为本发明的其它蛋白。Sp125 本身披露于 W0 98/18930, 并被称为 ZmpB- 一种锌金属蛋白酶。Sp101 披露于 W0 98/06734 (其中它具有参考编号 y85993)。它以 I 型信号序列为特征。Sp133 披露于 W0 98/06734 (其中它具有参考编号 y85992)。它同样以 I 型信号序列为特征。

[0137] 可包括在组合疫苗 (特别是用于预防中耳炎) 中的粘膜炎莫拉菌蛋白抗原的范例为: OMP106 [W0 97/41731 (Antex) & W0 96/34960 (PMC)]; OMP21 或其片段 (W0 0018910); LbpA 和 / 或 LbpB [W0 98/55606 (PMC)]; TbpA 和 / 或 TbpB [W0 97/13785 & W0 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, 等人 (1993) Infect. Immun. 61 :2003-2010]; UspA1 和 / 或 UspA2 [W0 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); Omp1A1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); 以及 OmpE。可包括在组合疫苗 (特别是用于预防中耳炎) 中的不可分型的流感嗜血杆菌抗原或其片段的范例: Fimbrin 蛋白 [(US 5766608-Ohio State Research Foundation)] 其包含其肽的融合体 [例如 LB1(f) 肽融合体; US 5843464 (OSU) 或 W0 99/64067]; OMP26 [W0 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA 和 / 或 TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (W0 94/12641); P2; 以及 P5 (W0 94/26304)。

[0138] 本发明的蛋白还可被有利地合并。合并表示该免疫原性组合物包含来自以下

组合的所有蛋白,该蛋白可作为载体蛋白或作为游离蛋白或者作为这两者的混合物。例如,在下文所示的两种蛋白的组合中,两种蛋白均被用作载体蛋白,或者均作为游离蛋白存在,或者可同时作为载体蛋白和游离蛋白,或者一种可作为载体蛋白和游离蛋白而另一种仅作为载体蛋白或仅作为游离蛋白,或者一种可作为载体蛋白而另一种作为游离蛋白。当给出三种蛋白的组合时,存在类似的可能性。组合包括,但不限于 PhtD+NR1xR2、PhtD+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合或融合蛋白、PhtD+Ply、PhtD+Sp128、PhtD+PsaA、PhtD+PspA、PhtA+NR1xR2、PhtA+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合或融合蛋白、PhtA+Ply、PhtA+Sp128、PhtA+PsaA、PhtA+PspA、NR1xR2+LytC、NR1xR2+PspA、NR1xR2+PsaA、NR1xR2+Sp128、R1xR2+LytC、R1xR2+PspA、R1xR2+PsaA、R1xR2+Sp128、R1xR2+PhtD、R1xR2+PhtA。任选地, NR1xR2(或 R1xR2) 来自于 CbpA 或 PspC。任选地,它来自于 CbpA。其它组合包括 3 蛋白组合,例如 PhtD+NR1xR2+Ply 和 PhtA+NR1xR2+PhtD。在一个实施方式中,该疫苗组合物包含作为载体蛋白的解毒肺炎球菌溶血素和 PhtD 或 PhtDE。在进一步的实施方式中,该疫苗组合物包含作为游离蛋白的解毒肺炎球菌溶血素和 PhtD 或 PhtDE。

[0139] 在一个独立的方面,本发明提供了免疫原性组合物,其包含至少四种含有来自不同肺炎链球菌血清型的糖的肺炎链球菌荚膜糖缀合物,其中至少一种糖缀合 PhtD 或其融合蛋白,且该免疫原性组合物能够引发针对 PhtD 的有效免疫应答。

[0140] 对 PhtD 或其融合蛋白的有效免疫应答可通过例如实施例 15 所述的保护测定进行测量。有效免疫应答可在异种菌株攻击后 7 天提供至少 40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 的存活。假定该攻击菌株是异种的,所提供的保护是由于对 PhtD 或其融合蛋白的免疫应答。

[0141] 替代性地,对 PhtD 的有效免疫应答可通过例如实施例 14 所述的 ELISA 进行测量。有效免疫应答给出了至少 250、300、350、400、500、550 或 600 μ g/ml GMC 的抗-PhtD IgG 应答。

[0142] 例如,该免疫原性组合物包含缀合至 PhtD 或其融合蛋白的来自不同血清型的至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种肺炎链球菌荚膜糖。例如进一步选自血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15、17F、18C、19A、19F、20、23F 和 33F 的血清型 22F 和 1、2、3、4、5、6 或 7 被缀合至 PhtD。在一个实施方式中,血清型 3、6A 和 22F 中的两种或三种被缀合至 PhtD 或其融合蛋白。

[0143] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种通过接头(例如 ADH)缀合至 PhtD 或其融合蛋白的肺炎链球菌荚膜糖。在一个实施方式中,采用了如下列举的其中一种缀合化学。

[0144] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含了至少一种缀合至 PhtD 或其融合蛋白的肺炎链球菌荚膜糖,其中 PhtD 与糖在缀合物中的比例介于 6 : 1 和 1 : 5、6 : 1 和 2 : 1、6 : 1 和 2.5 : 1、6 : 1 和 3 : 1、6 : 1 和 3.5 : 1(w/w) 或大于(即,包含更大比例的 PhtD) 2.0 : 1、2.5 : 1、3.0 : 1、3.5 : 1 或 4.0 : 1(w/w)。

[0145] 在一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含肺炎球菌溶血素。

[0146] 本发明进一步提供了包含本发明的免疫原性组合物和药学可接受的赋形剂的疫苗。

[0147] 本发明的疫苗可补充佐剂,特别是当该疫苗意图用于老年人群,同时用于婴儿时。

合适的佐剂包括铝盐,例如氢氧化铝凝胶或磷酸铝或明矾,但也可以是其它的金属盐,例如钙、镁、铁或锌的盐,或者可以是酰化酪氨酸或者酰化糖、阳离子或阴离子衍生的糖或者聚磷腈的不溶性悬浮液。

[0148] 该佐剂任选地选择为 Th1 型应答的优选诱导剂。该种高水平的 Th1 型细胞因子倾向于促进针对给定抗原的细胞介导免疫应答的诱导,而高水平的 Th2 型细胞因子倾向于促进针对该抗原的体液免疫应答的诱导。

[0149] Th2 和 Th2 型免疫应答的区别并不绝对。实际上一个个体将支持被描述为主要是 Th1 或主要是 Th2 的免疫应答。然而,通常可方便的以 Mosmann 和 Coffman 对鼠 CD4+ve T 细胞克隆的描述来考虑细胞因子家族 (Mosmann, T. R. 和 Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173)。习惯上, Th1 型应答与 T 淋巴细胞生成 INF- γ 和 IL-2 细胞因子相关联。其它通常与 Th1 型免疫应答的诱导关联的细胞因子并非由 T 细胞生成,例如 IL-2。相反地, Th2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 的分泌关联。促进主要是 Th1 应答的合适佐剂系统包括:单磷酸脂质 A 或其衍生物(或者一般而言的解毒 lipid A- 例如参见 W02005107798),特别是 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL) (其制备可参见 GB 2220211A);以及单磷酸脂质 A,任选地 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A,和铝盐(例如磷酸铝或氢氧化铝)或水包油乳液的组合。在该种组合中,抗原和 3D-MPL 包含在相同的颗粒结构中,从而允许抗原性和免疫刺激信号被更有效传递。研究显示 3D-MPL 能够进一步增强 alum 吸附抗原的免疫原性 [Thoelen 等人 Vaccine (1998) 16 :708-14 ;EP 689454-B1]。

[0150] 增强系统包括单磷酸脂质 A 和皂甙衍生物的组合,特别是 W0 94/00153 中披露的 QS21 和 3D-MPL 的组合,或者 W0 96/33739 中披露的反应原性较低的组合物,其中以胆固醇淬灭 QS21。特别有效的佐剂配方包括在 W095/17210 中描述的在水包油乳液中的 QS21、3D-MPLS 和生育酚。在一个实施方式中,该免疫原性组合物额外包含皂甙,其可以是 QS21。该配方还可包含水包油乳液和生育酚 (W0 95/17210)。含有未甲基化的 CpG 的寡核苷酸 (W0 96/02555) 和其它免疫调节寡核苷酸 (W00226757 和 W003507822) 也是 Th1 应答的潜在诱导剂,并适于在本发明使用。

[0151] 具体的佐剂选自金属盐、水包油乳液、To11 样受体激动剂(特别是 To11 样受体 2 激动剂、To11 样受体 3 激动剂、To11 样受体 4 激动剂、To11 样受体 7 激动剂、To11 样受体 8 激动剂和 To11 样受体 9 激动剂)、皂甙及其组合。

[0152] 一种可用于本发明的疫苗组合物的佐剂为来自革兰氏阴性细菌菌株的疱 (bleb) 或外膜囊泡,例如 W002/09746 所启示-特别是脑膜炎奈瑟氏球菌疱。疱的佐剂特性可通过在其表面保留 LOS(脂低聚糖)得到增强(通过以低浓度清洁剂[例如 0-0.1%脱氧胆酸盐]萃取)。LOS 可通过 W002/09746 中讨论的 msbB(-) 或 htrB(-) 突变进行解毒。佐剂特性还可通过从脑膜炎球菌疱保留 PorB(并任选地去除 PorA) 得到增强。佐剂特性还可通过截短脑膜炎球菌疱上的 LOS 的外核糖结构得到增强-例如通过 W02004/014417 中讨论的 lgtB(-) 突变。替代性地,前述 LOS(例如,从 msbB(-) 和 / 或 lgtB(-) 菌株分离) 可被纯化并被用作本发明组合物的佐剂。

[0153] 可用于本发明的组合物的另一佐剂选自如下组合:皂甙、脂质 A 或其衍生物、免疫

刺激寡核苷酸、烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯、水包油乳液或其组合。可用于本发明的组合物的其它佐剂为与另一佐剂组合的金属盐。在一个实施方式中,该佐剂为 To11 样受体激动剂,特别是 To11 氧受体 2、3、4、7、8 或 9 的激动剂,或者皂甙,特别是 Qs21。在一个实施方式中,佐剂系统包含来自上文列表的两种或多种佐剂。具体而言,该组合任选地包含皂甙(特别是 Qs21)佐剂和/或 To11 样受体 9 激动剂,例如含 CpG 的免疫刺激寡核苷酸。其它的组合包含皂甙(特别是 Qs21)佐剂和 To11 样受体 4 激动剂或其 3 脱酰化衍生物 3D-MPL,或者包含皂甙(特别是 Qs21)佐剂和 To11 样受体 4 配体如烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯。

[0154] 在一个实施方式中,佐剂为 3D-MPL 和 QS21 的组合(EP 0 671 948 B1),包含 3D-MPL 和 QS21 的水包油乳液(WO 95/17210, WO 98/56414),或者与其它载体配制的 3D-MPL(EP 0 689 454 B1)。在一个实施方式中,佐剂系统包含中所述的 3D-MPL、QS21 和 CpG 寡核苷酸的组合。

[0155] 在一个实施方式中,该佐剂为 To11 样受体(TLR)4 配体,任选地如脂质 A 衍生物激动剂,具体而言单磷酸脂质 A,更具体而言 3 脱酰化单磷酸脂质 A(3D-MPL)。

[0156] 3D-MPL 可由 GlaxoSmithKline Biologicals North America 获得,主要促进具有 IFN-g(Th1) 表型的 CD4+T 细胞应答。它可根据 GB 2 220 211A 中披露的方法生成。从化学上看它是具有 2、3、4 或 6 条酰化链的 3-脱酰单磷酸脂质 A。在一个实施方式中,本发明的该组合物采用了微粒 3D-MPL。微粒 3D-MPL 具有可通过 0.22 μ m 过滤器进行无菌过滤的粒径。该种制备物描述于国际专利申请 WO 94/21292。脂质 A 的人工衍生物已知,并被认为是 TLR4 激动剂,包括但不限于:

[0157] OM174(2-脱氧-6-o-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二烷酰氧基四-癸酰基氨基]-4-o-磷酸基- β -D-吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]- α -D-吡喃葡萄糖基二氢磷酸), (WO 95/14026)

[0158] OM 294DP(3S,9R)-3-[(R)-十二烷酰氧基四癸酰基氨基]-4-氧代-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]癸烷-1,10-二醇,1,10-双(二氢磷酸)(W099/64301 和 W0 00/0462)

[0159] OM 197 MP-Ac DP(3S-,9R)-3-[(R)-十二烷酰氧基四癸酰基氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]癸烷-1,10-二醇,1-二氢磷酸 10-(6-氨基己酸)(W0 01/46127)

[0160] 其它可用的 TLR4 配体例如 W09850399 或 US6303347 所披露的烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯(AGP)(同样披露了 AGP 的制备方法)或者 US6764840 中披露的 AGP 药学可接受的盐。部分 AGP 为 TLR4 激动剂,部分为 TLR4 拮抗剂。两者均为认为可用作佐剂。

[0161] 可用于本发明的另一免疫刺激剂是 Quil A 及其衍生物。Quil A 是一种从南美树种 Quilaja Saponaria Molina 中分离的皂甙制备物,并由 Dalsgaard 等人在 1974 年首次描述为具有佐剂活性(“saponin adjuvants”,Archiv. für diegesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)。以通过 HPLC 分离了 Quil A 的纯化片段,其保留了佐剂活性,而不具有 Quil A 的毒性(EP 0 362 278),例如 QS7 和 QS21(也被称为 QA7 和 QA21)。QS-21 是一种来自的 Quillaja saponaria Molina 树皮的天然皂甙,其诱导 CD8+ 细胞毒性 T 细胞(CTLs)、Th1 细胞和主要的 IgG2a 抗体应答,并且是本发明背景中的皂甙。

[0162] QS21 的具体配方已被表述,并且是本发明的实施方式,这些配方进一步包含固醇(W096/33739)。本发明的皂甙形成部分可以微团、混合微团(可选地具有胆盐)或者可以 ISCOM 基质(EP 0 109 942 B1)、脂质体或相关胶体结构例如蠕虫状或环状多聚体复合物或油脂/分层结构以及与胆固醇和脂质配制形成的薄片、或以水包油乳液(例如在 WO 95/17210)的形式分离。该皂甙可与金属盐(例如氢氧化铝或磷酸铝)(WO 98/15287)相关联。

[0163] 任选地,该皂甙以脂质体、ISCOM 或水包油乳液形式存在。

[0164] 增强系统包括单磷酸脂质 A(或解毒脂质 A)和皂甙衍生物的组合,特别是 WO 94/00153 中披露的 QS21 和 3D-MPL 的组合,或者 WO 96/33739 中披露的反应原性较低的组合物,其中以胆固醇淬灭 QS21。一种特别有效的佐剂配方包括在 WO 95/17210 中描述的在水包油乳液中的具有或不具有 QS21 和/或 3D-MPL 的生育酚。在一个实施方式中,该免疫原性组合物额外包含皂甙,其可以是 QS21。

[0165] 也可使用免疫刺激寡核苷酸或任意其它 Toll 样受体 (TLR)9 激动剂。在本发明的佐剂或疫苗中使用的寡核苷酸为可选地含 CpG 的寡核苷酸,任选地包含被至少三个、任选地至少六个或更多个核苷酸分离的两个或多个双核苷酸 CpG 基序。CpG 基序是一种后接鸟嘌呤核苷酸的胞嘧啶核苷酸。本发明的 CpG 寡核苷酸通常为脱氧核苷酸。在一个实施方式中,该寡核苷酸中的核苷酸间键合为二硫代磷酸酯或硫代磷酸酯键,尽管磷酸二酯和其它核苷酸间键合键也在本发明的范围内。同样包含在本发明范围内的是与核苷酸间键合混合的寡核苷酸。生产硫代磷酸酯寡核苷酸或而硫代磷酸酯的方法描述于 US5,666,153、US5,278,302 和 W095/26204。

[0166] 寡核苷酸的范例具有如下序列。这些序列任选地包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键合。

[0167] OLIGO 1 (SEQ ID NO :1) :TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

[0168] OLIGO 2 (SEQ ID NO :2) :TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

[0169] OLIGO 3 (SEQ ID NO :3) :ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGCACC ACG

[0170] OLIGO 4 (SEQ ID NO :4) :TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

[0171] OLIGO 5 (SEQ ID NO :5) :TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG1668)

[0172] OLIGO 6 (SEQ ID NO :6) :TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG5456)

[0173] 替代性的 CpG 寡核苷酸可包含上述序列,其中具有序列内删除或添加。

[0174] 本发明中采用的 CpG 寡核苷酸可通过本领域已知的方法合成(例如参见 EP 468520)。这些寡核苷酸可方便地采用自动合成仪合成得到。

[0175] 该佐剂可以是水包油乳液或者可包含于其它佐剂组合的水包油乳液。该乳液系统的油相可选地包含可代谢的油。术语可代谢的油的含义已为本领域公知。可代谢的可被定义为“能够通过代谢转化的”(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25th edition (1974))。该油可以是任意植物油、鱼油、动物或人造油,其对受体没有毒性并能够通过代谢转化。坚果、种子和谷物是植物油的常见来源。人造有也是本发明的一部分,并可包括已有市售的油,例如 **NEOBEE®** 等。角鲨烯 (2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳己烯) 是一种不饱和油,其大量发现于鲨鱼肝油中,少量发现于橄榄油、麦胚油、米糠油和酵母中,并且是一种可用于本发明的油。角鲨烯是一种可代

谢的油,事实上它是胆固醇生物合成中的一种中间体 (Merck index, 10th Edition, entry no. 8619)。

[0176] 母育酚 (例如, 维生素 E) 也常被用在油乳液佐剂中 (EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210)。在本发明的油乳液 (任选地水包油乳液) 中所用的母育酚可参照 EP 0 382 271 B1 所述进行配制, 其中母育酚可作为母育酚液体的分散体, 任选地包含乳化剂, 任选地其直径小于 1 微米。替代性恶, 该母育酚可与另一种油联用, 以形成油乳液的油相。可与母育酚联用的油乳液的范例已在此处描述, 例如上述可代谢的油。

[0177] 水包油乳液本身已被建议用作佐剂组合物 (EP 0 399 843B), 此外水包油乳化和其它活性剂的组合也被描述为疫苗的佐剂 (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241)。其它的油乳液佐剂已被描述, 例如油包水乳液 (US 5, 422, 109; EP 0 480 982 B2) 和水包油乳液 (US 5, 424, 067; EP 0 480 981 B)。所有这些形成油乳液系统 (特别当结合了母育酚时), 以形成本发明的佐剂和组合物。

[0178] 在一个实施方式中, 该油乳液 (例如水包油乳液) 进一步包含乳化剂, 例如 TWEEN 80 和 / 或固醇 (如胆固醇)。

[0179] 在一个实施方式中, 该油乳液 (任选地水包油乳液) 包含可代谢的无毒性油, 例如角鲨烷、角鲨烯或生育酚如 α 生育酚 (以及可选地角鲨烯和 α 生育酚两者) 以及任选地包含乳化剂 (或表面活性剂) 如 Tween 80。还可包含固醇 (如胆固醇)。

[0180] 生产水包油乳液的方法已为本领域技术人员公知。该方法通常包括将含母育酚的油相与表面活性剂 (如 PBS/TWEEN80™ 溶液) 混合, 然后采用匀浆机匀浆化, 本领域技术人员显然了解将混合物两次通过注射器针头的方法可用于将小量液体匀浆化。同样地, 本领域技术人员可采用微射流仪 (M110S 微射流机器, 最大 50 次, 周期 2 分钟, 最大输入压力 6bar (输出压约 850bar)) 中的乳化过程来生成更小或更大体积的乳液。这种方法可通过包括测量所得乳液直至制备物达到所需直径的油滴的常规实验实现。

[0181] 在水包油乳液中, 该油和乳化剂应当在水性载体中。该水性载体可以是, 例如, 磷酸盐缓冲盐水。

[0182] 在稳定的水包油乳液中发现的油滴的大小任选地小于 1 微米, 可以在大约 30-600nm 范围内, 任选地直径大约为 30-500nm, 且任选地直径大约为 150-500nm, 特别是直径大约 150nm, 该直径可通过光子相关光谱学测定。就此而言, 数量上 80% 的油滴应在该范围内, 任选地数量上超过 90% 和任选地超过 95% 的油滴在指定的大小范围内。在本发明的油乳液中存在的成分如角鲨烯的量通常约油 (总剂量体积) 的 0.5-20% 或 2-10% 范围内; 当 α 生育酚存在时为 2-10%; 表面活性剂 (例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯) 为 0.3-3%。任选地油 (例如角鲨烯) : 母育酚 (例如 α -母育酚) 的比例等于或小于 1, 因为这提供了更稳定的乳液。乳化剂如 Tween80 或 Span 85 也可以约 1% 的水平存在。在部分情况下, 本发明的疫苗可有利地进一步包含稳定剂。

[0183] 乳液系统的范例描述于 WO 95/17210、WO 99/11241 和 WO 99/12565, 其中披露了基于角鲨烯、生育酚和 TWEEN 80, 任选地与免疫刺激剂 QS21 和 / 或 3D-MPL 配制的乳液佐剂。

[0184] 因此在本发明的一个实施方式中, 本发明的佐剂可额外地进一步包含免疫刺激剂, 例如 LPS 或其衍生物和 / 或皂甙。其它免疫刺激剂的范例在此处描述, 并描述

于“Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach”1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M. F., and Newman, M. J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X。

[0185] 在一个实施方式中,根据本发明的佐剂和免疫原性组合物在上述油乳液中包含皂甙(例如 QS21)和/或 LPS 衍生物(例如 3D-MPL),任选地具有固醇(例如,胆固醇)。此外,该油乳液(任选地水包油乳液)可包含 span 85 和/或卵磷脂和/或三辛酸甘油酯。包含水包油乳液、固醇和皂甙的佐剂描述于 WO 99/12565。

[0186] 典型地,用于向人施用,皂甙(例如 QS21)和/或 LPS 衍生物(例如 3D-MPL)在人用剂量的免疫原性组合物中的范围为每剂量 $1\ \mu\text{g}$ - $200\ \mu\text{g}$,例如 10 - $100\ \mu\text{g}$,或 $10\ \mu\text{g}$ - $50\ \mu\text{g}$ 。通常油乳液(任选地水包油乳液)将包含 2-10%可代谢油。任选地它将包含 2-10%角鲨烯,2-10% α 生育酚和 0.3-3% (任选地 0.4-2%) 乳化剂(任选地 tween 80[聚氧乙烯山梨醇单油酸酯])。当角鲨烯和 α 生育酚都存在时,任选地角鲨烯: α 生育酚的比例等于或小于 1,这提供了更稳定的乳液。Span 85(去水山梨糖醇三油酸酯)也可在本发明所用乳液中以 0.5-1%的水平存在。在部分情况下,本发明的免疫原性组合物和疫苗可有利地进一步包含稳定剂,例如其它乳化剂/表面活性剂,包括辛酸(merckindex 10th Edition, entry no. 1739),例如三辛酸甘油酯。

[0187] 当包含角鲨烯和皂甙(任选地 QS21)时,在配方中还可有利地包含固醇(任选地胆固醇),这允许减少乳液中油的总体水平。这带来了生产成本的下降,疫苗总体舒适性的提高,以及所得免疫应答的定性和定量改善,例如提高了 IFN- γ 生产。相应地,本发明的佐剂系统通常包含的可代谢的油:皂甙(w/w)比例范围为 200:1 至 300:1,此外本发明还可以“低油”方式使用,其任选的范围为 1:1 至 200:1,任选地 20:1 至 100:1,或者约 48:1,该疫苗保留了所有成分的有益佐剂性能,同时反应原性大大下降。相应地,部分实施方式中的角鲨烯:QS21(w/w)比例范围为 1:1 至 250:1,或 20:1 至 200:1,或 20:1 至 100:1,或约 48:1。任选地以此处所述的皂甙:固醇比例包含固醇(例如,胆固醇)。

[0188] 本发明的乳液系统任选地具有在亚微米范围内的小油滴大小。任选地该油滴直径将在 120-750nm 或 120-600nm 范围内。

[0189] 一种特别有效的佐剂配方(最终与 AlPO_4 在本发明的免疫原性组合物中合并)包含了皂甙(例如, QS21)、LPS 衍生物(例如 3D-MPL)和油乳液(例如含于水包油乳液的角鲨烯和 α 生育酚),其描述于 WO 95/17210 或 WO 99/12565(特别是实施例 2,表 1 中的佐剂配方 11)。

[0190] TLR 2 激动剂的范例包括肽聚糖或脂蛋白。咪唑啉,例如咪唑莫特和瑞唑莫德是已知的 TLR7 激动剂。单链 RNA 也是已知的 TLR 激动剂(人 TLR8 的和小鼠的 TLR7),而取链 RNA 和聚 IC(聚肌苷酸-聚胞苷酸,一种商业合成的病毒 RNA 模拟物)是示范性的 TLR 3 激动剂。3D-MPL 是 TLR4 激动剂的范例,而 CPG 是 TLR9 激动剂的范例。

[0191] 免疫原性组合物可包含吸附在金属盐上的抗原和免疫刺激剂。EP 0 576478 B1、EP 0 689 454 B1 和 EP 0 633 784 B1 描述了基于铝的疫苗制剂,在其颗粒上吸附了抗原和免疫刺激剂 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A(3D-MPL)。在这些情况下,抗原首先被吸附在铝盐上,然后将免疫刺激剂 3D-MPL 吸附到相同的铝盐颗粒上。该方法包括用超声在水浴中悬浮

3D-MPL,直至颗粒大小介于 80 和 500nm。该抗原通常在室温搅拌下在铝盐上吸附一小时。然后将 3D-MPL 悬浮液添加至吸附抗原,并将该配方在室温下孵育 1 小时,并在 4°C 下保存待用。

[0192] 在另一方法中,该免疫刺激剂和该抗原分别吸附在单独的金属颗粒上,如 EP 1126876 所述。这种改进的方法包括将免疫刺激剂吸附在金属盐颗粒上,然后将抗原吸附在另一金属盐颗粒上,然后混合分散的金属盐颗粒以形成疫苗。在本发明中所用的佐剂可以是包含吸附在金属盐颗粒上的免疫刺激剂的佐剂组合物,其特征在于该金属盐颗粒基本不含其它抗原。此外,本发明提供的疫苗的特征在于该免疫刺激剂被吸附在基本不含其它抗原的金属盐颗粒上,且该金属盐颗粒吸附至基本不含其它免疫刺激剂的抗原。

[0193] 相应地,本发明提供了包含免疫刺激剂的佐剂配方,其被吸附在金属盐颗粒上,特征在于该组合物基本不含其它抗原。此外,本发明的佐剂配方可以是中间体,如果采用该种佐剂时,疫苗的生产中需要该种中间体。相应地提供了一种生产疫苗的方法,其包括将一种或多种免疫刺激剂吸附在金属颗粒上的佐剂组合物与抗原相混合。任选地,该抗原已被预先吸附在金属盐上。所述的金属盐与吸附了免疫刺激剂的金属盐相同或类似。任选地,该金属盐为铝盐,例如磷酸铝或氢氧化铝。

[0194] 本发明进一步提供了疫苗组合物,其包含了第一金属盐颗粒上的免疫刺激剂,以及吸附在金属盐上的抗原,其特征在于该第一和第二金属盐颗粒是单独的颗粒。

[0195] 此处所述的 LPS 或 LOS 衍生物或突变体或脂质 A 衍生物被设计为别天然脂多糖具有更低的毒性(例如,3D-MPL),并对于此处所述的部分的任意用途而言是可以互换的等同物。

[0196] 在一个实施方式中,在本发明的组合物中所用的佐剂包含脂质载体(通过已知技术由磷脂(例如二油酰基磷脂酰胆碱 [DOPC])和可选地固醇[例如胆固醇]制备)。该种脂质载体可携带脂质 A 衍生物[例如 3D-MPL,-参见上文]和/或皂甙(例如 QS21 参见上文)。在一个实施方式中,该佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.1-10mg、0.2-7、0.3-5、0.4-2 或 0.5-1mg(e.g. 0.4-0.6、0.9-1.1、0.5 或 1mg) 磷脂(例如 DOPC)、0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3 或 0.125-0.25mg(例如 0.2-0.3、0.1-0.15、0.25or 0.125mg) 固醇(例如胆固醇)、5-60、10-50、or 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL) 以及 5-60、10-50 或 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 皂甙(例如 QS21)。

[0197] 该佐剂特别适用于老年疫苗制剂。在一个实施方式中,含有该佐剂的该疫苗组合物包含来自至少如下血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(还可包含一种或多种来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或者所有)疫苗成分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Prevnar®**疫苗诱导的相应效价。

[0198] 在一个实施方式中,本发明的组合物中所用的佐剂包含由可代谢的油(例如角鲨烯)、乳化剂(例如 Tween 80)和任选地生育酚(例如 α 生育酚)制成的水包油乳液。在一个实施方式中,该佐剂包含(每 0.5mL 剂量)0.5-15、1-13、2-11、4-8 或 5-6mg(例如 2-3、5-6 或 10-11mg) 可代谢的油(如角鲨烯)、0.1-10、0.3-8、0.6-6、0.9-5、1-4 或 2-3mg(例如 0.9-1.1、2-3 或 4-5mg) 乳化剂(如 Tween 80) 以及任选地 0.5-20、1-15、2-12、4-10、

5-7mg(例如 11-13、5-6 或 2-3mg) 母育酚(如 α 生育酚)。

[0199] 该佐剂可任选地进一步包含 5-60、10-50 或 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

[0200] 这些佐剂特别适于婴儿或老年疫苗制剂。在一个实施方式中,含有该佐剂的该疫苗组合物包含来自至少如下血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(还可包含一种或多种来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或者所有)疫苗成分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的相应效价。

[0201] 该佐剂可任选地包含 0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3 或 0.125-0.25mg(例如 0.2-0.3、0.1-0.15、0.25 或 0.125mg) 固醇(例如胆固醇)、5-60、10-50 或 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL) 以及 5-60、10-50 或 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 皂甙(例如 QS21)。

[0202] 该佐剂特别适用于老年疫苗制剂。在一个实施方式中,含有该佐剂的该疫苗组合物包含来自至少如下血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(还可包含一种或多种来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或者所有)疫苗成分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的相应效价。

[0203] 在一个实施方式中,用于本发明组合物的该佐剂包含磷酸铝和脂质 A 衍生物(如 3D-MPL)。该佐剂可包含(每 0.5mL 剂量)100-750、200-500、400-500 或 300-400 μ g Al(磷酸铝)以及 5-60、10-50 或 20-30 μ g(例如 5-15、40-50、10、20、30、40 或 50 μ g) 脂质 A 衍生物(例如 3D-MPL)。

[0204] 该佐剂特别适用于老年或婴儿疫苗制剂。在一个实施方式中,含有该佐剂的该疫苗组合物包含来自至少如下血清型的糖缀合物:4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(还可包含一种或多种来自血清型 3、6A、19A 和 22F 的糖缀合物),其中在人类接种者中针对一种或多种(或者所有)疫苗成分 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 诱导的 GMC 抗体效价不明显低于由 **Pprevnar®** 疫苗诱导的相应效价。

[0205] 包含该疫苗制备物的本发明的免疫原性组合物可通过经全身或粘膜途径施用所述疫苗的方式保护或治疗易受传染的哺乳动物。这些施用可包括通过肌肉内(IM)、腹膜内(IP)、皮内(ID)或皮下(SC)途径注射;或通过粘膜施用至口腔/消化道、呼吸道、泌尿生殖道。通过鼻内(IN)施用疫苗治疗肺炎或中耳炎是可能的(因为肺炎双球菌的鼻咽运输能被更有效的预防,从而在其最早的阶段减少感染)。尽管本发明的疫苗可作为单个剂量施用,其成分也可同时或不同时共同施用(例如肺炎球菌糖缀合物可在该疫苗的任何细菌蛋白成分的施用同时或 1-2 周后单独施用,以最佳最佳协调彼此的免疫应答)。对于同时施用,任选地 Th1 佐剂可存在于任意或所有的不同施用中。处理单途径施用,可采用 2 种不同的施用途径。例如,糖或糖缀合物可 IM(或 ID)施用,而细菌蛋白可 IN(或 ID)施用。此外,本发明的疫苗可 IM 施用初次剂量,IN 施用促升剂量。

[0206] 在疫苗中的蛋白抗原含量通常在 1-100 μ g 范围内,任选地在 5-50 μ g 范围内,例如在 5-25 μ g 范围内。在初次接种后,对象可以充分的间隔接受一次或多次促升接种。

[0207] 疫苗制备总体描述于疫苗设计中(“The subunit and adjuvant approach”(eds

Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York)。Fullerton 的美国专利 US 4, 235, 877 描述了在脂质体中的胶囊化。

[0208] 本发明的疫苗或免疫原组合物可被贮存在溶液中或被冻干。在一个实施方式中, 该溶液在作为无定形冻干保护剂的糖 (例如蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖或者乳糖) 的存在下被冻干。在一个实施方式中, 该溶液在作为无定形冻干保护剂的糖以及提供改善的饼结构的填充剂 (例如甘氨酸或甘露糖醇) 的存在下被冻干。结晶填充剂的存在允许在高盐浓度存在下缩短冷冻干燥周期。用于本发明的免疫原性组合物或疫苗的冷冻干燥的该种混合物的范例包括蔗糖 / 甘氨酸、海藻糖 / 甘氨酸、葡萄糖 / 甘氨酸、甘露糖 / 甘氨酸、麦芽糖 / 甘氨酸、蔗糖 / 甘露糖醇 / 海藻糖 / 甘露糖醇、葡萄糖 / 甘露糖醇、甘露糖 / 甘露糖醇和麦芽糖 / 甘露糖醇。典型的两种组分的摩尔比例任选地为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 或 1 : 6。本发明的免疫原性组合物任选地包含上述冻干试剂。

[0209] 上述稳定剂和稳定剂的混合物可以进一步包含能够提高制剂的玻璃转化温度 (T_g') 的聚合物如聚 (乙烯 - 吡咯烷酮) (PVP)、羟乙基淀粉或葡聚糖, 或者作为结晶填充剂的聚合物如分子量介于 1500 和 6000 的聚乙二醇 (PEG) 和葡聚糖。

[0210] 本发明的免疫原性组合物任选地冻干并在使用前临时复原。冻干可导致更稳定的组合物 (疫苗), 并可能导致在 3D-MPL 存在下和铝基佐剂缺失下更高的抗体效价。

[0211] 在本发明的一个方面提供了疫苗试剂盒, 其包含了含有本发明的免疫原性组合物 (任选地呈冻干形式) 的小瓶, 并进一步包含含有此处所述的佐剂的小瓶。在本发明的该方面预想, 该佐剂将被用于复原该冻干的免疫原性组合物。

[0212] 尽管本发明的疫苗可通过任意途径施用, 所述疫苗施用至皮肤 (ID) 形成了本发明的一个实施方式。人类的皮肤包含了外部“角质”表皮, 被称为角质层, 其覆盖了表皮。在表皮下是一个成为真皮的层, 其进而覆盖了皮下组织。研究人员已经显示将疫苗注射进入皮肤, 特别是真皮时, 可刺激免疫应答, 这还伴随了多种额外的优点。以此处所述的疫苗进行皮内疫苗接种形成了本发明的任选特征。

[0213] 皮内注射的常规技术“mantoux 步骤”包括清洁皮肤, 然后伸展一只手, 用窄轨针头 (26-31 号) 的斜面向上, 将针头以介于 $10-15^\circ$ 的角度插入。当针头的斜面插入时, 针头的圆筒部分下降, 进一步插入同时提供略微的压力使其在皮肤下抬升。然后极为缓慢地注射液体, 从而在皮肤表面形成疱或肿块, 然后缓慢退出针头。

[0214] 最近, 已描述了特别设计用于将液体药剂施用至皮肤或透过皮肤的装置, 例如, 在 WO 99/34850 和 EP 1092444 中描述的装置, 以及在例如 W001/13977 ; US 5, 480, 381, US 5, 599, 302, US 5, 334, 144, US 5, 993, 412, US 5, 649, 912, US 5, 569, 189, US 5, 704, 911, US 5, 383, 851, US 5, 893, 397, US 5, 466, 220, US 5, 339, 163, US 5, 312, 335, US 5, 503, 627, US 5, 064, 413, US 5, 520, 639, US 4, 596, 556, US 4, 790, 824, US 4, 941, 880, US 4, 940, 460, WO 97/37705 和 WO 97/13537 中描述的快速注射装置。替代性地皮内施用疫苗制剂的方法包括常规的注射器和针头, 或者设计用于冲击传递固体疫苗的装置 (W099/27961), 或者透皮贴剂 (WO 97/48440 ; WO 98/28037) ; 或者应用于皮肤表面 (经真皮或经表皮传递 WO 98/20734 ; WO 98/28037)。

[0215] 当本发明的疫苗被施用至皮肤时, 或者更具体而言被施用至真皮时, 该疫苗具有较少的液体体积, 特别是介于约 0.05ml 和 0.2ml 的体积。

[0216] 本发明的皮肤或皮内疫苗中抗原的含量类似于肌肉疫苗中的常规剂量（见上文）。然而，皮肤或皮内疫苗的一个特征在于该制剂可能是“低剂量的”。相应的，该“低剂量”疫苗中的蛋白抗原任选地以低至每剂量 0.1-10 μg 或 0.1-5 μg 存在；且该糖（任选地糖缀合物）抗原可以每剂量 0.01-1 μg 或 0.01-0.5 μg 存在。

[0217] 此处所用的术语“皮内传递”指将疫苗传递至皮肤的真皮区域。然而，该疫苗并不必须仅处于真皮中。真皮是皮肤内从人皮肤表面约 1.0 和 2.0mm 的层，但它随着个体和身体的不同部位有着一定程度的变化。总体而言，预计在皮肤表面以下 1.5mm 可达到真皮。真皮位于表面的角质层和表皮与下方的皮下层之间。根据传递的模式，该疫苗最终可唯一或主要存在于真皮中，或者最终分布在表皮和真皮内。

[0218] 本发明进一步提供了用于预防或缓解由流感嗜血杆菌引起的中耳炎的改良疫苗，该改良疫苗通过添加流感嗜血杆菌蛋白例如缀合形式的蛋白 D 得到。此外，本发明进一步提供了用于预防或缓解婴儿肺炎球菌感染（例如，中耳炎）的改良疫苗，其通过向本发明的肺炎链球菌缀合物组合物添加一种或两种作为游离或缀合蛋白的肺炎球菌蛋白得到。所述肺炎球菌游离蛋白可与用作载体蛋白的任意肺炎链球菌蛋白相同或不同。一种或多种粘膜莫拉菌蛋白抗原可以游离或缀合形式包含在组合疫苗中。因此，本发明是一种诱发针对婴儿中耳炎的（保护性）免疫应答的改良方法。

[0219] 在另一实施方式中，本发明是通过施用安全和有效量的本发明的疫苗 [儿科疫苗] 诱发婴儿（在本发明的上下文中定义为 0-2 岁大）的（保护性）免疫应答的改良方法。本发明进一步的实施方式包括准备本发明的抗原性肺炎链球菌缀合物组合物以用于药物，以及本发明的肺炎链球菌缀合物在生产用于预防（或治疗）肺炎球菌疾病的药物中的应用。

[0220] 在另一实施方式中，本发明是一种通过施用安全和有效量的本发明的疫苗、任选地结合一种或两种作为游离或缀合蛋白肺炎链球菌蛋白（其中游离肺炎链球菌蛋白可与此处用作载体蛋白的任意肺炎链球菌蛋白相同或不同），诱发老年人群（在本发明的上下文中定义为 50 岁或更大，通常超过 55 岁，更通常超过 60 岁）的（保护性）免疫应答的改良方法。

[0221] 本发明的进一步的方面是一种针对肺炎链球菌和任选地流感嗜血杆菌引起的疾病免疫人类宿主的方法，其包括向该宿主施用免疫保护剂量的本发明的免疫原性组合物或疫苗或试剂盒。

[0222] 本发明的进一步的方面是用于治疗或预防由肺炎链球菌和任选地流感嗜血杆菌感染引起的疾病的本发明的免疫原性组合物。

[0223] 本发明进一步的方面是本发明的免疫原性组合物或疫苗或试剂盒在生产用于治疗或预防由肺炎链球菌和任选地流感嗜血杆菌感染引起的疾病的药物中的用途。

[0224] 此处的术语“包含”、“包括”“含有”在每种情况下可任选地分别被术语“由……组成”所取代。

[0225] 涉及本发明的“疫苗组合物”的实施方式同样适用于涉及本发明“免疫原性组合物”的实施方式，反之亦然。

[0226] 在本发明说明书中所引用的所有参考文献或专利申请均引入作为参考。

[0227] 为使本发明被更好地理解，列举了以下实施例。这些实施例仅用于阐述，不应解释

为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0228] 实施例 1 :蛋白 D 的表达

[0229] 流感嗜血杆菌蛋白 D

[0230] 蛋白 D 表达的遗传构建

[0231] 起始材料

[0232] 蛋白 D 编码 DNA

[0233] 蛋白 D 在所有血清型和不可分型菌株的流感嗜血杆菌之间高度保守。含有编码完整蛋白 D 基因的 DNA 序列的载体 pHIC348 已从瑞典 **Malmö** 的 **Malmö** 综合医院, Lund 大学医学微生物部的 A. Forsgren 博士处获得。蛋白 D 的 DNA 序列已由 Janson 等人 (1991) Infect. Immun. 59 :119-125 公开。

[0234] 表达载体 pMG1

[0235] 表达载体 pMG1 是一种 pBR322 衍生物 (Gross 等人, 1985), 其中导入了来自噬菌体 λ 的用于外源插入基因转录和翻译的控制元件 (Shatzman 等人, 1983)。此外, 氨苄青霉素抗性基因与卡那霉素抗性基因相交换。大肠杆菌菌株 AR58

[0236] 大肠杆菌菌株 AR58 可通过以预先在 SA500 衍生物上生长的 P1 噬菌体储液转导 N99 后生成 (galE::TN10, lambdaKil⁻cI857 Δ H1)。N99 和 SA500 是来自国立卫生研究院的 Martin Rosenberg 博士实验室的大肠杆菌 K12 菌株。

[0237] 表达载体 pMG 1

[0238] 为了生产蛋白 D, 编码该蛋白的 DNA 被克隆进入表达载体 pMG 1。该质粒采用了来自 lambda 噬菌体 DNA 的信号来推动插入外源基因的转录和翻译。该载体包含启动子 PL、操纵子 OL 和两个使用位点 (NutL 和 NutR) 以接受 N 蛋白被提供时的转录极性效应。包含该 PL 启动子的载体被导入大肠杆菌溶源性宿主, 以稳定质粒 DNA。溶源性宿主菌株包含整合进入基因组的复制缺陷型 lambda 噬菌体 DNA (Shatzman 等人, 1983)。染色体的 lambda 噬菌体 DNA 引导与载体的 OL 阻遏物结合的 cI 阻遏蛋白的合成, 并防止 RNA 聚合酶结合至 PL 启动子从而转录插入基因。表达菌株 AR58 的 cI 基因包含温度敏感性突变体, 从而使 PL 引导的转录可被温度变化调节, 即, 培养温度的上升可使阻遏物失活, 并启动外援蛋白的合成。这种表达系统允许外源蛋白 (特别是对细胞可能有毒性的那些蛋白) 的受控合成 (Shimatoka & Rosenberg, 1981)。

[0239] 大肠杆菌菌株 AR58

[0240] 用于生产蛋白 D 载体的 AR58 溶源性大肠杆菌菌株是标准 NIH 大肠杆菌 K12 菌株 N99 的衍生物 (F⁻su⁻galK2, lacZ⁻thr⁻)。它包含了缺陷型溶源性 lambda 噬菌体 (galE::TN10, lambdaKil⁻cI857 Δ H1)。Kil⁻表型可阻止宿主大分子合成的切断。cI857 突变赋予了 cI 阻遏蛋白温度敏感性损伤。 Δ H1 缺失去除了 lambda 噬菌体右操纵子和宿主 bio、uvr3 和 chlA 基因座。AR58 菌株可通过以预先在 SA500 衍生物上生长的 P1 噬菌体储液转导 N99 后生成 (galE::TN10, lambdaKil⁻cI857 Δ H1)。缺陷型溶源体导入 N99 中可采用四环素通过邻近 galE 基因的编码四环素抗性的 TN10 转座子的存在进行选择。

[0241] 载体 pMGMDPPrD 的构建

[0242] 包含编码流感病毒非结构 S1 蛋白的基因的 pMG 1 载体 (pMGNSI) 被用于构建 pMGMDPPrD。蛋白 D 基因通过 PCR 从 pHIC348 载体扩增 (Janson 等人 1991 Infect. Immun. 59 : 119-125), 其中采用了在 5' 和 3' 端分别包含了 NcoI 和 XbaI 限制性位点的 PCR 引物。该 NcoI/XbaI 片段随后被导入 NcoI 和 XbaI 之间的 pMGNSI, 从而创建了含有后接 PD 蛋白的 NS1 蛋白的 N 末端 81 氨基酸的融合蛋白。该载体被标记为 pMGNS1PrD。

[0243] 基于上述构建体, 生成了用于蛋白 D 表达的最终构建体。从 pMGNS1PrD 去除 BamHI/BamHI 片段。该 DNA 水解去除 NS1 编码区 (除了前三个 N 末端残基)。再次连接载体时, 生成了具有 WO 07/71711 第 44 页实施例 1 所示序列的编码融合蛋白的基因。

[0244] 蛋白 D 不包含通常连接了脂质链的前导肽或 N 末端半胱氨酸。因此该蛋白既不分泌进入周质, 也不脂化, 而是以可溶形式保留在细胞质中。

[0245] 最终的构建体 pMG-MDPPrD 通过 37°C 下热休克导入 AR58 宿主株。含质粒的细菌可在卡那霉素存在下进行选择。蛋白 D 编码 DNA 插入物的存在可通过采用选定的内切核酸酶消化分离的质粒 DNA 进行证实。该重组大肠杆菌菌株被称为 ECD4。

[0246] 蛋白 D 的表达受到 λP_L 启动子 / O_L 操纵子的控制。宿主株 AR58 在基因组中包含了温度敏感型 cI 基因, 其通过与 O_L 结合在低温下阻断 λP_L 的表达。一旦温度升高, cI 从 O_L 释放, 蛋白 D 被表达。

[0247] 小规模制备

[0248] 在发酵末期, 该细胞被浓缩并冷冻。

[0249] 从收获细胞的提取和蛋白 D 的纯化按照如下进行。将冷冻的细胞培养物团解冻, 并重悬浮于细胞破坏溶液 (柠檬酸缓冲液 pH 6.0) 中, 至最终 $OD_{650} = 60$ 。将悬浮液在 $P = 1000\text{bar}$ 下两次通过高压匀浆机。离心澄清细胞培养匀浆液, 通过过滤去除细胞碎片。在第一纯化步骤中, 过滤的细胞溶解物被应用至阳离子交换层析柱 (SP Sepharose Fast Flow)。PD 通过离子相互作用结合至凝胶基质, 并通过增加洗脱缓冲液的离子强度的步骤来洗脱。

[0250] 在第二纯化步骤中, 杂质被保留在阴离子交换基质 (Q Sepharose FastFlow) 上。PD 不与凝胶结合, 并可在流出液中收集。

[0251] 在两个柱层析步骤中, 通过 OD 监测收集的组分。用超滤浓缩通过该阴离子交换柱层析的含有纯化蛋白 D 的流出液。

[0252] 将含有蛋白 D 的超滤保留物最终通过 $0.2 \mu\text{m}$ 膜。

[0253] 大规模制备

[0254] 从收获细胞的提取和蛋白 D 的纯化按照如下进行。冷却收集的肉汤, 直接在约 800 的压力下两次通过高压匀浆机。

[0255] 在第一纯化步骤中, 细胞培养匀浆液被稀释并被应用至阳离子交换层析柱 (SP Sepharose Big beads)。PD 通过离子相互作用结合至凝胶基质, 通过增加洗脱缓冲液的离子强度的步骤来洗脱并过滤。

[0256] 在第二纯化步骤中, 杂质被保留在阴离子交换基质 (Q Sepharose FastFlow) 上。PD 不与凝胶结合, 并可在流出液中收集。

[0257] 在两个柱层析步骤中, 通过 OD 监测收集的组分。用超滤浓缩通过该阴离子交换柱层析的含有纯化蛋白 D 的流出液并进行渗透。

- [0258] 将含有蛋白 D 的超滤留物最终通过 0.2 μm 膜。
- [0259] 实施例 1b :PhtD 的表达
- [0260] PhtD 蛋白是肺炎球菌组氨酸三联体 (Pht) 蛋白家族的成员,其特征在于组氨酸三联体 (HXXHXH 基序) 的存在。PhtD 是一个 838aa- 的分子,并携带 5 个组氨酸三联体 (参见 MedImmune W000/37105 的氨基酸序列 SEQ ID NO :4 和 DNA 序列 SEQ ID NO :5)。PhtD 还在中部 (氨基酸位置 348-380) 含有富脯氨酸区。PhtD 具有带 LXXC 基序的 20aa-N- 末端信号序列。
- [0261] 遗传构建体
- [0262] 成熟 MedImmune PhtD 蛋白的基因序列 (从 aa 21 至 aa 838) 通过携带 pλ 启动子的内部 pTCMP14 载体重组转移至大肠杆菌。该大肠杆菌宿主菌株为 AR58,其携带了 cI857 热敏感性阻遏物,允许启动子的热诱导。
- [0263] 实施聚合酶链式反应以从 MedImmune 质粒 (携带来自肺炎链球菌菌株 Norway 4(血清型 4) 的 phtD 基因 -W0 00/37105 中所述的 SEQ ID NO :5) 扩增 phtD 基因。仅特异性针对 phtD 基因的引物被用于扩增两个片段中的 phtD 基因。引物携带 NdeI 和 JKpnI 或者 KpnI 和 XbaI 限制性位点。这些引物不与除了 phtD 特异性基因序列外的载体的任何核苷酸杂交。人工 ATG 起始密码子可采用携带 NdeI 限制性位点的第一引物插入。然后将所生成的 PCR 产物插入 pGEM-T 克隆载体 (Promega),并确认该 DNA 序列。然后采用标准技术对 TCMP14 表达载体中的片段亚克隆,然后将载体转化进入 AR58 大肠杆菌。
- [0264] PhtD 纯化
- [0265] PhtD 纯化按如下方式实现:
- [0266] 在卡那霉素存在下生长大肠杆菌细胞:在 30°C 下生长 30 小时,然后在 39.5°C 下诱导 18 小时
- [0267] 在 EDTA 5mM 和作为蛋白酶抑制剂的 PMSF 2mM 存在下从 OD±115 全培养物破裂大肠杆菌细胞:Rannie,2 代,1000bars。
- [0268] 在室温下 (20°C) 在膨胀床模式 Streamline Q XL 色谱上进行抗原捕获和细胞碎片去除,用 NaCl 150mM+Empigen 0.25% pH6.5 洗柱,并用含于 pH7.4 的 25mM 磷酸钾缓冲液的 NaCl 400mM+Empigen 0.25%洗脱。
- [0269] 在 Sartobran 150 柱体 (0.45+0.2 μm) 上过滤
- [0270] 在 4°C 下 5mM 咪唑存在下于 pH7.4 下将抗原结合在 Zn⁺⁺ 螯合 Sepharose FF IMAC 色谱上;用咪唑 5mM 和 Empigen 1%洗柱,并用 50mM 咪唑洗脱,两者均在 pH8.0 的 25mM 磷酸钾缓冲液中。
- [0271] 在 4°C 下于 pH8.0 (25mM 磷酸钾) 的 Fractogel EMD DEAE 上以正电荷模式进行弱阴离子交换色谱;用 140mM NaCl 洗柱,并用 200mM NaCl 洗脱,同时污染物 (蛋白和 DNA) 保持吸附在交换剂上。
- [0272] 在 50kDa 膜上用 pH7.15 的 2mM Na/K 磷酸盐浓缩和超滤。
- [0273] 在 Millipak-20 0.2 μm 过滤筒上对纯化物进行无菌过滤。
- [0274] 实施例 1c :肺炎球菌溶血素的表达
- [0275] 肺炎球菌的肺炎球菌溶血素可参照 W02004/081515 和 W02006/032499 所述进行制备和解毒。

[0276] 实施例 2：

[0277] 缀合物制备

[0278] 本领域公知如何制备纯化的肺炎球菌多糖。针对这些实施例的目的,这些多糖主要参照 EP072513 所述或通过密切相关的方法制备。在缀合之前,该多糖可通过如下所述的微射流进行大小处理。

[0279] 活化和偶联条件对每种多糖均为特定。这些条件在表 1 中给出。将大小处理的多糖(除 PS5、6B 和 23F)溶解于 NaCl 2M、NaCl 0.2M 或水中以进行注射(WFI)。对所有血清型评估最佳多糖浓度。如下文具体描述,除血清型 18C 外的所有血清型直接缀合至载体蛋白。制备了两种替代型的血清型 22F 缀合物;一种直接缀合,一种通过 ADH 接头缀合。

[0280] 从含于乙腈或乙腈/水 50%/50%溶液的 100mg/ml 储备液中,将 CDAP(CDAP/PS 比例 0.5-1.5mg/mg PS)添加至多糖溶液。1.5 分钟后,添加 0.2M-0.3M NaOH 以获得特定的活化 pH。多糖的活化可在该 pH 下于 25°C 下在 3 分钟内进行。将纯化蛋白(蛋白 D、PhtD、肺炎球菌溶血素或 DT)(其数量取决于初始 PS/载体蛋白比例)添加至活化多糖,经 pH 调节在特定 pH 下进行偶联反应达 2 小时(取决于血清型)。为了淬灭未反应的氰酸酯基团,向混合物中添加 2M 甘氨酸溶液。将 pH 调节至淬灭 pH(pH9.0)。将所述溶液在 25°C 下搅拌 30 分钟,然后在 2-8°C 下连续缓慢搅拌过夜。

[0281] 18C 的制备:

[0282] 将 18C 通过接头-己二酸双胍(ADH)连接至载体蛋白

[0283] 在缀合前对多糖血清型 18C 进行微射流。

[0284] 以 EDAC 衍生破伤风类毒素

[0285] 对于破伤风类毒素的衍生,在 0.2M NaCl 中稀释纯化 TT 至 25mg/ml,并添加 ADH 间隔基以达到最终浓度 0.2M。当间隔基的溶解完全时,将 pH 调节至 6.2。然后加入 EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺)以达到最终浓度 0.02M,将混合物在 pH 调节下搅拌 1 小时。通过在 25°C 下将 pH 升至 9.0 至少 30 分钟终止缩合反应。

[0286] 然后渗滤(10kDa CO 膜)衍生化 TT,从而去除残留 ADH 和 EDAC 试剂。

[0287] TT_{AH} 整体最终无菌过滤直至偶联步骤,并在 -70°C 下贮存。

[0288] 将 TT_{AH} 化学偶联至 PS 18C

[0289] 详细缀合参数可参见表 1。

[0290] 将 2 克微射流 PS 在水中稀释至指定浓度,并通过添加 NaCl 粉末调节至 2M NaCl。

[0291] 添加 CDAP 溶液(100mg/ml,在 50/50v/v 乙腈/WFI 中新鲜制备)至达到合适的 CDAP/PS 比例。

[0292] 通过添加 0.3M NaOH 将 pH 升高至活化 pH9.0,并在该 pH 下稳定至添加 TT_{AH}。

[0293] 3 分钟后,添加衍生 TT_{AH}(20mg/ml,含于 0.2M NaCl)至 TT_{AH}/PS 比例为 2;将 pH 调节至偶联 pH9.0。将溶液在 pH 调节下保持一小时。

[0294] 向混合物 PS/TT_{AH}/CDAP 添加 2M 甘氨酸溶液以淬灭。

[0295] 将 pH 调节至淬灭 pH(pH9.0)。

[0296] 将溶液在 25°C 下搅拌 30 分钟,然后在 2-8°C 下连续缓慢搅拌过夜。

[0297] PS22F_{AH}-PhtD 缀合物

[0298] 在该糖的第二种缀合方法中(第一种为表 1 所示的直接 PS22-PhtD 缀合法),通

过接头 - 己二酸双胍 (ADH) 将 22F 连接至载体蛋白。在缀合前对多糖血清型 22F 进行微射流。

[0299] PS 22F 衍生

[0300] 在温控水浴中在 25°C 连续搅拌下进行活化和偶联。

[0301] 稀释微射流 PS22F 以获得在 0.2M NaCl 中的 6mg/ml 的最终 PS 浓度, 并用 0.1N HCl 将该溶液调节至 pH6.05 ± 0.2。

[0302] 添加 CDAP 溶液 (100mg/ml, 在 50/50 乙腈 /WFI 中新鲜制备) 至达到合适的 CDAP/PS 比例 (1.5/1ww)。

[0303] 通过添加 0.5M NaOH 将 pH 升高至活化 pH9.00 ± 0.05, 并在该 pH 下稳定至添加 ADH。

[0304] 3 分钟后, 添加 ADH 以达到合适的 ADH/PS 比例 (8.9/1w/w); 将 pH 调节至偶联 pH9.0。将溶液在 pH 调节下保持一小时。

[0305] 浓缩并渗滤该 PS_{AH} 衍生物。

[0306] 偶联

[0307] 将含有 0.2M NaCl 的 10mg/ml PhtD 添加至 PS22F_{AH} 衍生物, 以使 PhtD/PS22F_{AH} 比例为 4/1 (w/w)。用 HCl 将 pH 调节至 5.0 ± 0.05。在 10 分钟内人工添加 (250 μ l/min) EDAC 溶液 (20mg/ml, 含有 0.1M Tris-HCl, pH7.5) 以达到 1mg EDAC/mg PS22F_{AH}。在 25°C 搅拌和 pH 调节下将所得溶液孵育 150 分钟 (尽管也使用 60 分钟)。通过添加 1M Tris-HCl pH7.5 (最终体积的 1/10) 中和该溶液, 并在 25°C 下保持 30 分钟。

[0308] 在 Sephacryl S400HR 上洗脱前, 使用 5 μ m Minisart 过滤器澄清缀合物。

[0309] 所得缀合物的最终 PhtD/PS 比例为 4.1 (w/w), 游离 PS 含量低于 1%, 抗原性 (α-PS/α-PS) 36.3%, 抗-PhtD 抗原性 7.4%。蛋白和多糖比例的测定采用 Lowry 和 Resorcinol 法进行, 抗原性采用夹心 ELISA 进行测定。

[0310] 缀合物纯化:

[0311] 采用以 0.15M NaCl 平衡的 Sephacryl S400HR 凝胶过滤柱 (18C 采用 S500HR) 对缀合物进行凝胶过滤纯化以去除小分子 (包括 DMAP) 和未结合的 PS 和蛋白。基于反应成分的不同分子大小, PS-PD、PS-TT、PS-PhtD、PS-肺炎球菌溶血素或 PS-DT 缀合物被首先洗脱, 然后是游离 PS, 然后为游离 PD 或游离 DT, 最后为 DMAP 和其它盐 (NaCl, 甘氨酸)。

[0312] 含有缀合物的组分可通过 UV_{280nm} 检测。根据它们的 K_d 汇集组分, 无菌过滤 (0.22 μ m) 并在 +2-8°C 下贮存。测定缀合物制剂中的 PS/蛋白比例。

[0313] PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/TT/DT/PhtD/Ply 缀合物的特定活化 / 偶联 / 淬灭条件 “μ fluid” 在表头中出现时表示该糖在缀合前通过微射流调节大小。微射流后的糖的大小在表 2 中给出。

[0314] 表 1 PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/TT/DT/PhtD/Ply 缀合物的特定活化 / 偶联 / 淬灭条件

[0315]

血清型	1 μ fluid	4 μ fluid	5	6A	6B	7F μ fluid
PS 浓度 (mg/ml)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS 溶解	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
初始 PD/PS 比例 (w/w)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
$pH_a = pH_c = p$ H_d	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

[0316]

血清型	9V μ fluid	14 μ fluid	18C μ fluid	19A μ fluid	19F μ fluid	22F μ fluid	23F
PS 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
载体蛋白 浓度 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	10.0 (P1y)	20.0 (DT)	10.0 (PhtD)	5.0
初始载体 蛋白 /PS 比例 (w/w)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP 浓 度 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH _a = pH _c = pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/ 9.0

[0317]

[0318] 注 :pHa、c、q 分别对应于活化、偶联和淬灭 pH

[0319] 鉴别 :

[0320] 每种缀合物均经过鉴别并满足了表 2 中所述的规格。多糖含量 ($\mu\text{g/ml}$) 通过 Resorcinol 测试检测, 蛋白含量 ($\mu\text{g/ml}$) 通过 Lowry 测试检测。最终的 PS/PD 比例 (w/w) 通过浓度的比例确定。

[0321] 游离多糖含量 (%) :

[0322] 在 4°C 下保存或在 37°C 下贮存 7 天的缀合物的游离多糖含量可在与 α -载体蛋白抗体和饱和硫酸铵孵育后离心所得的上清液中测定。

[0323] 在上清液中游离多糖的定量采用 α -PS/ α -PS ELISA。不含缀合物还作为 α -载体蛋白/ α -PS ELISA 的对照。

[0324] 抗原性 :

[0325] 在相同缀合物上的抗原性可在夹心型 ELISA 中分析, 其中抗体的捕获和检测分别为 α -PS 和 α -蛋白。

[0326] 游离蛋白含量 (%) :

[0327] 未缀合的载体蛋白可在纯化步骤中从缀合物中分离。游离残留蛋白的含量可在分子排阻色谱 (TSK 5000-PWXL) 后通过 UV 检测 (214nm) 进行测定。洗脱条件允许分离游离载体蛋白和缀合物。然后相对校正曲线测定在大量缀合物中的游离蛋白含量 (0-50 $\mu\text{g/ml}$ 载体蛋白)。以 % 表示的游离载体蛋白参照如下获得 : % 游离载体 = (游离载体 ($\mu\text{g/ml}$)/ (通过 Lowry 测定的相应载体蛋白总浓度 ($\mu\text{g/ml}$) * 100%)。

[0328] 稳定性 :

[0329] 在 HPLC-SEC 凝胶过滤 (TSK 5000-PWXL) 上对 4°C 下保存和在 37°C 下贮存 7 天的缀合物测定分子量分布 (K_{av}) 和稳定性。

[0330] 10/11/13/14- 价鉴别在表 2 中给出 (参见下方的注释)。

[0331] 蛋白缀合物可被吸附在磷酸铝上, 并汇集形成最终的疫苗。

[0332] 表 2- 缀合物的特性

缓合物	PS 大小 (Dax10 ³)	载体 /PS 比 例	游离 PS (Elisa)	游离载 体	PS 抗原 性 (Elisa)	缓合物 大小 (kDa)
PS1-PD	349- 382*	1.5-1.6	1.0%- 1.2%	3.9%- 4.8%	87%- 95%	1499 - 1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7- 6.5%	3.2%- 4.0%	90%- 96%	1303 - 1606
PS5- PD***	367-443	0.80	8.7- 11.2%	2.2%- 3.8%	93%- 108%	1998- 2352
PS6A- PD	1100- 1540	0.61	4.5%	ND	45.9%	ND
PS6B- PD***	1069- 1391	0.7-0.8	1.3- 1.6%	<2.0%	68%- 75%	4778- 5235
PS7F- PD	255- 264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907- 4452
PS9V- PD	258- 280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%- 69%	9073- 9572
PS14-PD	232- 241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430- 3779
PS18C- TT	89-97*	2.2-2.4	1.5- 2.2%	<4%	46%- 56%	5464- 6133
PS19A-	151	3.2	<1%		29%	

[0333]

	Ply*					
	PS19F- DT	133- 143*	1.4-1.5	4.1%- 5.9%	<1.2%- <1.3%	82%- 88%
[0334]	PS22F- PhtD*	159-167	2.17	5.8	ND	37% ND
	PS22F- AHPhtD*159-167		3.66- 4.34	<1%	ND	28-31% ND
	PS23F- PD***	914-980	0.5	1.4- 1.9%	3.7%- 4.9%	137%- 154% 2933- 3152

[0335] *天然 PS 微射流后的 PS 大小

[0336] ***未进行大小处理的多糖

[0337] ND- 未测定

[0338] 10 价疫苗可通过将血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 混合缀合物（例如，每人剂量分别采用 1、3、1、1、1、1、3、3、1 μ g 糖）后制备得到。11 价疫苗可通过进一步添加表 5 中的血清型 3 缀合物（例如每人剂量添加 1 μ g 糖）制备得到。13 价疫苗可通过进一步添加上述血清型 19A 和 22F 缀合物（22F 既可直接连接至 PhtD，也可通过 ADH 接头连接）[例如每人剂量添加 3 μ g 的每种糖] 制备得到。14 价疫苗可通过进一步添加上述血清型 6A 缀合物 [例如每人剂量添加 1 μ g 糖] 制备得到。

[0339] 实施例 3：在本发明免疫原性组合中包含流感嗜血杆菌蛋白 D 可提供对急性中耳炎 (AOM) 增强的保护的证据

[0340] 研究设计。

[0341] 该研究采用了 11Pn-PD 疫苗，其包含了各自与来自流感嗜血杆菌的蛋白 D 缀合的血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F（参见实施例 4 表 5）。研究对象被随机分成两组以在约 3、4、5 和 12-15 个月龄时接受四个剂量的 11Pn-PD 疫苗或贺福立适 (Havirx)。所有对象在 3、4 和 5 个月龄时同时接受 GSK Biologicals 的 Infanrix-hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib) 疫苗。Infanrix-hexa 是在施用前混合的 Pediarix 和 Hib 的组合。在“根据方案”分析的效力随访起始于第三疫苗剂量施用后 2 周，并持续至 24-27 个月龄。肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的鼻咽运输可在选定的对象亚组中评估。

[0342] 如果儿童出现恶心、耳部疼痛、鼓膜自发穿孔或自发性耳液溢，建议家长向研究人员咨询。如果该研究人员怀疑是 AOM 事件，则该儿童应立即让耳鼻喉 (ENT) 专家确认诊断。

[0343] AOM 的临床诊断可基于鼓膜的外观（即，发红、肿胀、光反射损失）或者中耳液体流出的存在（可通过简单的或气动式耳镜检查或通过显微镜观察证实）。此外，至少应存在如下迹象或症状中的两种：耳部疼痛、耳液溢、听力损失、发烧、昏睡、过敏、厌食、呕吐或腹泻。如果 ENT 专家确认临床诊断，则通过鼓膜穿刺术采集中耳液样本进行细菌学测试。

[0344] 对于重复患病的对象，如果在前一事件开始后持续了 30 天以上，则认为出现了新的 AOM 事件。此外，如果分离的细菌 / 血清型不同于之前的分离物，不管两个连续事件之间

的间隔, AOM 事件被认为新的细菌事件。

[0345] 试验结果

[0346] 总计 4968 名婴儿入组, 2489 名进入 11Pn-PD 组, 2479 名进入对照组。在两个组之间没有人口统计特征或风险因素的较大差异。

[0347] 临床事件和 AOM 案例定义

[0348] 在依据方案的随访期, 在 11Pn-PD 组总计记录了 333 次临床 AOM 事件, 在对照组记录了 499 次。

[0349] 表 3 显示了 11Pn-PD 疫苗和之前在芬兰测试的两种 7 价疫苗 (Eskola 等人 *N Engl J Med* 2001 ;344 :403-409 和 Kilpi 等人 *Clin Infect Dis* 2003 37 :1155-64) 对任意 AOM 事件或不同肺炎球菌血清型、流感嗜血杆菌、NTHi 和卡他莫拉菌引起的 AOM 的保护性效力。

[0350] 不管针对何种病原学, 11Pn-PD 实现了总体 AOM 疾病负担的 33.6% 的统计学显著的和临床相关的减少 (表 3)。

[0351] 在 11Pn-PD 疫苗中包含的 11 种肺炎球菌血清型中任意一种对 AOM 事件的总体效力为 57.6% (表 3)。

[0352] 在当前研究中另一重要的发现是 11Pn-PD 疫苗对流感嗜血杆菌引起的 AOM 提供了 35.6% 的保护 (特别地, 对 NTHi 引起的 AOM 提供了 35.3% 的保护)。鉴于在肺炎球菌缀合物疫苗时代流感嗜血杆菌作为 AOM 主要起因的持续增加的重要性, 这一发现具有重要的临床意义。与针对 AOM 提供的保护一致, 11Pn-PD 疫苗还减少了生命的第二年中的加强剂量后流感嗜血杆菌的鼻咽运输。这些发现不同于之前在芬兰的观察结果, 其中作为病因替换的证据, 对于两种 7 价肺炎球菌缀合物疫苗均观察到了流感嗜血杆菌引起的 AOM 事件的增加 (Eskola 等人和 Kilpi 等人)。

[0353] 在对 Hi 引起的 AOM 事件的保护和针对载体蛋白 D 的抗体水平之间无法建立明确的关联, 因为在 11Pn-PD 疫苗中初次免疫后的抗 -PD IgG 抗体浓度 (其保持无 Hi AOM 事件), 与在效力随访期过程中发生至少一次 Hi AOM 事件时在 11Pn-PD 疫苗中测得的初始剂量后抗 -PD IgG 抗体水平基本相同。然而, 尽管在疫苗的生物影响和初次免疫后 IgG 抗 -PD 免疫原性之间无法建立关联, 可以合理地假设在流感嗜血杆菌菌株之间高度保守的 PD 载体蛋白很大程度上有助于诱导针对 Hi 的保护。

[0354] 对 AOM 疾病的作用伴随着对鼻咽运输的作用, 对此, 疫苗血清型肺炎双球菌和流感嗜血杆菌的作用在类似的等级上 (图 1)。PD- 缀合物疫苗对流感嗜血杆菌的鼻咽运输的减少支持了 PD- 缀合物疫苗针对流感嗜血杆菌的直接保护作用的假设, 即使这种保护效力无法与 ELISA 测得的抗 -PD IgG 免疫应答相关联。

[0355] 在以下实验中采用了毛丝鼠中耳炎模型和以本实施例的 11 价制剂或实施例 2 的 10 价疫苗免疫的婴儿获得的血清汇集物 (还可参见表 1 和 2 以及下方的注释)。两种汇集物均相对免疫前血清汇集物使得患中耳炎动物百分比的明显减少。在 10 和 11 价免疫汇集物之间不存在显著差异。这证明了两种疫苗对于在该模型中诱导针对不可分型流感嗜血杆菌引起的中耳炎的保护具有类似的潜力。

[0356]

表 3

AOM 事件类型	11Pt-PD				FinOM 的 Prevnar (Bakola 等人)				FinOM 的 7v-OMP (Kilp 等人)			
	n	对照	VE		7v- CRM	对照	VE		7v- OMP	对照	VE	
			%	95%CI			%	95%CI			%	95%CI
N	2455	2452			786	794			805	794		
任意 AOM	333	499	33.6	20.8	1251	1345	6	-4	1364	1345	-1	-12
任意具有 MEF 的 AOM	322	474	32.4	19.0	1177	1267	7	-5	1279	1267	0	-12
培养确认的肺炎球菌	92	189	51.5	36.8	271	414	34	21	314	414	25	11
疫苗肺炎球菌血清型(*)	60	141	57.6	41.4	107	250	57	44	110	250	56	44
其它细菌病原体												
流感嗜血杆菌	44	68	35.6	3.8	315	287	-11	-34	315	287	-9	-32
不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi)	41	63	35.3	1.8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NC	NP
卡他莫拉菌	31	34	9.4	-52.5	379	381	-1	-19	444	381	-16	-36
				46.1				15				2

[0357]

NP = 未公布; N = ATP 效力组中的对象数量; n = 事件数量
***疫苗肺炎球菌血清型: 11Pn-PD = 11 型血清型, Prevnar 和 7v-OMP = 7 型血清型**
MEF = 中耳液

[0358] 实施例 4:

[0359] 血清型 19F 载体蛋白的选择

[0360] 采用的 ELISA 测定

[0361] 22F 抑制 ELISA 法主要基于 Concepcion 和 Frasch 在 2001 年提出的测定, 并在 Henckaerts 等人, 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360 中报道。简单而言, 将纯化的肺炎球菌多糖与甲基化人血清白蛋白混合, 并吸附在 Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) 高结合微量滴定板上 4°C 过夜。用含于 PBS 的 10% 胎牛血清 (FBS) 在室温搅拌下封闭该板 1 小时。用含 10% FBS、10 μg/mL 细胞壁多糖 (SSI) 和 2 μg/mL 血清型 22F 的肺炎球菌多糖 (ATCC) 的 PBS 稀释血清样本, 并用相同缓冲液在该微量滴定板上进一步稀释。采用 89-SF 中血清型 - 特异性 IgG 浓度针对标准血清 89-SF 校准的内部参照以相同方式处理并包含在每块板上。洗涤后, 采用在 10% FBS (含于 PBS) 中稀释的过氧

化物酶缀合的抗人 IgG 单克隆抗体 (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) 并在室温小搅拌 1 小时孵育, 以检测结合抗体。采用即时可用的单组份四甲基联苯胺过氧化物酶免疫测定底物试剂盒 (BioRad, Hercules, CA, US) 在室温下暗处显色。用 H₂SO₄ 0.18M 终止反应, 在 450nm 下读取光密度。通过参考内部参照血清曲线指定限度内的光密度点计算样本中的血清型特异性 IgG 浓度 ($\mu\text{g/mL}$), 所述曲线可通过用 SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 软件计算的 4- 参数逻辑对数方程建模。对于所有的血清型 (考虑检测限和定量极限), ELISA 的截断为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ IgG。

[0362] 调理吞噬测定

[0363] 在 2003 年 6 月的 WHO 咨询会议上建议使用 Romero-Steiner 等人 ClinDiagn Lab Immunol 2003 10(6) :pp1019-1024 提出的 OPA 测定。该方案用于在如下试验中测试血清型的 OPA 活性。

[0364] 缀合物制备

[0365] 在研究 11Pn-PD&Di-001 以及 11Pn-PD&Di-007 中包括了三种 11 价疫苗制剂 (表 4), 其中 3 μg 的 19F 多糖被缀合至白喉类毒素 (19F-DT), 而非将 1 μg 多糖缀合至蛋白 D (19F-PD)。研究 11Pn-PD、11Pn-PD&Di-001 和 11Pn-PD&Di-007 的缀合参数分别披露于表 5、6 和 7。

[0366] 这些 19F-DT 制剂进行初次免疫后一个月时针对血清型 19F 的抗肺炎球菌抗体应答和 OPA 活性分别显示于表 8 和 9 中。表 10 显示了在 23 价纯多糖加强免疫之前和之后的 22F-ELISA 抗体浓度和达到 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 阈值的对象比例。

[0367] 以这些 19F-DT 制剂诱导的抗体显示明显提高了调理吞噬活性, 这可通过初次免疫后一个月时更高的血清阳性比例 (调理吞噬效价 $\geq 1 : 8$) 和 OPAGMT 得到证明 (表 9)。23 价纯多糖加强免疫后一个月时, 19F 抗体的调理吞噬活性依旧明显高于用 19F-DT 制剂初次免疫的儿童 (表 11)。

[0368] 表 12 显示了在之前以 19F-DT 或 19F-PD 缀合物接种的幼儿在 11Pn-PD 加强剂量后与第四次连续 **Prevnar®** 剂量对比的免疫原性数据。考虑在美国 **Prevnar®** 的引入后报道的爆发案例, 血清型 19F 缀合至 DT 载体蛋白时提高的调理吞噬活性可能对该候选疫苗有利。

[0369] 表 13 提供了 19F-DT 缀合物相对于交叉反应性血清型 19A 的 ELISA 和 OPA 数据。据发现 19F-DT 诱导了少量但明显的针对 19A 的 OPA 活性。

[0370] 表 4 在临床研究所用的肺炎球菌缀合物疫苗制剂

[0371]

制剂	肺炎球菌血清型 μg /载体蛋白											Al^{3+} mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0.8	
19F-DT 形 式 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/D T	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	\leq 0.35
19F-DT 形 式 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	\leq 0.35	
19F-DT 形 式 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0.5	

[0372] 表 5PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/TT/DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 淬灭条件

[0373]

血清型	1	3	4	5	6B	7F
	天然	μ fluid	天然	天然	天然	天然
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS 溶解	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初始 PS/PD 比 例 (w/w)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
$pH_a = pH_c = pH_q$	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	40 分钟	60 分钟	60 分钟

[0374]

[0375]

血清型	9V 天然	14 天然	18C 天然	19F 天然	23F 天然
PS 浓度 (mg/ml)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初始 PS/PD 比例 (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
$pH_a = pH_c = pH_d$	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	30 分钟	60 分钟

[0376] 表 6 用于 11Pn-PD&Di-001 研究的 PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 淬灭条件

[0377]

血清型	1 μ fluid	3 μ fluid	4 μ fluid	5 μ fluid	6B μ fluid	7F 天然
PS 浓度 (mg/ml)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
初始 PD/PS 比例 (w/w)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
$pH_a = pH_c = pH_q$	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
偶联时间	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟

[0378]

血清型	9V 天然	14 天然	18C μ fluid	19F μ fluid	23F μ fluid
PS 浓度 (mg/ml)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
初始载体蛋白 / PS 比例 (w/w)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	0.75
$pH_a = pH_c = pH_q$	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	30 分钟	60 分钟	60 分钟

[0379] 表 7 用于 11Pn-PD&Di-007 研究的 PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 淬灭条件

[0380]

血清型	1	3	4	5	6B	7F
PS 浓度 (mg/ml)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS 溶解	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
初始 PD/PS 比例 (w/w)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
$pH_a = pH_c = pH_q$	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5./9.5/9
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	40 分钟	60 分钟	60 分钟

[0381]

血清型	9V μ fluid	14 μ fluid	18C 天然	19F μ fluid	19F μ fluid	23F μ fluid
PS 浓度 (mg/ml)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
载体蛋白浓度 (mg/ml)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
初始载体蛋白 /PS 比例 (w/w)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP 浓度 (mg/mg PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH _d = pH _c = pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶联时间	60 分钟	60 分钟	45 分钟	120 分钟	120 分钟	60 分钟

[0382]

[0383] 表 8 在 1 μ g 19F-PD、3 μ g 19F-DT 或 Prevnar (2 μ g 19F-CRM) 初次免疫 (全组)

后一个月时的 19F 抗体浓度 $\geq 0.20 \mu\text{g/mL}$ 的对象的百分比和 19F 抗体几何平均抗体浓度 (95% CI 的 GMC ; $\mu\text{g/mL}$)

[0384]

组别	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007(22F-ELISA)		
	N	% ≥ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/mL}$) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/mL}$) (95% CI)
11Pn-PD	152	98.7 (95.3-99.8)	1.93 (1.67-2.22)	50	100 (92.9-100)	2.78 (2.31-3.36)
19F-DT 形 式 1 ^r	146	99.3 (96.2-100)	2.88 (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT 形 式 2 ^r	150	96.0 (91.5-98.5)	2.43 (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT 形 式 3 ^r	-	-	-	50	96.0 (86.3-99.5)	3.70 (2.58-5.30)
Prevnar	148	98.6 (95.2-99.8)	2.98 (2.60-3.41)	41	97.6 (87.1-99.9)	2.91 (2.15-3.94)

[0385] ^r 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0386] 表 9 在 $1 \mu\text{g}$ 19F-PD、 $3 \mu\text{g}$ 19F-DT 或 Prevnar ($2 \mu\text{g}$ 19F-CRM) 初次免疫 (全组) 后一个月时的 19F OPA 效价 $\geq 1 : 8$ 的对象的百分比和 19FOPA GMT

[0387]

组别	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	84.6 (77.4-90.2)	77.8 (58.1-104.4)	46	95.7 (85.2-99.5)	167.8 (118.1-238.6)
19F-DT 形式 1 ^Γ	137	95.6 (90.7-98.4)	263.2 (209.4-330.7)	-	-	-
19F-DT 形式 2 ^Γ	139	92.1 (86.3-96.0)	218.9 (166.5-287.9)	-	-	-
19F-DT 形式 3 ^Γ	-	-	-	49	91.8 (80.4-97.7)	403.1 (225.7-719.9)
Prevnar	131	86.3 (79.2-91.6)	82.6 (61.1-111.6)	38	81.6 (65.7-92.3)	65.0 (37.7-112.2)

[0388] ^Γ 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0389] 表 10 对儿童以 1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT 或 Prevnar (2 μg 19F-CRM) 初次免疫后以 23 价纯多糖加强免疫前或一个月后 (全组) 19F 抗体浓度 ≥ 0.20 μg/mL 的对象的百分比和 19F 抗体 GMC (μg/mL)

[0390]

初次组别	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	加强免疫前			23 价 PS 加强免疫后一个月		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT 形式 1 ^Γ	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT 形式 2 ^Γ	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
Prevnar	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

[0391]

[0392] ^Γ 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0393] 表 11 对儿童以 1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT 或 Prevnar (2 μg 19F-CRM) 初次免疫后以 23 价纯多糖加强免疫前或一个月后 (全组) 19F OPA 效价 $\geq 1 : 8$ 的对象的百分比和 19F OPA GMT

[0394]

初次组别	11Pn-PD&Di-002					
	加强免疫前			23 价 PS 加强免疫后一个月		
	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT 形式 1 ^Γ	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT 形式 2 ^Γ	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
Prevnar	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

[0395] ^Γ 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0396] 表 12 对儿童以 1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT 或 Prevnar (2 μg 19F-CRM) 初次免疫后以 11Pn-PD 或 Prevnar 加强免疫一个月后 (全组) 针对 19F 肺炎双球菌的抗体浓度 $\geq 0.20 \mu\text{g/mL}$ 、OPA $\geq 1 : 8$ 的对象的百分比和 GMC/GMT

[0397]

初次组别	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA 测定			OPA 测定		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94.9-100)	4.52 (3.7-5.5)	21	100 (83.9-100)	255.6 (135.5-481.9)
19F-DT 形式 1 ^Γ	66	98.5 (91.8-100)	3.45 (2.8-4.3)	23	95.7 (78.1-99.9)	374.0 (192.6-726.2)
19F-DT 形式 2 ^Γ	70	98.6 (92.3-100)	3.80 (2.9-4.9)	29	96.6 (82.2-99.9)	249.1 (144.7-428.7)
Prevnar	69	97.1 (89.9-99.6)	2.56 (2.0-3.3)	31	96.8 (83.3-99.9)	528.7 (319.4-875.2)

[0398] ^Γ 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0399] 表 13 以 1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT 或 Prevnar (2 μg 19F-CRM) (全组) 初次免疫后一个月时针对 19A 肺炎双球菌的抗体浓度 ≥ 0.20 μg/mL、OPA ≥ 1 : 8 的对象的百分比和 GMC/GMT

[0400]

组别	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA 测定			OPA 测定		
	N	% ≥ 0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/mL) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28.9 (16.4-44.3)	0.09 (0.07- 0.11)	52	7.7 (2.1-18.5)	5.2 (4.0-6.8)
19F-DT 形式 2 ^Γ	51	29.4 (17.5-43.8)	0.11 (0.08- 0.16)	59	27.1 (16.4-40.3)	12.4 (7.6-20.3)

[0401]

Pprevnar	55	18.2 (9.1-30.9)	0.10 (0.08- 0.12)	61	3.3 (0.4-11.3)	4.6 (3.8-5.6)
-----------------	-----------	----------------------------------	--	-----------	---------------------------------	--------------------------------

[0402] 不同制剂的组成在表 4 中提供。

[0403] 实施例 5 :在临床前模型中的佐剂实验 :对老年恒河猴中肺炎球菌 11 价多糖缀合物的免疫原性的影响

[0404] 为了优化老年群体中引发的对缀合肺炎球菌疫苗的应答, GSK 配制了具有新型佐剂佐剂 C 的 11 价多糖 (PS) 缀合疫苗 - 见下文。

[0405] 5 只老年恒河猴 (14-28 岁) 组成的组在第 0 天和第 28 天以 500 μ l 的吸附在 315 μ g AlPO₄ 上的 11 价 PS 缀合物或与佐剂 C 混合的 11 价 PS 缀合物进行肌肉内免疫。

[0406] 在两种疫苗制剂中, 该 11 价 PS 缀合物分别由以下缀合物组成 :PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-PD、PS19F-PD、PS23F-DT 和 PS6B-DT。所用的疫苗为该疫苗的人用剂量的 1/5 剂量 (除 6B[10 μ g] 外每人用剂量每种糖 5 μ g), 该疫苗根据表 6 的条件 (实施例 4) 缀合, 除了 19F 参照如下 CDAP 工艺条件制备 :9mg/ml 大小处理的糖、5mg/ml 的 PD、初始 PD/PS 比例为 1.2/1、CDAP 浓度为 0.75mg/mgPS、pHa = pHc = pHq 9.0/9.0/9.0 且偶联时间为 60min。

[0407] 抗-PS ELISA IgG 水平和调理吞噬效价可在第 42 天采集的血清中测定。抗-PS3 记忆 B 细胞频率可从第 42 天采集的外周血细胞通过 Elispot 测定。

[0408] 根据下文所示的结果, 佐剂 C 相比具有 AlPO₄ 的缀合物明显提高了老年猴中 11 价 PS 缀合物的免疫原性。该新型佐剂增强了对 PS 的 IgG 应答 (图 1) 和调理吞噬抗体效价 (表 14)。另有支持证据显示通过使用佐剂 C 增加了 PS3- 特异性记忆 B 细胞的频率 (图 2)。

[0409] 表 14 在老年恒河猴中的缀合物免疫原性 (II 期后的调理 - 吞噬效价)

[0410]

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11. 价 AlPO ₄	免疫前	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	II 期后 14 天	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 价 Adj-C	免疫前	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	II 期后 14 天	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

[0411] B 细胞 Elispot

[0412] 该测定的原理依赖于记忆 B 细胞与 CpG 体外培养 5 天后发育成浆细胞的事实。体外生成的抗原特异性浆细胞可被容易地检测, 因此通过 B 细胞 elispot 测定进行计算。特异性浆细胞的数量反映了培养中发生的记忆 B 细胞的频率。

[0413] 简单而言, 在涂覆了抗原的培养板上孵育体外生成的浆细胞。通过常规免疫 - 酶催化步骤检测并作为记忆 B 细胞计算的抗原特异性浆细胞形成了抗体 / 抗原斑点。

[0414] 在本研究中, 多糖曾被用于涂覆培养板, 从而计算相应的记忆 B 细胞。结果表示为一百万个记忆 B 细胞中 PS 特异性记忆 B 细胞的频率。

[0415] 该研究显示佐剂 C 能够减少 PS3 加强性的已知问题 (参见 5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, April 2-6 2006, Alice Springs, Central Australia)

[0416] Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, P010.06)。

[0417] 实施例 6 解毒肺炎球菌溶血素 (dPly) 作为蛋白载体增强幼年 Balb/c 小鼠中的 PS 19F 免疫原性的效力

[0418] 40 只雌性 Balb/c 小鼠 (4 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μ l 的 4 价纯 PS 或 4 价 dPly-缀合 PS (均与佐剂 C 混合) IM 免疫。

[0419] 两种疫苗制剂均由 0.1 μ g (糖的量) 的各种如下 PS 组成: PS8、PS12F、PS19F 和 PS22F。

[0420] 在第 42 天采集的血清中检测抗 -PS ELISA IgG 水平。

[0421] 与纯 PS 免疫的小鼠相比, 4 价 dPly 缀合物免疫的小鼠中的抗 -PS19F 应答明显增加 (在图 3 中作为范例显示)。对于抗 -PS8、12F 和 22F IgG 应答, 观察到了相同的提高 (数据未显示)。

[0422] 实施例 7 肺炎球菌组氨酸三联体蛋白 D (PhtD) 作为蛋白载体增强幼年 Balb/c 小鼠中的 PS 22F 免疫原性的效力

[0423] 40 只雌性 Balb/c 小鼠 (4 周大) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μ l 的 4 价纯 PS 或 4 价 PhtD-缀合 PS (均与佐剂 C 混合) IM 免疫。

[0424] 两种疫苗制剂均由 0.1 μ g (糖的量) 的各种如下 PS 组成: PS8、PS12F、PS19F 和 PS22F。

[0425] 在第 42 天采集的血清中检测抗 -PS ELISA IgG 水平。

[0426] 与纯 PS 免疫的小鼠相比, 4 价 PhtD 缀合物免疫的小鼠中的抗 -PS22F 应答明显增加 (在图 4 中作为范例显示)。对于抗 -PS8、12F 和 19F IgG 应答, 观察到了相同的提高 (数据未显示)。

[0427] 实施例 8 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在老年 C57B1 小鼠中的免疫原性

[0428] 30 只老年 C57B1 小鼠 (> 69 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μ l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物 (均与佐剂 C 混合) IM 免疫 (见下文)。

[0429] 该 11 价疫苗制剂由如下每种缀合物的 0.1 μ g 糖组成: PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD (参见表 1 和表 2 下方对 11 价疫苗的注释)。该 13 价疫苗制剂额外包含 0.1 μ g 的 PS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物 (参见表 1 和表 2 下方对 13 价疫苗的注释 [使用直接缀合的 22F])。在第 2 和第 4 组中, 该肺炎球菌溶血素载体通过 GMBS 处理解毒, 在第 3 和第 5 组中, 其通过甲醛解毒 (该方法描述于 WO 04/81515)。在第 2 和第 3 组中, PhtD 被用于缀合 PS 22F, 在第 4 和第 5 组中, 采用了 PhtD_E 融合体 (构建体 VP147 来自于 WO 03/054007)。在第 6 组中, 19A 被缀合至白喉类毒素, 22F 被缀合至蛋白 D。

[0430] 抗 -PS19A 和 22F ELISA IgG 水平可通过如下步骤在第 42 天采集的单独血清中确

定。在汇集的血清中测量对其它 PS 生成的 ELISA IgG 应答。

[0431] 小鼠血清学步骤：

[0432] 抗-PS19A ELISA IgG 水平可用如下所述步骤在第 42 天采集的血清中评估：

[0433] 用含于 PBS 缓冲液的纯化 19A 型肺炎球菌 PS(10 μ g/ml) 在 37°C 下涂覆微量滴定板 2 小时。用 NaCl 0.9% mM-Tween 20 0.05% 洗涤滴定板四次。将血清与含于 PBS 0.05% Tween 20 的 50 μ g/ml CPS(V/V) 在 37°C 下孵育 1 小时。将血清加入微孔,并在 PBS-BSA 0.05% Tween 0.05% 中系列稀释(两倍稀释步骤)。将滴定板在室温下搅拌孵育 30 分钟。参照上文洗涤滴定板,添加抗-小鼠 IgG-过氧化物酶缀合物(1/2500 稀释)并将滴定板在室温下孵育 30 分钟。洗涤后,向每个微孔添加底物(含于 10ml 0.1M pH4.5 柠檬酸盐的 4mg OPDA 和 5 μ l H_2O_2),反应进行 15 分钟。添加 1N HCl 终止反应。使用分光光度计读取 490-620nm 下的吸收值。形成的颜色与血清中存在的抗体的量成直接比例。

[0434] 通过与参考曲线比较确定血清样本中存在的抗-PS19A IgG 水平,并以 μ g/ml 表示。可由针对所添加血清的已知量的 ELISA 结果对每块板生成参考曲线。

[0435] 抗-PS22F ELISA IgG 水平可用如下所述的步骤在第 42 天采集的血清中评估：

[0436] 用含于 PBS 缓冲液的纯化 22F 型肺炎球菌 PS(10 μ g/ml) 在 37°C 下涂覆微量滴定板 2 小时。用 NaCl 0.9% mM-Tween 20 0.05% 洗涤滴定板四次。将血清与含于 PBS 0.05% Tween 20 的 50 μ g/ml CPS(V/V) 在 37°C 下孵育 1 小时。将血清加入微孔,并在 PBS-BSA 0.05% Tween 0.05% 中系列稀释(两倍稀释步骤)。将滴定板在室温下搅拌孵育 30 分钟。参照上文洗涤滴定板,添加抗-小鼠 IgG 抗体过氧化物酶缀合物(1/2500 稀释)并将滴定板在室温下孵育 30 分钟。洗涤后,向每个微孔添加底物(含于 10ml 柠檬酸盐 0.1M pH4.5 的 4mg OPDA 和 5 μ l H_2O_2),反应进行 15 分钟。添加 1N HCl 终止反应。使用分光光度计读取 490-620nm 下的吸收值。形成的颜色与血清中存在的抗体的量成直接比例。

[0437] 通过与各板上添加血清的参考曲线比较确定未知血清中存在的抗-PS22F IgG 水平,并以 μ g/ml 表示。

[0438] 除了将小鼠血清汇集以外,可参照相同的步骤实现针对所有其它血清型的免疫应答。

[0439] 在 13 价缀合物疫苗制剂中施用的 19A-dPly 和 22F-PhTD 在老年 C57B1 小鼠中显示了免疫原性(表 15)。与用 11 价疫苗制剂免疫的小鼠相比,用 13 价制剂免疫的小鼠中针对其他 PS 诱导的免疫应答未受到负面影响。

[0440] 表 15 在老年 C57B1 小鼠中的 PS 免疫原性(III 期后 IgG 水平)

[0441]

老年 C57 黑色小鼠						
ELISA	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4	组别 5	组别 6
	11V 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C	11V 19A-dPly gms 22F-PhtD 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C	11V 19A-dPly gms 22F-PhtD-E 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD-E 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1 μ g/50 μ l 佐剂 C
1 平均汇集物	19.30	20.20	24.40	12.80	12.10	13.60
3 平均汇集物	6.32	4.84	5.21	6.74	2.38	2.54
4 平均汇集物	60.9	67.1	51.4	47.4	45.5	41.1
5 平均汇集物	1.34	3.81	3.06	2.75	1.26	1.23

[0442]

6B	平均汇集物	4.41	4.12	5.88	1.58	2.31	5.64
7F	平均汇集物	0.83	0.81	1.65	1.98	0.89	0.99
9V	平均汇集物	13.8	23.7	20.0	13.1	15.5	9.6
14	平均汇集物	25.73	42.96	34.12	32.53	23.97	15.60
18C	平均汇集物	13.4	20.1	11.9	9.1	8.3	8.4
19F	平均汇集物	57.5	90.0	63.8	36.5	47.0	69.1
23F	平均汇集物	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC	0.06	0.09	0.25	0.08	0.23	0.19
	IC	0.04-0.1	0.05-0.14	0.15-0.41	0.06-0.12	0.14-0.38	0.09-0.3
	%sero	33%	47%	83%	53%	80%	73%
22F	GMC	NR	5.81	3.76	0.54	0.85	2.02
	IC		3.2-10.6	1.8-7.9	0.3-1.1	0.4-1.7	1.2-3.4
	%sero	0%	97%	90%	77%	87%	97%

[0443] NR- 未测得实验结果

[0444] 小鼠 OPA 步骤：

[0445] 将血清样本在 56℃ 下加热 45 分钟，以灭活任意残留的内源性补体。将每等分二十五微升的每种 1 : 2 稀释的血清样本在 96 孔圆底微量滴定板的每个微孔中以 25 μl OPA 缓冲液 (HBSS-14.4% 灭活 FBS) 两倍系列稀释。然后，将 25 μl 的活化 HL-60 细胞 (1×10⁷ 细胞 /ml)、新鲜解冻的肺炎球菌工作种子和新鲜解冻的幼兔补体混合物以例如 4/2/1 比例 (v/v/v) 添加至稀释的血清中，以得到 50 μl 的终体积。将测定板在 37℃ 下定轨

振荡 (210rpm) 孵育 2 小时,以促进吞噬过程。通过将微量滴定板在冰上放置至少 1 分钟终止反应。将板上每个微孔的 20 μ l 等分转移至 96 孔平底微量滴定板的相应微孔中,并向每个微孔添加 50 μ l Todd-Hewitt Broth-0.9%琼脂。在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育过夜后,在琼脂中出现肺炎球菌集落,采用自动化图像分析系统 (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany) 进行计数。八个无血清样本的微孔被用作细菌对照,以确定每个微孔的肺炎球菌数量。测定对照微孔的 CFU 平均数,并用于计算每个血清样本的杀伤活性。血清样本的 OPA 效价可通过能够杀伤 50% 的肺炎球菌的血清的倒数 (reciprocal) 稀释进行确定。调理吞噬效价可采用 4 参数曲线拟合分析进行计算。

[0446] 调理吞噬测定的结果显示于图 13 和 14 中。

[0447] 实施例 9 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在幼年 Balb/c 小鼠中的免疫原性

[0448] 30 只幼年 Balb/c 小鼠 (4 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μ l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物 (均与佐剂 C 混合) IM 免疫 (见下文)。

[0449] 该 11 价疫苗制剂由如下每种缀合物的 0.1 μ g 糖组成: PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS 14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD (参见表 1 和表 2 下方对 11 价疫苗的注释)。该 13 价疫苗制剂额外包含 0.1 μ g 的 PS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物 (参见表 1 和表 2 下方对 13 价疫苗的注释 [使用直接缀合的 22F])。在第 2 和第 4 组中,该肺炎球菌溶血素载体通过 GMBS 处理解毒,在第 3 和第 5 组中,其通过甲醛解毒 (该方法描述于 WO 04/81515)。在第 2 和第 3 组中,PhtD 被用于缀合 PS 22F,在第 4 和第 5 组中,采用了 PhtD_E 融合体 (构建体 VP147 来自于 WO 03/054007)。在第 6 组中,19A 被缀合至白喉类毒素,22F 被缀合至蛋白 D。

[0450] 抗-PS19A 和 22F ELISA IgG 水平可在第 42 天采集的单独血清中确定。在汇集的血清中测量对其它 PS 生成的 ELISA IgG 应答。

[0451] 在 13 价缀合物疫苗制剂中施用的 19A-dPly 和 22F-PhtD 在幼年 Balb/c 小鼠中显示了免疫原性 (表 16)。与用 11 价疫苗制剂免疫的小鼠相比,用 13 价制剂免疫的小鼠中针对其他 PS 诱导的免疫应答未受到负面影响。

[0452] ELISA 按照实施例 8 所述进行。

[0453] 表 16 在幼年 Balb/c 小鼠中的 PS 免疫原性 (III 期后 IgG 水平)

[0454]

BalbC 小鼠							
ELISA	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4	组别 5	组别 6	
	11V 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD-E 0.1µg/50µl 佐剂 C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1µg/50µl 佐剂 C	
1	平均汇集物	131.70	101.20	83.00	82.40	67.90	85.50
3	平均汇集物	21.85	10.38	12.53	8.83	8.73	14.98
4	平均汇集物	147.4	127.0	104.4	95.0	113.6	114.2
5	平均汇集物	21.38	20.29	18.26	18.95	18.02	23.04
6B	平均汇集物	1.97	4.76	3.72	2.35	1.43	1.05

[0455]

7F	平均汇集物	7.69	4.58	4.77	4.24	3.92	3.94
9V	平均汇集物	30.1	30.7	26.5	21.4	23.4	28.3
14	平均汇集物	28.78	27.67	26.23	21.54	24.34	13.73
18C	平均汇集物	53.4	52.37	46.5	57.8	47.8	75.8
19F	平均汇集物	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2
23F	平均汇集物	4.98	3.9	5.11	0.57	3.13	4.57
19A	GMC	0.4	32.8	25.1	21.6	18.9	23.5
	IC	0.2-0.6	26.4-40.7	20.6-30.6	17.5-26.7	15.1-23.5	19.5-28.5
	%sero	93%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	NR	3.99	3.76	6.27	8.70	18.76
	IC		1.9-8.42	1.8-8	3.8-10.4	5.4-13.9	15.2-23.1
	%sero	0%	93%	100%	100%	100%	100%

[0456] NR- 未测得实验结果

[0457] 小鼠 OPA 步骤:

[0458] 将血清样本在 56℃ 下加热 45 分钟,以灭活任意残留的内源性补体。将每等分二十五微升的每种 1 : 2 稀释的血清样本在 96 孔圆底微量滴定板的每个微孔中以 25 μ l OPA 缓冲液 (HBSS-14.4% 灭活 FBS) 两倍系列稀释。然后,将 25 μ l 的活化 HL-60 细胞 (1 \times 10⁷ 细胞 /ml)、新鲜解冻的肺炎球菌工作种子和新鲜解冻的幼兔补体混合物以例如 4/2/1 比例 (v/v/v) 添加至稀释的血清中,以得到 50 μ l 的终体积。将测定板在 37℃ 下定轨振荡 (210rpm) 孵育 2 小时,以促进吞噬过程。通过将微量滴定板在冰上放置至少 1 分钟终止反应。将板上每个微孔的 20 μ l 等分转移至 96 孔平底微量滴定板的相应微孔中,并向每个微孔添加 50 μ l Todd-Hewitt Broth-0.9% 琼脂。在 37℃ 和 5% CO₂ 下孵育过夜后,在琼脂中出现肺炎球菌集落,采用自动化图像分析系统 (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany) 进行计数。八个无血清样本的微孔被用作细菌对照,以确定每个微孔的肺炎球菌数量。测定对照微孔的 CFU 平均数,并用于计算每个血清样本的杀伤活性。血清样本的 OPA 效价可通过能够杀伤 50% 的肺炎球菌的血清的倒数稀释进行确定。调理吞噬效价可采用 4 参数曲线拟合分析进行计算。

[0459] 结果显示于图 15 和 16。

[0460] 在 alum 制剂中的结是:

[0461] 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在幼年 Balb/c 小鼠中的免疫原性

[0462] 40 只幼年 Balb/c 小鼠 (4 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μ l 的 11 价 PS 缀合物或 13 价 PS 缀合物 (均吸附在 AlPO₄ 上) IM 免疫。同时施用 Infanrix Hexa。

[0463] 该 11 价疫苗制剂由如下每种缀合物的 0.1 μ g 糖组成: PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD (参见表 1 和表 2 下方对 11 价疫苗的注释)。该 13 价疫苗制剂额外包含 0.1 μ g 的 PS19A-dP1y 和 PS22F-PhtD 缀合物 (参见表 1 和表 2 下方对 13 价疫苗的注释 [使用直接缀合的 22F])。在第 2 和第 4 组中, 该肺炎球菌溶血素载体通过 GMBS 处理解毒, 在第 3 和第 5 组中, 其通过甲醛解毒。在第 2 和第 3 组中, PhtD 被用于缀合 PS 22F, 在第 4 和第 5 组中, 采用了 PhtD_E 融合体 (构建体 VP147 来自于 W003/054007)。在第 6 组中, 19A 被缀合至白喉类毒素, 22F 被缀合至蛋白 D。

[0464] 抗 -PS19A 和 22F ELISA IgG 水平以及调理吞噬效价可在第 42 天采集的单独血清中确定。在汇集的血清中测量对其它 PS 生成的 ELISA IgG 应答。

[0465] 在 13 价缀合物疫苗制剂中施用的 19A-dP1y 和 22F-PhtD 在幼年 Balb/c 小鼠中显示了免疫原性和调理吞噬效价 (表 17 和图 19-20)。与用 11 价疫苗制剂免疫的小鼠相比, 用 13 价制剂免疫的小鼠中针对其他 PS 诱导的免疫应答未受到负面影响。

[0466] 调理吞噬测定被用于评估该血清, 结果显示于图 19 和 20。

[0467]

表 17 在幼年 Balb/c 小鼠中的 PS 免疫原性 (III 期后 IgG 水平)

ELISA III 期后	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4	组别 5	组别 6
	11V	19A-Ply GMBS 22F-PhtD	19A-dPly 甲酯 22F-PhtD	19A-dPly GMBS 22F-PhtD	19A-dPly 甲酯 22F-PhtD	11V 19A-DT 22F-PD
	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC
1	37.535	35.312	56.839	39.781	35.739	30.270
3	9.093	9.874	7.991	10.548	7.502	8.217
4	28.422	27.439	25.796	31.274	34.295	31.589
5	9.258	8.668	9.6	7.551	8.869	8.309
6B	0.552	0.423	0.565	0.264	0.263	0.435
7F	3.771	2.541	5.394	2.618	2.754	3.048
9V	23.447	23.479	27.394	19.072	24.282	28.017
14	25.921	26.103	24.927	16.487	20.517	24.795
18C	6.223	6.873	7.726	5.812	9.186	9.146
19F	61.271	70.498	88.336	73.879	96.521	66.484
23F	1.836	0.669	0.648	0.259	1.116	0.596
19A	0.065	1.797	2.256	1.950	2.128	3.640
	NT	1.206-2.678	1.71-2977	1.368-2.778	1.478-3.064	2.793-4.744
	65%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	0.05	0.171	0.097	9.924	8.837	11.993
	0.05-0.05	0.104-0.282	0.0690.141	7.19-13.695	5.692-13.719	9.079-15.842
	0%	53%	41%	100%	100%	100%

[0468] 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在幼年 OF1 小鼠中的免疫原性
 [0469] 40 只幼年 OF1 小鼠 (4 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 50 μl 的 11 价 PS 缀合物

或 13 价 PS 缀合物（均吸附在 AlPO₄ 上）IM 免疫。同时施用 Infanrix Hexa。

[0470] 该 11 价疫苗制剂由如下每种缀合物的 0.1 μg 糖组成：PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD（参见表 1 和表 2 下方对 11 价疫苗的注释）。该 13 价疫苗制剂额外包含 0.1 μg 的 PS19A-dPly 和 PS22F-PhtD 缀合物（参见表 1 和表 2 下方对 13 价疫苗的注释 [使用直接缀合的 22F]）。在第 2 和第 4 组中，该肺炎球菌溶血素载体通过 GMBS 处理解毒，在第 3 和第 5 组中，其通过甲醛解毒（该方法描述于 WO 04/81515）。在第 2 和第 3 组中，PhtD 被用于缀合 PS 22F，在第 4 和第 5 组中，采用了 PhtD_E 融合体（构建体 VP147 来自于 WO 03/054007）。在第 6 组中，19A 被缀合至白喉类毒素，22F 被缀合至蛋白 D。

[0471] 抗-PS19A 和 22F ELISA IgG 水平以及调理吞噬效价可在第 42 天采集的单独血清中确定。在汇集的血清中测量对其它 PS 生成的 ELISA IgG 应答。

[0472] 在 13 价缀合物疫苗制剂中施用的 19A-dPly 和 22F-PhtD 在幼年 0F1 小鼠中显示了免疫原性和调理吞噬效价（表 18 和图 21-22）。与用 11 价疫苗制剂免疫的小鼠相比，用 13 价制剂免疫的小鼠中针对其他 PS 诱导的免疫应答未受到负面影响。

[0473] 该血清同样通过调理吞噬测定评估，结果显示于图 21 和 22。

[0474]

表 18 在幼年 OF1 小鼠中的 PS 免疫原性 (III 期后 IgG 水平)

ELISA III 期后	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4	组别 5	组别 6
	11V	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD	11V 19A-dPly 甲酰 22F-PhtD	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtD	11V 19A-dPly 甲酰 22F-PhtD	11V 19A-DT 22F-PD
	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC	1/10 HD SC
1	39.668	50.854	40.384	30.108	34.753	34.487
3	5.562	6.266	7.243	4.665	5.510	5.188
4	21.979	30.567	27.65	26.646	23.159	23.296
5	8.884	7.986	9.495	9.303	11.318	8.984
6B	3.158	4.139	3.48	2.44	3.784	3.137
7F	7.134	8.843	12.471	6.497	7.607	6.607
9V	24.052	37.153	36.348	35.168	29.746	26.592
14	29.027	46.057	36.605	40.883	35.026	39.186
18C	4.961	6.508	4.587	5.148	6.783	4.915
19F	48.667	74.366	45.561	63.845	68.155	47.703
23F	0.664	1.093	0.996	0.212	0.764	1.579
19A	0.057	1.849	2.266	1.864	3.751	2.434
	NT	1.132-3.020	1.439-3.569	1.157-3.004	2.825-4.980	1.725-3.435
	48%	100%	98%	95%	100%	100%
22F	0.064	11.190	16.196	12.431	17.319	27.490
	NT	6.225-20.114	9.718-26.992	7.95-19.439	12.056-24.879	22.044-34.281
	22.5%	96.9%	97.5%	97.5%	100.0%	100.0%

[0475] 实施例 10 含 19A-dPly 和 22F-PhtD 的 13 价 PS 缀合物在豚鼠中的免疫原性
 [0476] 20 只幼年豚鼠 (Hartley 株 ;5 周龄) 的组在第 0、14 和 28 天用 125 μ l 的 11 价 PS

缀合物或 13 价 PS 缀合物（均与佐剂 C 混合）IM 免疫（见下文）。

[0477] 该 11 价疫苗制剂由如下每种缀合物的 0.25 μ g 糖组成：PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 和 PS23F-PD（参见表 1 和表 2 下方对 11 价疫苗的注释）。该 13 价疫苗制剂额外包含 0.1 μ g 的 PS19A-dP1y 和 PS22F-PhtD 缀合物（参见表 1 和表 2 下方对 13 价疫苗的注释 [使用直接缀合的 22F]）。在第 2 和第 4 组中，该肺炎球菌溶血素载体通过 GMBS 处理解毒，在第 3 和第 5 组中，其通过甲醛解毒。在第 2 和第 3 组中，PhtD 被用于缀合 PS 22F，在第 4 和第 5 组中，采用了 PhtD_E 融合体（构建体 VP147 来自于 WO 03/054007）。在第 6 组中，19A 被缀合至白喉类毒素，22F 被缀合至蛋白 D。

[0478] 抗-PS19A 和 22F ELISA IgG 水平可通过如下方案在第 42 天采集的单独血清中确定。在汇集的血清中测量对其它 PS 生成的 ELISA IgG 应答。

[0479] 豚鼠血清学步骤：

[0480] 抗-PS19A ELISA IgG 水平可用如下所述步骤在第 42 天采集的血清中评估：

[0481] 用含于 PBS 缓冲液的纯化 19A 型肺炎球菌 PS (10 μ g/ml) 在 37°C 下涂覆微量滴定板 2 小时。用 NaCl 0.9% mM-Tween 200.05% 洗涤滴定板四次。将血清与含于 PBS 0.05% Tween 20 的 50 μ g/ml CPS (V/V) 在 37°C 下孵育 1 小时。将血清加入微孔，并在 PBS-BSA 0.05% Tween 0.05% 中系列稀释（两倍稀释步骤）。将滴定板在室温下搅拌孵育 30 分钟。参照上文洗涤滴定板，添加抗-豚鼠 IgG 过氧化物酶缀合物（1/1000 稀释）并将滴定板在室温下孵育 30 分钟。洗涤后，向每个微孔添加底物（含于 10ml 柠檬酸盐 0.1M pH4.5 的 4mg OPDA 和 5 μ l H₂O₂），反应进行 15 分钟。添加 1N HCl 终止反应。使用分光光度计读取 490-620nm 下的吸收值。形成的颜色与血清中存在的抗体的量成直接比例。

[0482] 通过与各板上添加血清的参考曲线比较确定未知血清中存在的抗-PS19A IgG 水平，并以 μ g/ml 表示。

[0483] 抗-PS22F ELISA IgG 水平可用如下所述步骤在第 42 天采集的血清中确定：

[0484] 用含于 PBS 缓冲液的纯化 22F 型肺炎球菌 PS (10 μ g/ml) 在 37°C 下涂覆微量滴定板 2 小时。用 NaCl 0.9% mM-Tween 200.05% 洗涤滴定板四次。将血清与含于 PBS 0.05% Tween 20 的 50 μ g/ml CPS (V/V) 在 37°C 下孵育 1 小时。将血清加入微孔，并在 PBS-BSA 0.05% Tween 0.05% 中系列稀释（两倍稀释步骤）。将滴定板在室温下搅拌孵育 30 分钟。参照上文洗涤滴定板，添加抗-豚鼠 IgG 过氧化物酶缀合物（1/1000 稀释）并将滴定板在室温下孵育 30 分钟。洗涤后，向每个微孔添加底物（含于 10ml 柠檬酸盐 0.1M pH4.5 的 4mg OPDA 和 5 μ l H₂O₂），反应进行 15 分钟。添加 1N HCl 终止反应。使用分光光度计读取 490-620nm 下的吸收值。形成的颜色与血清中存在的抗体的量成直接比例。

[0485] 通过与各板上添加血清的参考曲线比较确定未知血清中存在的抗-PS22F IgG 水平，并以 μ g/ml 表示。

[0486] 除了将豚鼠血清汇集以外，可根据相同的步骤实现针对所有其它血清型的免疫应答。

[0487] 表 19 在豚鼠中的 PS 免疫原性（III 期后 IgG 水平）

[0488]

豚鼠						
ELISA	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4	组别 5	组别 6
	11V	11V 19A-dPly gmb	11V 19A-dPly 甲醛	11V 19A-dPly gmb	11V 19A-dPly 甲醛	11V 19A-DT
	0.1µg/50µl 佐剂 C	0.1µg/50µl 佐剂 C	0.1µg/50µl 佐剂 C	0.1µg/50µl 佐剂 C	0.1µg/50µl 佐剂 C	0.1µg/50µl 佐剂 C
1 平均汇集物	78.00	77.21	76.15	68.77	68.59	81.04

[0489]

3	平均汇集物	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4	平均汇集物	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5	平均汇集物	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40
6B	平均汇集物	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F	平均汇集物	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1
9V	平均汇集物	90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14	平均汇集物	71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C	平均汇集物	109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1
19F	平均汇集物	73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23F	平均汇集物	19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A	GMC	0.4	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74

[0490]

	IC	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
	%sero	75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
	IC	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
	%sero	10%	95%	95%	100%	100%	100%

[0491] 调理吞噬测定同样被用于测试该血清,结果显示于图 17 和 18。

[0492] 实施例 11 制备和测试的制剂

[0493] a) 制备以下制剂(采用了表 1 的 13 价疫苗和表 5 的血清型 3- 参见表 2 下方关于 14 价疫苗的注释 [采用了直接缀合的 22F 或通过 ADH 接头缀合])。所述糖按如下所示与磷酸铝和 3D-MPL 配制。

[0494]

14V 25µg MPL BAC 铝含量总和 每剂量:						14V 10µg MPL BAC 铝含量总和 每剂量:					
PS	载体	µg PS	µg MPL	PS/AI 比例 1/x	µg AI	PS	载体	µg PS	µg MPL	PS/AI 比例 1/x	µg AI
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AB}	3		15	45	18C	TT _{AB}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhD	3		10	30	22F	PhD	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
FF 铝含量				总计=	355	FF 铝含量				总计=	295

[0495] b) 向相同的糖制剂添加如下佐剂中的每一种:

[0496] - 在下文的表中显示了每 500 µ l 剂量的乳液成分的浓度。

[0497]	佐剂 A1	佐剂 A2	佐剂 A3	
[0498] 成分	250 µ l o/w 乳液	125 µ l o/w 乳液	50 µ l o/w 乳液	
[0499] α 生育酚	11.88mg	5.94mg	2.38mg	
[0500] 角鲨烯	10.7mg	5.35mg	2.14mg	
[0501] Tween80	4.85mg	2.43mg	0.97mg	
[0502]	佐剂 A4	佐剂 A5	佐剂 A6	佐剂 A7
[0503] 成分	250 µ l o/w 乳液	250 µ l o/w 乳液	125 µ l o/w 乳液	50 µ l o/w 乳液
[0504]	乳液	液	液	乳液
[0505] α 生育酚	11.88mg	11.88mg	5.94mg	2.38mg
[0506] 角鲨烯	10.7mg	10.7mg	5.35mg	2.14mg
[0507] Tween 80	4.85mg	4.85mg	2.43mg	0.97mg
[0508] 3D-MPL	50 µ g	25 µ g	25 µ g	10 µ g

[0509] c) 该糖还可与两种基于脂质体的佐剂配制:

- [0510] 佐剂 B1 组成
- [0511] 性质数量 (每 0.5mL 剂量)
- [0512] 脂质体:
- [0513] -DOPC 1mg
- [0514] -胆固醇 0.25mg
- [0515] 3DMPL 50 μ g
- [0516] QS21 50 μ g
- [0517] KH_2PO_4 13.124mg 缓冲液
- [0518] Na_2HPO_4 10.290mg 缓冲液
- [0519] NaCl 2.922mg
- [0520] (100mM)
- [0521] WFI 添加额外 (q. s. ad) 0.5ml 溶剂
- [0522] pH6.1
- [0523] 1. 总 PO_4 浓度 = 50mM
- [0524] 佐剂 B2 组成
- [0525] 性质数量 (每 0.5mL 剂量)
- [0526] 脂质体:
- [0527] -DOPC 0.5mg
- [0528] -胆固醇 0.125mg
- [0529] 3DMPL 25 μ g
- [0530] QS21 25 μ g
- [0531] KH_2PO_4 13.124mg 缓冲液
- [0532] Na_2HPO_4 10.290mg 缓冲液
- [0533] NaCl 2.922mg
- [0534] (100mM)
- [0535] WFI 添加额外 0.5ml 溶剂
- [0536] pH6.1
- [0537] d) 该糖还可与佐剂 C 配制 (参见上文使用了该佐剂的其它组合物):
- [0538] 性质数量 (每 0.5mL 剂量)
- [0539] 水包油乳液 :50 μ l
- [0540] -角鲨烯 2.136mg
- [0541] - α -生育酚 2.372mg
- [0542] -Tween 80 0.97mg
- [0543] -胆固醇 0.1mg
- [0544] 3DMPL 50 μ g
- [0545] QS21 50 μ g
- [0546] KH_2PO_4 10.470mg 缓冲液
- [0547] Na_2HPO_4 10.219mg 缓冲液
- [0548] NaCl 4.003mg

- [0549] (137mM)
- [0550] KCl 0.101mg
- [0551] (2.7mM)
- [0552] WFI 添加额外 0.5ml 溶剂
- [0553] pH6.8
- [0554] 实施例 12 缀合化学对 22F-PhtD 缀合物在 Balb/c 小鼠中免疫原性的影响
- [0555] 30 只雌性 Balb/c 小鼠的组在第 0、14 和 28 天用包含 PS 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F 的 13 价 PS 制剂（剂量：对于 PS 4、18C、19A、19F 和 22F 为 0.3 μ g 糖 / 缀合物，对于其它 PS 为 0.1 μ g 糖 / 缀合物）肌肉内（IM）途径免疫。
- [0556] PS 18C 被缀合至破伤风类毒素，19F 被缀合至白喉类毒素，19A 被缀合至甲醛 - 解毒 Ply，22F 被缀合至 PhtD，其它 PS 被缀合至 PD。
- [0557] 对通过直接 CDAP 化学制备的 22F-PhtD 或 22F-AH-PhtD (ADH 衍生 PS) 组成的两种制剂进行比较。以直接缀合或通过 ADH 间隔基缀合 22F 制备的 13 价疫苗的特征参见实施例 2，表 1 以及表 2 下方的注释。该疫苗制剂添加了佐剂 C。
- [0558] 抗 -PS22F ELISA IgG 水平和调理吞噬效价在 42 天采集的血清中测定。
- [0559] 对于 IgG 水平（图 5）和调理吞噬效价（图 6），22F-AH-PhtD 均显示了比 22F-PhtD 高得多的免疫原性。
- [0560] 实施例 13 新佐剂对肺炎链球菌荚膜 PS 缀合物的免疫原性的影响
- [0561] 40 只幼年 C57B1 小鼠的组在第 0、14 和 28 天用包含 PS 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F 和 23F 的 13 价 PS 制剂（剂量：对于 PS 4、18C、19A、19F 和 22F 为 0.3 μ g / 缀合物，对于其它 PS 为 0.1 μ g / 缀合物）IM 途径免疫。
- [0562] PS 18C 被缀合至破伤风类毒素，19F 被缀合至白喉类毒素，19A 被缀合至甲醛 - 解毒 Ply，22F 被缀合至 PhtD，其它 PS 被缀合至 PD。以 22F 直接缀合制备的 13 价疫苗的特征参见实施例 2，表 1 以及表 2 下方的注释。
- [0563] 添加了 AlPO₄、佐剂 A1、佐剂 A4 或佐剂 A5 的四种制剂进行对比。
- [0564] 在 42 天采集并每组汇集的血清中测定抗 -PS、Ply、PhtD 和 PD ELISA IgG 水平。对每种抗原计算以下比例：以所测试新佐剂诱导的 IgG 水平 / 以 AlPO₄ 诱导的 IgG 水平。
- [0565] 与经典的 AlPO₄ 制剂相比，所有测试的新型佐剂使得对血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 22F 缀合物的免疫应答均提高了至少 2 倍（图 7）。在本实验中，血清型 23F 未获得可靠应答。
- [0566] 实施例 14 PhtD / 解毒 Ply 组合在肺炎球菌猴肺炎模型中的保护效力
- [0567] 将按照具有最低预先存在的抗 -19F 抗体水平选择的 6 只恒河猴（3 至 8 岁）的组在第 0 和 28 天用包含 PS 缀合物（即，1 μ g [糖的] PS 1、3、5、6B、7F、9V、14 和 23F 以及 3 μ g PS 4、18C 和 19F）或 PhtD (10 μ g) + 甲醛 - 解毒 Ply (10 μ g) 或 PhtD/E 融合蛋白 (10 μ g) 和甲醛 - 解毒 Ply (10 μ g) 或单独的佐剂肌肉内免疫。
- [0568] PS 18C 被缀合至破伤风类毒素，19F 被缀合至白喉类毒素，其它 PS 被缀合至 PD。11 价疫苗的特征参见实施例 2，表 1 以及表 2 下方的注释。所有制剂添加了佐剂 C。
- [0569] 在第 42 天于右肺中接种 19F 型肺炎球菌 (5.10⁸cfu)。在攻击后第 1、3 和 7 天采集的支气管肺泡灌洗液中对集落进行计数。所述结果表示为攻击后 7 天每组死亡、肺部移

生或清除的动物数量。

[0570] 如图 8 所示,与单独佐剂组相比,11 价缀合物和 PhtD+dPly 组合获得了接近统计显著性(尽管所用动物数量较少)的良好保护($p < 0.12$, Fisher 精确检验)。

[0571] 实施例 15 缀合化学对针对 22F-PhtD 缀合物诱导的 4 型攻击的抗 -PhtD 抗体应答和保护效力的影响

[0572] 20 只雌性 OF1 小鼠的组在第 0 和 14 天用 $3 \mu\text{g}$ 的 22F-PhtD(通过直接 CDAP 化学制备)或 22F-AH-PhtD(AH- 衍生 PS) 或单独的佐剂肌肉内途径免疫。两种单价 22F 缀合物均通过实施例 2 的方法制备(也参见表 1 和表 2)。每种制剂均添加佐剂 C。

[0573] 在第 28 天采集的血清中检测抗 -PhtD ELISA IgG 水平。

[0574] 在第 29 天用 $5 \cdot 10^6 \text{cfu}$ 的 4 型肺炎球菌鼻内攻击小鼠(即,未被所测试疫苗制剂中存在的 PS 所潜在涵盖的肺炎球菌血清型)。监测死亡率至攻击后 10 天。

[0575] 图 9 所示的结果证明了与 22F-PhtD 相比,22F-AH-PhtD 诱导了明显更高的抗 -PhtD IgG 应答。如在图 10 中所示反映,与 22F-PhtD 相比,对 4 型攻击有更好的保护。

[0576] 实施例 16 在生成保护性免疫应答中结合多糖和蛋白的益处

[0577] 在小鼠致命肺炎链球菌攻击模型中评估了针对 PhtD 和荚膜多糖的免疫应答之间的潜在协同作用。小鼠以 PhtD 肌肉内免疫三次(第 0、14 和 28 天)。在细菌攻击前一小时,将抗多糖抗体被动转移至小鼠(IP, $200 \mu\text{l}$)。在攻击后 8 或 11 天通过肺炎链球菌诱导致死率。这里对两种肺炎链球菌菌株(血清型 3 和血清型 1)存在保护的协同作用。

[0578] 肺炎链球菌 3/43 攻击模型:

[0579] 在此实验中,用吸附在 A1P04 上的 PhtD 免疫 OF1 小鼠,并在用肺炎链球菌血清型 3(Spn 3/43) 攻击前 1 小时被动转移 $1.25 \mu\text{g}$ 抗 -PS3 豚鼠抗体。

[0580] 结果显示于图 11。在仅接受 PBS 的小鼠中观察到了 70% 的致死率。在接受抗 -PS3 抗体或以 PhtD 免疫的小鼠的组中观察到了中等的保护。在结合了分别针对 PhtD 和 PS3 的主动和被动免疫的小鼠中得到了几乎导致完全保护的协同作用。

[0581] 肺炎链球菌血清型 1/57 攻击模型:

[0582] 在此实验中,用添加了 TH1 佐剂的 PhtD 免疫 OF1 小鼠,并在用肺炎链球菌血清型 1(Spn 1/57) 攻击前一小时被动转移抗 -PS1 豚鼠抗体。

[0583] 结果显示于图 12。在仅接受了 TH1 佐剂(主动免疫)和 PBS(被动免疫)的对照组的小鼠中观察到了较高的致死率。在接受抗 -PS1 抗体(55% 存活)或以 PhtD 免疫(25% 存活)的小鼠的组中观察到了中等的保护。在结合了分别针对 PhtD 和 PS1 的主动和被动免疫的小鼠中得到了几乎导致完全保护的协同作用。

[0584] 这些数据支持在针对肺炎链球菌感染的保护机制中针对肺炎链球菌蛋白(即 PhtD) 和荚膜多糖的免疫应答的协同作用。

[0585] 实施例 17 肺炎球菌 PS-TT 和 PS-DT 缀合物对 11 价疫苗制剂中剩余的肺炎球菌 PS-PD 缀合物免疫应答的影响

[0586] 含有 11PS-PD 缀合物的制剂与含有 7PS-PD、2PS-TT(PS 6B 和 23F) 和 2PS-DT(PS 18C 和 19F) 缀合物的制剂在小鼠和豚鼠免疫原性模型中比较。

[0587] 小鼠用疫苗人用剂量的 $1/10$ ($0.1 \mu\text{gPS}$) 肌肉内免疫三次。在第 42 天采集血液样本,通过 ELISA 测定针对每种多糖的免疫应答。

[0588] 豚鼠用疫苗人用剂量的 1/4 (0.25 μ gPS) 肌肉内免疫三次。同时施用 Infanrix Hexa 以模拟人的情形。在第 42 天采集血液样本, 通过 ELISA 测定针对每种多糖的免疫应答。

[0589] E: 实验 N° PN115 (plms 20040304) 小鼠

[0590]

ELISA		
	均在 PD 上 1 μ g	6B-TTAH 1 μ g 23F-TTAH 1 μ g 18C-DTAH 1 μ g 19F-DT 1 μ g 1/4PD1 μ g 其它在 PD 上 1 μ g
1GMC 95% CI % seropos	6.148 4.54-8.33 100%	19.961* 14.73-27.05 100%
3GMC 95% CI % seropos	1.763 1.223-2.542 100%	2.483 1.693-3.643 100%
4GMC 95% CI % seropos	3.643 2.498-5.311 100%	11.849* 8.909-15.759 100%
5GMC 95% CI % seropos	2.291 1.575-3.332 100%	5.154* 3.829-6.939 100%
6B GMC 95% CI % seropos	0.048 0.031-0.075 44%	0.537* 0.342-0.843 100%
7F GMC 95% CI % seropos	0.297 0.22-0.41 100%	0.774 0.48-1.25 100%

ELISA		
9V GMC 95% CI % seropos	2.098 1.575-2.793 100%	8.098* 6.507-10.078 100%
14GMC 95% CI % seropos	4.983 3.742-6.634 100%	9.327* 7.669-11.344 100%
18C GMC 95% CI % seropos	0.469 0.32-0.69 100%	3.274* 2.67-4.01 100%
19F GMC 95% CI % seropos	3.052 2.14-4.35 100%	21.274* 16.54-27.37 100%
23F GMC 95% CI % seropos	0.072 0.044-0.117 38%	1.209 0.457-3.2 71%

[0591] E) 实验 N° PN116 (plms 20040308) 豚鼠

[0592]

ELISA		
	均在 PD 上 1 μg	6B-TTAH 1 μg 23F-TTAH 1 μg 18C-DTAH 1 μg 19F-DT 1 μg 1/4PD 1 μg 其它在 PD 上 1 μg
1GMC 95% CI % seropos	8.244 4.745-14.324 100%	33.479* 21.507-52.114 100%

ELISA		
3GMC 95% CI % seropos	2.348 142-3.89 100%	1.619 0.84-3.13 100%
4GMC 95% CI % seropos	9.211 5.535-15.238 100%	19.033 10.816-33.494 100%
5GMC 95% CI % seropos	14.04 9.967-19.776 100%	14.791 10.227-21.392 100%
6B GMC 95% CI % seropos	0.491 0.292-0.825 100%	1.667 0.746-3.726 100%
7F GMC 95% CI % seropos	10.467 5.979-18.324 100%	37.49 [*] 21.944-64.051 100%
9V GMC 95% CI % seropos	5.459 3.106-9.589 100%	10.309 6.183-17.187 100%
14GMC 95% CI % seropos	1.235 0.686-2.224 100%	4.358 [*] 2.073-9.161 100%
19F GMC 95% CI % seropos	7.769 5.617-10.745 100%	15.933 [*] 12.036-21.092 100%
18C GMC 95% CI % seropos	2.373 1.297-4.341 100%	8.744 [*] 5.128-14.908 100%

ELISA		
23F GMC	5.621	33.791 [*]
95% CI	3.289-9.608	20.838-54.797
% seropos	100%	100%

[0593] 含有与 TT(PS 6B 和 23F) 和 DT(PS 18C 和 19F) 缀合的两种多糖的制剂与 11-V PD 制剂相比, 在小鼠和豚鼠中均观察到针对与 PD 缀合的大部分多糖的增加的免疫应答。这些差异分别在小鼠和豚鼠中针对 PS 1、4、5、9V 和 14 以及 PS 1、7F 和 14 具有统计显著性。

0963963x1 序列表

<110> 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

<120> 疫苗

<130>VB62501

<160>6

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>1

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210>2

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>2

tetcccagcg tgcgccat 18

<210>3

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>3
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210>4
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400>4
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210>5
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400>5
tccatgacgt tcctgatgct 20

<210>6
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400>6
tcgacgtttt cggcgcgcgc cg 22

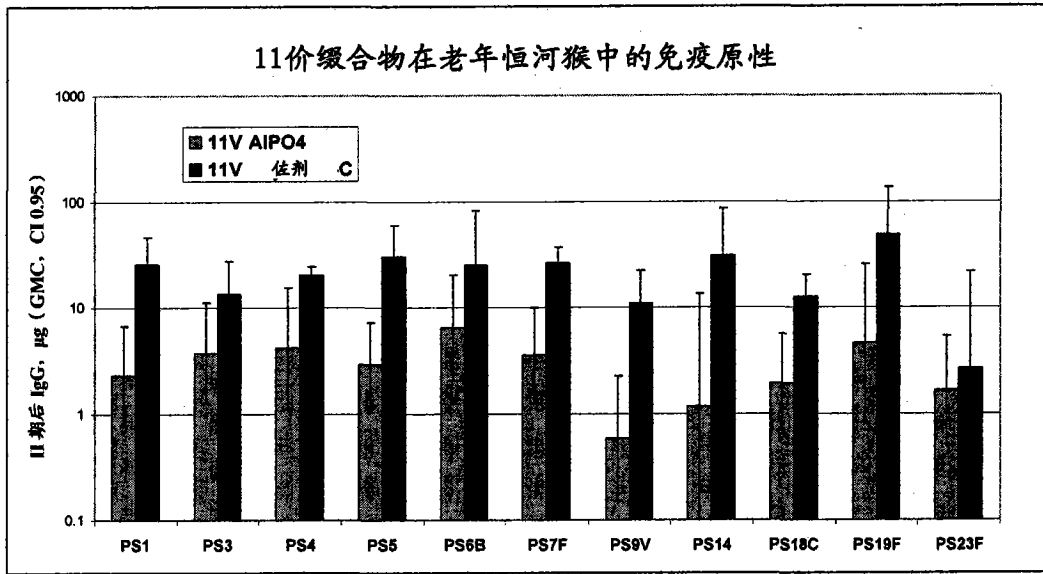


图 1

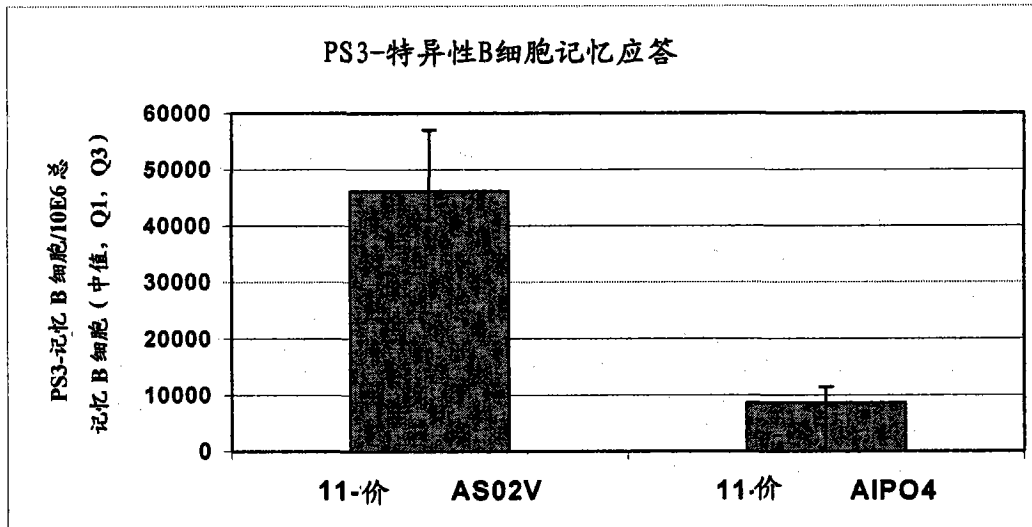


图 2

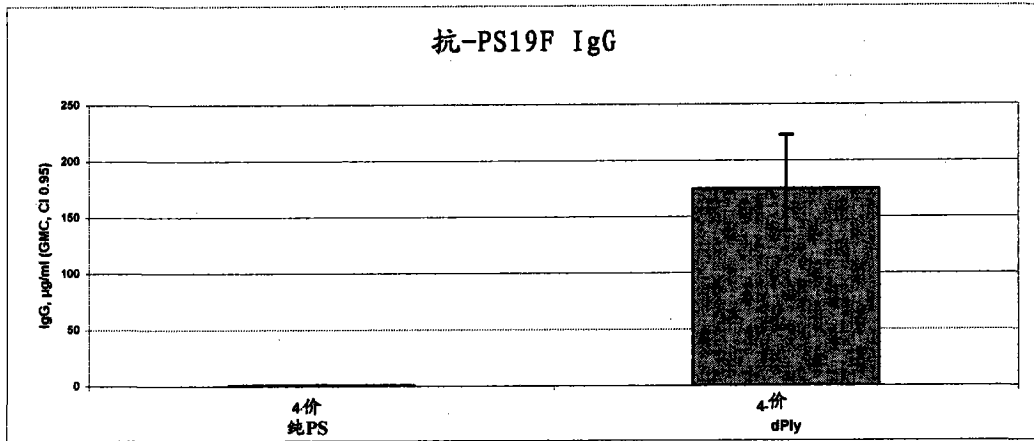


图 3

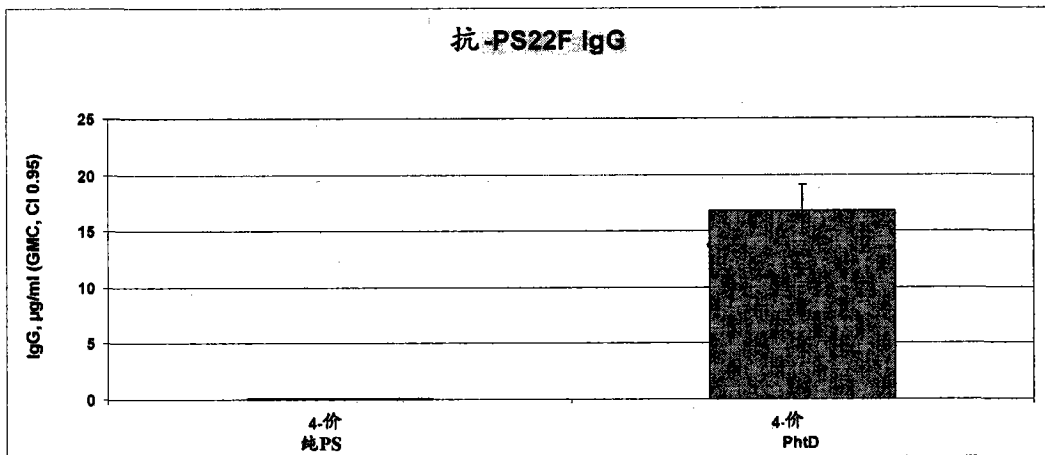


图 4

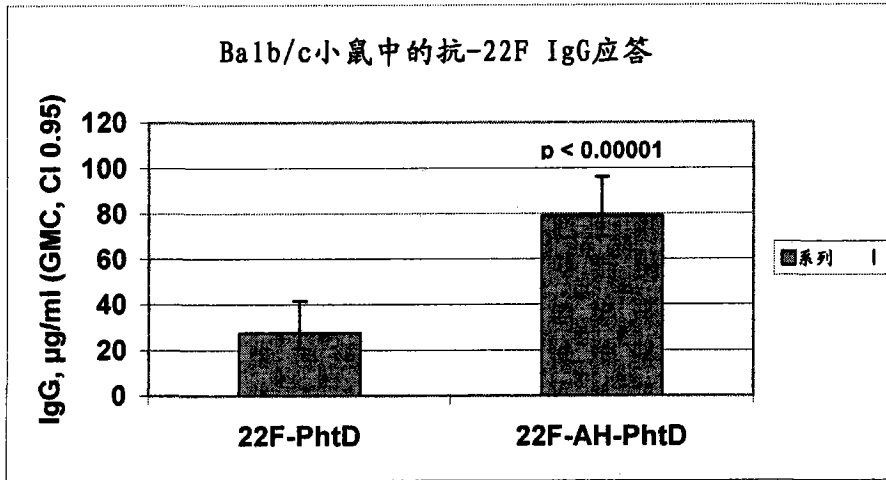


图 5

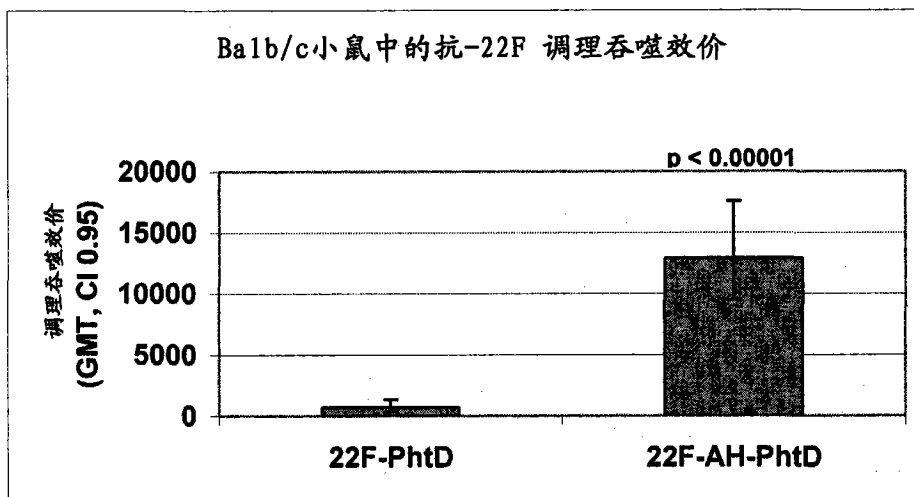


图 6

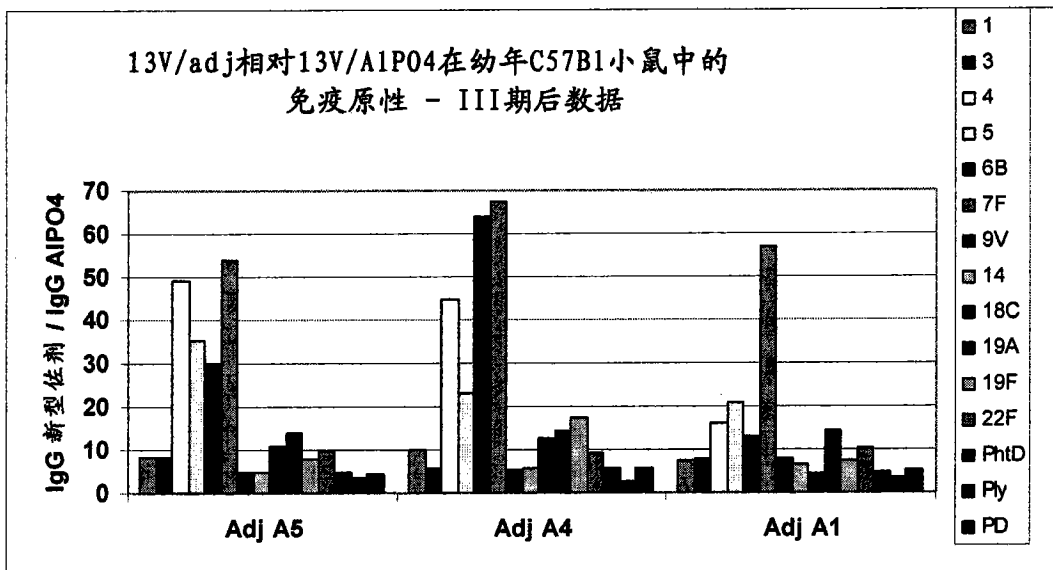


图 7

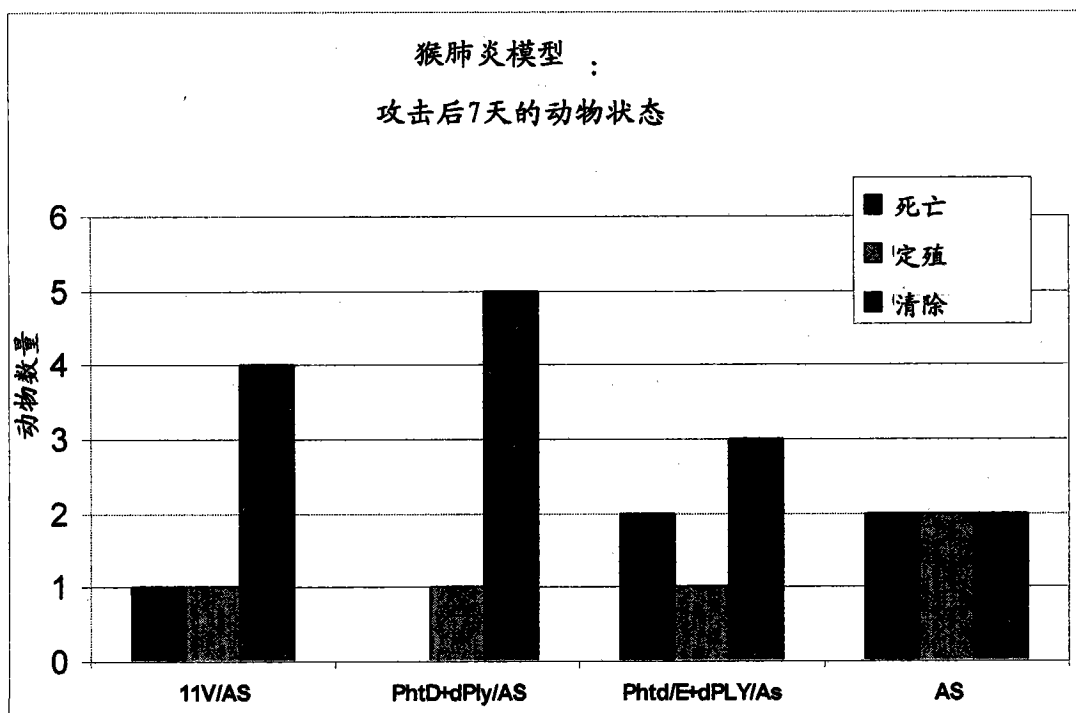


图 8

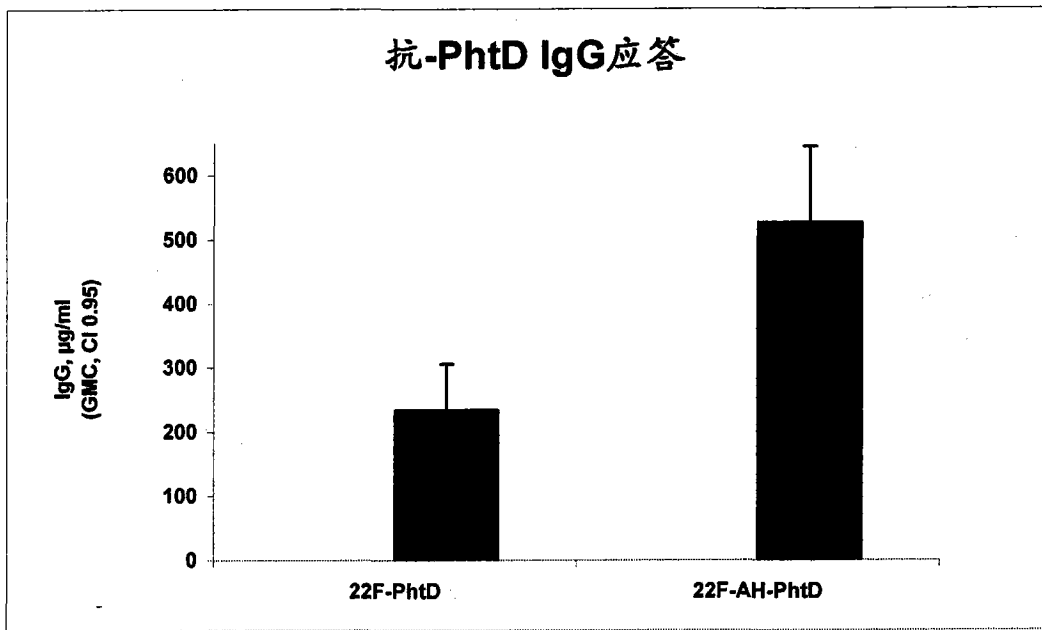


图 9

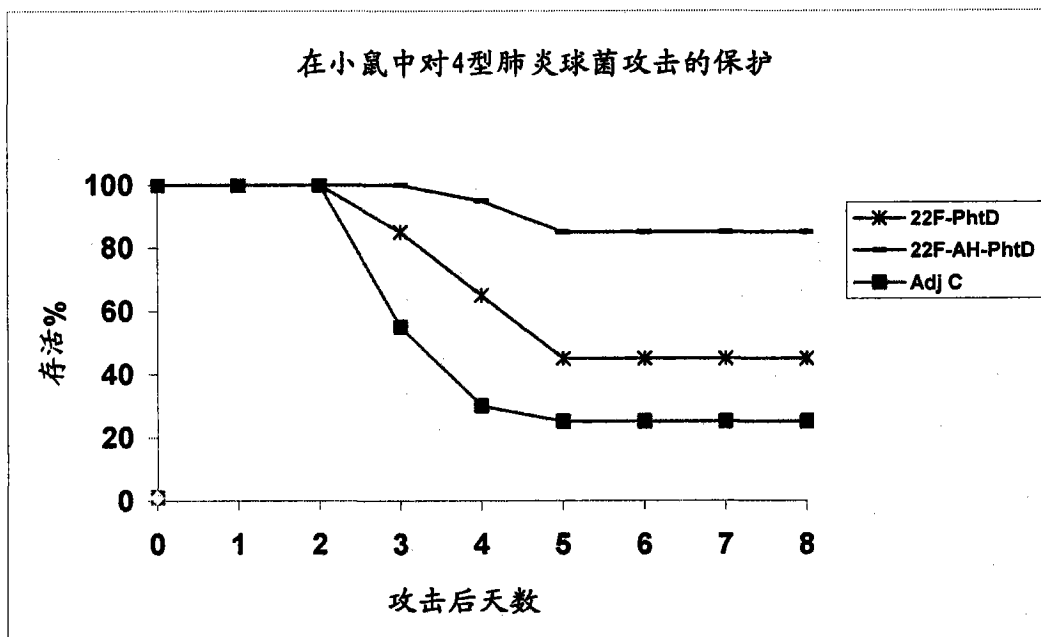


图 10

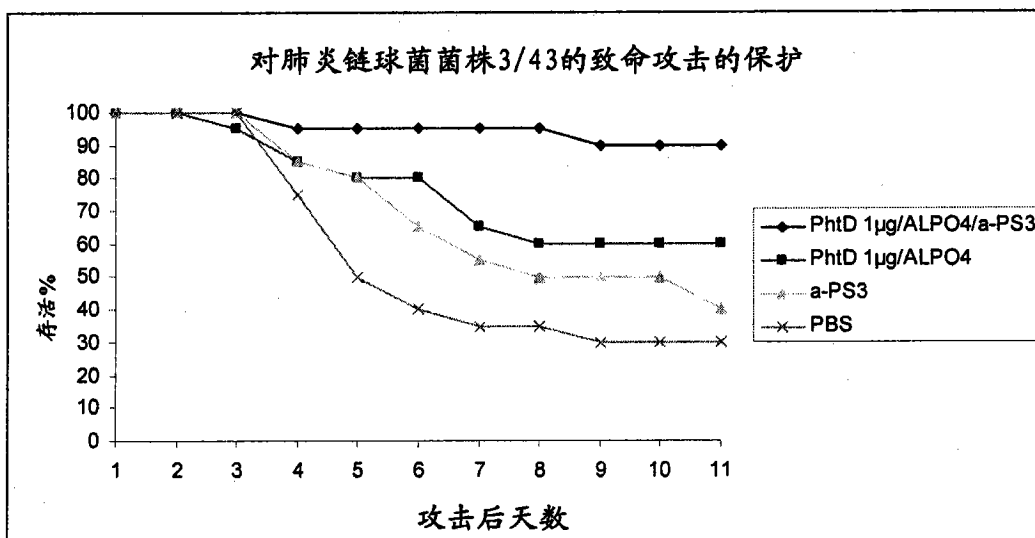


图 11

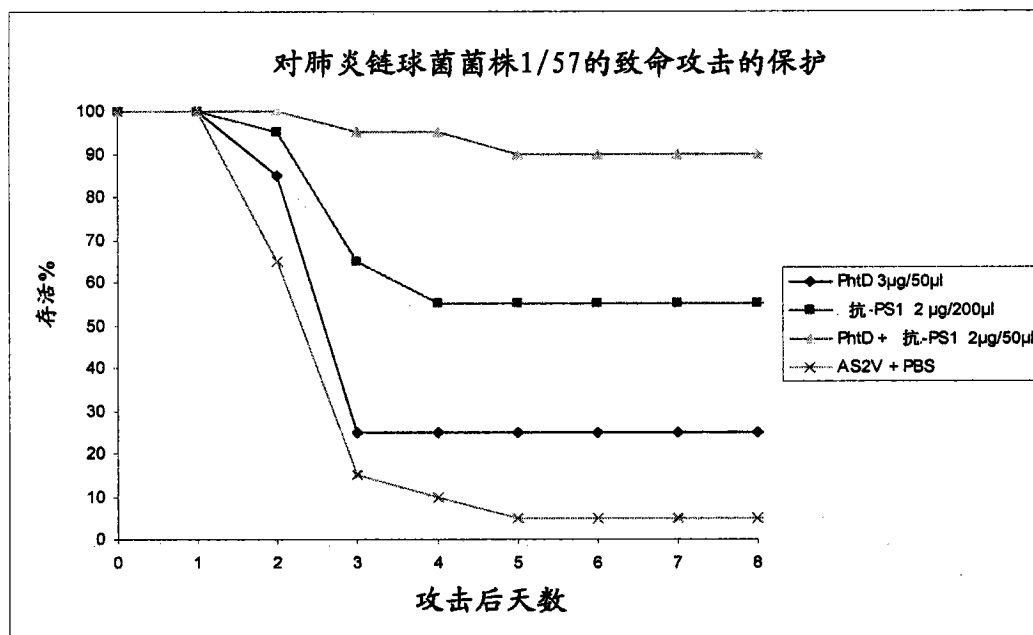


图 12

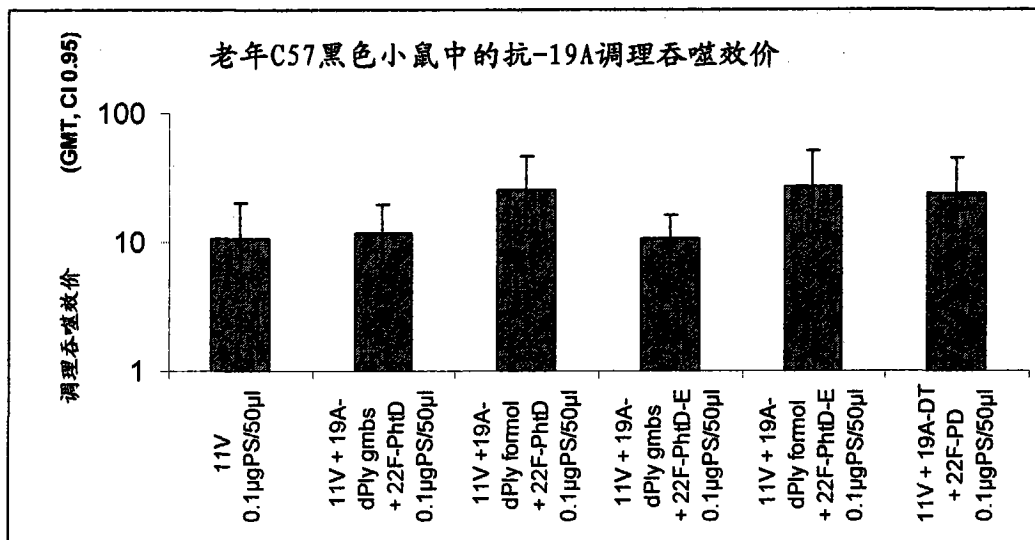


图 13

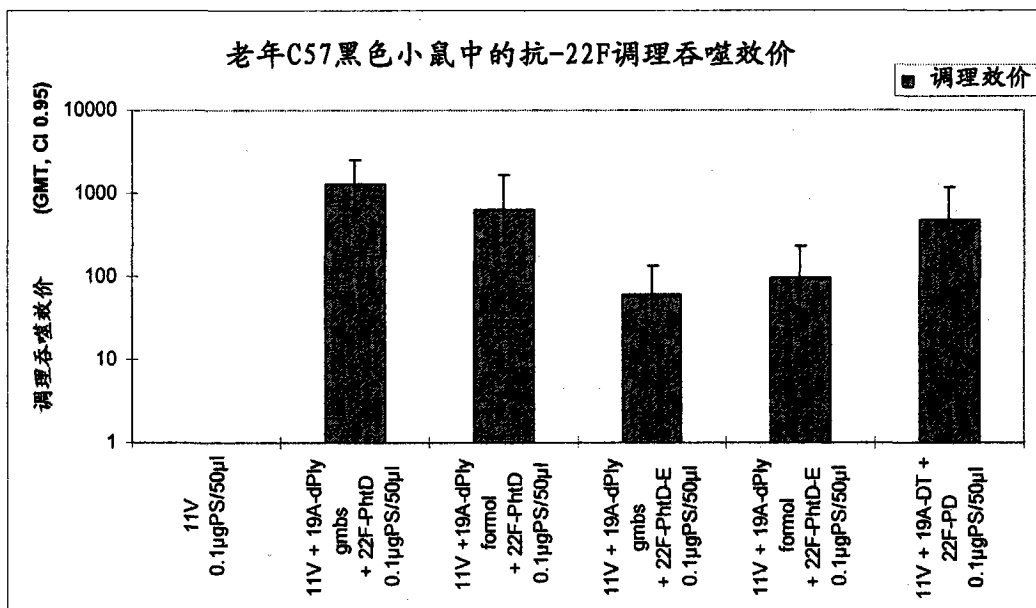


图 14

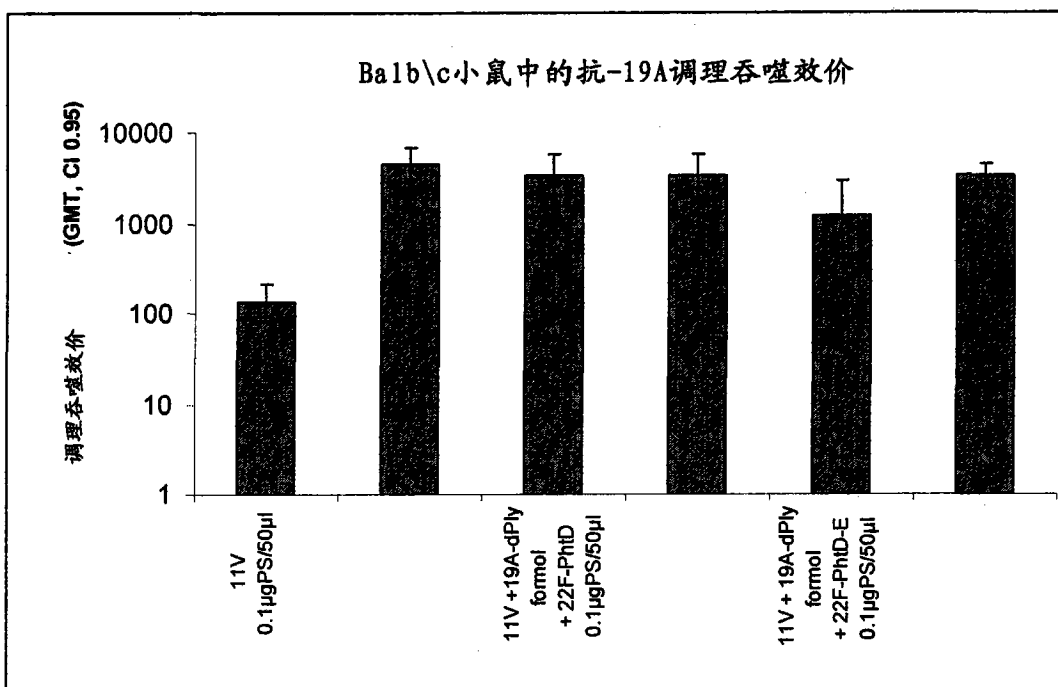


图 15

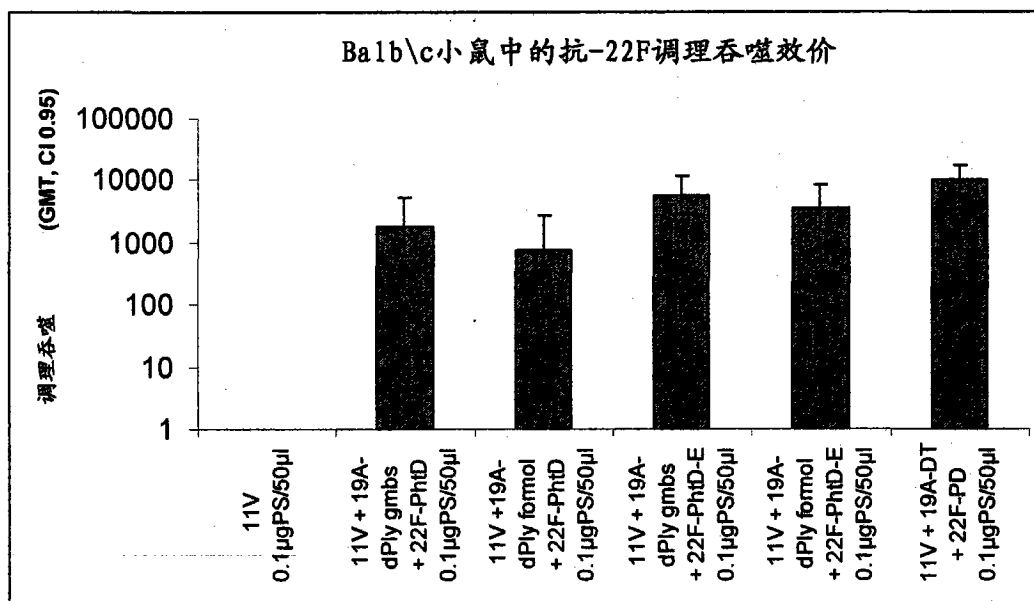


图 16

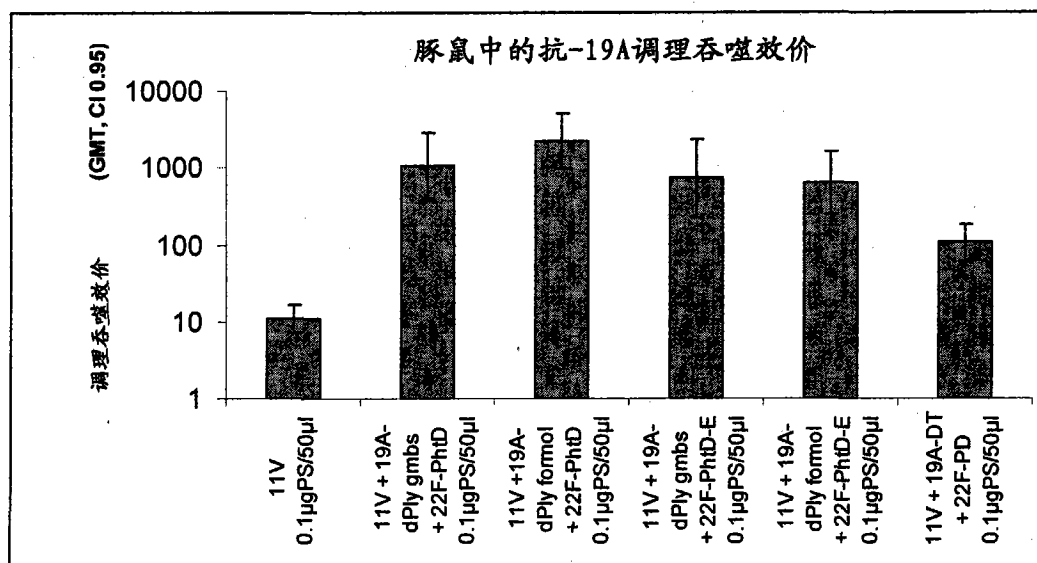


图 17

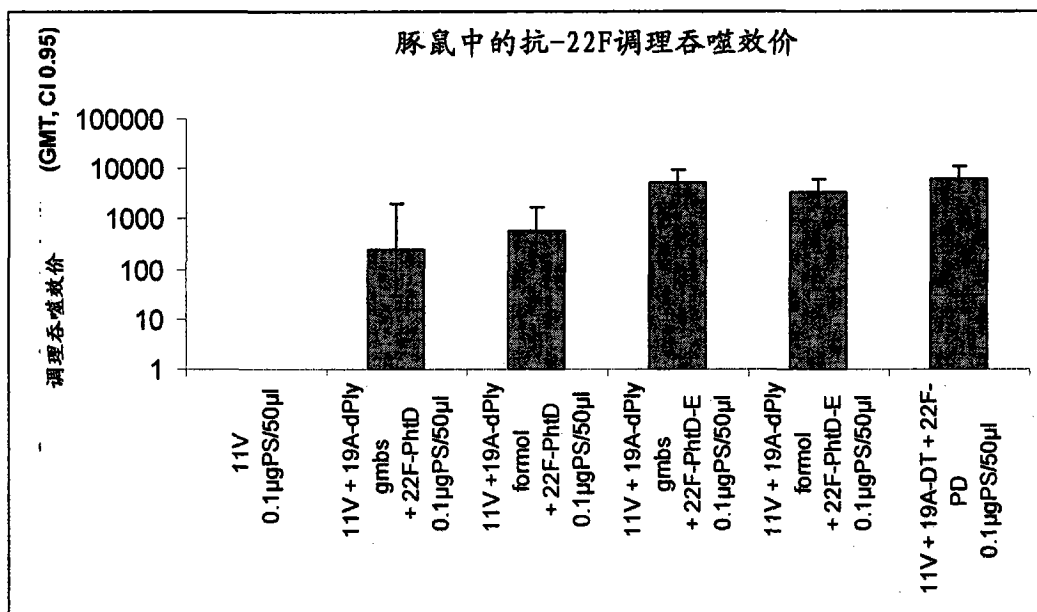


图 18

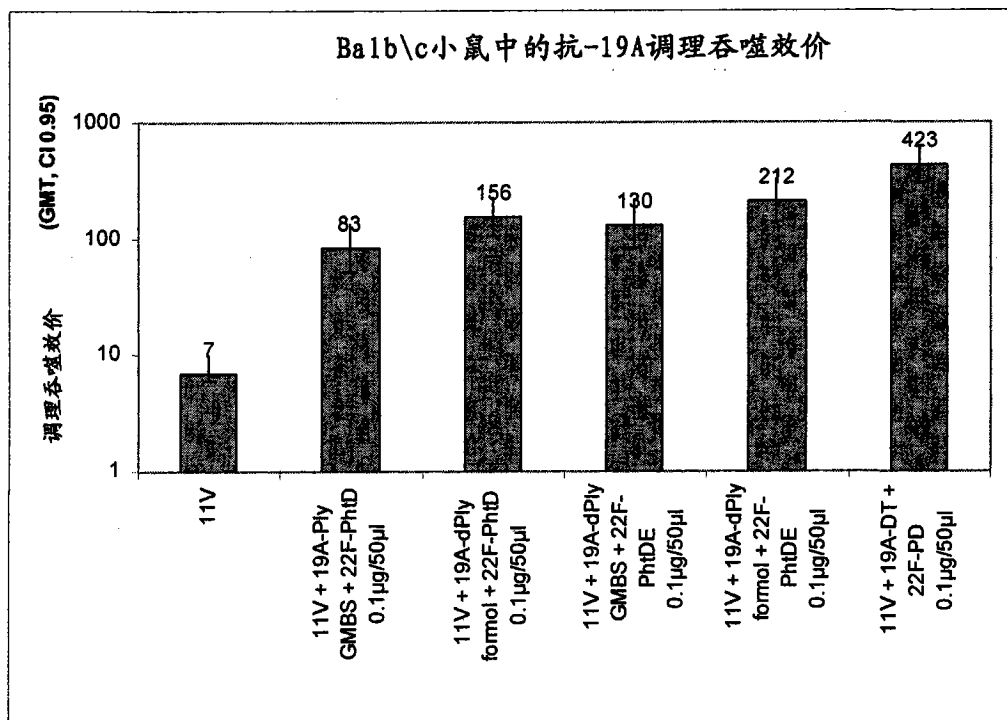


图 19

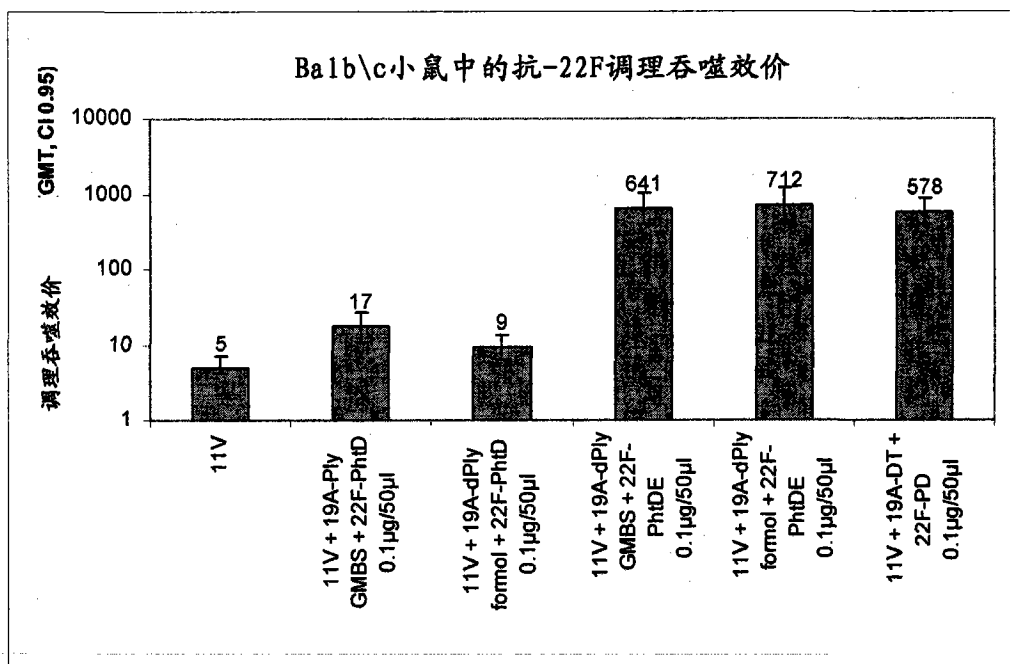


图 20

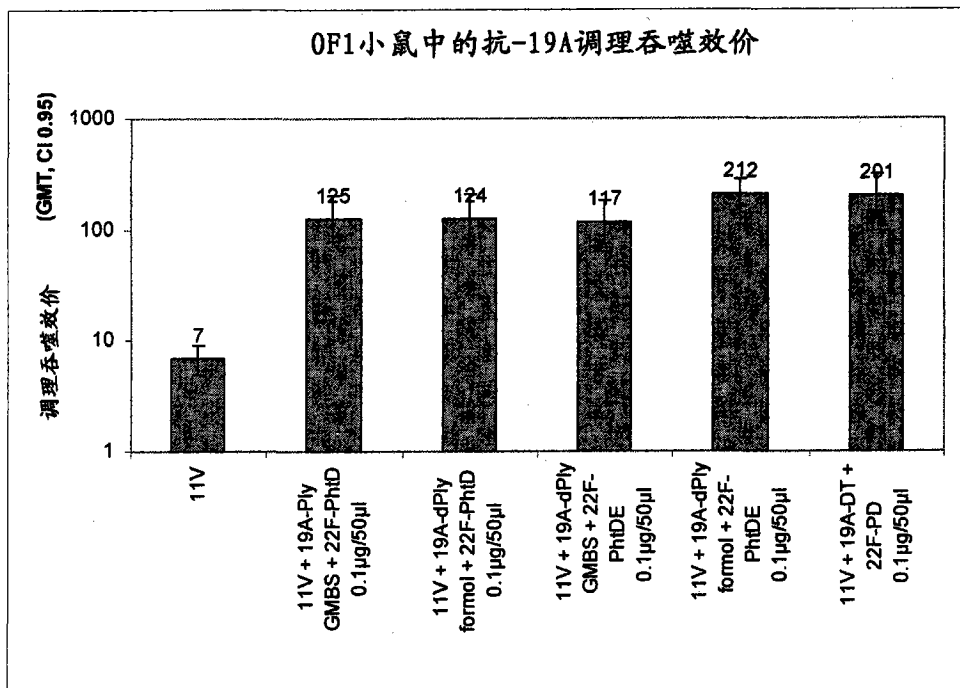


图 21

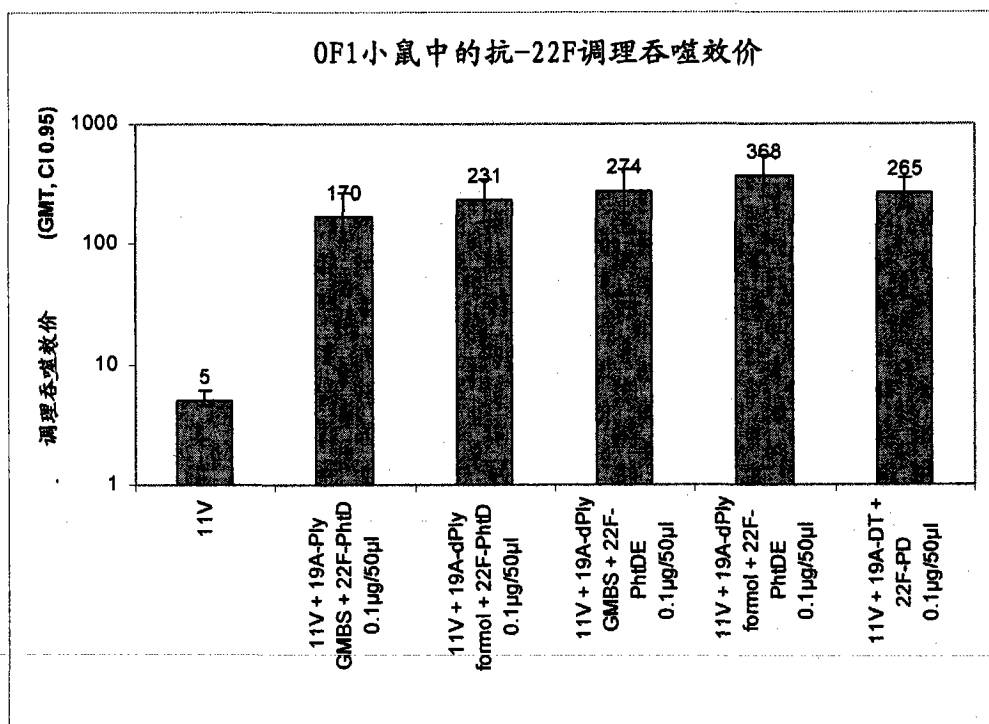


图 22