



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101287488 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 200680037163. 0

(22) 申请日 2006. 09. 01

(30) 优先权数据

60/713, 801 2005. 09. 01 US

60/750, 894 2005. 12. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2006/002861 2006. 09. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02007/026249 EN 2007. 03. 08

(73) 专利权人 诺华疫苗和诊断有限两合公司

地址 德国马尔堡

(72) 发明人 A·波考瓦斯基

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

A61K 39/09 (2006. 01)

A61K 39/095 (2006. 01) (续)

(56) 对比文件

CN 1547485 A, 2004. 11. 17, 权利要求 1-7、
14-21、25-38, 说明书 1-16 页.

CN 1449293 A, 2003. 10. 15, 权利要求 1-16,
说明书 1-10 页.

Buttery Jim P et al. Immunogenicity
and Safety of a Combination
Pneumococcal-Meningococcal Vaccine in
Infants. 《JAMA》. 2005, 第 293 卷 (第 14 期),
摘要, 1752 页右栏第 2 段, 1757 页中间栏第 1 段.

Halperin S A et al. Simultaneous
administration of meningococcal C conjugate
vaccine and diphtheria-tetanus-acellular
pertussis-inactivated
poliovirus-Haemophilus influenzae type b
conjugate vaccine in children: a randomized
double-blind study. 《Clinical and
Investigative Medicine》. 2002, 第 25 卷 (第 6
期), 243-251.

Rennels M et al. Safety and
immunogenicity of combined conjugate
9-valent S. pneumoniae-meningococcal
group C (9vPnc-MnCC) and H. influenza
b-9vPnc-MnCC (Hb0C-9vPnc-MnCC) vaccine.
《Abstracts of the interscience
conference on antimicrobial agents and
chemotherapy》. 2001, 第 41 卷摘要.

Slack Martin H et al. Immune Response
of Premature Infants to Meningococcal
Serogroup C and Combined Diphtheria-Tetanus
Toxoids - Acellular Pertussis - Haemophilus
influenzae Type b Conjugate Vaccines. 《The
Journal of Infectious Diseases》. 2001, 第 184
卷 (第 12 期), 1617-1620.

Eskola J et al. Reactogenicity and
immunogenicity of combined vaccines for
bacteraemic diseases caused by Haemophilus
influenzae type b, meningococci and

(续)

审查员 李影

权利要求书 3 页 说明书 30 页

序列表 3 页

(54) 发明名称

含血清群 C 脑膜炎球菌的多价疫苗

(57) 摘要

对包含血清群 C 脑膜炎球菌偶联抗原的疫苗
做出的各种改进, 包括: (a) 与无细胞百日咳杆菌
抗原共施用; (b) 与灭活的脊髓灰质炎病毒抗原
共施用; (c) 与可能是液体形式的单独的肺炎球

菌偶联物组分一起装在试剂盒中; 以及 (d) 与肺
炎球菌偶联抗原一起但不与磷酸铝佐剂一起使
用。所述试剂盒中可装有: (a) 包含来自肺炎链
球菌的偶联荚膜糖的水性制剂的第一免疫原性组
分; 和 (b) 包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的
偶联荚膜糖的第二免疫原性组分。

[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

A61K 39/13 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

(56) 对比文件

pneumococci in 24-month-old children.

《Vaccine》.1990, 第8卷(第2期), 摘要, 107
页右栏第3段-108页左栏第1段, 109页右栏第
1段, 表3.

1. 一种免疫原性组合物,其包含 (a) 来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,所述肺炎链球菌来自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F,所述肺炎链球菌偶联物吸附或未吸附到磷酸铝佐剂上;(b) 来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和 (c) 来自 1 型脊髓灰质炎病毒、2 型脊髓灰质炎病毒和 3 型脊髓灰质炎病毒的灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,其中所述组合物为水性形式,所述至少一种来自肺炎链球菌的荚膜糖和来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖各自偶联于相同的载体蛋白,所述载体蛋白是以类毒素形式使用的细菌毒素。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,还包含乙肝病毒表面抗原。

3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含氢氧化铝佐剂和磷酸铝佐剂。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖是 0Ac+ 株的荚膜糖。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物未吸附到磷酸铝佐剂。

6. 如权利要求 4 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物未吸附到磷酸铝佐剂。

7. 如权利要求 3 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物未吸附到磷酸铝佐剂。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物被吸附到磷酸铝佐剂。

9. 如权利要求 4 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物被吸附到磷酸铝佐剂。

10. 如权利要求 3 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物被吸附到磷酸铝佐剂。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述相同的载体蛋白是破伤风类毒素。

12. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述相同的载体蛋白是来自流感嗜血杆菌的蛋白 D。

13. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述相同的载体蛋白是 CRM197。

14. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述肺炎链球菌偶联物的糖类:蛋白质比例 (w/w) 在 1 : 10 和 10 : 1 之间。

15. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌偶联物的糖类:蛋白质比例 (w/w) 在 1 : 10 和 10 : 1 之间。

16. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,按糖类测量,所述脑膜炎奈瑟球菌偶联物的含量为每剂 1-20 μ g。

17. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,按糖类测量,所述肺炎链球菌偶联物的含量为每剂 1-20 μ g。

18. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其包含 2- 苯氧乙醇。

19. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述任何铝盐的浓度小于 3mg/ml。

20. 一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第

一免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖的水性制剂和磷酸铝佐剂,所述肺炎链球菌来自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F;和 (b) 所述第二免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;所述至少一种来自肺炎链球菌的荚膜糖和来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖各自偶联于相同的载体蛋白,所述载体蛋白是以类毒素形式使用的细菌毒素。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖是 OAc+。

22. 如权利要求 20 或权利要求 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述第二组分不含磷酸铝佐剂。

23. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物未吸附到磷酸铝佐剂。

24. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物被吸附到磷酸铝佐剂。

25. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖为冻干形式。

26. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组分包括以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;乙肝病毒表面抗原;和来自 1 型脊髓灰质炎病毒、2 型脊髓灰质炎病毒和 3 型脊髓灰质炎病毒的灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

27. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述第二组分包括以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;乙肝病毒表面抗原;和来自 1 型脊髓灰质炎病毒、2 型脊髓灰质炎病毒和 3 型脊髓灰质炎病毒的灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

28. 如权利要求 20 或 21 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还含有第三组分,所述第三组分包括以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;乙肝病毒表面抗原;和来自 1 型脊髓灰质炎病毒、2 型脊髓灰质炎病毒和 3 型脊髓灰质炎病毒的灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

29. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原为包含脂质基质的颗粒形式,所述脂质基质包含磷脂、磷脂酰肌醇和聚山梨醇酯 20。

30. 如权利要求 27 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原为包含脂质基质的颗粒形式,所述脂质基质包含磷脂、磷脂酰肌醇和聚山梨醇酯 20。

31. 如权利要求 28 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原为包含脂质基质的颗粒形式,所述脂质基质包含磷脂、磷脂酰肌醇和聚山梨醇酯 20。

32. 如权利要求 27 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原的氨基酸序列是 SEQ ID NO:1。

33. 如权利要求 28 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原的氨基酸序列是 SEQ ID NO:1。

34. 如权利要求 29 所述的试剂盒,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原的氨基酸序列是 SEQ ID NO:1。

35. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述相同的载体蛋白是破伤风类毒素。

36. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述相同的载体蛋白是来自流感嗜血

杆菌的蛋白 D。

37. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述相同的载体蛋白是 CRM197。

38. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述肺炎链球菌偶联物的糖类:蛋白质比例 (w/w) 在 1 : 10 和 10 : 1 之间。

39. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟球菌偶联物的糖类:蛋白质比例 (w/w) 在 1 : 10 和 10 : 1 之间。

40. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,按糖类测量,所述脑膜炎奈瑟球菌偶联物的含量为每剂 1-20 μ g。

41. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,按糖类测量,所述肺炎链球菌偶联物的含量为每剂 1-20 μ g。

42. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其包含 2- 苯氧乙醇。

43. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其特征在于,所述任何铝盐的浓度小于 3mg/ml。

44. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,用于制备提高患者免疫应答的药物。

45. (a) 来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖的水性制剂,所述肺炎链球菌来自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F,所述水性制剂包含磷酸铝佐剂;和 (b) 来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖在制造用于免疫患者的药物中的应用,所述至少一种来自肺炎链球菌的荚膜糖和来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖各自偶联于相同的载体蛋白,所述载体蛋白是以类毒素形式使用的细菌毒素。

46. 一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 一种组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖和磷酸铝佐剂,所述肺炎链球菌来自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F;(b) 一种组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 0Ac+ 株的偶联荚膜糖,(c) 一种或多种来自 1 型脊髓灰质炎病毒、2 型脊髓灰质炎病毒和 3 型脊髓灰质炎病毒的灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;其中所述至少一种来自肺炎链球菌的荚膜糖和来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖各自偶联于相同的载体蛋白,所述载体蛋白是以类毒素形式使用的细菌毒素。

含血清群 C 脑膜炎球菌的多价疫苗

[0001] 文中引用的所有文献被全文纳入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本发明的领域涉及免疫患者以抵抗多种病原体。

背景技术

[0003] 在一次剂量中含有来自一种以上病原生物的抗原的疫苗被称为“多价”或“组合”疫苗。在欧洲和美国,被证实对人体有效的各种组合疫苗包括抵抗白喉、破伤风和百日咳的三价疫苗(“DTP”疫苗)以及保护抵抗麻疹、腮腺炎和风疹的三价疫苗(“MMR”疫苗)。

[0004] 组合疫苗能为患者提供减少注射次数的优点,从而导致顺应性提高(例如见参考文献 1 的第 29 章)的临床优点,儿科疫苗尤其如此。然而同时,由于以下各种因素它们的制造存在许多困难:抗原和其他组分之间的物理和生物化学不相容性;免疫干扰;以及稳定性。各种组合疫苗描述于参考文献 2-10。

[0005] 在 2005 年,一项广泛宣传的研究 [11] 报道称,当将脑膜炎奈瑟球菌(*N. meningitidis*)血清群 C(‘MenC’)荚膜糖偶联疫苗与 9 价肺炎链球菌(肺炎链球菌)偶联糖类作为组合疫苗给予时其免疫原性被削弱。而且,与 b 型流感嗜血杆菌(*H. influenzae* type b)(‘Hib’)偶联物共施用以及与白喉类毒素共施用都观察到了削弱效应。作者总结到,‘Pnc9-MenC’组合疫苗“可能不适合代替单独的 MenC 或肺炎球菌糖偶联疫苗”。而且,他们还暗示,不相容性可能与抗原的组合特性无关,并且“单独施用疫苗可能有相同的效果”。

[0006] 因此仍旧需要能够保护抵抗 MenC 和肺炎球菌且不使这两种组分的免疫原性显著损失的免疫接种。还需要可保护抵抗 MenC、肺炎球菌、白喉和 Hib 且不使这四种组分的免疫原性显著损失的免疫接种。进一步说,仍旧需要将 MenC 免疫接种整合入现有的免疫方案。

[0007] 发明概述

[0008] 参考文献 11 的研究发现了 MenC 免疫原性的降低,在本发明中并未看见这种降低。与参考文献 11 的研究相比,本发明在几个关键方面不同,探索了分开或组合施用而成功取代了现有技术的不足。

[0009] 参考文献 11 的研究采用了全细胞百日咳杆菌抗原,并发现了 MenC 免疫原性的降低,在本发明的第一个方面中,将 MenC 偶联抗原与无细胞百日咳杆菌抗原共施用,且未观察到免疫原性有任何损失。这种情况与之前采用 Hib 偶联物的经验相反,它通常与全细胞百日咳抗原相容但与无细胞百日咳抗原不相容。它还与之前采用肺炎球菌偶联物的经验相反,其中当与无细胞百日咳杆菌抗原共施用时抗体反应被降低但在采用细胞抗原时抗体反应并未降低 [2]。采用无细胞抗原而非细胞抗原在安全性和反应原性方面提供了优点。

[0010] 而且,参考文献 11 的研究是与骨髓灰质炎口服疫苗(‘OPV’)同时给予 MenC/Pnc9 疫苗,发现 MenC 免疫原性降低,在本发明的第二个方面中, MenC 偶联抗原与可注射形式的骨髓灰质炎疫苗如灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗(‘IPV’)共施用,未观察到免疫原性有损

失。用 IPV 代替 OPV 消除了疫苗相关的骨髓灰质炎瘫痪的风险。

[0011] 此外,参考文献 11 的研究采用的疫苗组合物中的肺炎球菌和 MenC 偶联物是以预混合组合物提供的,发现 MenC 免疫原性降低,在本发明的第三个方面, MenC 偶联抗原是单独于肺炎球菌偶联物提供的,其形式为由多个部分组成的试剂盒,未观察到免疫原性的损失。MenC 和肺炎球菌偶联物可单独施用于患者(例如在不同部位),或者可在使用时将它们混合物以组合施用。全液体组合疫苗试剂盒的制造和分配不是很方便,但目前使用的是这种类型的试剂盒(例如 INFANRIX HEXA™ 产品),且免疫原性的提高和抗原的稳定性不足以补偿这种不便之处。

[0012] 此外,参考文献 11 的研究采用的疫苗组合物中的肺炎球菌和 MenC 偶联物是以冻干组合物提供的,发现 MenC 免疫原性降低,在本发明的第四个方面中,肺炎球菌偶联抗原以液体形式提供,未观察到免疫原性的损失。MenC 偶联物可采用冻干形式或者也可采用液体形式。以液体形式提供肺炎球菌偶联物则不需要在使用时重建,也可以用它来重建冻干形式的任何其他免疫原性组分。

[0013] 此外,参考文献 11 的研究采用的疫苗组合物中的肺炎球菌和 MenC 偶联物是与磷酸铝佐剂混合提供的,发现 MenC 免疫原性减低,在本发明的第五个方面,脑膜炎球菌偶联抗原未与磷酸铝佐剂一起提供,未观察到免疫原性的损失。磷酸铝佐剂可用氢氧化铝佐剂代替,或者可以根本不包含任何铝佐剂。也可采用其他的铝盐替代方案。

[0014] 最后,在本发明的第六个方面中, MenC 和肺炎球菌偶联物是与无细胞百日咳抗原和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原之一或两者一起施用的,且这两种偶联物采用相同的载体蛋白。采用通用载体蛋白减少了同时呈递于免疫系统的不同抗原的总数,且制造更加方便。如果施用一种以上的肺炎球菌偶联物,则各种肺炎球菌偶联物可具有相同的载体蛋白,或者可以有不同的载体蛋白,但至少一种肺炎球菌偶联物将具有与 MenC 偶联物相同的载体蛋白。

[0015] 下面更详细描述了本发明的这六个方面。

[0016] 2004 年 12 月出版的参考文献 3 描述了一项研究,该研究将 INFANRIXHEXA™(GSK)与 MENINGITEC™(惠氏(Wyeth))共施用于婴儿不同的大腿。INFANRIX HEXA™以 D-T-Pa-HBsAg-IPV 液体制剂以及额外的冻干 Hib 组分提供,在使用时将 Hib 组分重悬于 5 价液体制剂以得到 6 价组合疫苗。MENINGITEC™以含有磷酸铝佐剂的液体制剂提供。相反,在本发明的第五个方面中,提供的脑膜炎球菌偶联抗原不含磷酸铝佐剂。与参考文献 3 不同的还有,在本发明的第七个方面中,脑膜炎球菌偶联抗原以冻干形式提供。这种冻干形式将在注射前被重建成水性形式,且重建可采用 (a) 含有 D-T-Pa 的液体制剂,或 (b) 单独的水性载体,以便与含有 D-T-Pa 的制剂共施用。

[0017] 参考文献 4 披露的一项研究中,脑膜炎球菌 C 偶联疫苗与 5 价 D-T-Pa-IPV-Hib 疫苗共施用。参考文献 5 披露的一项研究中,肺炎球菌 C 偶联疫苗与 5 价 D-T-Pa-IPV-Hib 疫苗共施用。这些 5 价疫苗都不包含 HBsAg 组分。参考文献 6 披露的研究中, (a) HBsAg 与肺炎球菌偶联疫苗同时施用于婴儿,和 (b) 与肺炎球菌偶联疫苗同时给学步童单独施用 D-T-Pa 和 Hib 疫苗。参考文献 7 披露的一项研究中,脑膜炎球菌 C 偶联疫苗与 4 价 D-T-Pa-Hib 疫苗共施用。在本发明的第八个方面,脑膜炎球菌血清群 C 和肺炎球菌偶联物与乙肝表面抗原一起施用。在本发明的第九个方面,脑膜炎球菌血清群 C 和肺炎球菌偶联物与灭活的脊

髓灰质炎病毒抗原一起施用。

[0018] 下面更加详细描述了本发明的这九个方面。这九个方面可单独或组合使用。

[0019] 参考文献 8 描述了一项研究,其中将 6 价 D-T-Pa-HBV-IPV-Hib 疫苗与 7 价肺炎球菌偶联疫苗共施用,但不使用脑膜炎球菌偶联物。参考文献 9 和 10 描述了各种可能的组合疫苗,其中可包含脑膜炎球菌偶联物,但缺乏特定的细节,例如未描述所提及的脑膜炎球菌血清群 C 糖类的 O-乙酰化状态。

[0020] 无细胞百日咳抗原的应用

[0021] 在本发明的第一个方面,MenC 偶联物(‘MCC’)抗原与无细胞百日咳杆菌抗原(通常称为 ‘Pa’)共施用。MCC 和 Pa 抗原可单独施用于患者,或者可作为组合疫苗施用。

[0022] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a)所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和(b)所述第二免疫原性组分包含无细胞百日咳杆菌抗原。

[0023] 除无细胞百日咳杆菌抗原,所述第二免疫原性组分优选包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;以及任选的偶联的 Hib 抗原。

[0024] 所述试剂盒还可装有含有偶联的肺炎球菌糖抗原的组分。

[0025] 本发明还提供了一种免疫原性组合物,其包含:(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和(b)无细胞百日咳杆菌抗原。除了 MCC 和无细胞百日咳杆菌抗原,该组合物可含有以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;以及任选的偶联的 Hib 抗原。它还可包含偶联的肺炎球菌糖抗原。

[0026] 可注射的骨髓灰质炎疫苗的应用

[0027] 在本发明的第二个方面,MenC 偶联物(‘MCC’)抗原与可注射的脊髓灰质炎病毒抗原如灭活的骨髓灰质炎疫苗(‘IPV’)(也称为 Salk 疫苗)共施用。MCC 和 IPV 抗原可单独施用于患者或者它们可作为组合疫苗施用。

[0028] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a)所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和(b)所述第二免疫原性组分包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0029] 除 IPV,所述第二免疫原性组分优选包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;无细胞百日咳抗原;以及任选的偶联的 Hib 抗原。

[0030] 所述试剂盒也可装有含有偶联的肺炎球菌糖抗原的组分。

[0031] 本发明还提供了一种免疫原性组合物,其中包含:(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和(b)灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。除 MCC 和无细胞百日咳杆菌抗原,该组合物可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;无细胞百日咳抗原;以及任选的偶联的 Hib 抗原。它还可包含偶联的肺炎球菌糖抗原。

[0032] 以独立的试剂盒组分提供 MenC

[0033] 在本发明的第三个方面,以多组分试剂盒的形式将 MenC 偶联物(‘MCC’)抗原独立于肺炎球菌偶联物(TnC)提供。

[0034] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a)所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和

(b) 所述第二免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。

[0035] 除此之外,所述第一组分可含有以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳抗原;和 HBsAg。它还可包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。它还可包含偶联的 Hib 抗原。然而,当所述第一组分中包含这六种额外抗原之一时,它将不能含在所述第二组分中。

[0036] 除此之外,所述第二组分可含有以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳抗原;和 HBsAg。它还可包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。它还可包含偶联的 Hib 抗原。然而,当所述第二组分中包含这六种额外抗原之一时,它将不能含在所述第一组分中。

[0037] 当所述第一或第二组分都不含有白喉类毒素时,白喉类毒素可含在试剂盒的其他组分中。类似地,当所述第一或第二组分都不含有破伤风类毒素时,破伤风类毒素可含在试剂盒的其他组分中。类似地,当所述第一或第二组分都不含有百日咳抗原时,百日咳抗原可含在试剂盒的其他组分中。类似地,当所述第一或第二组分都不含有 HBsAg 时,HBsAg 可含在试剂盒的其他组分中。类似地,当所述第一或第二组分都不含有 Hib 偶联物时,Hib 偶联物可含在试剂盒的其他组分中。类似地,当所述第一或第二组分都不含有 IPV 时,IPV 可含在试剂盒的其他组分中。

[0038] 白喉、破伤风和百日咳抗原将通常一起含在试剂盒的同一组分内。

[0039] 液态肺炎球菌偶联物

[0040] 在本发明的第四个方面,肺炎球菌偶联抗原以液体形式提供。可以以下方式提供共施用的 MenC 偶联物:(i) 单独地,以冻干形式;(ii) 单独地,也以液体形式;或 (iii) 与肺炎球菌偶联物混合,以液体形式。

[0041] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖的水性制剂;和 (b) 所述第二免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖。所述第二组分中的 MCC 可以是水性制剂或冻干制剂。

[0042] 所述第一和 / 或第二组分也可含有以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;HBsAg;和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。优选所有这五种其他抗原都含在所述第一组分或所述第二组分中。或者,这五种抗原可作为试剂盒的第三免疫原性组分提供。该试剂盒可在所述第一或第二(或第三)组分中含有偶联的 Hib 抗原。

[0043] 本发明还提供了一种免疫原性组合物,其包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖和来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,其中所述组合物为水性形式。该免疫原性组合物优选还包括以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;无细胞百日咳杆菌抗原;HBsAg;灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;以及任选的偶联的 Hib 抗原。

[0044] MenC 和磷酸铝佐剂

[0045] 在本发明的第五个方面,提供的脑膜炎球菌偶联抗原不含磷酸铝佐剂。所述磷酸铝佐剂可用氢氧化铝佐剂代替,或者可以根本不含任何铝佐剂。共施用的肺炎球菌偶联物可与磷酸铝佐剂一起提供。

[0046] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,但不含磷酸铝佐剂;和 (b) 所述第二免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。

[0047] 在优选的安排中,所述第一免疫原性组分不含磷酸铝佐剂,但它可含有氢氧化铝

佐剂。或者,它和不含铝盐,此时它可含有非铝基佐剂,或者它可以根本不含佐剂。

[0048] 在另一种安排中,所述第一组分中允许存在磷酸铝,所述第一组分可含有氢氧化铝和磷酸铝佐剂的混合物。因此,本发明还提供了一种免疫原性组合物,其包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖和来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,其中所述组合物包含氢氧化铝佐剂和磷酸铝佐剂。

[0049] 再在一种安排中,所述第一组分中允许存在磷酸铝佐剂,且脑膜炎球菌偶联物组分被吸附到磷酸铝佐剂上。因此,本发明还提供了一种免疫原性组合物,其包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖和来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 偶联物被吸附到磷酸铝佐剂上。本发明还提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,该荚膜糖被吸附到磷酸铝佐剂上;和(b) 所述第二免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。所述肺炎球菌偶联物也可被吸附到磷酸铝佐剂上。

[0050] 除此之外,它还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳抗原;和 HBsAg。它还可包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。它还可包含偶联的 Hib 抗原。

[0051] MenC 和 PnC 的载体蛋白

[0052] 在本发明的第六个方面,MenC 和肺炎球菌偶联物是与无细胞百日咳抗原和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原之一或两者一起施用的,且这两种偶联物采用相同的载体蛋白。尽管存在载体诱导的抑制作用的风险,本发明已经发现,MenC 和肺炎球菌偶联物不会相互干扰,这与参考文献 11 中作者的意见相反。

[0053] 因此,本发明提供了一种免疫原性组合物,其包含:(a) 偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,和(c) 无细胞百日咳抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。该组合物还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;和/或偶联的 Hib 糖类。

[0054] 使用“相同的”载体蛋白不是指肺炎球菌和脑膜炎球菌糖类都结合于一个载体蛋白分子(参见参考文献 12)。相反,这两种偶联物相互独立,但第一偶联物所用的载体与所述第二偶联物所用的载体相同,例如,肺炎球菌糖类偶联于 CRM197,脑膜炎球菌糖类也偶联于 CRM197,但不是同时将肺炎球菌和脑膜炎球菌糖类偶联于 CRM197。因此,可单独制备偶联物然后再混合。

[0055] 本发明还提供了含有 PnC、MCC 以及 Pa 或 IPV 之一或两者的试剂盒:

[0056] • 一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 一种组分包含偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 一种组分包含偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,(c) 一种组分包含无细胞百日咳抗原,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。

[0057] • 一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 一种组分包含偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 一种组分包含偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,(c) 一种组分包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。

[0058] 抗原(a)、(b)和(c)都存在于试剂盒内,但它们不是同一试剂盒组分的所有部分。

可能有以下抗原安排,其中抗原 (a)、(b) 和 (c) 存在于最多三种独立组分中:

[0059]

组分 1	(a)	(a) 和 (b)	(a) 和 (c)	(a)
组分 2	(b) 和 (c)	(c)	(b)	(b)
组分 3	—	—	—	(c)

[0060] 为提供 PnC、MCC、Pa 和 IPV,本发明提供了一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 一种组分包含偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 一种组分包含偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,(c) 一种组分包含无细胞百日咳抗原;和 (d) 一种组分包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。

[0061] 抗原 (a)、(b)、(c) 和 (d) 都存在于试剂盒内,但它们不是同一试剂盒组分的所有部分。可能有以下抗原安排,其中抗原 (a)、(b)、(c) 和 (d) 存在于最多四种独立组分中:

[0062]

组分 1	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
组分 2	(b)、(c) 和 (d)	(b)	(b) 和 (d)	(b)	(c) 和 (d)	(c)	(c)
组分 3	-	(c) 和 (d)	(c)	(c)	-	(d)	(d)
组分 4	-	-	-	(d)	-	-	-
组分 1	(a) 和 (c)	(a) 和 (c)	(a)、(b) 和 (c)	(a)、(b) 和 (d)	(a) 和 (d)	(a) 和 (d)	(a) 和 (d)
组分 2	(b)	(b) 和 (d)	(d)	(c)	(b)	(b)	(b) 和 (c)
组分 3	(d)	-	-	-	-	(c)	-
组分 4	-	-	-	-	-	-	-

[0063] 通常,抗原 (c) 和 (d) 将是相同组分的一部分。

[0064] 这些试剂盒还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;HBsAg;和/或偶联的 Hib 糖类。

[0065] 如果组合物或试剂盒包含来自一种以上肺炎链球菌血清型和/或一种以上脑膜

炎奈瑟球菌血清群的糖类,则本发明的该方面要求至少一种肺炎链球菌偶联物和至少一种脑膜炎奈瑟球菌偶联物使用相同的载体蛋白。一些实施方式中,相同的载体蛋白将用于所有的肺炎链球菌偶联物和至少一种脑膜炎奈瑟球菌偶联物。其他实施方式中,相同的载体蛋白将用于至少一种肺炎链球菌偶联物和所有的脑膜炎奈瑟球菌偶联物。其他实施方式中,相同的载体蛋白将用于所有的肺炎链球菌偶联物和所有的脑膜炎奈瑟球菌偶联物。下面将更加详细地讨论载体的选择。

[0066] 当组合物或试剂盒包含偶联的 Hib 糖类时,则该 Hib 糖类中的载体蛋白可以与肺炎球菌和脑膜炎球菌偶联物中的载体相同,或者 Hib 偶联物可采用不同的载体。

[0067] 当组合物或试剂盒包含破伤风类毒素时,则肺炎球菌偶联物和脑膜炎球菌偶联物中的载体蛋白优选不是破伤风类毒素。一些实施方式中,肺炎球菌偶联物和脑膜炎球菌偶联物都不含破伤风类毒素载体。

[0068] 当组合物或试剂盒包含白喉类毒素时,则肺炎球菌偶联物和脑膜炎球菌偶联物中的载体蛋白优选不是白喉类毒素。一些实施方式中,肺炎球菌偶联物和脑膜炎球菌偶联物都不含白喉类毒素载体。

[0069] 当组合物或试剂盒包含白喉类毒素和破伤风类毒素时,则肺炎球菌和脑膜炎球菌偶联物中的载体蛋白优选既不是白喉类毒素也不是破伤风类毒素。

[0070] MenC 的冷冻干燥

[0071] 在本发明的第七个方面,在试剂盒中提供了冻干形式的脑膜炎球菌血清群 C 偶联抗原,该试剂盒中还装有含有 D-T-Pa 的水性制剂。

[0072] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含白喉类毒素、破伤风类毒素和无细胞百日咳杆菌抗原的水性制剂;和(b) 所述第二免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖, in 冻干形式。

[0073] 冻干的 MenC 偶联物将在注射前被重建成水性形式。重建步骤可采用:(a) 含有 D-T-Pa 的水性制剂,以得到包含 MenC 偶联物的组合疫苗,或者(b) 单独的水性载体,以得到与含有 D-T-Pa 的注射剂共施用的第二种注射剂,此时,该试剂盒中可装水性载体作为额外组分。

[0074] 所述含有 D-T-Pa 的制剂也可含有以下之一或两者:乙肝病毒表面抗原;和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0075] 偶联的 Hib 抗原也可含在该试剂盒中。它可含在冻干形式中(例如与冻干的 MenC 组分在同一容器内)或在含有 D-T-Pa 的制剂中。

[0076] MenC、PnC 和 HBsAg 的施用

[0077] 在本发明的第八个方面,脑膜炎球菌血清群 C 和肺炎球菌偶联物与乙肝表面抗原一起施用。

[0078] 因此,本发明提供了一种免疫原性组合物,其包含:(a) 来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,(b) 来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,和(c) 乙肝病毒表面抗原。该组合物还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;和/或偶联的 Hib 糖类。

[0079] 本发明还提供了一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组

分,其中:(a)一种组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,(b)一种组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,(c)一种组分包含乙肝病毒表面抗原。

[0080] 抗原(a)、(b)和(c)都存在于试剂盒内,但它们不是同一试剂盒组分的所有部分。可能有以下抗原安排,其中抗原(a)、(b)和(c)存在于最多三种独立组分中:

[0081]

组分 1	(a)	(a) 和 (b)	(a) 和 (c)	(a)
组分 2	(b) 和 (c)	(c)	(b)	(b)
组分 3	-	-	-	(c)

[0082] 所述试剂盒还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;和/或偶联的 Hib 糖类。这些额外抗原可包含在同一试剂盒组分中作为(a)、(b)或(c)中的任何一种,或者可存在于独立的组分中。然而通常,一种试剂盒组分可包含以下所有:HBsAg;白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0083] MenC、PnC 和 IPV 的施用

[0084] 在本发明的第九个方面,脑膜炎球菌血清群 C 和肺炎球菌偶联物是与灭活的脊髓灰质炎病毒抗原一起施用的。

[0085] 因此,本发明提供了一种免疫原性组合物,其包含:(a)来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,(b)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,和(c)灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。The 组合物还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;HBsAg;和/或偶联的 Hib 糖类。

[0086] 本发明还提供了一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a)一种组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖,(b)一种组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,(c)一种组分包含灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0087] 抗原(a)、(b)和(c)都存在于试剂盒内,但它们不是同一试剂盒组分的所有部分。可能有以下抗原安排,其中抗原(a)、(b)和(c)存在于最多三种独立组分中:

[0088]

组分 1	(a)	(a) 和 (b)	(a) 和 (c)	(a)
组分 2	(b) 和 (c)	(c)	(b)	(b)
组分 3	-	-	-	(c)

[0089] 所述试剂盒还可包含以下一种或多种:白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;HBsAg;和/或偶联的 Hib 糖类。这些额外抗原可包含在同一试剂盒组分中作为(a)、(b)或(c)中的任何一种,或者可存在于独立的组分中。然而通常,一种试剂盒组分可包含以下所有:灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;白喉类毒素;破伤风类毒素;百日咳杆菌抗原;和 HBsAg。

[0090] 所述第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九方面的组合

[0091] 本发明的这九个方面可单独应用或者可将 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个方面组合应用。例如,本发明还提供了以下 kits:

[0092] • 一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;和(b) 所述第二免疫原性组分包含无细胞百日咳杆菌抗原和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。

[0093] • 一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分,第二免疫原性组分和第三免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;(b) 所述第二免疫原性组分包含无细胞百日咳杆菌抗原和 / 或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;和(c) 所述第三免疫原性组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。

[0094] • 一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分以及任选的,第三组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,但不含磷酸铝佐剂;(b) 所述第二免疫原性组分包含无细胞百日咳杆菌抗原和 / 或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;和(c) 所述任选的第三组分包含来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。

[0095] • 一种试剂盒,其中装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 所述第一免疫原性组分包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖;(b) 所述第二免疫原性组分包含白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,其特征在于,所述第一免疫原性组分是冻干的和 / 或不含磷酸铝佐剂。

[0096] • 一种试剂盒,其中至少装有第一免疫原性组分和第二免疫原性组分,其中:(a) 一种组分包含偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 一种组分包含偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,(c) 一种组分包含无细胞百日咳抗原,其特征在于,所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的,且含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的组分是冻干的和 / 或不含磷酸铝佐剂。

[0097] 等等。

[0098] 本发明还提供了以下免疫原性组合物:

[0099] • 包含来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖、无细胞百日咳杆菌抗原和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原的免疫原性组合物。

[0100] • 包含以下组分的免疫原性组合物:(a) 来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖,(b) 无细胞百日咳杆菌抗原和 / 或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原;和(c) 来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖。

[0101] • 包含以下组分的免疫原性组合物:(a) 偶联于第一载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖,(b) 偶联于第二载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖,和(c) 无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、和乙肝病毒表面抗原,其中所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。

[0102] 等等。

[0103] 用于本发明的抗原

[0104] 本发明的组合物和试剂盒包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 糖抗原。通常,它们还包含至少一种偶联的肺炎链球菌糖抗原。它们还可包含来自其他病原体,尤其是来自细菌和 / 或病毒的进一步的抗原,抗原。优选的进一步的抗原选自:

- [0105] • 白喉类毒素 (‘D’)
- [0106] • 破伤风类毒素 (‘T’)
- [0107] • 百日咳抗原 (‘T’), 它通常是无细胞的 (‘aP’)
- [0108] • 乙肝病毒 (HBV) 表面抗原 (‘HBsAg’)
- [0109] • 甲肝病毒 (HAV) 抗原
- [0110] • 偶联的 b 型流感嗜血杆菌荚膜糖 (‘Hib’)
- [0111] • 灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗 (IPV)
- [0112] • 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 荚膜糖 (‘MenA’)
- [0113] • 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 荚膜糖 (‘MenW135’)
- [0114] • 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 荚膜糖 (‘MenY’)
- [0115] 可采用一种以上的这些进一步的抗原。特别优选以下抗原组合：
- [0116] • 二价疫苗 :MenC-PnC。
- [0117] • 四价疫苗 :D-T-Pa-MenC。
- [0118] • 五 价 疫 苗 :D-T-Pa-Hib-MenC ;D-T-Pa-IPV-MenC ;D-T-Pa-HB sAg-MenC ;
D-T-Pa-MenC-PnC。
- [0119] • 六价疫苗 :D-T-Pa-HB s Ag-IP V-MenC ;D-T-Pa-HB sAg-MenC-PnC。
- [0120] • 七价疫苗 :D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib-MenC ;D-T-Pa-HBsAg-Hib-MenC-MenA。
- [0121] • 八 价 疫 苗 :D-T-Pa-HB s Ag-IP V-Hib-MenC-MenA ;
D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib-MenG-PnC。
- [0122] 这些组合物可由所列抗原构成, 或者可进一步包含来自额外病原体的抗原。因此, 它们的单独使用或作为其他疫苗的组分。
- [0123] 偶联的脑膜炎奈瑟球菌糖类
- [0124] 偶联的脑膜炎球菌抗原包括来自偶联于载体蛋白的脑膜炎奈瑟球菌的荚膜糖抗原。抗血清群 C 的单价偶联疫苗已被证实可用于人类, 其中包括 MENJUGATE™[13]、MENINGITEC™ 和 NEISVAC-C™。血清群 A+C 偶联物的混合物是已知的 [14,15], 血清群 A+C+W135+Y 偶联物的混合物也已报道 [16-19] 并在 2005 年被批准作为 MENACTRA™ 产品。
- [0125] 本发明采用了至少一种来自血清群 C 的脑膜炎球菌糖类, 但也可包括来自血清群 A、W135 和 / 或 Y 中一种或多种的糖类, 例如 A+C、C+W135、C+Y、A+C+W135、A+C+Y、C+W135+Y、A+C+W135+Y。当采用一种以上血清群时则优选采用血清群 A 和 C。
- [0126] 脑膜炎球菌血清群 C 的荚膜糖是一种 $\alpha 2 \rightarrow 9$ - 连接的唾液酸 (N- 乙酰神经氨酸) 的均聚物, 其在 C-7 或 C-8 残基上通常具有 O- 乙酰 (OAc) 基。该化合物可表示为 : $\rightarrow 9$)-Neu p NAc 7/8OAc-($\alpha 2 \rightarrow$
- [0127] 一些 MenC 菌株 (约占侵袭性分离物的 12%) 产生缺乏这种 OAc 基团的多糖。OAc 基团的存在或不存在能产生独特表位, 且抗体结合糖类的特异性可影响其抗 O- 乙酰化 (OAc-) 和脱 -O- 乙酰化 (OAc+) 菌株的杀菌活性 [20-22]。批准的 MenC 偶联疫苗包含 OAc-(NEISVAC-C™) 和 OAc+(MENJUGATE™ 和 MENINGITEC™) 糖类。用于本发明的血清群 C 糖类可从 OAc+ 或 OAc- 菌株制备。优选的制备血清群 C 偶联物的菌株是 OAc+ 菌株, 优选血清型 16 的菌株, 优选血清亚型 P1.7a,1 的菌株。因此, C:16:P1.7a,1OAc+ 菌株是优选的。血清亚型 P1.1 的 OAc+ 菌株也是有用的, 如 C11 菌株。

[0128] 脑膜炎球菌血清群 A 的荚膜糖是一种 ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-连接的 N-乙酰-D-甘露糖胺-1-磷酸的均聚物,其在 C3 和 C4 位被部分 O-乙酰化。C-3 位的乙酰化比例可以是 70-95%。用于纯化糖类的条件可导致去 O-乙酰化(例如在碱性条件下),但优选保留该 C-3 位的 OAc。因此,优选至少 50%(例如至少 60%、70%、80%、90%、95%或更多)的甘露糖胺残基在 C-3 位被 O-乙酰化。

[0129] 血清群 W135 的糖类是唾液酸-半乳糖二糖单元的聚合物。与血清群 C 的糖类一样,它具有不同程度的 O-乙酰化,但在唾液酸的 7 和 9 位 [23]。其结构可写为: $\rightarrow 4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)-\alpha-(2 \rightarrow 6)-D-Gal-\alpha-(1 \rightarrow$

[0130] 血清群 Y 的糖类类似于血清群 W135 的糖类,但二糖重复单元包含葡萄糖而非半乳糖。与血清群 W135 一样,它在唾液酸的 7 和 9 位具有不同程度的 O-乙酰化 [23]。血清群 Y 的结构可写为:

[0131] $\rightarrow 4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)-\alpha-(2 \rightarrow 6)-D-Glc-\alpha-(1 \rightarrow$

[0132] MENJUGATE™ 和 MENINGITEC™ 产品采用 CRM197 载体蛋白,这种载体也可用于本发明。NEISVAC-C™ 产品采用破伤风类毒素载体蛋白,这种载体也可用于本发明,白喉类毒素也一样。对脑膜炎球菌偶联物而言,另一种有用的载体蛋白是来自流感嗜血杆菌的蛋白 D,它不存在于任何现有经批准的偶联疫苗中。

[0133] 当从脑膜炎球菌制备时偶联物的糖部分可含有全长糖类,和/或可含有全长糖类的片段。用于本发明的糖类优选短于在细菌中发现的天然荚膜糖。因此,优选将糖类解聚,其解聚在糖类的纯化之后但在偶联之前进行。解聚降低了糖类的链长。一种解聚方法涉及采用过氧化氢 [16]。将过氧化氢加入糖类(例如使 H₂O₂ 的最终浓度为 1%),然后孵育(例如在约 55°C)混合物直到实现所需的链长降低。另一种解聚方法涉及酸水解 [17]。其他解聚方法是本领域已知的。用来制备用于本发明的偶联物的糖类可通过这些解聚方法中的任何一种获得。可采用解聚来提供对免疫原性而言最合适的链长和/或为对糖类进行物理操作而降低链长。优选的糖单元的平均聚合度(D_p)范围如下:A=10-20;C=12-22;W135=15-25;Y=15-25。对于所有血清群,就分子量而非 D_p 而言,其优选范围为:<100kDa;5kDa-75kDa;7kDa-50kDa;8kDa-35kDa;12kDa-25kDa;15kDa-22kDa。

[0134] 可采用的脑膜炎球菌偶联物中糖类:蛋白质的比例(w/w)在 1:10(即蛋白质过量)和 10:1(即糖类过量)之间,例如,尤其对于血清群 C,可采用的比例在 1:5 和 5:1 之间、在 1:2.5 和 2.5:1 之间、或在 1:1.25 和 1.25:1 之间。

[0135] 通常,每剂组合物将含有 1-20 μ g(按糖类测量)所存在的各种血清群。

[0136] 给予脑膜炎球菌偶联物优选导致相关血清组的血清杀菌测定(SBA)效价提高至少 4 倍,优选至少 8 倍。SBA 效价可用幼兔补体或人补体测量 [24]。

[0137] 脑膜炎球菌偶联物可被或不被吸附于铝盐佐剂。

[0138] 根据本发明,脑膜炎球菌偶联物在其使用前可被冻干。如果被冻干,则组合物可包含稳定剂如甘露醇。它还可包含氯化钠。

[0139] 偶联的肺炎球菌糖类

[0140] 偶联的肺炎球菌抗原包含来自偶联于载体蛋白的肺炎链球菌的荚膜糖抗原[例如参考文献 25-27]。优选包含来自一种以上肺炎链球菌血清型的糖类:来自 23 种不同血清型的多糖的混合物被广泛应用,与 5-11 种不同血清型多糖形成的偶联疫苗也被广泛应

用 [28]。例如,PREVNAR™[29] 含有来自 7 种血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F) 的抗原,各种糖类通过反应性氨基化单独偶联于 CRM197,每 0.5ml 剂量含有 2 μ g 各种糖类 (血清型 6B 为 4 μ g)。

[0141] 本发明的组合物优选至少含有血清型 6B、14、19F 和 23F 的糖抗原。进一步的血清型宜选自:1、3、4、5、7F、9V 和 18C。7 价 (如 PREVNAR™)、9 价 (例如 PREVNAR 中的 7 种血清型加上 1 和 5)、10 价 (例如 PREVNAR 中的 7 种血清型加上 1、5 和 7F) 以及 11 价 (例如 PREVNAR 中的 7 种血清型加上 1、3、5 和 7F) 肺炎球菌血清型疫苗特别有效。

[0142] 当从肺炎球菌制备时偶联物的糖部分可含有全长糖类,和 / 或可含有全长糖类的片段。用于本发明的糖类优选短于在细菌中发现的天然荚膜糖,如上文对脑膜炎球菌偶联物的描述。

[0143] 可采用的肺炎球菌偶联物中糖类:蛋白质的比例 (w/w) 在 1 : 10 (即蛋白质过量) 和 10 : 1 (即糖类过量) 之间,例如,可采用的比例在 1 : 5 和 5 : 1 之间、在 1 : 2.5 和 2.5 : 1 之间、或在 1 : 1.25 和 1.25 : 1 之间。

[0144] PREVNAR™ 产品采用 CRM197 载体蛋白,而这种载体也可用于本发明。可与肺炎球菌糖类一起使用的其他载体包括,但不限于,破伤风类毒素载体,白喉类毒素载体,和 / 或流感嗜血杆菌蛋白 D 载体。对混合的肺炎球菌血清型采用多种载体是有利的 [30],例如可同时包含流感嗜血杆菌蛋白 D 载体和例如破伤风类毒素载体和 / 或白喉类毒素载体。例如,血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14 和 23F 中的一种或多种 (优选全部) 可偶联于流感嗜血杆菌蛋白 D 载体,血清型 18C 可偶联于破伤风类毒素,而血清型 19F 可偶联于白喉类毒素载体。

[0145] 通常,每剂组合物将含有 1-20 μ g (按糖类测量) 所存在的各种血清群。

[0146] 百日咳抗原

[0147] 百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 会造成百日咳。疫苗中的百日咳抗原是细胞 (全细胞,以灭活的百日咳杆菌细胞的形式) 或无细胞的。有细胞百日咳抗原的制备已充分论述 [例如见参考文献 1 的第 21 章],例如可通过热灭活百日咳杆菌 I 期培养物来获得。然而,优选地,本发明采用无细胞抗原。

[0148] 当采用无细胞抗原时,优选采用一种、两种或 (优选) 三种以下抗原:(1) 解毒的百日咳毒素 (百日咳类毒素,或 'PT'); (2) 丝状血凝素 ('FHA'); (3) 黏附素 (pertactin) (也称为 '69kDa 外膜蛋白')。这三种抗原优选从生长在改进的 Stainer-Scholte 液体培养基中的百日咳杆菌培养物中分离来制备。PT 和 FHA 可从发酵肉汤中分离 (例如通过吸附到羟基磷灰石凝胶上),而黏附素可通过热处理和絮凝从细胞中提取 (例如采用氯化钡)。可在连续层析和 / 或沉淀步骤中纯化抗原。PT 和 FHA 可通过例如疏水层析、亲和层析和排阻层析来纯化。黏附素可通过例如离子交换层析、疏水层析和排阻层析来纯化。FHA 和黏附素在用于本发明之前可用甲醛处理。PT 优选用甲醛和 / 或戊二醛处理来解毒。除了这种化学解毒方法,PT 还可以是其中的酶活性已通过突变而降低的 PT 突变体 [31],但优选通过化学处理来解毒。

[0149] 无细胞百日咳抗原优选被吸附到一种或多种铝盐佐剂上。或者可以未吸附的状态加入它们。当加入黏附素时则优选已将它吸附到氢氧化铝佐剂上。PT 和 FHA 可被吸附到氢氧化铝或磷酸铝佐剂上。最优选将 PT、FHA 和黏附素都吸附氢氧化铝上。

[0150] 组合物将通常包含:1-50 μ g/剂PT;1-50 μ g/剂FHA;和1-50 μ g黏附素。优选量为约25 μ g/剂PT,约25 μ g/剂FHA和约8 μ g/剂黏附素。

[0151] 除了PT、FHA和黏附素,无细胞百日咳疫苗中可能含有纤毛素(例如凝集原2和3)。

[0152] 灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗

[0153] 脊髓灰质炎病毒造成骨髓灰质炎。除了使用口服脊髓灰质炎病毒疫苗,本发明的优选实施方式采用IPV,如参考文献1第24章的详细描述所披露。

[0154] 脊髓灰质炎病毒可在细胞培养物中生长,优选的培养物采用衍生自猴肾的Vero细胞系。Vero细胞可在微载体上方便地培养。生长之后,可采用诸如超滤、渗滤和层析酯类的技术纯化病毒粒子。施用于患者之前,脊髓灰质炎病毒必需被灭活,这可通过用甲醛处理来实现。

[0155] 骨髓灰质炎可由三种类型的脊髓灰质炎病毒中的一种造成。这三种类型是类似的并造成相同的症状,但它们在抗原上非常不同,被一种类型感染不会产生对其他类型感染的抵抗力。因此本发明优选采用三种脊髓灰质炎病毒抗原:1型脊髓灰质炎病毒(例如Mahoney毒株),2型脊髓灰质炎病毒(例如MEF-1毒株),和3型脊髓灰质炎病毒(例如Saukett毒株)。优选将病毒单独生长、纯化和灭活,然后合并以得到大量用于本发明的三价混合物。

[0156] IPV的量通常用‘DU’单位(“D-抗原单位”[32])表示。优选在每剂中采用1-100 DU每种病毒类型,例如约80DU 1型脊髓灰质炎病毒,约16 DU 2型脊髓灰质炎病毒,以及约64 DU 3型脊髓灰质炎病毒。

[0157] 脊髓灰质炎病毒抗原在用来制造本发明的组合物之前优选不吸附到任何铝盐佐剂上,但在储存过程中它们可吸附到疫苗组合物中的铝佐剂上。

[0158] 白喉类毒素

[0159] 白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)造成白喉。可对白喉毒素进行处理(例如采用福尔马林或甲醛)以除去毒性同时保留在注射后诱导特异性抗-毒素抗体的能力。这些白喉类毒素被用于白喉疫苗并更加详细地描述于参考文献1的第13章。优选的白喉类毒素是通过甲醛处理的那些。可使白喉棒状杆菌在可添加有牛提取物的生长培养基(例如,Fenton培养基或者Linggoud和Fenton培养基)中生长,然后进行甲醛处理、超滤和沉淀以得到白喉类毒素。然后用包括无菌过滤和/或渗析的方法处理类毒素化的材料。

[0160] 白喉类毒素的量可表达为国际单位(IU)。例如,NIBSC提供的‘吸附的白喉类毒素的第三国际标准1999’(*Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard* 1999)[33,34]含有160IU/安瓿。除了IU系统,‘Lf’单位(“絮凝化单位”或“临界絮凝化剂量”)被定义为与1国际单位抗毒素混合产生最佳絮凝化混合物的类毒素的量[35]。例如,NIBSC提供的‘简易白喉类毒素’(*Diphtheria Toxoid, Plain*)[36],其含有300Lf/安瓿,还提供了‘用于絮凝试验的白喉类毒素的第一国际参考试剂’(*The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test*)[37],其含有900Lf/安瓿。

[0161] 组合物通常含有20-80Lf白喉类毒素,通常约50Lf。

[0162] 以IU测量,组合物将通常含有至少30IU/剂。

[0163] 白喉类毒素优选被吸附到氢氧化铝佐剂上。

[0164] 破伤风类毒素

[0165] 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) 造成破伤风。可对破伤风毒素进行处理以得到保护性类毒素。该类毒素可用于破伤风疫苗并更加详细描述于参考文献 1 的第 27 章。优选的破伤风类毒素是经过甲醛处理的那些。可使破伤风梭菌在生长培养基 (例如, 衍生自牛酪蛋白的 Latham 培养基) 中生长, 然后进行甲醛处理、超滤和沉淀以得到破伤风类毒素。然后可用包括无菌过滤和 / 或渗析的方法处理该材料。

[0166] 破伤风类毒素的量可表达为国际单位 (IU)。例如, NIBSC 提供的 ‘吸附的破伤风类毒素的第三国际标准 2000’ (Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000) [38, 39] 含有 469 IU/ 安瓿。除了 IU 系统, ‘Lf’ 单位 (“絮凝化单位” 或 “临界絮凝化剂量”) 被定义为与 1 国际单位抗毒素混合产生最佳絮凝化混合物的类毒素的量 [35]。例如, NIBSC 提供了 ‘用于絮凝试验的破伤风类毒素的第一国际参考试剂’ (The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test) [40], 其含有 1000 Lf/ 安瓿。

[0167] 组合物将通常含有 5-50 Lf 白喉类毒素, 通常约 20 Lf。

[0168] 以 IU 测量, 组合物将通常含有至少 40 IU/ 剂。

[0169] 破伤风类毒素可被吸附到氢氧化铝佐剂上, 但这不是必需的 (例如可吸附总破伤风类毒素的 0-10%)。

[0170] 甲肝病毒抗原

[0171] 甲肝病毒 (HAV) 是一种已知的会造成病毒性肝炎的物质。HAV 疫苗描述于参考文献 1 的第 15 章。优选的 HAV 组分基于灭活的病毒, 并可通过福尔马林处理来实现灭活。病毒可生长在人胎肺二倍体成纤维细胞如 MRC-5 细胞上。优选的 HAV 毒株是 HM175, 尽管也可采用 CR326F。细胞可在允许病毒生长的条件下生长。将细胞裂解, 并通过超滤和凝胶渗透层析来纯化所得悬浮液。

[0172] 以 EU (Elisa 单位) 测量, HAV 抗原的量通常至少约 500 EU/ml。

[0173] 乙肝病毒表面抗原

[0174] 乙肝病毒 (HBV) 是一种已知的造成病毒性肝炎的物质。HBV 病毒粒子由被外部蛋白质外壳或衣壳包裹的内部核心构成, 病毒核心含有病毒 DNA 基因组。衣壳的主要成份是一种蛋白质, 被称为 HBV 表面抗原, 或者更通常称为 ‘HBsAg’, 这是一种分子量约为 24 kDa 的由 226 个氨基酸构成的多肽。所有现有乙肝疫苗含 HBsAg, 当这种抗原被给予接种者时它能刺激产生抗 -HBsAg 抗体从而抵抗 HBV 感染。

[0175] 为制造疫苗, 可用两种方法制备 HBsAg。第一种方法涉及从慢性乙肝携带者的血浆中纯化特定形式的抗原, 这是因为慢性乙肝携带者肝脏在 HBV 感染期间会合成大量 HBsAg 并释放到血流中。第二种方法涉及通过重组 DNA 法表达蛋白质。优选通过在酵母细胞内重组表达来制备用于本发明方法的 HBsAg。合适的酵母包括, 例如, 酵母属 (如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 或汉森酵母属 (如多形汉森酵母 (*H. polymorpha*)) 宿主。

[0176] HBsAg 将通常是非糖基化的。与天然 HBsAg (即血浆纯化产品) 不同, 酵母表达的 HBsAg 通常是非糖基化的, 且这是最优选的用于本发明的 HBsAg 形式, 这是由于它是高度免疫原性的且制备时没有血液产品污染的风险。

[0177] HBsAg 通常为基本球形颗粒 (平均直径约 20nm) 的形式,其中含有包含磷脂的脂质基质。酵母表达的 HBsAg 颗粒可含有在天然 HBV 病毒粒子中未发现的磷脂酰肌醇。该颗粒也可含有非毒性量的 LPS 以刺激免疫系统 [41]。优选的 HBsAg 的形式为含有包含磷脂、磷脂酰肌醇和聚山梨醇酯 20 的脂质基质的颗粒。

[0178] 所有已知 HBV 亚型含有通用决定子 ‘a’。结合其他决定子和亚决定子已经鉴定出了 9 种亚型:ayw1、ayw2、ayw3、ayw4、ayr、adw2、adw4、adrq- 和 adrq+。除了这些亚型,还出现了其他变体,如已经在被免疫的个体中检测出的 HBV 突变体 (“逃逸突变体 (escape mutant)”)。最优选的用于本发明的 HBV 亚型是 adw2 亚型。优选的 HBsAg 具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:1):

[0179]

```
MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPI  
CPGYRWMCLRRFIIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPCKTCTTPAQGNMFP  
CCCTKPTDGNCTCIPIPSWAFKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWG  
P  
L  
S  
I  
V  
S  
P  
F  
I  
P  
L  
L  
P  
I  
F  
F  
C  
L  
W  
V  
Y  
I
```

[0180] 该序列在第 117 号氨基酸上不同于最匹配的数据库,是 Asn 残基而非 Ser。本发明可采用 SEQ ID NO:1,或与 SEQ ID NO:1 有最多 10 个 (即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个) 单个氨基酸取代的序列。

[0181] 除了 ‘S’ 序列,表面抗原可包含全部或部分前 -S 序列,如全部或部分前 -S1 和 / 或前 -S2 序列。

[0182] 优选通过以下方式表达 HBsAg:(1) 在甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因上游启动子的控制下表达;和 / 或 (2) 与下游 ARG3 转录终止子一起表达。

[0183] 甘油醛-3-磷酸脱氢酶是一种糖酵解酶,已经发现它的启动子特别适合控制 HBsAg 在酿酒酵母中的表达 [42]。优选的 GAPDH 启动子包含以下 1060- 聚核苷酸序列 (SEQ ID NO:2):

[0184]

```
AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACACATTTCGAAATACTTTGACCCATTTTC  
GAGGACCTTGTCACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTTCTATGACTTGATGCAATTCC  
CAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATATTTGACCTCTTAACAGGTTTCAGACG  
CGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGAACTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTG  
AATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTACTGACGCGGAGGCCAAGGCCAAAAGATTTCCTTGATTACGT  
AAGGGAGTTAGAATCATTGTTGAATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTTCGAGTTTATCATTAATCAATACTG  
CCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTGATTTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAG  
CCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATC  
GTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGTCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTTAAGCTG  
GCATCCAGAAAAAAAAGAATCCAGCACCACAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTTCATAGGT  
CCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCACAAAACGGGCACAACTCAATGG  
AGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATT  
TTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCA  
GTTCCCTGAAATTATTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT  
GTAAATCTATTCTTAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACAC  
CAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAA
```

[0185] 该序列在以下几个方面不同于参考文献 42 中的序列:(1) 核苷酸 42 处的 A/C 取代;(2) 核苷酸 194 处的 T/A 取代;(3) 核苷酸 301 处的 C/A 突变;(4) 核苷酸 471 处的插入;(5) 残基 569 上的 C/T 取代;(6) 残基 597 上的 T/C 取代;(7) 核苷酸 604 处的 T 插入 (五 -T 代替四 -T);和 (8) 用一个 A 代替 3' GCTT 序列。

[0186] 本发明可采用这种 1060- 聚的启动子序列,或者可采用与这种 1060- 聚的序列有最多 20 个 (即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20) 点突变的

序列,各点突变可以是单个核苷酸的删除、取代或插入。

[0187] 这种 1060- 聚的序列优选位于编码 HBsAg N- 末端的 ATG 起始密码子的立即下游 (SEQ ID NO :3) :

[0188]

```
AAGCTTACCACTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACACATTGAAATACTTTGACCCATTTTC
GAGGACCTTGTACCTTGAGCCCAAGAGAGCAAGATTTAAATTTTCCTATGACTTGATGCBAATTCC
CAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATATTTGACCTCTTAACAGGTTTCAGACG
CGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGAACTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTG
AATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTACTGACGCGGAGGCCAAGGCCAAAAGATTCTTGATTACGT
AAGGGAGTTAGAATCATTTTGAATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTTCAGTTTATCATTATCAATACTG
CCATTTCAAAGAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCTTAACCTTTATTAGTCAAAAAATTAG
CCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATC
GTAGGTGCTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGTCATCCACTAATATAATGGAGCCCGCTTTTAAAGCTG
GCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGT
CCATTTCTCTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCCAAAACAGGGCACCAACCTCAATGG
AGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATT
TTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAGCTGAAAAAAAGGTTGAAACCA
GTTCCCTGAAATTTATCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCT
GTAAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTAAACAC
CAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAATG...
```

[0189] 酵母的 ARG3 基因编码鸟氨酸氨甲酰转移酶 [43], 其转录终止序列已被用于某些酵母重组表达系统 [44、45、46]。它可有利地控制 HBsAg 在酵母中的表达, 尤其是与 GAPDH 启动子组合。

[0190] 编码 HBsAg 的基因将通常被插入质粒。优选的质粒包含 GAPDH 启动子, 然后是编码 HBsAg 的序列, 然后是 ARG3 终止子。优选的质粒还可包含以下之一、之二或所有三种: (1) LEU2 选择标记; (2) 2 μ 质粒序列; 和 / 或 (3) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 复制功能的起点 [46]。因此, 优选的质粒可作为酵母和大肠杆菌之间的穿梭载体。

[0191] 14500-15000bp 的质粒是优选的, 例如在 14600 和 14700bp 之间。

[0192] 当采用 LEU2 选择标记时则宿主细胞应 LEU2-ve (即亮氨酸营养缺陷型)。该宿主细胞可以是 leu2-3 leu2-112 突变体。优选的酵母宿主的其他特征有 his3 和 / 或 can1-11。最优选的酵母宿主是 leu2-3 Leu2-112 his3 can1-11, 如 DC5 株。

[0193] 细胞破碎后纯化 HBsAg 的优选方法包括: 超滤; 排阻层析; 阴离子交换层析; 超速离心; 脱盐; 和无菌过滤。细胞破碎后可将裂解液沉淀 (例如采用聚乙二醇), 将 HBsAg 留在溶液中以准备超滤。

[0194] 纯化之后可对 HBsAg 进行透析 (例如用半胱氨酸), 透析可用来除去任何含汞防腐剂, 如制备 HBsAg 时可能采用的硫柳汞 [47]。

[0195] HBsAg 的量通常以微克表示, 每剂疫苗中 HBsAg 的典型含量为 5-5 μ g, 例如 10 μ g/剂。

[0196] 尽管在最终的疫苗中 HBsAg 可被吸附到氢氧化铝佐剂上 (如熟知的 ENGERIX-BTM 产品), 或这可保持未吸附, 但它将通常被吸附到磷酸铝佐剂上 [48]。

[0197] 偶联的 b 型流感嗜血杆菌抗原

[0198] 偶联的 b 型流感嗜血杆菌 (‘Hib’) 会造成细菌性脑膜炎。Hib 疫苗通常基于荚膜糖抗原 [例如参考文献 1 的第 14 章], 其制备已经充分论述 [例如参考文献 49-58]。

[0199] Hib 糖类可偶联于载体蛋白以增强其免疫原性, 尤其是在儿童中的免疫原性。典型的载体蛋白有破伤风类毒素、白喉类毒素、白喉类毒素的 CRM197 衍生物、流感嗜血杆菌 D 蛋

白、以及来自血清群 B 脑膜炎球菌的外膜蛋白复合物。Hib 偶联物中的载体蛋白优选不同于脑膜炎球菌偶联物中的载体蛋白,但在一些实施方式中也可使用相同的载体。

[0200] 破伤风类毒素是优选的载体,如用于通常称为‘PRP-T’的产品。制备 PRP-T 时可采用溴化氰活化 Hib 荚膜多糖,将活化的糖类偶联于己二酸接头(如(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺),通常为盐酸盐),然后使接头-糖类部分与破伤风类毒素载体蛋白反应。

[0201] 偶联物的糖类部分可包含从 Hib 菌制备的全长聚核糖基核糖醇磷酸 (PRP),和/或全长 PRP 的片段。

[0202] 可采用的 Hib 偶联物中糖类:蛋白质的比例 (w/w) 在 1:5 (即蛋白质过量) 和 5:1 (即糖类过量) 之间,例如,比例在 1:2 和 5:1 之间以及比例在 1:1.25 和 1:2.5 之间。然而,在优选的疫苗中,糖与载体蛋白的重量比在 1:2 和 1:4 之间,优选在 1:2.5 和 1:3.5 之间。在破伤风类毒素同时作为抗原和载体蛋白的疫苗中,偶联物中糖与载体蛋白的重量比可在 1:0.3 和 1:2 之间 [59]。

[0203] Hib 偶联物的量通常以糖类的质量表示(即偶联物整体(载体+糖类)的剂量高于标示剂量)以避免由于载体的选择造成的差异。每剂疫苗中 Hib 糖类的典型含量为 1-30 μ g,优选约 10 μ g。

[0204] 给予 Hib 抗原优选导致抗-PRP 抗体浓度 $\geq 0.15 \mu$ g/ml,更优选 $\geq 1 \mu$ g/ml,这些是标准的可接受反应阈值。

[0205] 按照本发明, Hib 偶联物在其使用前可被冻干。在冻干操作之前也可加入其它组分,例如作为稳定剂。可加入的优选稳定剂是乳糖、蔗糖和甘露醇,以及它们的混合物,例如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。因此,最终的疫苗可含有乳糖和/或蔗糖。采用蔗糖/甘露醇混合物能加速干燥过程。

[0206] Hib 偶联物可吸附或不吸附到铝盐佐剂上。优选的不将它们吸附到氢氧化铝佐剂上。

[0207] 本发明组合物的特征

[0208] 除了上述抗原性组分,本发明的组合物将通常含有非-抗原性组分。所述非-抗原性组分可包括载体、佐剂、赋形剂、缓冲剂等等,如下面的详述部分所述。这些非-抗原性组分可具有各种来源。例如,它们可出现在一种制造过程中使用的抗原或佐剂材料中或者可独立于那些组分单独加入。

[0209] 优选的本发明的组合物含有一种或多种药物载体和/或赋形剂。

[0210] 为控制张力,优选包含生理盐,如钠盐。优选氯化钠 (NaCl),其含量可以为 1-20mg/ml。

[0211] 组合物的渗量将在 200mOsm/kg 和 400mOsm/kg 之间,优选 240-360mOsm/kg,且更优选为 290-320mOsm/kg。之前已报道称渗量对于接种造成的疼痛没有影响 [60],尽管如此将渗量保持在该范围内是优选的。

[0212] 本发明的组合物可含有一种或多种缓冲液。典型的缓冲液包括:磷酸缓冲液; Tris 缓冲液; 硼酸缓冲液; 琥珀酸缓冲液; 组氨酸缓冲液; 或柠檬酸缓冲液。缓冲液的含量通常为 5-20mM。

[0213] 本发明组合物的 pH 将通常在 0.5 和 7.5 之间,为得到最佳的稳定性更通常在 5.0

和 6.0 之间,或在 6.0 和 7.0 之间。

[0214] 本发明的组合物优选是无菌的。

[0215] 本发明的组合物优选是无热原的,例如含有 $< 1\text{EU}$ (内毒素单位,标准测量)/剂,优选 $< 0.1\text{EU}$ /剂。

[0216] 本发明的组合物优选不含谷蛋白。

[0217] 当抗原被吸附时,组合物可以是具有絮状外观的悬浮液。这种外观意味着不容易看见微生物污染,因此疫苗中优选含有防腐剂。当将疫苗包装在多剂量容器中时这特别重要。优选包含的防腐剂是 2- 苯氧乙醇和硫柳汞。然而可能时建议不使用汞防腐剂(例如硫柳汞)。优选本发明的组合物所含的汞少于约 25ng/ml 。

[0218] 以 Al^{3+} 表示,本发明组合物中任何铝盐的浓度优选低于 5mg/ml ,例如 $\leq 4\text{mg/ml}$ 、 $\leq 3\text{mg/ml}$ 、 $\leq 2\text{mg/ml}$ 、 $\leq 1\text{mg/ml}$,等等。

[0219] 本发明的组合物优选以 0.5ml 的剂量给予患者。当提及 0.5ml 的剂量时应理解为包括正常的偏差,如 $0.5\text{ml} \pm 0.05\text{ml}$ 。

[0220] 本发明可提供适合包装成单次剂量的半成品,然后可将该单次剂量分配给患者。上面提到的浓度通常是最终包装剂量的浓度,因此半成品疫苗的浓度可能较高(例如通过稀释降至最终浓度)。

[0221] 在用本发明所述方法制造的最终疫苗中可能还保留有痕量的各种抗原性组分的残余物质。例如,如果采用甲醛来制备白喉、破伤风和百日咳的类毒素,则最终的疫苗产品可能保留有痕量的甲醛(例如少于 $10\mu\text{g/ml}$,优选 $< 5\mu\text{g/ml}$)。在制备脊髓灰质炎病毒时可能采用培养基或稳定剂(例如培养基 199),这些物质可能被携带入最终的疫苗。类似地,游离氨基酸(例如丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸和/或甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸和/或羟脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和/或缬氨酸)、维生素(例如胆碱、抗坏血酸等)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、钙、葡萄糖、腺嘌呤硫酸、酚红、乙酸钠、氯化钾等可保留在最终的疫苗中,其各自的浓度 $\leq 100\mu\text{g/ml}$,优选 $< 10\mu\text{g/ml}$ 。抗原制备中的其他组分,如新霉素(例如硫酸新霉素,尤其来自 IPV 组分)、多粘菌素 B(例如硫酸多粘菌素 B、尤其来自 IPV 组分)等也可以,例如,每剂亚纳克级的量存在。

[0222] 最终疫苗中源自抗原制备的其他可能组分起因于未对抗原进行充分纯化。因此可能存在小量百日咳博德特氏菌,白喉棒状杆菌,破伤风梭菌和/或酿酒酵母的蛋白质和/或基因组 DNA。

[0223] 当采用 IPV 组分时,通常将使其在 Vero 细胞上生长。最终的疫苗优选含有少于 50pg/ml Vero 细胞 DNA,例如少于 50pg/ml Vero 细胞 DNA,所述 DNA 的长度 ≥ 50 个碱基对。

[0224] 佐剂

[0225] 优选的本发明的免疫原性组合物含有佐剂,且这种佐剂优选包含一种或多种铝盐,尤其是磷酸铝佐剂和/或氢氧化铝佐剂。用于制备本发明组合物的抗原性组分优选在使用前含有铝佐剂,即它们被‘预混合’或‘预吸附’到佐剂上。

[0226] 目前使用的铝佐剂通常被称为“氢氧化铝”或“磷酸铝”佐剂。然而这些只是为方便起见而取的名字,它们都没有准确描述所存在的实际化合物(例如参见参考文献 61 的第 9 章)。本发明可采用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”。

[0227] 被称为“氢氧化铝”的佐剂通常为铝的羟基氧化物盐类,其通常至少部分为晶体状的。铝的羟基氧化物可表示为 $\text{AlO}(\text{OH})$,通过红外 (IR) 光谱可将其与其它铝化合物如氢氧化铝 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 区别开,尤其是通过 1070cm^{-1} 出现的吸收带和 $3090\text{--}3100\text{cm}^{-1}$ 出现的强肩峰[参考文献 61 的第 9 章]。

[0228] 被称为“磷酸铝”的佐剂通常为铝的羟基磷酸盐,经常还含有小量硫酸盐。它们可通过沉淀获得,沉淀期间的反应条件和浓度会影响磷酸根对盐中羟基的取代程度。羟基磷酸盐中 PO_4/Al 的摩尔比通常在 0.3 和 0.99 之间。羟基磷酸盐因存在羟基而不同于严格的 AlPO_4 。例如, 3164cm^{-1} 处的 IR 光谱条带(例如当加热至 200°C 时)证明存在结构性羟基[参考文献 61 的第 9 章]。

[0229] 磷酸铝佐剂的 $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ 摩尔比通常为 0.3–1.2,优选 0.8–1.2,更优选 0.95 ± 0.1 。磷酸铝将通常是无定形的,尤其对于羟基磷酸盐而言。典型的佐剂一般为无定形羟基磷酸铝,其中 PO_4/Al 摩尔比为 0.84–0.92,包含 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。磷酸铝通常是颗粒。抗原吸附后其颗粒的直径一般为 $0.5\text{--}20\mu\text{m}$ (如约 $5\text{--}10\mu\text{m}$)。

[0230] 磷酸铝的 PZC 与用磷酸根取代羟基的程度成反比,这种取代程度可随着用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度而改变。也可通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(磷酸根越多=PZC 的酸性越强)或通过加入缓冲液如组氨酸缓冲液(使 PZC 的碱性更强)来改变 PZC。用于本发明的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0–7.0,更优选 5.0–6.5,如约 5.7。

[0231] 用于制备本发明组合物的磷酸铝溶液可(但不必须)含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸缓冲液或 Tris 缓冲液)。磷酸铝溶液优选无菌和无热原。磷酸铝溶液可包含游离的水性磷酸根离子,如以浓度为 $1.0\text{--}20\text{mM}$,优选为 $5\text{--}15\text{mM}$,更优选约为 10mM 存在的。磷酸铝溶液也可包含氯化钠。氯化钠浓度优选为 $0.1\text{--}100\text{mg}/\text{ml}$ (如 $0.5\text{--}50\text{mg}/\text{ml}$, $1\text{--}20\text{mg}/\text{ml}$, $2\text{--}10\text{mg}/\text{ml}$),更优选约为 $3\pm 1\text{mg}/\text{ml}$ 。存在 NaCl 有助于在吸附抗原之前正确测定 pH。

[0232] 疫苗的处理和施用方法

[0233] 本发明涉及共施用来自不同病原体的抗原。这些抗原可以组合疫苗(即含有多种抗原的单一水性组合物,从而在施用它之后可使对象同时产生针对多种病原体的免疫力)的形式共施用。或者,它们可单独施用于患者(例如在不同部位),但它们各自的施用基本同时,例如在医生或其他健康护理供应者的同一次诊断中进行。因此,不同的抗原可同时单独施用或一次施用,或者可先将它们混合然后再使用。在不同部位同时施用不同偶联疫苗可避免共享载体蛋白的偶联物通常发生的潜在抑制效应。

[0234] 本发明的组合物适合施用于人类患者,因此本发明提供了一种提高患者免疫应答的方法,该方法包括给患者施用本发明的组合物的步骤。

[0235] 本发明还提供了一种用于药物的本发明的组合物。

[0236] 本发明还提供了(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖和(b)无细胞百日咳杆菌抗原在制备用于免疫患者的药物中的应用。

[0237] 本发明还提供了(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖和(b)灭活的脊髓灰质炎病毒抗原在制备免疫患者的药物中的应用。

[0238] 本发明还提供了(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖、(b)来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖、(c)乙肝病毒表面抗原在制备免疫患者的药物中的应用。

[0239] 本发明还提供了(a)来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖、(b)来自肺炎

链球菌的偶联荚膜糖、(c) 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原在制备免疫患者的药物中的应用。

[0240] 本发明还提供了 (a) 来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖、(b) 来自肺炎链球菌的偶联荚膜糖、(c) 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原和 (d) 无细胞百日咳杆菌抗原在制备免疫患者的药物中的应用。

[0241] 本发明还提供了 (a) 偶联于第一载体蛋白的来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖、(b) 偶联于第二载体蛋白的来自肺炎链球菌的荚膜糖在制备免疫患者的药物中的应用，其特征在于，所述第一载体蛋白和所述第二载体蛋白是相同的。

[0242] 本发明的免疫原性组合物优选是用于减轻或预防诸如以下疾病的疫苗：细菌性脑膜炎，包括脑膜炎球菌性脑膜炎、肺炎球菌性脑膜炎和 Hib 脑膜炎；病毒性感染，包括 HBV 和 HAV 感染；白喉；破伤风；百日咳；和 / 或骨髓灰质炎。

[0243] 优选的接受本发明组合物的患者小于 2 岁，优选其年龄在 0-12 个月之间。一组特殊的患者年龄在 1-3 个月之间且之前未接受过脑膜炎球菌偶联疫苗。另一组患者的年龄在 3-5 个月之间且之前接种过白喉类毒素。

[0244] 为发挥全部功效，针对儿童的典型初免方案可包括施用一次以上的剂量。例如，可在以下时刻给药：0、2 和 4 月（0 时给予第一剂）；0、1 和 2 月；0 和 2 月；0、2 和 8 月；等等。第一剂（0 时）可在约 2 个月大时施用，或者有时（例如在 0-2-8 月的方案中）在大约 3 个月大时施用。

[0245] 例如对儿童而言，可在其 2 岁时将组合物作为加强剂量使用。

[0246] 本发明的组合物可通过肌肉注射到例如手臂、大腿或臀部来施用。当采用单独施用，尤其是当要同时施用两种独立的组合物时，则通常将组合物注射到相对的肢，例如注射到左臂和右臂。

[0247] 当本发明的组合物含有铝 - 基佐剂时，在储存过程中在组分可能会出现沉淀。因此在施用于患者之前应振荡组合物。经过振荡的组合物将通常是混浊的白色悬浮液。

[0248] 包装本发明的组合物

[0249] 本发明的组合物可被放在容器中以供使用。合适的容器包括药瓶和一次性针筒（优选无菌针筒）。

[0250] 当将本发明的组合物包装入药瓶时，优选这些药瓶是用玻璃或塑料材料制成的。药瓶在加入组合物之前优选被灭菌。为避免对乳胶敏感患者造成问题，可用不含乳胶的塞子密封药瓶。药瓶中可装有单剂量疫苗或者可装有一剂以上疫苗（‘多剂量’药瓶），例如，10 剂。当采用多剂量药瓶时，各剂量应在严格无菌条件下用无菌针头和针筒取出，同时要小心避免污染药瓶的内容物。优选的药瓶由无色玻璃制成。

[0251] 药瓶可具有适配的盖子（例如，Luer 锁紧套口），从而可将预装针筒插入该盖，将针筒的内容物排入药瓶内（例如以重建其中的冻干材料），并可将药瓶的内容物重新吸回针筒。从药瓶上取下针筒之后，然后可加上针头并可将组合物施用于患者。所述盖优选位于封口或覆盖物内侧，从而在接触盖子之前封口或覆盖物已被除去。

[0252] 当组合物被包装入针筒时，针筒上通常未附加针头，但可与针筒一起提供单独的针头以供装配和使用。优选安全针头。通常为 1 英寸 23 号、1 英寸 25 号和 5/8 英寸 25 号针头。可在针筒上提供可剥离的印有内容物批号和有效期的标签以方便保存。针筒内的柱塞优选有制动器以防止柱塞在抽吸过程中意外被拉出。针筒可具有乳胶橡皮帽和 / 或柱

塞。一次性针筒装有单剂量疫苗。针筒通常会具有针帽以在附加针头之前密封针尖,且该针帽优选由丁基橡胶制成。如果针筒和针头是独立包装的,则优选为针头配备丁基橡胶护罩。优选灰色丁基橡胶。优选的针筒是以商品名“Tip-Lok”™销售的针筒。

[0253] 当采用玻璃容器(例如,针筒或药瓶)时,优选采用由硼硅玻璃而非钠钙玻璃制成的容器。

[0254] 本发明提供了各种试剂盒。所述试剂盒可包含单独的免疫原性组合物,且这些组合物可在使用时临时地相互混合以得到组合疫苗,或者可将它们单独施用(例如在不同部位),但在基本相同的时刻。因此,试剂盒内的组合物可供同时单独施用或依次施用,或者可将它们混合。当将组合物混合时,优选至少一种组合物为水性形式而一种最初为冻干形式,从而可使冻干的组合物在使用时被水性组合物重新活化。当存在冻干的组分时,它将通常包含一种或多种偶联的糖抗原。

[0255] 典型的单独包含在本发明的试剂盒内的组合物包括:含有 MenC 偶联抗原的组合物;含有肺炎球菌偶联物抗原的组合物;含有无细胞百日咳杆菌抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原的组合物;以及含有 Hib 偶联物的组合物。

[0256] 含有无细胞百日咳杆菌抗原的组合物将通常还含有白喉类毒素和破伤风类毒素。它还可包含以下一种或多种:HBsAg 和/或 IPV。因此,试剂盒内的一种组合物可以是五价 D-T-Pa-HBsAg-IPV 组合物,或是全液体的 D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib 组分。

[0257] 试剂盒内的各组合物可单独保存,例如分别保存在独立的药瓶或针筒内。还可以在针筒内提供一种组合物而在其他药瓶内提供其他组合物。当要在使用时临时混合各组分时,存放独立容器的另一种方法是采用多室容器。多室针筒能够在储存时单独保存各组合物,但在拉动针筒活塞时将它们混合物。

[0258] 当不以试剂盒形式提供时,本发明的组合物可以是全液体形式。

[0259] 免疫方案

[0260] 如上所述,儿童的典型初免方案包括施用多次剂量。例如,可在以下时刻施用剂量:0、2 和 4 月(第一次剂量在 0 时刻施用);0、1 和 2 月;0 和 2 月;等等。第一剂(0 时刻)通常在大约 2 个月大时施用。

[0261] 已经发现 2-剂方案(例如间隔 2 个月)的效果不比昂贵的 3-剂方案(例如间隔 1 个月)差。常规的非-脑膜炎球菌疫苗可在 2-剂方案的两次剂量之间给予。

[0262] 因此,本发明提供了一种治疗患者的方法,该患者之前已经接受了(i)一剂来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖和(ii)一剂以上的无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒中的一种或多种,该方法包括给患者再施用一剂来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖。再一剂 MenC 可任选与其他抗原共施用,如上所述。

[0263] 本发明还提供了一种提高患者体内的免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:(i)给患者共施用来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖以及无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒中的一种或多种;然后(ii)被患者施用无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒中的一种或多种,不同时施用来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖;和(iii)给患者共施用来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖以及无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和/或灭活的脊髓灰质炎病毒中的一种或多种。步骤(i)、(ii)和(iii)优选以至少 1 个月为间隔依次进行。它

们可在约 2 个月大、约 3 个月大、和约 4 个月大时进行。可通过施用以下疫苗方便地进行该方法：(i) 第一疫苗和第二疫苗；(ii) 仅第二疫苗而无第一疫苗；和 (iii) 仅第一疫苗而无第二疫苗。

[0264] 在另一种方案中，步骤 (ii) 和 (iii) 可颠倒，即患者在第一次和第二次就诊时接受血清群 C 疫苗，但在第三次就诊时不接受。

[0265] 本发明还提供了来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联荚膜糖在制备免疫患者的药物中的应用，其中所述患者之前已经接受过 (i) n 剂来自脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖和 (ii) n 剂以上的无细胞百日咳杆菌抗原、乙肝病毒表面抗原和 / 或灭活的脊髓灰质炎病毒中的一种或多种。n 的值优选为 1。

[0266] 概述

[0267] 术语“含有”包括“包含”以及“由... 组成”，例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它的物质，例如 X+Y。

[0268] 术语“基本上”不排除“完全”，例如“基本上不含”Y 的组合物可完全不含 Y。“基本上”可视需要从本发明定义中省去。

[0269] 与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x \pm 10\%$ 。

[0270] 除非另有说明，包括混合两种或多种组分的步骤的方法对于特定混合顺序没有任何要求。因此可以任何顺序混合组分。当有三种组分时则可将两种组分相互组合，然后将该组合物与第三种组分合并，等等。

[0271] 当将抗原描述为被“吸附”到佐剂时，优选至少 50%（以重量计）的抗原被吸附，例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多。优选白喉类毒素和破伤风类毒素都被全部吸附，即在上清液中不可检测。也优选将 HBsAg 全部吸附。

[0272] 偶联物的量通常以糖类的质量表示（即，偶联物（载体 + 糖类）的剂量作为一个整体将高于所标称剂量）以避免由于载体选择而造成的变化。

[0273] 用于偶联物的典型的载体蛋白是细菌毒素，如白喉毒素 [例如见参考文献 1 的第 13 章；参考文献 62-65]（或其 CRM197 突变体 [66-69]）和破伤风毒素，通常以类毒素形式使用（例如通过用灭活化学物质如福尔马林或甲醛处理得到）。其它合适的载体蛋白包括，但不限于，脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [70]、合成肽 [71, 72]、热激蛋白 [73, 74]、百日咳蛋白 [75, 76]、细胞因子 [77]、淋巴因子 [77]、激素 [77]、生长因子 [77]、含有各种病原体衍生抗原的多种人 CD4⁺T 细胞表位的人造蛋白 [78] 如 N19 [79]、流感嗜血杆菌的 D 蛋白 [80-82]、肺炎球菌溶血素 [83]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [84]、铁摄取蛋白 [85]、艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B [86]，等等。

[0274] 当采用动物（尤其是牛）材料来培养细胞时，它们应获自未患遗传性海绵状脑病 (TSE) 且尤其未患牛海绵状脑病 (BSE) 的来源。

[0275] 实施本发明的方式

[0276] 应理解，将仅通过实施例的方式描述本发明，可对其做出修饰而仍旧在本发明的范围和精神内。

[0277] 2、4 和 6 个月时的三次剂量

[0278] 设计了一项研究以评价 MENJUGATE™ 疫苗（偶联的脑膜炎球菌血清群 C 荚膜糖）当与 PREVNAR™ 疫苗（偶联的 7 价肺炎球菌荚膜糖）和 / 或 INFANRIX-HEXA™ 产品

(D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib) 一起给予时的安全性和免疫原性。

[0279] 登记了 992 名 2 个月大的婴儿, 将它们分配到三个疫苗接种组之一, 这三个组分别接受: (1) PREVNAR™+INFANRIX-HEXA™; (2) MENJUGATE™+INFANRIX-HEXA™; 或 (3) MENJUGATE™+PREVNAR™+INFANRIX-HEXA™。疫苗是同时施用的, 但注射部位不同。进行该研究, 其中疫苗在 2、4 和 6 个月大时施用。

[0280] 相比第 2 组, 第 3 组的局部红斑、硬化和肿胀略微降低 (通常不到约 5% 有反应); 这两组的压痛的相同的。所有组的全身反应是类似的, 但通常第 2 组最低, 但腹泻在第 3 组最低。然而在所有情况下中, 疫苗都被良好耐受并且是安全的。

[0281] 为评价免疫原性, 测量来自各对象的两份血样的抗 MenC 的抗菌效价 (BCA): 第一份样品在第一次疫苗剂量时采集; 第二份样品在所述第三次剂量 4-6 周后采集。BCA 试验采用人补体。

[0282] 该研究的免疫学结果是不确定的, 因为 Buttery 等 [11] 曾报道称, 脑膜炎球菌血清群 C 偶联物与肺炎球菌多价偶联物在免疫上不相容。然而相反, 本发明的研究显示, 组 (2) 和 (3) 中的对象 100% 获得抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的保护性抗菌效价 (即两份血样中 BCA 效价的升高 $\geq 1:8$)。而且, 两组之间的 GMT 几乎相同, 这显示各种非-MenC 疫苗组分都不会干扰 MenC 偶联物的免疫原性。

[0283] BCA 结果如下:

[0284]

疫苗组	2	3	差异 / 比例
BCAGMT 升高 $\geq 1:8$ 的百分比	100% (98-100%)	100% (99-100%)	0% (-1% -2%)
第二份样品的 BCAGMT	572 (473-690)	565 (465-686)	0.99 (0.75-1.3)

[0285] INFANRIX HEXA™ 组分的免疫原性未被削弱。通过 ELISA 测定所述第二份血样抗 D、T、P、Hib 和 HBsAg 的抗体效价。通过标准中和试验测定抗脊髓灰质炎病毒的抗体效价。结果如下:

[0286]

抗原	标准	组 3	组 2	差异
白喉	$\geq 0.1\text{IU/mL}$	100%	100%	0%
破伤风	$\geq 0.1\text{IU/mL}$	100%	100%	0%
百日咳	≥ 4 倍增长	87%	89%	-2%
Hib	$\geq 0.15\text{ }\mu\text{g/mL}$	96%	99%	-3%
HBsAg	$\geq 10\text{mIU/mL}$	99%	99%	0%

1 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	99%	100%	0%
2 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	100%	100%	0%
3 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	99%	100%	0%
抗原	标准	组 1	组 2	差异
白喉	$\geq 0.1 \text{ IU/mL}$	100%	100%	0%
破伤风	$\geq 0.1 \text{ IU/mL}$	100%	100%	0%
百日咳	≥ 4 倍增长	92%	89%	-3%
Hib	$\geq 0.15 \mu \text{ g/mL}$	98%	99%	0%
HBsAg	$\geq 10 \text{ mIU/mL}$	98%	99%	2%
1 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	99%	100%	1%
2 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	100%	100%	0%
3 型脊髓灰质炎病毒	$\geq 1 : 8$	99%	100%	1%

[0287]

[0288] PREVNAR™ 组分的免疫原性未被显著削弱。所述第二份血样中 ELISA 效价 $\geq 0.15 \mu \text{ g/mL}$ 的患者的百分比如下：

[0289]

血清型	组 3	组 1	差异
4	95%	96%	0%
6B	91%	92%	-1%
14	94%	96%	-2%
9V	95%	97%	-2%
18C	96%	94%	-3%
19F	94%	97%	-3%
23F	91%	95%	-3%

[0290] 因此，与组 (1) 相比，组 (2) 和 (3) 中抗 MenC 糖类的免疫应答未降低。这三组中针对六价抗原的免疫应答是类似的。因此，与组 (1) 相比，组 (3) 中抗肺炎球菌糖类的免疫

应答未降低。这些结果与参考文献 3 一致。

[0291] 2- 剂和 3- 剂方案的比较

[0292] 可按照 3- 剂初免方案在第 2、3 和 4 个月大时施用 INFANRIX-HEXA™。由于与无细胞百日咳抗原共施用会抑制偶联疫苗,所以设计了一项研究来评价当以这种 3- 剂方案将 MENJUGATE™ 疫苗与 INFANRIX-HEXA™ 产品一起给予时的安全性和免疫原性。脑膜炎球菌偶联物与所有三种六价剂量(即在第 2、3 和 4 个月大时)或仅与第一和第三剂量(即在第 2 和 4 个月大时)共施用。在第 12 个月大时施用未偶联的血清群 A 和 C 糖类的混合物,同时再施用一剂 INFANRIX-HEXA™ 并在 7 或 28 天后采血,以此来评价抗脑膜炎球菌偶联物的记忆应答。

[0293] 登记了 241 名 7-11 个月大的婴儿,将它们分配到四个疫苗接种组之一,这三个组分别接受:(1) 按照 3- 剂方案施用 MENJUGATE™+INFANRIX-HEXA™,然后在第 12 个月时施用未偶联的 A/C 和 INFANRIX-HEXA™,1 周后采血;(2) 与组(1) 相同,但在施用未偶联的 A/C 28 天后采血;(3) 按照 2- 剂方案施用 MENJUGATE™+INFANRIX-HEXA™,已经在 3 个月大时施用过 INFANRIX-HEXA™,然后在 12 个月时施用未偶联的 A/C 和 INFANRIX-HEXA™,1 周后采血;(4) 与组(3) 相同,但在施用未偶联的 A/C 28 天后采血。当同时施用一剂以上时,将各剂同时施用于不同的注射部位。

[0294] 未观察到各治疗组和疫苗之间的局部反应原性有任何临床上显著的差异。与第一、第二和第三次注射六价疫苗或 Menjugate™ 之后相比,在 12 个月大时施用 MenPS A/C 疫苗并再次注射六价疫苗之后,各组中出现局部反应的对象比例较高。大多数局部反应在注射后 2 天内发生,其评级为轻微或中等。没有对象报告对脑膜炎球菌偶联物有严重的局部反应。

[0295] 将所有的注射汇总,所诱发的全身反应的发生率在四个治疗组之间是类似的。在第 2 次就诊时发现共施用 Menjugate™ 和六价疫苗(组 1 和 2) 后的全身反应可与仅施用六价疫苗(组 3 和 4) 后的全身反应相比,未观察到任何临床相关差异。大多数全身反应在注射后 6 小时至 2 天内发生。没有对象的直肠温度 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0296] 用 Menjugate™ 初免 1 个月之后,2- 剂和 3- 剂免疫接种方案中显示出保护性 SBA 效价(效价 ≥ 8) 的疫苗的百分比分别为 98% 和 100%。免疫后 8 个月时,残余的保护性 SBA 效价为 89% (2- 剂组) 和 95% (3- 剂组)。这两种免疫接种方案都使 2 或 3 次免疫接种 1 个月后测得的 SBA 效价的几何平均数升高了 100 倍以上。

[0297] 接触一次 MenPS A/C 激发剂量之后,用任何一种 Menjugate™ 免疫接种方案初免的对象 SBA GMT 相比激发之前都升高了 15 倍或以上。而在之前研究的历史对照组中,对未初免的 12 个月大的婴儿施用一剂 MenPS A/C 后观察到 SBA GMT 仅升高 1.09 倍。用 MenPS A/C GMT 激发 28 天后测得的 SBA(组 2 和 4) 相比在第 7 天测得的 SBA(组 1 和 3) 有升高的趋势。

[0298] 因此所有四个疫苗接种组都有类似的反应原性和其他安全性特征。

[0299] 2- 剂和 3- 剂方案组中对象的抗乙肝表面抗原抗体的 GMC 基线是类似的(8.61IU/1 和 5.93IU/1)。初免 1 个月之后,基线分别升高了 52- 倍和 96- 倍,各组中 99% 以上的对象中保护性抗体的浓度 $\geq 10\text{IU/1}$ 。

[0300] 因此,在 2 和 4 个月大时注射两次脑膜炎球菌偶联物能初免疫系统从而在健康

婴儿中产生免疫记忆力。2-剂组中98%的对象以及3-剂组中100%的对象的hBCA效价都 $\geq 1:8$ 。2-剂方案诱导的免疫应答可被认为并不比3-剂方案诱导的免疫应答差。所有对象中有99%的对象响应六价疫苗乙肝组分产生的效价 $\geq 10\text{IU}/1$ ，因此证明不会与2-剂或3-剂脑膜炎球菌方案产生干扰。

[0301] 总之，在1岁以下婴儿中进行的以2个月为间隔的脑膜炎球菌偶联物的2-剂方案与六价疫苗一起给予时具有免疫原性并能诱导免疫记忆力。MenC的2-剂免疫接种方案不差于3-剂方案。没有证据表明共施用的D、T、aP、IPV、HBV或Hib抗原的免疫原性下降。

[0302] 在第二年时可对所有这些患者施用脑膜炎球菌偶联物的加强剂量。

[0303] 给婴儿免疫接种7价D-T-aP-HBV-IPV-Hib-MenC

[0304] 作为对上述结果的支持，参考文献87报道了按照两种免疫接种方案与基于DtaP的组合物同时使用脑膜炎球菌C偶联疫苗(NEISVAC-C™，具有破伤风类毒素载体)的研究，一种接种方案在出生时就接种乙肝疫苗。使健康的婴儿随机接受以下之一：(i) 在第2、4和6个月接受D-T-aP-HBV-IPV/Hib(INFANRIX HEXA™)，或(ii) 在出生时接受HBV，然后在第2和6个月接受INFANRIX HEXA™，但在第4个月接受D-T-aP-IPV/Hib。两组中，将在第2和4个月时与INFANRIX HEXA™共施用2剂MenC-TT偶联物以及在第2、4和6个月时与INFANRIX HEXA™共施用3剂MenC-CRM197偶联物(MENINGITEC™)进行比较。

[0305] 给予第三次疫苗剂量1个月后，所有NEISVAC-C™受者都具有血清保护性抗-PRP抗体浓度，且给予第二次NEISVAC-C™剂量之后所有受者的SBA-MenC效价 $\geq 1:8$ 。这些反应不比给予3剂DTaP-HBV-IPV/Hib和MENINGITEC™后看到的反应差。与施用MENINGITEC™疫苗相比，施用NEISVAC-C™疫苗后得到的抗-PRP抗体GMC明显较高。对所有其他共施用抗原的免疫应答未受损害，NEISVAC-C™疫苗组的血清保护/血清阳性率 $\geq 98.1\%$ 。

[0306] 所有方案被良好耐受，研究组之间的反应原性没有差异。

[0307] 因此与两剂MenC偶联物和破伤风类毒素载体共施用D-T-aP-HBV-IPV/Hib或D-T-aP-IPV/Hib被认为是安全、良好耐受、并且是免疫原性的，且对共施用抗原的反应没有受损。

[0308] 参考文献（其内容通过引用纳入本文）

[0309] 《疫苗》(Vaccines) (Plotkin 和 Orenstein 编)，第四版，2004，ISBN：0-7216-9688-0。

[0310] Dagan 等，(2004) Infect Immun 72:5383-91。

[0311] Tejedor 等，(2004) Pediatr Infect Dis J 23:1109-15。

[0312] Halperin 等，(2002) Clin Invest Med 25:243-51。

[0313] Schmitt 等，(2003) Vaccines 21:3653-62。

[0314] Shinefield 等，(1999) Pediatr Infect Dis J. 18:757-63。

[0315] Slack 等，(2001) J Infect Dis. 184:1617-20。

[0316] Tichmann-Schumann 等，(2005) Pediatr Infect Dis 24:70-77。

[0317] W002/00249。

[0318] W002/080965。

[0319] Buttery 等，(2005) JAMA 293:1751-8。

- [0320] W099/42130。
- [0321] Jones(2001)Curr Opin Investig Drugs 2 :47-49。
- [0322] Costantino 等, (1992)Vaccines 10 :691-8。
- [0323] Lieberman 等, (1996)JAMA 275 :1499-503。
- [0324] W002/058737。
- [0325] W003/007985。
- [0326] Rennels 等, (2002)Pediatr Infect Dis J 21 :978-979。
- [0327] Campbell 等, (2002)J Infect Dis 186 :1848-1851。
- [0328] Arakere 和 Frasc (1991)Infect. Immun. 59 :4349-4356。
- [0329] Michon 等, (2000)Dev. Biol. 103 :151-160。
- [0330] Rubinstein 和 Stein(1998)J. Immunol. 141 :4357-4362。
- [0331] W02005/033148。
- [0332] W. H. O. Tech Rep. Ser. 594 :51, 1976。
- [0333] Watson(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :331-332。
- [0334] Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v。
- [0335] Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207。
- [0336] Zielen 等, (2000)Infect. Immun. 68 :1435-1440。
- [0337] Darkes 和 Plosker(2002)Paediatr Drugs 4 :609-630。
- [0338] W098/51339。
- [0339] Rappuoli 等, (1991)TIBTECH 9 :232-23%。
- [0340] 世界卫生组织 (WHO) 的《免疫接种的免疫学基础系列丛书》(The immunological basis for immunization series) 的第 6 辑 (Robertson)
- [0341] Sesardic 等, (2001)Biologicals 29 :107-22。
- [0342] NIBSC 编码 :98/560。
- [0343] 世界卫生组织的《免疫接种的免疫学基础系列丛书》的第 1 辑 (Galazka)。
- [0344] NIBSC 编码 :69/017。
- [0345] NIBSC 编码 :DIFT。
- [0346] Sesardic 等, (2002)Biologicals 30 :49-68。
- [0347] NIBSC 编码 :98/552。
- [0348] NIBSC 编码 :TEFT。
- [0349] Vanlandschoot 等, (2005)J Gen Virol 86 :323-31。
- [0350] 欧洲专利 0460716 ;美国专利 5349059。
- [0351] Crabeel 等, (1983)Proc Natl Acad Sci USA 78 :5026-30。
- [0352] Cabezon 等, (1984)Proc Natl Acad Sci USA 81 :6594-8。
- [0353] van der Straten 等, (1986)DNA 5 :129-36。
- [0354] Harford 等, (1987)Postgraduate Medical Journal 63 (增刊 2) :65-70。
- [0355] W003/066094。
- [0356] W093/24148。
- [0357] Ramsay 等, (2001)Lancet 357 (9251) :195-196。

- [0358] Lindberg(1999)Vaccines 17 增刊 2 :S28-36。
- [0359] Buttery 和 Moxon(2000)J R Coll Physicians Lond 34 :163-168。
- [0360] Ahmad 和 Chapnick(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :113-133, vii。
- [0361] Goldblatt(1998)J. Med. Microbiol. 47 :563-567。
- [0362] 欧洲专利 0477508。
- [0363] 美国专利 5, 306, 492。
- [0364] W098/42721。
- [0365] 《偶联疫苗》(Conjugate Vaccines) (Cruse 等编) ISBN 3805549326, 尤其是第 10 卷 :48-114。
- [0366] Hermanson(1996)《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques) ISBN :0123423368 或 012342335X。
- [0367] W096/40242。
- [0368] Nony 等, (2001)Vaccines 27 :3645-51。
- [0369] 《疫苗设计:亚单位和佐剂进展》(Vaccine Desing:The Subunit andAdjuvant Approach) (Powell 和 Newman 编) 普利马出版社 (Plenum Press)1995 (ISBN 0-306-44867-X)
- [0370] 美国专利 4, 709, 017。
- [0371] W093/25210。
- [0372] 美国专利 5, 917, 017。
- [0373] W000/48638。
- [0374] Del Guidice 等, (1998)Molecular Aspects of Medicine 19 :1-70。
- [0375] Anonymous (Jan 2002)Research Disclosure, 453077。
- [0376] Anderson(1983)Infect Immun 39(1) :233-238。
- [0377] Anderson 等, (1985)J Clin Invest 76(1) :52-59。
- [0378] EP-A-0372501。
- [0379] EP-A-0378881。
- [0380] EP-A-0427347。
- [0381] W093/17712
- [0382] W094/03208。
- [0383] W098/58668。
- [0384] EP-A-0471177。
- [0385] W091/01146
- [0386] Falugi 等, (2001)Eur J Immunol 31 :3816-3824。
- [0387] Baraldo 等, (2004)Infect Immun 72(8) :4884-7。
- [0388] EP-A-0594610。
- [0389] Ruan 等, (1990)J Immunol 145 :3379-3384。
- [0390] W000/56360。
- [0391] Kuo 等, (1995)Infect Immun 63 :2706-13。
- [0392] W002/091998。

[0393] W001/72337

[0394] W000/61761。

[0395] Tejedor 等, (2006)Pediatr Infect Dis J 25 :713-20。

[0001]

序列表

<110> 诺华疫苗和诊断有限两合公司 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG)

<120> 含血清群 C 脑膜炎球菌的多价疫苗

<130> P044644W0

<140> PCT/IB2006/_____

<141> 2006-09-01

<150> USSN 60/____, ____

<151> 2005-09-01

<150> USSN 60/____, ____

<151> 2005-12-16

<160> 3

<170> SeqWin99, 1.02 版

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> 乙肝病毒 (Hepatitis B virus)

<400> 1

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys
35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

[0002]

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
115 120 125

Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
145 150 155 160

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 2
<211> 1060
<212> DNA
<213> 酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 2
aagcttacca gttctcacac ggaacaccac taatggacac acattcgaaa tactttgacc 60
ctatttttga ggacctgtgc accttgagcc caagagagcc aagatttaaa ttttcctatg 120
acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacgggtcaa gaagacatat 180
ttgacctctt aacaggttca gacgcgactg cctcatcagt aagaccggtt gaaaagaact 240
tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgttag cgtcaacaac aagaagttaa 300
ctgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aaggaggtta gaatcatttt 360
gaataaaaaa cacgcttttt cagttcgagt ttatcattat caatactgcc atttcaaaga 420
atacgtaaat aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 480
ttaattctgc tgtaaccggt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa 540
catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccc 600

[0003]

```

ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 660
ccaacccatca gtccataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaac 720
aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aaatgatgac 780
acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct 840
gctctctctg atttgaaaa agctgaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaaattatt 900
cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct 960
atttcttaaa ctctttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaaacac 1020
caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa 1060

```

<210> 3

<211> 1063

<212> DNA

<213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 3

```

aagcttacca gtctcacac ggaacaccac taatggacac acattcgaaa tactttgacc 60
ctattttcga ggaccttgct accttgagcc caagagagcc aagatttaaa ttttcctatg 120
acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacggtaa gaagacatat 180
ttgacctctt aacaggttca gacgcgactg cctcatcagt aagaccggt gaaaagaact 240
tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgtag cgtcaacaac aagaagtta 300
ctgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aaggagtta gaatcatttt 360
gaataaaaaa cagcttttt cagttcgagt ttatcattat caatactgcc atttcaaaga 420
atacgtaaat aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 480
ttaattctgc tgtaaccgt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa 540
catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 600
ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 660
ccaacccatca gtccataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaac 720
aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aaatgatgac 780
acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct 840
gctctctctg atttgaaaa agctgaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaaattatt 900
cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct 960
atttcttaaa ctctttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaaacac 1020
caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa atg 1063

```