



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102028944 B

(45) 授权公告日 2013.12.04

(21) 申请号 201010587090.0

(22) 申请日 2005.03.14

(30) 优先权数据

0405787.3 2004.03.15 GB

(62) 分案原申请数据

200580015290.6 2005.03.14

(73) 专利权人 诺华疫苗和诊断有限公司

地址 意大利锡耶纳

(72) 发明人 M·肯托尼

(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 39/385(2006.01)

A61K 39/116(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61K 39/05(2006.01)

A61K 39/08(2006.01)

A61K 39/10(2006.01)

A61K 39/102(2006.01)

(56) 对比文件

FERNANDEZ 等. Randomized trial of the

immunogenicity of fractional dose regimens of PRP-T Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. 《THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE》. 2000, 第 62 卷 (第 4 期), 第 485 — 490.

JACOB AMIR 等. immunogenicity and safety of a liquid combination of DT-PRP-T vs lyophilized PRP-T reconstituted with DTP. 《VACCINE》. 1997, 第 15 卷 (第 2 期), 第 149—154 页.

NICOL M. HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B CONJUGATE VACCINE DILUTED TENFOLD IN DIPHTHERIA-TETANUS-WHOLE CELL PERTUSSIS VACCINE: A RANDOMIZED TRIAL. 《PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL》. 2002, 第 21 卷 (第 2 期), 第 138 — 141 页.

审查员 张蕊

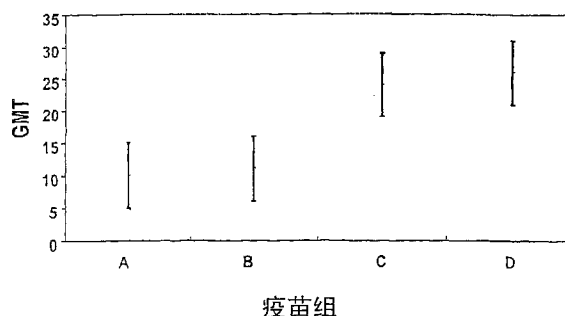
权利要求书3页 说明书22页 附图1页

(54) 发明名称

含有低剂量 HIB 偶联物的组合疫苗

(57) 摘要

已知包含用于免疫以抵御白喉、破伤风、百日咳和 Hib 的抗原的组合疫苗 ('DTP-Hib' 疫苗)。本发明解决了本领域对含有低剂量 Hib 抗原以降低成本而且不需要重建的疫苗的需要。因此, 本发明提供了包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 Hib 的抗原的组合疫苗, 其中: (a) 保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖偶联物; (b) 所述疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 < 15 μ g/ml; 和 (c) 该 Hib 偶联物从未被冻干过。已发现本发明疫苗是安全的并具有高免疫原性。



1. 一种用于保护对象以至少抵御白喉（'D'）、破伤风（'T'）、百日咳（'P'）和 B 型流感嗜血杆菌（'Hib'）的抗原的组合疫苗，其中：(a) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物；(b) 所述疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ ；和 (c) 所述 Hib 偶联物从未被冻干过，所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

2. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述白喉抗原包含白喉类毒素，所述破伤风抗原包含破伤风类毒素，所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

3. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

4. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

5. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

6. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

7. 一种装有可刺穿密封物并含有组合疫苗的药瓶，所述组合疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌（'Hib'）的抗原，其中所述保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物，其中 (a) 所述疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ ，(b) 药瓶的可刺穿密封物未被刺穿过；和 (c) 所述 Hib 偶联物从未被冻干过，所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

8. 如权利要求 7 所述的药瓶，其特征在于，所述白喉抗原包含白喉类毒素，所述破伤风抗原包含破伤风类毒素，所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

9. 如权利要求 7 所述的药瓶，其特征在于，所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

10. 如权利要求 7 所述的药瓶，其特征在于，所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

11. 如权利要求 7 所述的药瓶，其特征在于，所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

12. 如权利要求 7 所述的药瓶，其特征在于，所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

13. 一种含有组合疫苗的密封容器，所述组合疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌（'Hib'）的抗原，其中所述保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物，所述疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ ，和所述 Hib 偶联物从未被冻干过，所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

14. 如权利要求 13 所述的容器，其特征在于，所述白喉抗原包含白喉类毒素，所述破伤风抗原包含破伤风类毒素，所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

15. 如权利要求 13 所述的容器，其特征在于，所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

16. 如权利要求 13 所述的容器，其特征在于，所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

17. 如权利要求 13 所述的容器，其特征在于，所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

18. 如权利要求 13 所述的容器，其特征在于，所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

19. 一种包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 ('Hib') 的抗原的组合疫苗的制备方法,其中用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物,所述疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$,所述 Hib 偶联物从未被冻干过,所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂,其特征在于该方法不包括以下步骤的一个或两个:(a) 冻干 Hib 偶联物抗原的步骤,(b) 将白喉、破伤风和百日咳抗原包装到与 Hib 偶联物抗原分开的混合形式中的步骤。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述白喉抗原包含白喉类毒素,所述破伤风抗原包含破伤风类毒素,所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

22. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

23. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

24. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

25. 一种将组合疫苗注入容器的方法,其中:(a) 所述疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 ('Hib') 的抗原;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和 (c) 所述疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$;所述 Hib 偶联物从未被冻干过,所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述白喉抗原包含白喉类毒素,所述破伤风抗原包含破伤风类毒素,所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

27. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

28. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

29. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

30. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

31. 一种将标记贴在容器上的方法,其中:(a) 所述容器含有包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 ('Hib') 的抗原的组合疫苗;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和 (c) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$,所述 Hib 偶联物从未被冻干过,所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述白喉抗原包含白喉类毒素,所述破伤风抗原包含破伤风类毒素,所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

33. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

34. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

35. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗

原。

36. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

37. 一种将组合疫苗注入容器然后从容器中取出该疫苗的方法,其中:(a) 所述疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌('Hib')的抗原;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和(c) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $<15 \mu\text{g/ml}$,所述 Hib 偶联物从未被冻干过,所述疫苗不包含氢氧化铝佐剂。

38. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述白喉抗原包含白喉类毒素,所述破伤风抗原包含破伤风类毒素,所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

39. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

40. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

41. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

42. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

43. 一种用于保护对象以至少抵御白喉('D')、破伤风('T')、百日咳('P')和 B 型流感嗜血杆菌('Hib')的抗原的组合疫苗,其中:(a) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;(b) 所述疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $<15 \mu\text{g/ml}$,所述 Hib 偶联物从未被冻干过;和(c) 所述疫苗(i) 不含氢氧化铝佐剂和/或(ii) 不含硫酸铝钾佐剂。

44. 如权利要求 43 所述的疫苗,其包含磷酸铝佐剂。

45. 如权利要求 44 所述的疫苗,其特征在于,所述 Hib 偶联物不吸附于所述磷酸铝佐剂。

46. 如权利要求 43 所述的疫苗,其特征在于,所述白喉抗原包含白喉类毒素,所述破伤风抗原包含破伤风类毒素,所述百日咳抗原包含细胞百日咳组分。

47. 如权利要求 43 所述的疫苗,其特征在于,所述偶联物包含 CRM₁₉₇ 运载体、破伤风类毒素运载体或脑膜炎奈瑟球菌运载体的外膜复合物。

48. 如权利要求 43 所述的疫苗,其特征在于,所述偶联物包含 Hib 聚核糖基核糖醇磷酸的寡糖片段。

49. 如权利要求 43 所述的疫苗,其特征在于,所述组合疫苗还包含乙肝病毒的表面抗原。

50. 如权利要求 43 所述的疫苗,其特征在于,所述组合疫苗还包含脊髓灰质炎抗原。

51. 权利要求 1 或 43 所述的疫苗用于制备在哺乳动物中产生抗体应答的药物的用途。

含有低剂量 HIB 偶联物的组合疫苗

[0001] 本申请是 2005.03.14 提交的 CN200580015290.6, 题为“含有低剂量 HIB 偶联物的组合疫苗”的分案申请。

[0002] 本文所引用的所有文献都已完整纳入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及组合疫苗领域, 具体说是保护性抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (*H. influenzae* b 型, ' Hib') 的组合疫苗领域。

背景技术

[0004] 已知包含用于免疫以抵御白喉、破伤风、百日咳和 Hib 的抗原的组合疫苗 (' DTP-Hib' 疫苗)。可购得三种这样的疫苗, 其商品名是 TETRAMUNE™ 和 QUATTVAXEM™ (它们采用细胞百日咳抗原 ' DTwP-Hib') 和 INFANRIX-Hib™ (它采用非细胞百日咳抗原 ' DTaP-Hib')。

[0005] DTaP-Hib 疫苗中包含 Hib 偶联组分与抗 Hib 应答的降低相关 [1,2]。而且, Hib 偶联物在水性介质中不稳定, 不能以这种形式存活很长的贮存时间 [3]。因此, 在包含 Hib 偶联抗原的组合疫苗中, 通常将 Hib 组分制成在递送时用其它抗原的液体制剂重建的冻干粉末。

[0006] Hib- 偶联抗原的生产并不便宜, 有担心其成本将会抑制在发展中国家的广泛应用, 因此开发了使用 Hib 偶联物的替代方案 [4-6]。扩展其应用的一种方法是给予两次剂量 (如 3 和 5 月龄时 [5] 或 4 和 6 月龄时 [6]), 而非通常的三次剂量 (2、4 和 6 月龄时 [7])。然而, 在不同的方法中, Hib 偶联物一般给予 10 μ g/ 剂量, 采用了较低剂量 (一般为分数, 如 1/2、1/3、1/4 等) [4,6]。在参考文献 6 中, 例如, 以 5 μ g/ 剂量或 3.33 μ g/ 剂量给予 Hib 偶联物。

[0007] 相同方法已经延伸到 DTP-Hib 疫苗中的 Hib 偶联物。例如, 参考文献 8 比较了全剂量、半剂量和 1/3 剂量 Hib 偶联物与 DTwP 疫苗联用, 虽然与分别给予 DTP 和 Hib 相比, 接受组合型 DTP-Hib 疫苗的患者体内抗 -PRP 抗体的几何平均浓度降低, 但在所有病例中都能观察到可接受的保护性抗 Hib 免疫应答。参考文献 9 通过用 10 剂量的 DTwP 药瓶重建 1 剂量的 Hib, 使用 10 倍稀释的 Hib 偶联物剂量。参考文献 10 公开了用 TRITANRIX™ DTwP-HBsAg 疫苗将冻干 Hib 偶联物重建为全剂量、半剂量或 1/4 剂量。

[0008] 然而, 在这些情况下, Hib- 偶联物是冻干形式, 不得不在给药之前用水性 DTP 抗原重建。因此, 必须用两个分开的容器提供这些疫苗 (水性 DTP 装在一个容器中, 冻干的 Hib 装在另一个容器中), 这种对两个容器的需求增加了额外成本, 也增加了包装阶段、运输阶段、储存阶段和给药阶段的物流需求。由于剂量降低的疫苗旨在降低成本和鼓励在发展中世界销售, 所以这些额外需求显然不利。需要重建步骤也意味着存在终端使用者出错的风险、非标准化给药的可能性、混合产物污染的风险和需要训练重建步骤的操作人员。所有这些问题都阻碍其进入预计目标市场, 即发展中世界。

[0009] 因此,仍然需要包含低剂量 Hib 偶联抗原而不需要分别包装该 Hib 抗原的组合疫苗。

发明内容

[0010] 本发明提供了包含用于保护对象以至少抵御白喉 (' D')、破伤风 (' T')、百日咳 (P') 和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原的组合疫苗,其中:(a) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;(b) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$;和 (c) 该 Hib 偶联物从未被冻干过。已发现与参考文献 6、8 和 9 中观察到的免疫应答相比,本发明疫苗是安全的,并具有高免疫原性。

[0011] 本发明也提供了包含用于保护对象以至少抵御白喉 (' D')、破伤风 (' T')、百日咳 (P') 和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原的组合疫苗,其中:(a) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;(b) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$;和 (c) 该疫苗 (i) 不含氢氧化铝佐剂和 / 或 (ii) 不含硫酸铝钾佐剂。相信氢氧化铝参与了糖偶联物的降解,因此作为佐剂,该疫苗优选包含磷酸铝佐剂。当存在铝佐剂 (如磷酸铝佐剂) 时,优选 Hib 偶联物不吸附于该佐剂。

[0012] 本发明也提供装有可刺穿密封物并含有组合疫苗的药瓶,所述组合疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原,其中所述保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物,其中 (a) 所述疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$, (b) 药瓶的可刺穿密封物未被刺穿过。

[0013] 本发明也提供含有组合疫苗的密封容器,所述组合疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原,其中所述保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物,所述疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ 。

[0014] 本发明也提供包含用于保护对象以至少抵御白喉 (' D')、破伤风 (' T')、百日咳 (P') 和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原的组合疫苗的制备方法,其中用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物,疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$, 其中 (a) 该方法包括混合用于保护性抵御 D、T、P 和 Hib 的所述抗原的步骤,和 (b) 该方法 (i) 不包括冻干 Hib 偶联物抗原的步骤,和 / 或 (ii) 不包括将白喉、破伤风和百日咳抗原包装到与 Hib 偶联物抗原分开的混合形式中的步骤。

[0015] 本发明也提供将组合疫苗注入容器的方法,其中:(a) 该疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和 (c) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ 。

[0016] 本发明也提供将标记贴在容器上的方法,其中:(a) 该容器含有包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原的组合疫苗;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和 (c) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ 。该标记可说明该容器含有疫苗。

[0017] 本发明也提供将组合疫苗注入容器然后从容器中取出该疫苗的方法,其中:(a) 该疫苗包含用于保护对象以至少抵御白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (' Hib') 的抗原;(b) 用于保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物;和 (c) 疫苗中该 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$ 。

[0018] DTP 组分

[0019] 白喉抗原优选为白喉类毒素。已经详细记载了白喉类毒素的制备 [如参考文献 11 的第 13 章]。可采用任何合适的白喉类毒素。白喉类毒素的浓度通常为 5-100Lf/ml。优选浓度为 10-50Lf/ml。更优选的浓度为 20-40Lf/ml。最优选的浓度约为 30Lf/ml。或者, 优选浓度为 5-25Lf/ml, 更优选的浓度为 10-20Lf/ml, 最优选的浓度约为 15Lf/ml。然而, 当采用无细胞百日咳抗原时, 白喉类毒素的优选浓度约为 50Lf/ml。

[0020] 破伤风抗原优选为破伤风类毒素。已经良好地描述了破伤风类毒素的制备 [如参考文献 11 的第 27 章]。可采用任何合适的破伤风类毒素。破伤风类毒素的浓度通常为 1-50Lf/ml。优选浓度为 2-9Lf/ml。更优选的浓度为 5-8Lf/ml。最优选的浓度约为 6.5Lf/ml。然而, 当采用无细胞百日咳抗原时, 白喉类毒素的优选浓度约为 20Lf/ml。

[0021] 用于本发明的百日咳抗原可以是细胞 (如全细胞) 或无细胞的。已经详细记载了两种抗原类型的制备 [如参见参考文献 11 的第 21 章; 也参见参考文献 12]。对于细胞百日咳抗原, 百日咳抗原的浓度通常为 5-500U/ml。优选浓度为 10-400U/ml。更优选的浓度为 25-350U/ml。最优选的浓度约为 300U/ml。当采用无细胞抗原时, 优选采用百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (FHA), 更优选与百日咳杆菌黏附素 (pertactin) (也称为 PRN 或 69kDa 抗原) 混合, 任选地与凝集原 (也称为菌毛) 2 和 3 混合 [13]。每个疫苗剂量 (如每 0.5ml) 的百日咳抗原水平一般为: 10 μg PT、5 μg FHA、3 μg 或 5 μg PRN, 5 μg 混合的菌毛。PT 是有毒蛋白, 当存在于百日咳抗原中时, 优选脱毒。可通过化学和 / 或遗传方法脱毒。优选的脱毒突变体是 9K/129G 双突变体 [14]。

[0022] Hib 偶联物

[0023] 用于本发明疫苗的 B 型流感嗜血杆菌抗原包含 Hib 荚膜糖抗原。B 型流感嗜血杆菌的糖抗原是熟知的 [如参考文献 11 的第 14 章]。将 Hib 糖偶联于运载体蛋白以增强其免疫原性, 尤其是在儿童中的免疫原性。已经详细记载了 Hib 荚膜糖的制备 [如参考文献 15-24]。本发明可采用任何合适的 Hib 偶联物。上面描述了合适的运载体蛋白, Hib 糖的优选运载体是 CRM₁₉₇ ('HbOC'), 破伤风类毒素 ('PRP-T') 与脑膜炎奈瑟球菌 (*N. meningitidis*) 的外膜复合物 ('PRP-OMP')。

[0024] 该偶联物的糖部分可以是多糖 (如全长聚核糖基核糖醇磷酸 (PRP)), 但优选采用寡糖 (如 MW 约为 1-5kDa)。它们可通过片段化纯化 PRP (如通过水解)、然后通常纯化所需大小的片段而方便地形成。当本发明组合物包含偶联的寡糖时, 寡糖制备应该在偶联之前。

[0025] 用于共价偶联的优选运载体蛋白是细菌毒素或类毒素, 如白喉类毒素或破伤风类毒素。尤其优选 CRM₁₉₇ 白喉毒素突变体 [25-27]。其它合适的运载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [28]、合成肽 [29, 30]、热激蛋白 [31, 32]、百日咳蛋白 [33, 34]、细胞因子 [35]、淋巴因子 [35]、激素 [35]、生长因子 [35]、包含来自各种病原体衍生抗原的多个人 CD4+T 细胞表位的人造蛋白 [36]、流感嗜血杆菌的蛋白 D [37, 38]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [39]、摄铁蛋白 [40]、艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B [41] 等。优选运载体是白喉类毒素、破伤风类毒素和 CRM₁₉₇。

[0026] 可采用糖 : 蛋白比 (w/w) 为 1 : 5 (即蛋白过量) - 5 : 1 (即糖过量), 如 1 : 2-5 : 1 和 1 : 1.25-1 : 2.5 的偶联物。

[0027] 偶联物可与游离的运载体蛋白联用 [42]。当本发明组合物中给定运载体蛋白既有

游离形式又有偶联形式时,全部组合物中未偶联形式优选不多于运载体蛋白总量的 5%,更优选小于 2 重量%。

[0028] 可采用任何合适的偶联反应,需要时采用任何合适接头。

[0029] 一般在偶联之前将糖活化或官能化。活化可包括例如,氰化试剂如 CDAP(如 1-氰基-4-(二甲基氨基)-四氟硼酸吡啶 [43,44 等])。其它合适技术采用碳二亚胺、酰肼、活化酯、降冰片烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU;也参见参考文献 22 的引言)。

[0030] 可用任何已知方法,例如参考文献 45 和 46 所述方法通过接头基团连接。一种连接类型包括多糖的还原性胺化,将得到的氨基与己二酸接头基团的一端偶联,然后将蛋白质偶联于己二酸接头基团的另一端 [20、47、48]。其它接头包括 B-丙酰胺基 [49]、硝基苯基-乙基胺 [50]、卤代酰基卤化物 [51]、糖苷键 [52]、6-氨基己酸 [53]、ADH[54]、C₄-C₁₂ 基团 [55] 等。作为采用接头的替代方式,可采用直接连接。与蛋白质直接连接可包括氧化多糖,然后用蛋白质还原性胺化,例如参考文献 56 和 57 所述。

[0031] 一种方法包括:将氨基引入糖(如通过用 -NH₂ 取代末端 = O 基团),然后用己二酸二酯(如己二酸 N-羟基琥珀酰亚胺二酯)衍生化,优选与运载体蛋白反应。另一优选反应采用 CDAP 活化和蛋白 D 运载体。

[0032] 偶联后,可分离游离糖和偶联糖。有许多合适方法可用于此分离,包括疏水层析、切线式超滤,透析等。[也参见参考文献 58 和 59 等]。如果疫苗包含游离形式和偶联形式的给定糖,全部组合物中未偶联形式优选不多于该糖总量的 20 重量%(如 ≤ 15%、≤ 10%、≤ 5%、≤ 2%、≤ 1%)。

[0033] 优选偶联物包含通过己二酸接头共价偶联于 CRM₁₉₇ 的 Hib 寡糖 [60,61]。破伤风类毒素也是优选的运载体。

[0034] 给予 Hib 抗原优选使抗 -PRP 抗体浓度 ≥ 0.15 μg/ml,更优选 ≥ 1 μg/ml。这些是标准的可接受应答阈值。

[0035] 本发明疫苗中 Hib 偶联物的浓度为 < 15 μg/ml,如 ≤ 14 μg/ml、≤ 12 μg/ml、≤ 10 μg/ml、≤ 7.5 μg/ml、≤ 5 μg/ml、≤ 4 μg/ml、≤ 3 μg/ml、≤ 2 μg/ml、≤ 1 μg/ml 等。当运载体蛋白不是 OMPC 时,可能采用稍高的剂量,如 < 20 μg/ml、≤ 19 μg/ml、≤ 18 μg/ml、≤ 17 μg/ml、≤ 16 μg/ml 等。然而,本发明疫苗中 Hib 偶联物的浓度通常为至少 0.1 μg/ml,如 ≥ 0.2 μg/ml、≥ 0.3 μg/ml、≥ 0.4 μg/ml、≥ 0.5 μg/ml、≥ 0.6 μg/ml、≥ 0.7 μg/ml、≥ 0.8 μg/ml、≥ 0.9 μg/ml、≥ 1.0 μg/ml、≥ 1.25 μg/ml、≥ 1.5 μg/ml、≥ 2.0 μg/ml、≥ 3.5 μg/ml 等。因此,所述疫苗中 Hib 偶联物浓度的优选范围是 d₁-d₂ μg/ml,其中:(i) d₁ < d₂; (ii) d₁ 选自 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.5 和 4.0;和 (iii) d₂ 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 和 15。

[0036] 在说明书和权利要求书中根据糖量定义 Hib 偶联物的浓度(即作为整体的偶联物(运载体+糖)剂量高于所述剂量),以避免由于运载体的选择而引起的变化。

[0037] 本发明组合物中 Hib 偶联物抗原不是冻干的并且从未被冻干过。

[0038] 佐剂

[0039] 相信氢氧化铝参与 Hib 糖偶联物的降解 [62],因此疫苗优选包含磷酸铝佐剂作为

佐剂。

[0040] 当存在磷酸铝佐剂时,与参考文献 63 相反,Hib 偶联物优选不吸附于该佐剂。可通过选择生产期间的正确混合顺序,通过选择抗原/佐剂混合期间的合适 pH,和/或通过选择具有合适零电点(PZC)的佐剂[64]来实现不吸附(见下)。

[0041] 当存在磷酸铝时,白喉类毒素一般吸附在磷酸铝上。吸附优选为部分吸附,如组合物中全部白喉类毒素的大约 30-80 重量%是吸附的(如约 40%-70%、约 50%-60%等)。当储存于约 37°C 时,白喉类毒素的吸附随时间增加。破伤风类毒素一般吸附在磷酸铝上。吸附优选为部分吸附,如组合物中全部破伤风类毒素的不多于 40 重量%是吸附的(如不多于 30%、不多于 20%、不多于 10%等)。破伤风类毒素吸附水平可以约为 0%。Hib-偶联物仍然不吸附于铝佐剂。组合物中优选不多于 15 重量%的 Hib-偶联物应吸附于磷酸铝(如至多 10%、至多 5%、至多 4%、至多 3%、至多 2%或至多 1%)。

[0042] 本文所用术语“磷酸铝”包括磷酸铝、羟基磷酸铝和羟基磷酸硫酸铝。用于本发明的磷酸铝优选形式是羟基磷酸盐。

[0043] 磷酸铝的 $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ 摩尔比通常为 0.3-1.2,优选 0.8-1.2,更优选 0.95 ± 0.1 。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,包括 0.6mg Al^{3+}/ml 。磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。磷酸铝通常是颗粒。抗原吸附后其颗粒的直径一般为 0.5-20 μm (如约 5-10 μm)。

[0044] 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来改变 PZC(更多磷酸根=更酸性的 PZC),或通过加入缓冲液如组氨酸缓冲液(使 PZC 的碱性更强)。用于本发明的磷酸铝的 PZC 通常为 5.0-7.0,更优选 5.5-6.0,如约 5.7。

[0045] 优选以加入抗原的水性溶液形式使用磷酸铝(注:一般将磷酸铝水溶液称为“溶液”,但是从严格的物理化学观点来看,该盐不可溶,形成的是悬液)。优选将磷酸铝稀释到所需浓度,以保证在加入抗原组分之前是均一溶液。

[0046] 在加入抗原之前 Al^{3+} 的浓度通常为 0-10mg/ml。优选浓度为 2-6mg/ml。更优选的浓度为 4-5mg/ml,如 4.4mg/ml(对应的磷酸铝浓度是 20mg/ml)。本发明疫苗中 Al^{3+} 的最终浓度通常为 0.1-2.0mg/ml。优选浓度为 0.2-1.5mg/ml。更优选的浓度为 0.3-1.0mg/ml。最优选的浓度约为 0.6mg/ml。

[0047] 用于制备本发明疫苗的磷酸铝溶液可(但不必须)含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸缓冲液)。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,如浓度为 1.0-20mM,优选为 5-15mM,更优选约为 10mM。磷酸铝溶液也可包含氯化钠。氯化钠浓度优选为 0.1-100mg/ml(如 0.5-50mg/ml,1-20mg/ml,2-10mg/ml),更优选约为 $3 \pm 1\text{mg}/\text{ml}$ 。存在 NaCl 有助于在吸附于抗原之前正确测定 pH。

[0048] 虽然通常可以采用铝盐作为单独的佐剂,但本发明疫苗可包含的其它佐剂包括但不限于:

[0049] A. 含矿物质的组合物

[0050] 含矿物质的组合物适合用作本发明佐剂,包括无机盐,如铝盐和钙盐。发明包括无机盐如氢氧化物(例如羟基氧化物)、磷酸盐(例如羟基磷酸盐、正磷酸盐)、硫酸盐等[例如参见参考文献 65 的第 8 和 9 章]或不同无机化合物的混合物,化合物采用任何合适的形式

(例如凝胶、晶体、无定形等),优选吸收。含矿物质的组合物可制成金属盐的颗粒 [66]。

[0051] 本发明疫苗组合物优选基本上不含氢氧化铝(如羟基氧化铝)。组合物中氢氧化铝的浓度通常小于 $100 \mu\text{g/ml}$, 优选小于 $50 \mu\text{g/ml}$, 更优选小于 $10 \mu\text{g/ml}$, 最优选小于 $1 \mu\text{g/ml}$ 。具体说, Hib- 偶联物抗原优选不吸附在氢氧化铝上。

[0052] 可采用磷酸钙佐剂。

[0053] B. 油乳剂

[0054] 适合用作本发明佐剂的油乳剂组合物包括鲨烯-水乳剂, 如 MF59 [参考文献 65 的第 10 章; 也参见参考文献 67] (5% 鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% Span 85, 用微流化机制成亚微米颗粒)。也可使用完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA)。

[0055] C. 皂苷制剂 [参考文献 65 的第 22 章]

[0056] 皂苷制剂也能用作发明的佐剂。皂苷是甾醇糖苷和三萜糖苷的异种组, 在广范围的植物种类的树皮、叶、茎干、根和甚至花中发现。来自皂树 (*Quillaia saponaria*) Molina 树皮的皂苷作为佐剂已广泛研究。皂苷也能商业获得自丽花菝葜 (*Smilax ornata*) (墨西哥菝葜)、满天星 (*Gypsophilla paniculata*) (婚纱花) 和肥皂草 (*Saponaria officianalis*) (皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21 以及脂质制剂如 ISCOM。QS21 以 Stimulon™ 出售。

[0057] 皂苷组合物用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化。已鉴定出使用这些技术特别纯化的部分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。皂苷优选是 QS21。生成 QS21 的方法示于参考文献 42。皂苷制剂也可包括甾醇, 如胆固醇 [69]。

[0058] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合体 (ISCOM) 的独特颗粒 [参考文献 65 的第 23 章]。ISCOM 通常也包括磷脂如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷可用于 ISCOM。ISCOM 优选包括 1 种或多种 QuilA、QHA 和 QHC。ISCOM 进一步描述于参考文献 69-71。ISCOM 任选可不含另外的去垢剂 [72]。

[0059] 开发以皂苷为基础的佐剂的综述可见参考文献 73 和 74。

[0060] D. 病毒体和病毒样颗粒

[0061] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也可用作发明的佐剂。这些结构一般包含 1 种或多种来自病毒的蛋白, 病毒任选结合磷脂或用磷脂配制。它们通常不致病、不复制且一般不包含任何天然病毒基因组。病毒蛋白可重组生成或从全病毒中分离。这些适用于病毒体或 VLP 的病毒蛋白包括衍生自流感病毒 (如 HA 或 NA)、乙肝病毒 (如核心或衣壳蛋白)、戊型肝炎病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺沃克病毒、人乳头瘤病毒、HIV、RNA- 噬菌体、Q β - 噬菌体 (如外被蛋白)、GA- 噬菌体、fr- 噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty (如反转录转座子 Ty 蛋白 p1) 的蛋白。VLP 进一步讨论于参考文献 75-80。病毒体进一步讨论于例如参考文献 81。

[0062] E. 细菌或微生物衍生物

[0063] 适合用于发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物, 如肠细菌脂多糖 (LPS) 的非毒性衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激性寡核苷酸和 ADP- 核糖基化毒素和其去毒衍生物。

[0064] LPS 的非毒性衍生物包括单磷酰脂质 A (MPL) 和 3-O- 脱酰 MPL (3d MPL)。3d MPL 是 3-O- 脱酰单磷酰脂质 A 与 4、5 或 6 条酰化链的混合物。3-O- 脱酰单磷酰脂质 A 的优选“小颗粒”形式示于参考文献 82。这种“小颗粒”3d MPL 小到足以经 $0.22 \mu\text{m}$ 膜无菌过滤

[82]。其它非毒性 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物,如氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物,例如 RC-529[83,84]。

[0065] 脂质 A 衍生物包括来自大肠杆菌的脂质 A 衍生物,如 OM-174。OM-174 描述于例如参考文献 85 和 86。

[0066] 适合用作发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含 CpG 基序(二核苷酸序列,含通过磷酸键连接鸟苷的未甲基化胞嘧啶)的核苷酸序列。含回文或聚(dG)序列的双链 RNAs 和寡核苷酸也显示是免疫刺激性的。

[0067] CpG 可包括核苷酸修饰/类似物如硫代磷酸修饰且可以是双链或单链。参考文献 87、88 和 89 揭示可能的类似物取代,如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。CpG 寡核苷酸的佐剂效果进一步讨论于参考文献 90-95。

[0068] CpG 序列可指向 TLR9,如基序 GTCGTT 或 TTCGTT[96]。CpG 序列可对诱导 Th1 免疫反应特异,如 CpG-A ODN,或它可对诱导 B 细胞反应更特异,如 CpG-B ODN。CpG-A 和 CpG-B ODN 讨论于参考文献 97-99。CpG 优选是 CpG-A ODN。

[0069] 优选构建 CpG 寡核苷酸,使 5' 末端易接受受体识别。2 种 CpG 寡核苷酸序列可任选在其 3' 末端附着以形成“免疫聚体”(immunomers)。参见例如参考文献 96 和 100-102。

[0070] 细菌 ADP-核糖基化毒素和其去毒衍生物可用作发明的佐剂。蛋白优选获得自大肠杆菌(大肠杆菌热不稳定性肠毒素“LT”)、霍乱(“CT”)或百日咳(“PT”)。使用去毒 ADP-核糖基化毒素作为粘膜佐剂描述于参考文献 103 且用作肠胃外佐剂描述于参考文献 104。毒素或类毒素优选以全毒素形式,包括 A 和 B 亚基。A 亚基优选包含去毒突变;B 亚基优选不突变。佐剂优选是去毒 LT 突变体,如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。使用 ADP-核糖基化毒素和其去毒衍生物,特别是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂可见参考文献 105-112。关于氨基酸取代的数字参考优选基于参考文献 113 所列 ADP-核糖基化毒素的 A 和 B 亚基排列,参考文献 113 特别全部纳入本文供参考。

[0071] F. 人免疫调节剂

[0072] 适合用作发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子如白介素(例如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12[114]等)[115]、干扰素(例如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0073] G. 生物粘合剂和粘膜粘合剂

[0074] 生物粘合剂和粘膜粘合剂也可用作发明的佐剂。合适的生物粘合剂包括酯化透明质酸微球体[116]或粘膜粘合剂如聚(丙烯酸)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。壳聚糖和其衍生物也可用作发明的佐剂[117]。

[0075] H. 微粒

[0076] 微粒也可用作发明的佐剂。优选从可生物降解和无毒性物质(如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等)材料形成的颗粒(即 $\sim 100\text{nm}$ 到 $\sim 150\text{nm}$ 直径的颗粒,更优选 $\sim 200\text{nm}$ 到 $\sim 30\mu\text{m}$ 直径,最优选 $\sim 500\text{nm}$ 到 $\sim 10\mu\text{m}$ 直径),优选具有聚交酯聚乙交酯共聚物,任选处理的以具有带负电的表面(例如用 SDS)或带正电的表面(例如用阳离子去垢剂,如 CTAB)。

[0077] I. 脂质体(参考文献 65 的第 13 和 14 章)

[0078] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子描述于参考文献 118-120。

[0079] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0080] 适用于发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯 [121]。这种制剂进一步包括组合辛苯昔醇的聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂 [122] 以及组合至少 1 种另外非离子表面活性剂如辛苯昔醇的聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂 [123]。优选的聚氧乙烯醚选自下组：聚氧乙烯-9-月桂醚 (laureth9)、聚氧乙烯-9-硬脂基醚、聚氧乙烯-8-硬脂基醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

[0081] K. 聚磷腈 (PCPP)

[0082] PCPP 制剂描述于例如参考文献 124 和 125。

[0083] L. 胞壁酰肽

[0084] 适合用作发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括 N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP) 和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (MTP-PE)。

[0085] M. 咪唑喹诺酮 (imidazoquinolone) 化合物

[0086] 适合用作发明佐剂的咪唑酮化合物的例子包括咪唑莫特和其同源物 (例如“瑞喹莫德 3M”), 它们进一步描述于参考文献 126 和 127。

[0087] 发明也可包括 1 种或多种上面鉴定的佐剂的组合。例如, 下列佐剂组合物能用于发明: (1) 皂苷和水包油乳剂 [128]; (2) 皂苷 (例如 QS21)+ 非毒性 LPS 衍生物 (例如 3dMPL) [129]; (3) 皂苷 (例如 QS21)+ 非毒性 LPS 衍生物 (例如 3dMPL)+ 胆固醇; (4) 皂苷 (例如 QS21)+3dMPL+IL-12 (任选 + 甾醇) [130]; (5) 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳剂的组合 [131]; (6) SAF, 含 10% 鲨烯、0.4% 吐温 80™、5% 普朗尼克 (Pluronic)-嵌段共聚物 L121 和 thr-MDP, 微流化成亚微米乳剂或涡旋产生较大粒度乳剂; (7) Ribi™ 佐剂体系 (RAS) (Ribi Immunochem), 含 2% 鲨烯、0.2% 吐温 80 和 1 种或多种来自单磷酸脂 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 的细菌细胞壁成分, 优选 MPL+CWS (Detox™); (8) 1 种或多种无机盐 (如铝盐)+ 非毒性 LPS 衍生物 (如 3dMPL)。

[0088] 其它用作免疫刺激剂的物质示于参考文献 65 的第 7 章。

[0089] 其它抗原

[0090] 本发明组合物包含 D、T、P 和 Hib 抗原。它们也可包含其它抗原, 如:

[0091] - 脑膜炎奈瑟球菌血清组 A、C、W135 和 / 或 Y 的糖抗原, 如参考文献 132 中公开的血清组 C 的寡糖, 或参考文献 133 的寡糖。该疫苗优选含有血清组 A、C、W135 和 Y 的 2、3 或 4 的偶联物。

[0092] - 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的糖抗原 [如参考文献 134-136]。

[0093] - 甲肝病毒抗原, 如灭活病毒 [如 137, 138]。

[0094] - 乙肝病毒抗原, 如表面抗原和 / 或核心抗原 [如 138, 139]。

[0095] - 从脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 制备的外膜囊泡 (OMV) 或胞 (bleb), 如参考文献 140、141、142、143 等所述。

[0096] - 脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的蛋白抗原, 如参考文献 144-150 所述, 尤其优选蛋白' 287' (见下) 和衍生物 (如' ΔG287')。

[0097] - 脊髓灰质炎抗原 [如 151, 152], 如 IPV。

[0098] 组合物可包含这些其它抗原中的一种或多种。各抗原的浓度一般是至少 $1\mu\text{g/ml}$ 。通常,任何给定抗原的浓度都足以引发对抗该抗原的免疫应答。优选通过组合并不去除单个糖抗原的保护效力,但实际上可能降低免疫原性(如 ELISA 滴度)。

[0099] 当采用糖抗原时,优选将其偶联于运载体蛋白以增强免疫原性。

[0100] 作为在本发明组合物中采用蛋白质抗原的替代方式,可采用编码该抗原的核酸[如参考文献 153-161]。因此,本发明组合物的蛋白组分可被编码该蛋白的核酸取代(优选 DNA 如质粒形式的 DNA)。类似地,本发明组合物可包含模拟糖抗原的蛋白如模拟表位[162] 或抗-独特型抗体。它们可取代单独的糖组分,或可补充糖组分。例如,疫苗可包含 MenC[163] 或 MenA[164] 荚膜多糖的肽模拟物以取代糖本身。

[0101] 当本发明疫苗包括乙肝表面抗原('HBsAg')时,可用两种方式制备此抗原。第一种方法包括从慢性乙肝载体的血浆中纯化颗粒形式的抗原,因为在 HBV 感染期间大量 HbsAg 在肝中合成并释放到血流中。第二种方式是优选方式,它包括通过重组 DNA 方法表达蛋白。优选通过酿酒酵母表达来制备 HBsAg。可将 HbsAg 基因注入质粒中,可用启动子如'GAPDH'启动子(来自甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因)控制质粒中 HbsAg 基因的表达。可在合成培养基中培养该酵母。然后,可采用包括以下步骤的方法纯化 HbsAg:例如沉淀、离子交换层析和超滤。纯化后,可对 HbsAg 进行透析(如用半胱氨酸)。可使用颗粒形式的 HBsAg。

[0102] 当本发明疫苗包括脊髓灰质炎抗原时,优选采用三种脊髓灰质炎病毒抗原-1 型脊髓灰质炎病毒(如 Mahoney 毒株)、2 型脊髓灰质炎病毒(如 MEF-1 毒株)和 3 型脊髓灰质炎病毒(如 Saukett 毒株)。可在细胞培养物中培养脊髓灰质炎病毒。优选的培养物采用 VERO 细胞系,该细胞系是衍生自猴肾的连续细胞系。可方便地培养 VERO 细胞作为微运载体。在病毒感染前和感染期间 VERO 细胞培养物可包括采用来自牛的材料,如小牛血清,该材料应该获自未患牛海绵状脑炎(BSE)的来源。培养物也可包括诸如乳清蛋白水解产物等材料。培养后,可用诸如超滤、透析和层析等技术纯化病毒粒子。在给予患者之前,必须灭活病毒,可通过甲醛处理达到这个目的。优选单独地培养、纯化和灭活病毒,然后混合它们以产生大量混合物,用于加入吸附的白喉和破伤风抗原中。

[0103] 本发明疫苗中的抗原应该以“免疫有效量”存在,即以单剂量或一系列剂量的一部分给予个体该量能有效治疗或预防疾病。该量依待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类组(如人、灵长类等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需保护的程 度、疫苗的制剂、主治医师对医学状况的评价和其它相关因素而不同。预计该量属于由常规试验确定的相对宽的范围。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案(如包括加强剂量)。

[0104] 本发明疫苗的非免疫组分

[0105] 除了上述抗原和佐剂组分以外,本发明疫苗一般包含一种或多种'药学上可接受的运载体',包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何运载体。合适的运载体一般是大且代谢慢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖[165]、海藻糖[166]、乳糖和脂质聚集体(如油珠或脂质体)。本领域普通技术人员熟知这些运载体。疫苗也可含有稀释剂,如水、盐水、甘油等。此外,也可存在辅助物质,如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。无菌无热原的磷酸盐缓冲生理盐水是典型的运载体。对药学上可接受的赋形剂的充分讨论参见参考文献 167。

[0106] 本发明组合物是水性形式即溶液或悬液。这种类型的液体制剂可以使组合物直接以其包装形式给药而无需用水性介质重建,因此这种液体制剂是理想的注射剂。可将组合物装在药瓶中,或者可装在预先充满的注射器中。注射器可装有或不装针头。注射器将包含单剂量的组合物,而药瓶可包含单剂量或多剂量。

[0107] 本发明液体疫苗也适合用于重建冻干形式的其它疫苗。当准备以此种临用前重建的形式应用疫苗时,本发明提供了一种药盒,该药盒可包括两个药瓶,或可包括一个预先充满的注射器和一个药瓶,在注射前用注射器内容物活化药瓶内容物。

[0108] 可将本发明疫苗包装成单剂形式或多剂形式。对于多剂形式,药瓶比预先充满的注射器更优选。可常规地建立有效剂量体积,但注射组合物的人用剂量的体积一般为 0.5ml。

[0109] 本发明疫苗的 pH 通常为 6.0-8.0,更优选 6.3-6.9 如 6.6 ± 0.2 。优选在此 pH 下缓冲疫苗。可用缓冲液维持稳定的 pH。如果组合物包含氢氧化铝盐,优选采用组氨酸缓冲液 [168]。该组合物可以是无菌和 / 或无热原的。磷酸铝和全细胞百日咳抗原不适合过滤除菌,因此当本发明组合物包含这些成分之一时,优选用高压蒸气法对本发明组合物灭菌和 / 或采用生产中心菌的组分。

[0110] 本发明组合物可与人体等渗。

[0111] 本发明疫苗可包含抗微生物剂,特别是包装在多剂形式中时。许多抗微生物剂是基于汞的(如硫柳汞),但优选避免采用含汞防腐剂,如可采用 2-苯氧基乙醇。防腐剂优选以低水平(如 0.01 体积%)存在。防腐剂可以是外源性加入的和 / 或可以是混合形成该组合物的大量抗原的组分(如存在的百日咳抗原作为防腐剂)。

[0112] 本发明疫苗可包含去污剂如吐温(聚山梨酸酯),如吐温 80。去污剂通常以低水平存在,如 $< 0.01\%$ 。

[0113] 本发明疫苗可包含钠盐(如氯化钠),以产生张力。该组合物可包含氯化钠。该组合物中氯化钠的浓度优选 0.1-100mg/ml(如 1-50mg/ml、2-20mg/ml、5-15mg/ml),更优选 $10 \pm 2\text{mg/ml}$ NaCl 如约 9mg/ml。

[0114] 本发明疫苗通常包含缓冲液。一般是磷酸盐或组氨酸缓冲液。

[0115] 本发明疫苗的溶液中可包含游离的磷酸根离子(如通过采用磷酸盐缓冲液),以帮助抗原不吸附。本发明组合物中游离磷酸根离子的浓度通常为 0.1-10.0mM,优选为 1-5mM,更优选约 2.5mM。

[0116] 包装本发明疫苗

[0117] 本发明疫苗可包装到多种类型的容器中,如药瓶、注射器等。

[0118] 对于需要重建冻干 Hib 组分的现有 DTP-Hib 疫苗,将 DTP 抗原水溶液从第一个密封药瓶中吸入注射器,然后注入含有冻干物质的第二个密封药瓶中。然后将重建的疫苗吸入同一注射器中,给予患者。相反,本发明疫苗中的 Hib 偶联物在水溶液中稳定,不需要冻干。因此,本发明能够提供装有可刺穿密封物并含有 DTP-Hib 疫苗的药瓶,其中可刺穿封口未被刺穿过。类似地,本发明能够提供含有本发明疫苗的密封容器。需要重建冻干 Hib 组分的现有 DTP-Hib 疫苗必须包装到两个独立容器中。相反,本发明可以提供将已经包含 DTP-Hib 抗原的形式的本发明疫苗注入容器的方法。注入优选不通过容器中的密封物。

[0119] 类似地,在制造过程中对疫苗包装进行标记,然后当它们是分开的 DTP 和 Hib 形式

时标记现有疫苗 DTP-Hib, 而本发明可标记最终 DTP-Hib 形式的疫苗。

[0120] 而且, 将现有重建的 DTP-Hib 疫苗以 DTP-Hib 形式从其容器中抽出, 但它们不是以这种形式注入容器的。然而, 根据本发明, 这种 DTP-Hib 疫苗可以混合的 DTP-Hib 形式注入和抽出。注入和抽出之间的时间可以至少为 n 周, 其中 n 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多。抽出通常要通过针头 (如无菌递送装置如注射器的针头), 但注入容器中通常是在生产线上而非递送装置中进行。

[0121] 制备本发明疫苗

[0122] 本发明疫苗含有至少 DTP-Hib 抗原, 因此, 它们的制备包括混合这四种抗原。不像现有重建的 DTP-Hib 疫苗的制备那样, 本发明可提供不包括冻干 Hib 偶联物的步骤的制备方法。类似地, 本发明能够提供不包括将混合的 DTP 抗原与 Hib 抗原分开包装的步骤的制备方法。

[0123] 在制备期间, 加入的抗原通常未吸附在铝盐上 (即它们不是 ‘预吸附的’)。因此, 对于加入的各个抗原来说, 优选不多于 5 重量% (优选为 0) 已经吸附于铝盐 (如至多 4%、至多 3% 或至多 2%)。然而, 在一些情况下, 可加入预吸附的抗原。

[0124] 制备大量本发明疫苗的方法一般是将 Hib 组分加入 D、T 和 P 组分的混合物中即在加入 Hib 组分之前混合 DTP 组分。此混合顺序可在使得加入 Hib 组分之前调节组合物的离子强度和 / 或 pH (如 $\text{pH} < 7$), 以防止吸附于可能存在的任何铝佐剂。

[0125] 优选在 15°C - 30°C (如 19°C - 27°C , 或 $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$) 制备本发明疫苗。

[0126] 给予本发明疫苗

[0127] 本发明提供了在哺乳动物中产生抗体应答的方法, 该方法包括将本发明疫苗给予该哺乳动物。给予疫苗可以是预防性目的 (即预防感染) 或治疗性目的 (即治疗感染后的疾病)。本发明提供了在哺乳动物中产生免疫应答的方法, 该方法包括给予有效量的本发明疫苗的步骤。该免疫应答优选为保护性, 优选涉及抗体。该方法可产生加强应答。

[0128] 该哺乳动物优选为人。当该疫苗用于预防性目的时, 人优选为儿童 (如幼儿或婴儿) 或青少年; 当该疫苗用于治疗性目的时, 人优选为成人。用于儿童的疫苗也可给予成人, (例如) 以评价安全性、剂量、免疫原性等。

[0129] 本发明也提供用作药物的本发明组合物。该药物优选能够在哺乳动物中产生免疫应答 (即它是免疫原性组合物), 更优选为疫苗。

[0130] 本发明也提供至少白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌 (‘Hib’) 抗原在生产用于免疫患者的组合疫苗中的应用, 其中 (a) 保护性抵御 Hib 的抗原是 Hib 荚膜糖的偶联物; (b) 疫苗中 Hib 偶联物的浓度 $< 15 \mu\text{g/ml}$; (c) 生产不包括冻干 Hib 偶联物。

[0131] 这些应用和方法优选用于预防和 / 或治疗白喉杆菌 (*C. diphtheriae*)、破伤风杆菌 (*C. tetani*)、百日咳杆菌 (*B. pertussis*) 和流感嗜血杆菌的感染和由这些感染引起的疾病, 如预防白喉、破伤风、百日咳、细菌性脑膜炎等。

[0132] 检测治疗性治疗效果的一种方式包括在给予本发明组合物后监测细菌感染。检测预防性治疗效果的一种方式包括在给予该组合物后监测对抗原的免疫应答。可通过将本发明组合物给予受试对象 (如 12-16 月龄的儿童, 或动物模型 [169]), 然后测定标准免疫学参数来测定它们的免疫原性。通常在给予组合物约 4 周后测定这些免疫应答, 并与给予组合物之前测定的值作比较。除了评价在患者、标准动物和体外模型中的实际保护效果, 评价

Hib 和 DTP 疫苗效果的保护相关性也是熟知的。

[0133] 通常将本发明组合物直接给予患者。可通过胃肠道外注射（如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或给予组织间隙），或通过直肠、口腔、阴道、局部、透皮、鼻内、眼内、耳内、肺部或其它粘膜给药完成直接递送。优选肌肉内给予股或上肢。可通过针头（如皮下注射器针头）进行注射，但也可采用无针注射。肌肉内剂量一般是 0.5ml。可用本发明引发全身性免疫和 / 或粘膜免疫。

[0134] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。多剂量可用于初次免疫方案和 / 或加强免疫方案。初次剂量方案后，可进行加强剂量方案。可常规地测定初敏剂量之间的合适时间（如 4-16 周）以及初敏和加强免疫之间的合适时间。

[0135] 细菌感染会影响身体的各个区域，因此本发明组合物可制备成各种形式。例如，该组合物可制备成液体溶液或悬液的可注射剂。可将该组合物制备成用于以细粉或喷雾肺部给药的（如）吸入剂。可将该组合物制备成栓剂或阴道栓剂。可将该组合物制备成用于鼻内、耳内或眼内给药的（如）喷雾剂、滴剂、凝胶剂或粉末剂 [如参考文献 170 和 171]。已经报道了成功的 Hib 多糖 [172] 和 DTP 疫苗 [173, 174] 的鼻内给药。

[0136] 概要

[0137] 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。

[0138] 与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x \pm 10\%$ 。

[0139] 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。

[0140] 附图简要说明

[0141] 图 1 显示抗 -PRP GMT 和疫苗组 A、B、C 和 D 的 95% 置信区间。

[0142] 实施本发明的方式

[0143] 制备了四种 DTwP-Hib 疫苗制剂，其不同之处仅在于 Hib-CRM₁₉₇ 偶联物的剂量。疫苗制备成 0.5ml 剂量，其抗原组成如下：

[0144]

	A	B	C	D[175]
Hib-CRM197 偶联物(μg 糖/剂量)	1.25	2.5	5	10
白喉类毒素(Lf/剂量)	15			
破伤风类毒素(Lf/剂量)	3.2			
灭活的百日咳杆菌生物体(OU/剂量)	15			
磷酸铝佐剂(mgAl^{3+} /剂量)	0.3			
NaCl(mg/剂量)	4.5			
硫柳汞	痕量			
相对于参考文献 175 的 Hib 组分	1/3	1/4	1/2	1

[0145] 主要生产方法如下：从 wfi 开始；加入磷酸铝佐剂；加入 D 组分；加入 T 组分；加入 wP 组分；加入 NaCl；检测和调节 pH；加入 Hib 组分。与参考文献 175 所述相反，Hib 组分不吸附于佐剂。

[0146] 稳定性

[0147] 进行了两项稳定性研究：一项是在 2-8℃ 的正常贮存条件下贮存 2 年，另一项是在 37℃ 的加速条件下贮存 14 天。竖直或倒转位置保贮存后测定疫苗。通过测定 pH 和游离糖评价稳定性。

[0148] 第一项研究的结果如下：

[0149]

		相对 HIB 剂量			
月	参数	1	1/2	1/4	1/8
0	pH	6.7	6.5	6.5	6.6
0	%游离糖	2.9	<3.6	<7.2	<14.4
6	pH	6.8	6.7	6.7	6.7
6	%游离糖	2.6	<3.6	<7.2	<14.5
12	pH	7.0	6.9	6.9	7.0
12	%游离糖	4.8	5.1	2.5	4.4
24	pH	7.1	7.0	7.0	7.1
24	%游离糖	6.1	5.8	5.6	5.0

[0150] 加速稳定性研究的结果如下：

[0151]

		相对 HIB 剂量			
时间	参数	1	1/2	1/4	1/8
0	pH	6.7	6.5	6.5	6.6
	%游离糖	2.2	<3.6	<7.2	<14.4
14 天 竖直	pH	—	—	—	—
	%游离糖	4.2	5.1	<7.2	<14.5
14 天 倒转	pH	6.8	6.7	6.7	6.8
	%游离糖	5.0	5.6	<7.2	<14.5

[0152] 因此，该疫苗在延长时间内稳定。以相同的时间量程测定吸附性，Hib 偶联物在贮存期间保持不吸附。

[0153] 临床测试

[0154] 共征集了 261 名婴儿，在双盲试验中随机分组接受四种疫苗之一，以评价安全性和免疫原性（参考：参考文献 6、8 和 9 中的研究，它们是部分盲法或开放式试

验)。征集妊娠 37 周以上出生、出生体重至少 2500g 并适合局部 EPI 的三月龄婴儿,以 66 : 65 : 65 : 65A : B : C : D 比例随机分组,在 3、4 和 5 月龄接受三次单独的肌肉内给药,给予以上疫苗之一。根据局部 EPI,对象在 2、4 和 6 月龄平行接受口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)。

[0155] 征集时的平均年龄为 94(范围 69-108) 天,4 个疫苗组在性别、种族、体重和身高分布上没有差异。按月随访患者的注射后反应和副反应。安全性分析中共包括 260 名对象(四个疫苗组各自 65 名),免疫原性分析中包括 251 名对象(组 A 61 名,组 B 和 C 各 64 名,组 D 62 名)。9 名对象没有完成该研究,因为他们的父母/法定监护人在研究完成之前收回了他们的同意(组 A 5 名对象,组 B 1 名对象,组 D 3 名对象)。

[0156] 在基线和第三次给药一个月后获得血样。测定抗 -PRP、抗 -百日咳、抗 -白喉和抗 -破伤风抗体。用由 FDA ELISA 法修饰而来的 ELISA 测定 IgG 抗 -PRP 抗体 [176]。用 ELISA 定量 IgG 抗 -白喉毒素抗体和 IgG 抗 -破伤风毒素抗体。还用 ELISA 测定百日咳杆菌的血清学标记(抗 -百日咳杆菌黏附素和抗 -凝集原 2-3)。

[0157] 安全性和免疫原性

[0158] 在每次疫苗给药 30 分钟后,由研究人员监测对象。要求父母在每次注射后 7 天在日记上记录每天的直肠温度以及局部和全身反应。此外,研究人员在每次疫苗接种后第二天和第七天主动电话联系父母/法定监护人,以获得副作用的详细情况。在整个研究期间严格检查和记录副作用的出现,或严重副作用和需要医生访问的情况和/或任何医学情况。安全性分析中包括接受至少一次疫苗接种的对象。

[0159] 大部分局部和全身反应是轻微和暂时的。最常见的是局部反应引起的压痛、红斑和硬结,以及全身反应引起的烦躁、嗜睡和非正常啼哭:

[0160]

	A: 1.25 µg	B: 2.5 µg	C: 5 µg	D: 10 µg
局部反应				
压痛-任何 (当移动注射肢时啼哭)	48(74%) 16(25%)	53(82%) 19(29%)	52(80%) 16(25%)	49(75%) 15(23%)
红斑-任何 (>50mm)	31(48%) 6(9%)	29(45%) 5(8%)	37(57%) 7(11%)	31(48%) 4(6%)
硬结-任何 (>50mm)	27(42%) 3(5%)	21(32%) 4(6%)	25(38%) 6(9%)	24(37%) 3(5%)
全身反应				
皮疹	3(5%)	4(6%)	3(5%)	3(5%)
饮食习惯改变	20(31%)	16(25%)	26(40%)	27(42%)
嗜睡	41(63%)	49(75%)	44(68%)	39(60%)
非正常啼哭	29(45%)	23(35%)	32(49%)	29(45%)
持续啼哭	10(15%)	8(12%)	10(15%)	7(11%)
烦躁	47(72%)	53(82%)	50(77%)	49(75%)
呕吐	5(8%)	6(9%)	9(14%)	7(11%)
腹泻	17(26%)	24(37%)	22(34%)	18(28%)
其它				
直肠温度				
≥38.5°C-<40.5°C	14(22%)	21(32%)	10(15%)	12(18%)
≥40.5°C	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
使用止痛药/退热药	33(51%)	43(66%)	28(43%)	33(51%)

[0161] 在这 4 个疫苗组中没有观察到显著性差异,解决了所有疫苗接种后反应,没有后遗症。未报道与研究疫苗相关的严重副作用。

[0162] 免疫原性

[0163] 抗-PRP 血清转化率(%血清转化患者)如下:

[0164]

	1-25 μ g		2.5 μ g		5 μ g		10 μ g	
滴度	$\geq 0.15\mu\text{g/ml}$	$\geq 1.0\mu\text{g/ml}$	$\geq 0.15\mu\text{g/ml}$	$\geq 1.0\mu\text{g/ml}$	$\geq 0.15\mu\text{g/ml}$	$\geq 1.0\mu\text{g/ml}$	$\geq 0.15\mu\text{g/ml}$	$\geq 1.0\mu\text{g/ml}$
前	47%	12%	30%	6%	32%	6%	34%	4%
后	98%	90%	97%	88%	98%	97%	100%	95%

[0165] 通过查看 (a) 抗百日咳杆菌黏附素和抗-凝集原 2-3 应答的增加和 (b) GMT 评价抗-百日咳血清转化率。结果 (% 患者) 如下:

[0166]

	1.25 μ g	2.5 μ g	5 μ g	10 μ g
抗百日咳杆菌黏附素				
% 增加 2 倍的患者	91%	95%	88%	94%
% 增加 4 倍的患者	80%	83%	78%	89%
抗百日咳杆菌黏附素 GMT (μ g/ml)	19	21	24	20
抗凝集原 2-3				
% 增加 2 倍的患者	81%	81%	83%	80%
% 增加 4 倍的患者	70%	80%	78%	71%
抗凝集原 2-3 GMT (μ g/ml)	87	77	66	76

[0167] 抗-白喉和抗-破伤风 GMT 如下:

[0168]

	1.25 μ g	2.5 μ g	5 μ g	10 μ g
抗白喉 GMT (μ g/ml)	1.33	1.65	1.49	4.70
抗破伤风 GMT (μ g/ml)	4.89	5.10	5.24	5.16

[0169] 因此,在四个疫苗组中抗 PRP 滴度 $\geq 0.15 \mu\text{g/mL}$ 的对象比例相似,但组 C 和 D 的抗 PRP 滴度 $\geq 1.0 \mu\text{g/mL}$ 的对象比例 (分别为 97% 和 95%) 高于组 A 和 B (分别为 90% 和 88%)。抗-PRP GMT 显示出明显的剂量依赖效应,组 A (6.94 $\mu\text{g/mL}$) 和 B (7.82 $\mu\text{g/mL}$) 相似,组 C (17 $\mu\text{g/mL}$) 和 D (18 $\mu\text{g/mL}$) 相似,但与 C 和 D 组相比,组 A 和 B 显著较低 (图 1)。

[0170] 第三次接种疫苗 1 个月后,这四个疫苗组各组中的所有对象血清转化为针对白喉和破伤风 (抗体水平 $\geq 0.1 \text{IU/mL}$)。在这四个疫苗组中没有检测到 GMT 差异。

[0171] 在这四个疫苗组中,没有观察到与基线相比抗百日咳杆菌黏附素和抗凝集原 2-3 抗体增加 2 倍或 4 倍的对象分数的差异。在这四个疫苗组中 GMT 也相似。

[0172] 结论

[0173] 分剂量为 5、2.5 或 1.25 μg Hib- 偶联物 / 剂量的 DTwPHib 疫苗制剂与参比 10 μg 剂量的免疫原性相同,血清转化率也是如此。用 10 μg 或 5 μg 偶联物的制剂引发了高水平 and 相同水平的抗 PRP GMT。虽然 2.5 μg 和 1.25 μg 偶联物 / 剂量的制剂引发的抗 -PRP GMT 水平较低,但它们也有足够的免疫原性。

[0174] 因此,本研究证实了在含有 DTP 疫苗的合适剂型中 Hib 抗原量可降低到低至 1.25 μg / 剂量,而不会影响其它疫苗组分的保护效果。

[0175] DTP-Hib 疫苗的所有四种剂型都是安全的,并且所有疫苗组分都有免疫原性。就抗 PRP 血清保护速率而言,这四种剂型的免疫原性对于短期 (滴度 $\geq 0.15 \mu\text{g/mL}$) 和长期 (滴度 $\geq 1 \mu\text{g/mL}$) 来说都是相当的。含有 5 μg 偶联物的剂型与含有 10 μg 的参比剂型的免疫原性相同,这两种剂型引起的抗 PRP GMT 特别高 (17 和 18 $\mu\text{g/mL}$)。与采用分剂量 Hib 疫苗的其它研究中观察到的免疫应答相比,含有 1.25 和 2.5 μg 偶联物的剂型具有高免疫原性 [6,8,9]。

[0176] 其它信息可参见参考文献 177。

[0177] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,可在保持在本发明范围和精神内的情况下进行修改。

[0178] 参考文献 (将其全部内容纳入本文)

[0179] [1]Eskola 等, (1996) Lancet 348 :1688-1692。

[0180] [2]Vidor 等, (1999) 《组合疫苗》(Combination Vaccines) (Ellis 编) 的第 1 章 ISBN0-89603-717-7。

[0181] [3]Corbel (1996) Dev Biol Stand 87 :113-124。

[0182] [4]Campbell 等, (2002) Pediatr Infect Dis J 21 :822-826。

[0183] [5]Guimaraes et al (2002) Int J Infect Dis 6 :113-117。

[0184] [6]Lagos 等, (1998) Lancet 351 :1472-1476。

[0185] [7]Amir 等, (1997) Vaccine 15 :149-154。

[0186] [8]Fernandez 等, (2000) Am J Trop Med Hyg 62 :485-490。

[0187] [9]Nicol 等, (2002) Pediatr Infect Dis J 21 :138-141。

[0188] [10]W002/00249。

[0189] [11] 《疫苗》(Vaccines) (Plotkin 等编) 第四版, ISBN 0-7216-9688-0。

[0190] [12]Gustafsson 等, (1996) N. Engl. J. Med. 334 :349-355。

[0191] [13]Rappuoli 等, (1991) TIBTECH 9 :232-238。

[0192] [14]Rappuoli (1997) Nature Medicine 3 :374-376。

[0193] [15]Ramsay 等, (2001) Lancet 357 (9251) :195-196。

[0194] [16]Lindberg (1999) Vaccine 17 增刊 2 :S28-36。

[0195] [17]Buttery 和 Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond 34 :163-168。

[0196] [18]Ahmad 和 Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13 :113-133, vii。

[0197] [19]Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47 :563-567。

[0198] [20] 欧洲专利 0477508。

[0199] [21] 美国专利 5,306,492。

[0200] [22]W098/42721。

- [0201] [23]《偶联疫苗》(Conjugate Vaccines)(Cruse 等编)ISBN 3805549326,特别是第 10 卷:48-114。
- [0202] [24]Hermanson(1996)《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques)ISBN: 0123423368 或 012342335X。
- [0203] [25] 佚名 (Jan 2002)Research Disclosure,453077。
- [0204] [26]Anderson(1983)Infect Immun 39(1):233-238。
- [0205] [27]Anderson 等,(1985)J Clin Invest 76(1):52-59。
- [0206] [28]EP-A-0372501。
- [0207] [29]EP-A-0378881。
- [0208] [30]EP-A-0427347。
- [0209] [31]W093/17712
- [0210] [32]W094/03208。
- [0211] [33]W098/58668。
- [0212] [34]EP-A-0471 177。
- [0213] [35]W091/01146
- [0214] [36]Falugi 等,(2001)Eur J Immunol 31:3816-3824。
- [0215] [37]EP-A-0594610。
- [0216] [38]W000/56360。
- [0217] [39]W002/091998。
- [0218] [40]W001/72337
- [0219] [41]W000/61761。
- [0220] [42]W096/40242。
- [0221] [43]Lees 等,(1996)Vaccine 14:190-198。
- [0222] [44]W095/08348。
- [0223] [45] 美国专利 4,882,317
- [0224] [46] 美国专利 4,695,624
- [0225] [47]Porro 等,(1985)Mol Immunol 22:907-919。
- [0226] [48]EP-A-0208375
- [0227] [49]W000/10599
- [0228] [50]Gever 等,Med. Microbiol. Immunol,165:171-288(1979)。
- [0229] [51] 美国专利 4,057,685。
- [0230] [52] 美国专利 4,673,574 ;4,761,283 ;4,808,700。
- [0231] [53] 美国专利 4,459,286。
- [0232] [54] 美国专利 4,965,338
- [0233] [55] 美国专利 4,663,160。
- [0234] [56] 美国专利 4,761,283
- [0235] [57] 美国专利 4,356,170
- [0236] [58]Lei 等,(2000)Dev Biol(Basel)103:259-264。
- [0237] [59]W000/38711 ;美国专利 6,146,902。

- [0238] [60] Kanra 等, (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42 :421-427。
- [0239] [61] Ravenscroft 等, (2000) Dev Biol (巴塞尔) 103 :35-47。
- [0240] [62] Sturgess 等, (1999) Vaccine 17 :1169-1 178。
- [0241] [63] W097/00697。
- [0242] [64] W096/37222 ;美国专利 6, 333, 036。
- [0243] [65] 《疫苗设计》(Vaccine Design...) (1995) Powell 和 Newman 编 . ISBN : 030644867X. Plenum。
- [0244] [66] W000/23105。
- [0245] [67] W090/14837。
- [0246] [68] 美国专利 5, 057, 540。
- [0247] [69] W096/33739。
- [0248] [70] EP-A-0109942。
- [0249] [71] W096/1 171 1。
- [0250] [72] W000/07621。
- [0251] [73] Barr 等, (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32 :247-271。
- [0252] [74] Sjolanderet 等, (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32 :321-338。
- [0253] [75] Niikura 等, (2002) Virology 293 :273-280。
- [0254] [76] Lenz 等, (2001) J Immunol 166 :5346-5355。
- [0255] [77] Pinto 等, (2003) J Infect Dis 188 :327-338。
- [0256] [78] Gerber 等, (2001) Virol 75 :4752-4760。
- [0257] [79] W003/024480
- [0258] [80] W003/024481
- [0259] [81] Gluck 等, (2002) Vaccine 20 :B10-B16。
- [0260] [82] EP-A-0689454。
- [0261] [83] Johnson 等, (1999) Bioorg Med Chem Lett 9 :2273-2278。
- [0262] [84] Evans 等, (2003) Expert Rev Vaccine 2 :219-229。
- [0263] [85] Meraldi 等, (2003) Vaccine 21 :2485-2491。
- [0264] [86] Pajak 等, (2003) Vaccine 21 :836-842。
- [0265] [87] Kandimalla 等, (2003) Nucleic Acids Research 31 :2393-2400。
- [0266] [88] W002/26757。
- [0267] [89] W099/62923。
- [0268] [90] Krieg (2003) Nature Medicine 9 :831-835。
- [0269] [91] McCluskie 等, (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32 : 179-185。
- [0270] [92] W098/40100。
- [0271] [93] 美国专利 6, 207, 646。
- [0272] [94] 美国专利 6, 239, 116。
- [0273] [95] 美国专利 6, 429, 199。
- [0274] [96] Kandimalla 等, (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3) :

654-658。

- [0275] [97]Blackwell 等, (2003)J Immunol 170 :4061-4068。
- [0276] [98]Krieg(2002)Trends Immunol 23 :64-65。
- [0277] [99]W001/95935。
- [0278] [100]Kandimalla 等, (2003)BBRC 306 :948-953。
- [0279] [101]Bhagat 等, (2003)BBRC 300 :853-861。
- [0280] [102]W003/035836。
- [0281] [103]W095/17211。
- [0282] [104]W098/42375。
- [0283] [105]Beignon 等, (2002)Infect Immun 70 :3012-3019。
- [0284] [106]Pizza 等, (2001)Vaccine 19 :2534-2541。
- [0285] [107]Pizza 等, (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461。
- [0286] [108]Scharton-Kersten 等, (2000)Infect Immun 68 :5306-5313。
- [0287] [109]Ryan 等, (1999)Infect Immun 67 :6270-6280。
- [0288] [110]Partidos 等, (1999)Immunol Lett 67 :209-216。
- [0289] [111]Peppoloni 等, (2003)Expert Rev Vaccine 2 :285-293。
- [0290] [112]Pine 等, (2002)J Control Release 85 :263-270。
- [0291] [113]Domenighini 等, (1995)Mol Microbiol 15 :1 165-1 167。
- [0292] [114]W099/40936。
- [0293] [115]W099/44636。
- [0294] [116]Singh 等, (2001)J Cont Release 70 :267-276。
- [0295] [117]W099/27960。
- [0296] [118] 美国专利 6,090,406
- [0297] [119] 美国专利 5,916,588
- [0298] [120]EP-A-0626169。
- [0299] [121]W099/52549。
- [0300] [122]W001/21207。
- [0301] [123]W001/21152。
- [0302] [124]Andrianov 等, (1998)Biomaterials 19 :109-115。
- [0303] [125]Payne 等, (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196。
- [0304] [126]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27 :571-577。
- [0305] [127]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4 :214-218。
- [0306] [128]W099/11241。
- [0307] [129]W094/00153。
- [0308] [130]W098/57659。
- [0309] [131] 欧洲专利申请 0835318、0735898 和 0761231。
- [0310] [132]Costantino 等, (1992)Vaccine 10 :691-698。
- [0311] [133]W003/007985。
- [0312] [134]Watson(2000)P ediatr Infect Dis J 19 :331-332。

- [0313] [135]Rubin(2000)Pediatr Clin North Am 47 :269-285, v。
[0314] [136]Jedrzejewski(2001)Microbiol Mol Biol Rev 65 :187-207。
[0315] [137]Bell(2000)Pediatr Infect Dis J 19 :1187-1188。
[0316] [138]Iwarson(1995)APMIS 103 :321-326。
[0317] [139]Gerlich 等, (1990)Vaccine 8 Suppl :S63-68 和 79-80。
[0318] [140]Bjune 等, (1991)Lancet 338(8775) :1093-96
[0319] [141]W001/52885。
[0320] [142]Fukasawa 等, (1999)Vaccine 17 :2951-2958。
[0321] [143]Rosenqvist 等, (1998)Dev. Biol. Stand. 92 :323-333。
[0322] [144]W099/24578。
[0323] [145]W099/36544。
[0324] [146]W099/57280。
[0325] [147]W000/22430。
[0326] [148]Tettelin 等, (2000)Science 287 :1809-1815。
[0327] [149]W096/29412。
[0328] [150]Pizza 等, (2000)Science 287 :1816-1820。
[0329] [151]Sutter 等, (2000)Pediatr Clin North Am 47 :287-308。
[0330] [152]Zimmerman 和 Spann(1999)Am Fam Physician 59 :113-118, 125-126。
[0331] [153]Robinson 和 Torres(1997)Seminars in Immunology 9 :271-283。
[0332] [154]Donnelly 等, (1997)Annu Rev Immunol 15 :617-648。
[0333] [155]Scott-Taylor 和 Dalgleish(2000)Expert Opin Investig Drugs 9 :
471-480。
[0334] [156]Apostolopoulos 和 Plebanski(2000)Curr Opin Mol Ther 2 ;AA\441。
[0335] [157]Ilan(1999)Curr Opin Mol Ther 1 :116-120。
[0336] [158]Dubensky 等, (2000)Mol Med 6 :723-732。
[0337] [159]Robinson 和 Pertmer(2000)Adv Virus Res 55 :1-74。
[0338] [160]Donnelly 等, (2000)Am J Respir Crit Care Med 162(4Pt 2) :S190-193。
[0339] [161]Davis(1999)Mt. Sinai J. Med. 66 :84-90。
[0340] [162]Charalambous 和 Feavers(2001)J Med Microbiol 50 :937-939。
[0341] [163]Westerink(2001)Int Rev Immunol 20 :251-261。
[0342] [164]Grothaus 等, (2000)Vaccine 18 :1253-1263。
[0343] [165]Paoletti 等, (2001)Vaccine 19 :2118-2126。
[0344] [166]W000/56365。
[0345] [167]Gennaro(2000)《雷明顿:药物科学和实践》(Remington:The Science and
Practice of Pharmacy). 第 20 版, ISBN :0683306472。
[0346] [168]W003/009869。
[0347] [169]W001/30390。
[0348] [170]Almeida 和 Alpar(1996)J. Drug Targeting 3 :455-467。
[0349] [171]Agarwal 和 Mishra(1999)Indian J Exp Biol 37 :6-16。

-
- [0350] [172]Bergquist 等, (1998)APMIS 106 :800-806。
- [0351] [173]Ryan 等, (1999)Infect Immun 67(12) :6270-6280。
- [0352] [174]Nagai 等, (2001)Vaccine 19 :4824-4834。
- [0353] [175]BotetAsensi 等, (2003)Acta Paediatrica 92 :541-545。
- [0354] [176]Mariani 等, (1988)Clin Diagn Lab Immunol 5 :667-674。
- [0355] [177]Tamm 等, (2005)Vaccine 23 :1715-1719。

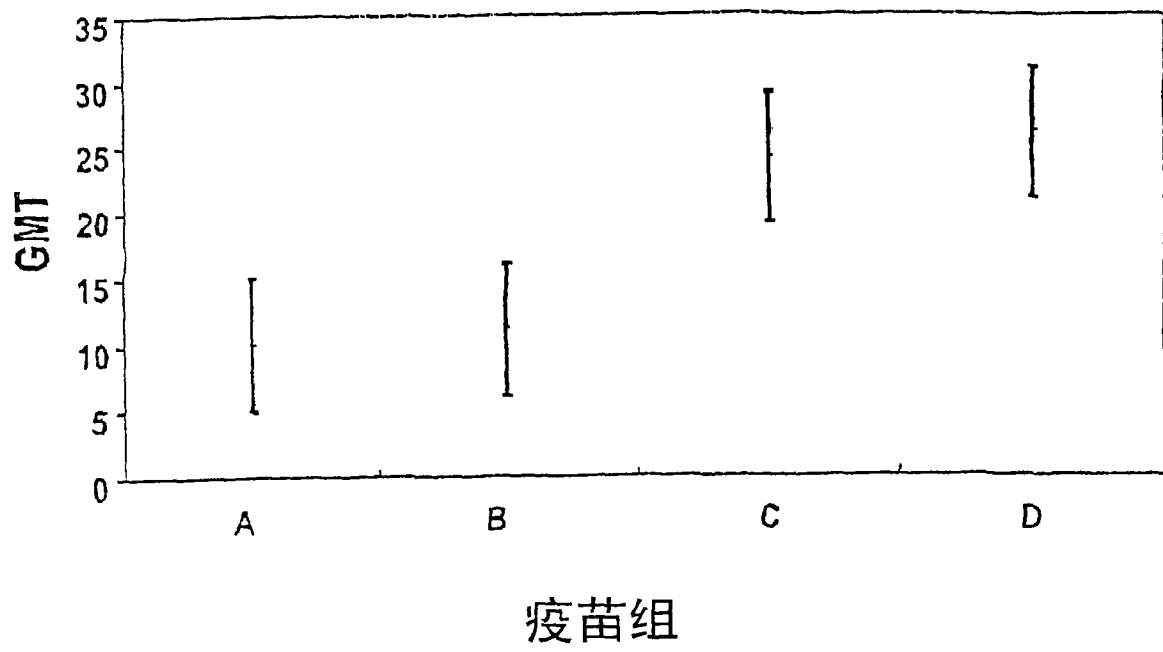


图 1