



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678094 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 200880018507. 2

(22) 申请日 2008. 06. 04

(30) 优先权数据

60/933, 235 2007. 06. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 12. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2008/002121 2008. 06. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/149238 EN 2008. 12. 11

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·肯托尼 P·科斯坦蒂诺

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 张宜红 张静

4-23 页、权利要求书。

W0 2007/060548 A2, 2007. 05. 31, 说明书全文。

Paul M. Mendelman etc. 《Immunogenicity and safety of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-Neisseria meningitidis conjugate vaccine in 7.5ug liquid formulation:a comparison of three lots with the 15.0ug lyophilized formulation》. 《Vaccine》. 1997, 第15卷(第6/7期), 775-781.

Dan M. Granoff etc. 《MF59 Adjuvant Enhances Antibody Responses of Infant Baboons Immunized with Haemophilus influenzae Type b and Neisseria meningitidis Group C Oligosaccharide-CRM197 Conjugate Vaccine》. 《Infection and Immunity》. 1997, 第65卷(第5期), 1710-1715.

审查员 杨莹跃

(51) Int. Cl.

A61K 39/095(2006. 01)

A61K 39/102(2006. 01)

A61K 9/19(2006. 01)

A61K 9/107(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2003/007985 A2, 2003. 01. 30, 说明书第

权利要求书3页 说明书19页

(54) 发明名称

脑膜炎疫苗制剂

(57) 摘要

用液体 Hib 组分重建冻干的脑膜炎球菌组分, 从而制备脑膜炎组合疫苗。冻干的脑膜炎组分也可用水包油乳液重建。

1. 一种试剂盒,其包括:(i) 水性组分,所述水性组分包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物;和(ii) 冻干组分,所述冻干组分包含脑膜炎奈瑟菌血清群 A、C、W135 和 Y 的荚膜糖的偶联物。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述水性组分包含佐剂。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述流感嗜血杆菌偶联物吸附于磷酸铝。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述水性组分不含佐剂。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,给予所述流感嗜血杆菌偶联物在患者中产生浓度大于 0.15 微克/毫升的抗-PRP 抗体。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述水性组分中流感嗜血杆菌偶联物的浓度为 0.5-50 微克/毫升。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述流感嗜血杆菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、破伤风类毒素和脑膜炎奈瑟菌的外膜复合物。

8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述水性组分包含以下一种或多种物质:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、乙型肝炎病毒表面抗原和/或肺炎球菌糖。

9. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,给予脑膜炎奈瑟菌偶联物可引起杀菌性抗体应答。

10. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,每个血清群的脑膜炎球菌荚膜糖的量在 1 微克到 20 微克之间。

11. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、白喉类毒素和破伤风类毒素。

12. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述冻干组分包含含稳定剂的荚膜糖。

13. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述冻干组分包含佐剂。

14. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述冻干组分不含佐剂。

15. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述冻干组分不含 Hib 糖。

16. 一种组合疫苗,其包含:(i) B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物;和(ii) 脑膜炎奈瑟菌血清群 A、C、W135 和 Y 的荚膜糖的偶联物,通过将水性 B 型流感嗜血杆菌偶联物与冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物组合进行制备。

17. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述水性 B 型流感嗜血杆菌偶联物包含佐剂。

18. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述流感嗜血杆菌偶联物吸附于磷酸铝。

19. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述水性 B 型流感嗜血杆菌偶联物不含佐剂。

20. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,给予所述流感嗜血杆菌偶联物在患者中产生浓度大于 0.15 微克/毫升的抗-PRP 抗体。

21. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述水性 B 型流感嗜血杆菌偶联物中流感嗜血杆菌偶联物的浓度为 0.5-50 微克/毫升。

22. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述流感嗜血杆菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、破伤风类毒素和脑膜炎奈瑟菌的外膜复合物。

23. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗还包含以下一种或多种物质:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、乙型肝炎病毒表面抗原和 / 或肺炎球菌糖。

24. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,给予脑膜炎奈瑟菌偶联物可引起杀菌性抗体应答。

25. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,每个血清群的脑膜炎球菌荚膜糖的量在 1 微克到 20 微克之间。

26. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、白喉类毒素和破伤风类毒素。

27. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物包含稳定剂的荚膜糖。

28. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物包含佐剂。

29. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物不含佐剂。

30. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物不含 Hib 糖。

31. 如权利要求 16 所述的疫苗,所述疫苗包含一种或多种缓冲剂。

32. 如权利要求 16 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗包含以下一种或多种物质:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、乙型肝炎病毒表面抗原和 / 或肺炎球菌糖。

33. 如权利要求 16 所述的疫苗,所述冻干的脑膜炎奈瑟氏菌偶联物用水包油乳液重建。

34. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,给予所述流感嗜血杆菌偶联物在患者中产生浓度大于 0.15 微克 / 毫升的抗 -PRP 抗体。

35. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,所述水性组分中流感嗜血杆菌偶联物的浓度为 0.5-50 微克 / 毫升。

36. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,所述流感嗜血杆菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、破伤风类毒素和脑膜炎奈瑟菌的外膜复合物。

37. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,给予脑膜炎奈瑟菌偶联物可引起杀菌性抗体应答。

38. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,每个血清群的脑膜炎球菌荚膜糖的量在 1 微克到 20 微克之间。

39. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、白喉类毒素和破伤风类毒素。

40. 如权利要求 33 所述的疫苗,所述疫苗包含一种或多种缓冲剂。

41. 如权利要求 33 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗包含以下一种或多种物质:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、乙型肝炎病毒表面抗原和 / 或肺炎球菌糖。

42. 权利要求 1—41 中任一项所述的疫苗在制备用于减轻或防止细菌性脑膜炎的药物中的用途。

43. 一种制备组合疫苗的方法,该方法包括组合以下组分的步骤:(i) 水性组分,所述水性组分包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物,和(ii) 冻干组分,所述冻干组分包含脑膜炎奈瑟菌血清群 A、C、W135 和 Y 的荚膜糖的偶联物。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述水性组分包含佐剂。

45. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述流感嗜血杆菌偶联物吸附于磷酸铝。

46. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述水性组分不含佐剂。

47. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,给予所述流感嗜血杆菌偶联物在患者中产生浓度大于 0.15 微克/毫升的抗-PRP 抗体。

48. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述水性组分中流感嗜血杆菌偶联物的浓度为 0.5-50 微克/毫升。

49. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述流感嗜血杆菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、破伤风类毒素和脑膜炎奈瑟菌的外膜复合物。

50. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述水性组分包含以下一种或多种物质:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原、乙型肝炎病毒表面抗原和/或肺炎球菌糖。

51. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,给予脑膜炎奈瑟菌偶联物可引起杀菌性抗体应答。

52. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,每个血清群的脑膜炎球菌荚膜糖的量在 1 微克到 20 微克之间。

53. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述脑膜炎奈瑟菌糖偶联于选自下组的载体蛋白:CRM197、白喉类毒素和破伤风类毒素。

54. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述冻干组分包含含稳定剂的荚膜糖。

55. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述冻干组分包含佐剂。

56. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述冻干组分不含佐剂。

57. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述冻干组分不含 Hib 糖。

脑膜炎疫苗制剂

[0001] 本申请要求美国临时申请 60/933, 235 的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于免疫接种抵御脑膜炎的组合疫苗配制领域。

背景技术

[0003] 单剂量中含有一种以上病原生物的抗原的疫苗被称为“多价”或“组合”疫苗,例如白喉、破伤风和百日咳(“DTP”)疫苗以及麻疹、腮腺炎和风疹(“MMR”)疫苗。组合疫苗对患者的益处在于能减少注射次数,从而带来顺应性提高的临床优势(例如参见参考文献 1 的第 29 章),儿科接种时尤其如此。然而同时,由于以下因素其制造较为困难:抗原和其他组分之间的物理和生化属性不相容;免疫干扰;以及稳定性。

[0004] 这些困难中的一些可通过适当配制疫苗而解决。例如,偶联的 B 型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)(“Hib”)的 PRP 荚膜糖在水性条件下可能不稳定,因此 INFANRIX™ 系列中含 Hib 的疫苗(包括 PEDIARIX™)包含冻干的 Hib 组分,使用时用剩余的抗原水性制剂进行重建。参考文献 2 也描述了含 Hib 的疫苗制剂,Hib 偶联物与脑膜炎球菌偶联物组合冻干,临用时重建。相反,参考文献 3 描述了脑膜炎球菌偶联物的全液体制剂,其他组分(例如 Hib 或肺炎球菌偶联物)可冻干并重建。参考文献 22 描述了脑膜炎球菌偶联物的组合,其中血清群 A(“MenA”)偶联物冻干后用其他血清群偶联物的液体制剂重建。

[0005] Hib 和脑膜炎球菌是细菌性脑膜炎的两大原因,本发明的目的提供另外且改良的 Hib 和脑膜炎球菌偶联物的疫苗制剂。

发明内容

[0006] 根据本发明的一些实施方式,用液体 Hib 组分重建冻干的脑膜炎球菌组分,从而制备脑膜炎组合疫苗。

[0007] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其包括:(i) 水性组分,包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物;和(ii) 冻干组分,包含脑膜炎奈瑟菌(*Neisseriameningitidis*)荚膜糖的偶联物。为给予患者,水性和冻干组分组合形成适合注射的组合液体疫苗。

[0008] 本发明还提供了制备组合疫苗的方法,该方法包括将(i) 水性组分,包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物,和(ii) 冻干组分,包含脑膜炎奈瑟菌荚膜糖的偶联物进行组合的步骤。

[0009] 本发明还提供了一种组合疫苗,其包含:(i) B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物;和(ii) 脑膜炎奈瑟菌荚膜糖的偶联物,通过将水性流感嗜血杆菌偶联物与冻干的脑膜炎奈瑟菌偶联物组合来制备。疫苗可包含冻干稳定剂(如下所述)。

[0010] 液体组分

[0011] 本发明的试剂盒和方法涉及使用包括 Hib 糖偶联物的水性抗原组分。给予 Hib 偶

联物优选能使患者抗-PRP 抗体浓度大于 0.15 微克/毫升,更优选大于 1 微克/毫升。这些是标准可接受的效应阈值。

[0012] Hib 糖抗原是众所周知的[例如,参考文献 1 的第 14 章],其制备方法也已详细记载[例如,参考文献 4-13]。Hib 糖与载体蛋白偶联以提高其免疫原性,尤其是儿童中的免疫原性。本发明可使用任何合适的 Hib 偶联物。

[0013] Hib 偶联物的糖部分可以是多糖(例如,全长磷酸多核糖基核糖醇 (PRP)),但也可以使用寡糖(例如,分子量为约 1 到约 5kDa)。纯化 PRP 的片段化(例如水解)可方便地形成寡糖,然后通常纯化具有所需大小的片段。如果本发明的组合物包含偶联的寡糖,应先制备寡糖再偶联。

[0014] 水性组分中 Hib 偶联物的浓度通常在 0.5 微克/毫升到 50 微克/毫升的范围内,例如 1-20 微克/毫升,12-16 微克/毫升等。浓度可约为 15 微克/毫升。

[0015] 水性 Hib 组分可以不含佐剂或者可包含佐剂。如果包含佐剂,佐剂通常是铝盐,例如磷酸铝或氢氧化铝。如果包含佐剂,Hib 组分可吸附于铝盐或者未吸附。已报道在一些情况下吸附于磷酸铝佐剂是有益的[14],而在另一些情况下未吸附是有益的[2]。

[0016] 已知各种不同的 Hib 偶联物。例如,参考文献 1 的表 14-7 给出了四种不同 Hib 偶联物的特征。它们由各种参数相区别,例如载体蛋白。本发明可使用任何合适的载体蛋白(如下所述),如 CRM197(在“HbOC”中),破伤风类毒素(在“PRP-T”中)以及脑膜炎奈瑟菌的外膜复合物(在“PRP-OMP”中)。

[0017] 各种水性 Hib 偶联物市售可得并且可用于本发明。例如,惠氏(Wyeth)的 HIBTITER™ 产品有液体制剂可用。HIBTITER™ 采用 CRM197 载体,每 0.5 毫升剂量(以小瓶供应)包含 0.9%氯化钠配制的 10 微克糖,不含佐剂。默克(Merck)的 PEDVAXHIB™ 产品也有液体制剂可用。PEDVAXHIB™ 使用 OMPC 载体,每 0.5 毫升剂量包含 0.9%氯化钠配制的 7.5 微克糖和 225 微克羟基磷酸硫酸铝佐剂。该制剂不含乳糖和硫柳汞。ACTHIB™ 产品目前没有液体形式可用。另一种有用的 Hib 偶联物包含通过己二酸接头共价连接于 CRM₁₉₇ 的 Hib 寡糖[15,16]。

[0018] Hib 偶联物可以是水性组分中唯一的抗原成分,或者可以存在一种或多种其他抗原。例如,水性组分可包含以下一种或多种:白喉类毒素,破伤风类毒素,无细胞百日咳抗原,灭活的脊髓灰质炎病毒抗原,乙型肝炎病毒表面抗原和/或肺炎球菌糖。如果水性组分包含佐剂并包括 Hib 偶联物、白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原和乙型肝炎病毒表面抗原,可使用 HEXAVAC™ 产品。如果水性组分包含佐剂并包括 Hib 偶联物、白喉类毒素、破伤风类毒素、全细胞百日咳抗原、乙型肝炎病毒表面抗原,可使用 QUINVAXEM™ 产品。如果水性组分包含佐剂并包括 Hib 偶联物、白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原和脊髓灰质炎病毒,可使用 PEDIACEL™ 产品。

[0019] 本发明优选使用市售液体单价 Hib 偶联物作为水性组分,如不含佐剂的 HIBTITER™ 疫苗。组合 Hib 和脑膜炎球菌偶联物时避免使用佐剂的明显优点在参考文献 2 中提及。

[0020] 冻干组分

[0021] 本发明的试剂盒和方法涉及使用包括脑膜炎球菌荚膜糖偶联物的冻干抗原组分。给予脑膜炎球菌偶联物优选导致血清群 (serogroup) 杀菌抗体应答,用人补体测量时,相

关血清群的血清杀菌试验 (SBA) 效价增加至少 4 倍, 优选至少 8 倍。如果用兔补体测定 SBA 效价, 那么效价优选提高至少 128 倍。

[0022] 针对血清群 C 的偶联单价疫苗已被批准用于人, 其包含 MENJUGATE™[18]、MENINGITEC™ 和 NEISVAC-C™。已知血清群 A+C 的偶联物的混合物 [19, 20], 已报道了血清群 A+C+W135+Y 的偶联物的混合物 [21-24], 并于 2005 被批准作为水性 MENACTRA™ 产品上市。本发明所用冻干组分可包括一种或多种脑膜炎球菌偶联物。

[0023] 包括血清群 A、C、W135 和 Y 中的 2、3 或 4 种时, 通常 (例如) 是 A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y, 等等。包含所有四种血清群 A、C、W135 和 Y 中的糖的组分是优选的。如果包括来自一种以上血清群的偶联物, 它们可以基本上相等质量存在, 例如各血清群糖的质量彼此在 $\pm 10\%$ 内。冻干组分中每种血清群的典型含量在 1 微克到 20 微克之间, 例如每个血清群 2-10 微克, 或者约 4 微克。作为基本相等比例的替代形式, 可试验双倍质量的血清群 A 的糖。

[0024] 血清群 A 脑膜炎球菌的荚膜糖是 ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-连接的 N-乙酰基-D-甘露糖胺-1-磷酸酯的均聚物, 具有部分 C3 和 C4 位的 O-乙酰基化。C-3 位的乙酰化可以是 70-95%。用于纯化糖的条件可导致脱-O-乙酰化 (例如在碱性条件下), 但在 C-3 位保留 OAc 也是有用的。在一些实施方式中, 血清群 A 糖中至少 50% (例如, 至少 60%、70%、80%、90%、95% 或更多) 的甘露糖胺残基的 C-3 位被 O-乙酰基化。乙酰基可被封闭基团取代以避免水解 [25], 这种改性的糖仍然是本发明涵义内的血清群 A 糖。

[0025] 血清群 C 荚膜糖是 ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-连接的唾液酸 (N-乙酰基神经氨酸, 或“NeuNAc”) 的均聚物。糖结构为 $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/80Ac-($\alpha 2 \rightarrow$)。大多数血清群 C 株在唾液酸残基的 C-7 和 / 或 C-8 位具有 O-乙酰基团, 但约 15% 的临床分离物缺乏这些 O-乙酰基 [26, 27]。OAc 基团的存在与否产生独特表位, 抗体与糖结合的特异性可影响其对 O-乙酰化 (OAc-) 和脱-O-乙酰化 (OAc+) 菌株的杀菌活性 [28-30]。本发明中使用的血清群 C 糖可以从 OAc+ 或 OAc- 菌株获得。获得许可的 MenC 偶联物疫苗包含 OAc-(NEISVAC-C™) 和 OAc+(MENJUGATE™ 和 MENINGITEC™) 糖。在一些实施方式中, 用于制备血清群 C 偶联物的菌株是 OAc+ 菌株, 例如血清型 16, 血清亚型 P1.7a, 1 等。因此, 可使用 C:16:P1.7a, 10Ac+ 菌株。也可使用血清亚型 P1.1 的 OAc+ 菌株, 例如 C11 菌株。

[0026] 血清群 W135 糖是唾液酸-半乳糖二糖单元的聚合物。类似于血清群 C 糖, 其具有可变的 O-乙酰化, 但在唾液酸 7 和 9 位 [31]。结构如下: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac (7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$)。

[0027] 血清群 Y 糖类类似于血清群 W135 糖, 只是二糖重复单元包括葡萄糖而非半乳糖。类似于血清群 W135, 在唾液酸 7 和 9 位具有可变的 O-乙酰化 [31]。血清群 Y 的结构如下: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac (7/90Ac)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$)。

[0028] 本发明中使用的糖可以如上所述 O-乙酰化 (例如, 在天然荚膜糖中所见相同的 O 乙酰化模式), 或者可以在糖环的一个或多个位置部分或完全脱-O-乙酰化, 或者与天然荚膜糖相比, 它们可以超-O-乙酰化。

[0029] 偶联物中的糖部分可包括由脑膜炎球菌制备的全长糖, 和 / 或可包括全长糖的片段, 即比细菌中存在的天然荚膜糖短的糖。因此, 糖可以解聚, 解聚发生在糖纯化期间或者之后、但在偶联之前。解聚可降低糖链长度。一种解聚方法涉及使用过氧化氢 [21]。将过

氧化氢加入糖中（例如， H_2O_2 终浓度为 1%），然后孵育混合物（例如在约 55℃）直到实现所需的链长降低。另一种解聚方法涉及酸水解 [22]。其他解聚方法是本领域已知的。用于制备本发明中使用的偶联物的糖可以通过任何这些解聚方法获得。可利用解聚获得对于免疫原性最佳的链长和 / 或出于糖的物理可操作性而降低链长。在一些实施方式中，糖具有以下平均聚合度 (Dp) : A = 10-20 ; C = 12-22 ; W135 = 15-25 ; Y = 15-25。在分子量方面，而非 Dp，对于所有血清群，有用的范围是 : < 100kDa ; 5kDa-75kDa ; 7kDa-50kDa ; 8kDa-35kDa ; 12kDa-25kDa ; 15kDa-22kDa。

[0030] 在一些实施方式中，脑膜炎球菌血清群 A、C、W135 和 Y 的糖的平均分子量各自超过 50kDa，例如 $\geq 75kDa$ ， $\geq 100kDa$ ， $\geq 110kDa$ ， $\geq 120kDa$ ， $\geq 130kDa$ ，等等 [32]，甚至最高达 1500kDa，具体通过 MALLS 测定。例如 : MenA 糖可以是 50-500kDa，如 60-80kDa ; MenC 糖可以是 100-210kDa ; MenW135 糖可以是 60-190kDa，如 120-140kDa ; 和 / 或 MenY 糖可以是 60-190kDa，如 150-160kDa。

[0031] 有用的载体蛋白（如下所述）包括 CRM197、白喉类毒素和 / 或破伤风类毒素。如果冻干组分包括来自一种以上脑膜炎球菌血清群的偶联物，则各偶联物可使用不同的载体蛋白（例如，一种血清群在 CRM197 上，另一种在破伤风类毒素上）或者它们可使用相同的载体蛋白（例如，来自两种血清群的糖分别偶联于 CRM197，然后组合）。

[0032] 出于稳定性原因，冻干组分可包含稳定剂，例如乳糖、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，最终疫苗可包含乳糖和 / 或蔗糖。使用蔗糖 / 甘露醇混合物可加速干燥过程。冻干组分也可包含氯化钠。重建后冻干材料中的可溶性组分可保留在组合物中。

[0033] 冻干组分可包含或不包含佐剂，例如铝盐。

[0034] 冻干组分优选不包含 Hib 糖。

[0035] 包装本发明的组合物

[0036] 本发明中使用的湿润和干燥组分必须在使用前保持相互分离。因此，它们以试剂盒形式分别包装。试剂盒可采取各种形式。

[0037] 在一些实施方式中，两种组分各自包装在独立的容器中。在其它实施方式中，两种组分包装在单一容器的不同腔室内，例如包装到多室注射器的不同室内。双室注射器能使两种单独的组合物在储存期间保持隔离，但在启动注射器栓塞时发生混合。

[0038] 冻干材料通常保存在密封小瓶中。该小瓶可具有开口（例如橡胶密封，可裂颈部等），保持无菌的同时允许取出内容物和 / 或引入水性材料进行重建。小瓶可由各种材料制成，例如玻璃、塑料等。

[0039] 水性材料也可以保存在小瓶中，但作为可选形式也可以保存在（例如）注射器中。同样，容器能够在保持无菌的同时允许取出其内容物。注射器可施加有或未施加与其附连的针头，在没有针头的情况下，可将独立的针头与注射器一起包装以供组装和使用，注射器通常具有针尖帽以在附连针头之前封闭针尖。优选安全性针头。一般是 1- 英寸 23- 号、1- 英寸 25- 号和 5/8- 英寸 25- 号针头。注射器的活塞可带有抑止装置，以防止活塞在吸出时偶然脱出。注射器可由各种材料，如玻璃、塑料等制成。

[0040] 药瓶可以有适合的帽（如 Luer 锁），以便将预填装注射器插入该帽，可以将注射器的内容物推入药瓶（在其中重建冻干物质），可以将药瓶的内容物吸回注射器中。从药瓶中

拔出注射器后,可连上针头,将该组合物给予患者。该帽可以位于封口或盖子内侧,以便在封口或盖子打开后才能接触到该帽。

[0041] 如果将材料包装到容器内,通常在材料加入容器之前对容器进行灭菌。

[0042] 采用玻璃容器(如注射器或药瓶)时,可采用由硼硅酸盐玻璃,而非钠钙玻璃制成的容器。

[0043] 重建

[0044] 在给予患者之前,本发明涉及用水性组分(含有 Hib 偶联物)重建冻干的抗原组分(含有至少一种脑膜炎球菌偶联物)。重建可涉及各种步骤。

[0045] 如果组分保存在多室注射器中,则驱动注射器将导致水性和干燥材料的混合。如果组分保存在单独容器中,可使用不同的混合过程。在一些实施方式中,小瓶中的水性材料可以抽取到注射器内(例如通过针头),或者已经位于注射器内。然后,将水性材料由注射器转移到含冻干材料的小瓶中(例如通过针头,可以是与先前从小瓶抽取水性材料所用针头相同或不同的针头)。因而重建冻干材料,将其抽取(例如,通过针头,同样可以与先前使用的针头相同或不同)到注射器内(例如,与先前使用的注射器相同或不同),由该注射器注入患者(例如,通过针头,同样可以与先前使用的针头相同或不同)。

[0046] 一旦冻干材料和水性材料发生组合并位于递送装置内(通常是注射器),可将该组合物给予患者。重建通常刚好在给予患者之前进行,例如注射前不超过 30 分钟。

[0047] 重建之后,给予患者的组合物将包含 Hib 和脑膜炎球菌偶联物。Hib 偶联物源自最初的水性材料,而脑膜炎球菌偶联物源自最初的冻干材料。最初的水性材料也可包括脑膜炎球菌偶联物,例如冻干材料可包含来自血清群 A 和 W135 的偶联物,水性材料包含来自血清群 C 的偶联物(除了 Hib 偶联物之外)。

[0048] 本发明重建疫苗中 Hib 糖的质量通常为 0.5-50 微克,例如 1-20 微克,10-15 微克,12-16 微克。该量可以约为 12.5 微克。小于 5 微克的质量也是合适的 [33],例如 1-5 微克,2-4 微克,或约 2.5 微克。

[0049] 重建疫苗中每种血清群的脑膜炎球菌糖的质量通常在 1 微克到 20 微克之间,例如每种血清群 2-10 微克,或约 5-10 微克。如果包括来自一种以上血清群的偶联物,它们可以基本上相等质量存在,例如各血清群糖的质量彼此在 $\pm 10\%$ 内。作为相等比例的替代形式,可利用双倍质量的血清群 A 的糖。因此,疫苗可包含 10 微克 MenA 糖以及各 5 微克的 MenC、W135 和 Y 糖。

[0050] 在一些实施方式中,Hib 糖的质量与特定脑膜炎球菌血清群糖的质量基本相同。在一些实施方式中,Hib 糖的质量大于特定脑膜炎球菌血清群糖的质量(例如 1.5 倍)。在一些实施方式中,Hib 糖的质量小于特定脑膜炎球菌血清群糖的质量(例如 1.5 倍)。

[0051] 如果组合物包含来自一种以上脑膜炎球菌血清群的糖,则每种血清群有平均糖质量。如果使用基本相等质量的各血清群,则平均质量与各个血清群的质量相同;如果使用非等量的血清群,则平均质量不同,对于 10 : 5 : 5 : 5 微克的 MenACWY 来说,平均质量为每血清群 6.25 微克。在一些实施方式中,Hib 糖的质量与每血清群的脑膜炎球菌糖平均质量基本相同。在一些实施方式中,Hib 糖的质量大于每血清群的脑膜炎球菌糖平均质量(例如,至少 1.5 倍)。在一些实施方式中,Hib 糖的质量小于每血清群的脑膜炎球菌糖平均质量(例如,至少 1.5 倍) [34]。

[0052] 治疗方法和疫苗的给药

[0053] 本发明涉及并行给予组合疫苗形式的 Hib 和脑膜炎球菌偶联物。重建的组合物适合给予人类患者,且本发明提供了提升患者免疫应答的方法,该方法包括将本发明组合物给予患者的步骤。

[0054] 本发明也提供了用于药物中的本发明组合物。

[0055] 本发明还提供了 (i) 水性组分,包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物,和 (ii) 冻干组分,包含脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖的偶联物在制造用于给予患者的药物中的应用。

[0056] 本发明还提供了用于免疫接种的组合,其包含:(i) 水性组分,包含 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖的偶联物;和 (ii) 冻干组分,包含脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖的偶联物。

[0057] 本发明的重建组合物优选疫苗,用于减轻或防止细菌性脑膜炎,包括脑膜炎球菌性脑膜炎和 Hib 脑膜炎。

[0058] 接受本发明组合物的患者可以小于 2 岁,例如 0-12 个月。一类特定的患者为 1 到 3 个月大,过去未曾接受过脑膜炎球菌偶联物疫苗。

[0059] 为发挥充分功效,典型的儿童初次免疫方案可包括给予一次以上的剂量。例如,可在以下时间给予剂量:第 0,2 和 4 个月(0 时为首剂量);第 0,1 和 2 个月;第 0 和 2 个月;第 0,2 和 8 个月;等等。首剂量(0 时)可以在约 2 个月大时给予,或者有时(例如,在 0-2-8 个月方案中)在约 3 个月大时给予。

[0060] 组合物还可用作加强剂量,例如对儿童而言在其两岁时使用。

[0061] 可通过肌肉内注射到(例如)手臂、腿或臀部中给予本发明组合物。

[0062] 如果本发明组合物包含铝基佐剂,储藏过程中组分可能会沉淀。因此,在重建前后要震荡该混合物再给予患者。

[0063] 偶联

[0064] 本发明采用 Hib 和脑膜炎球菌偶联物,其中荚膜糖偶联于载体蛋白。用于共价偶联的有用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,或其衍生物如 CRM197 白喉毒素突变体 [35-37]。其他合适的载体蛋白包括,脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [38]、合成肽 [39、40]、热激蛋白 [41,42]、百日咳蛋白 [43,44]、细胞因子 [45]、淋巴因子 [45]、激素 [45]、生长因子 [45]、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 [46] 如 N19[47]、流感嗜血杆菌的 D 蛋白 [48-50]、肺炎球菌溶血素 [51]、肺炎球菌表面蛋白 PspA[52]、铁摄取蛋白 [53]、艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B[54] 等等。

[0065] 白喉类毒素 (Dt)、破伤风类毒素 (Tt) 和 CRM197 是目前儿科疫苗中使用的主要载体,例如来自 GSK 的 Hib 偶联物使用 Tt 作为载体,HIBTITER™ 产品使用 CRM197,PREVENAR™ 中的肺炎球菌偶联物使用 CRM197,MENJUGATE™ 和 MENINGITEC™ 产品使用 CRM197,NEISVAC-C™ 使用 Tt。

[0066] 可使用糖:蛋白质比例 (w/w) 在 1 : 5(即蛋白质过量)和 5 : 1(即糖过量)之间的偶联物,例如比例在 1 : 2 到 5 : 1 之间,比例在 1 : 1.25 到 1 : 2.5 之间。如参考文献 55 所述,混合物中不同的脑膜炎球菌血清群偶联物具有不同的糖:蛋白质比例,例如一种的比例为 1 : 2 到 1 : 5 之间,而另一种的比例在 5 : 1 到 1 : 1.99 之间。

[0067] 偶联物可与游离载体蛋白联用 [56]。当本发明组合物中给定载体蛋白存在游离和偶联形式时,未偶联形式可不多于组合物中载体蛋白总量的 5%,更常见少于 2 重量%。

[0068] 可采用任何合适的偶联反应,必要时采用任何合适的接头。

[0069] 一般在偶联前活化或官能化糖。活化可包括例如:用氰化试剂如 CDAP(如 1-氰基-4-二甲基氨基四氟硼酸吡啶 [57,58 等])。其它合适技术采用活性酯、碳二亚胺、酰肼、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 11 的引言)。

[0070] 可用任何已知方法,如参考文献 59 和 60 所述的方法通过接头基团进行连接。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该己二酸接头基团的另一端 [61,62]。其它接头包括 β -丙酰胺基 [63]、硝基苯基-乙基胺 [64]、卤代酰基卤化物 [65]、糖苷键 [66]、6-氨基己酸 [67]、ADH[68]、C4-C12 部分 [69] 等。也可使用碳二亚胺缩合反应 [70]。作为采用接头的替代方法,可以采用直接连接。直接连接蛋白质可包括氧化多糖,然后与蛋白质进行还原性胺化,如参考文献 71 和 72 所述。

[0071] 可以使用包括以下步骤的方法:将氨基引入糖(如用 $-NH_2$ 取代末端 = O 基团),然后用己二酸二酯(如己二酸 N-羟基琥珀酰亚胺基二酯)衍生后,与载体蛋白反应。在另一个有用的反应中,用氰化试剂衍生化糖,然后与蛋白质偶联(直接,或者在载体中引入巯基或酰肼亲核基团之后),无需使用接头。合适的氰化试剂包括:1-氰基-4-(二甲基氨基)-吡啶鎓四氟硼酸盐(“CDAP”),对硝基苯基氰酸酯和 N-氰基三乙基铵四氟硼酸盐(“CTEA”)。

[0072] 如参考文献 73 所述,混合物可包含一种糖/蛋白直接连接的偶联物和另一种通过接头连接的偶联物。当使用来自不同脑膜炎球菌血清群的糖偶联物时这种设置尤其有用,例如 MenA 和 MenC 糖可通过接头偶联,而 MenW135 和 MenY 糖则直接偶联于载体蛋白。

[0073] 偶联后,可分离游离和偶联的糖。许多合适的方法可实现这种分离,包括疏水色谱、切向超滤、透析等。(例如,也可参见 74 和 75 等)。如果疫苗包含游离和偶联形式的给定糖,未偶联形式不超过组合中全部糖总量的 20 重量%(例如, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$)。

[0074] 各偶联物的载体量(偶联和未偶联)可以不超过 100 微克/毫升,例如各偶联物的载体蛋白 < 30 微克/毫升。一些组合中载体的总浓度小于 500 微克/毫升,例如 < 400 微克/毫升, < 300 微克/毫升, < 200 微克/毫升, < 100 微克/毫升, < 50 微克/毫升,等等。

[0075] 本发明组合物的特征

[0076] 除了上述抗原组分,本发明组合物(混合前和混合后)通常还包含非抗原组分。非抗原组分可包括载体、佐剂、赋形剂、缓冲剂等,如下文更详细所述。

[0077] 本发明组合物通常包含一种或多种药物载体和/或赋形剂。无菌、无热原的磷酸盐缓冲生理盐水是一种典型载体。药学上可接受的赋形剂的全面讨论参见参考文献 76。

[0078] 为了控制张力,包含生理性盐如钠盐是有用的。氯化钠(NaCl)是一种这样的盐,其浓度可以是 1-20 毫克/毫升。

[0079] 通常,水性组合物(冻干材料重建之前和/或之后)的重量克分子渗透浓度在 200mOsm/kg 到 400mOsm/kg 之间,例如 240-360mOsm/kg,或者 290-320mOsm/kg。

[0080] 本发明组合物可包含一种或多种缓冲剂。缓冲剂一般包括:磷酸盐缓冲剂;Tris

缓冲剂；硼酸盐缓冲剂；琥珀酸盐缓冲剂；组氨酸缓冲剂；或柠檬酸缓冲剂。包含的缓冲剂的浓度一般是 5-20mM。缓冲剂可包含在水性和 / 或冻干组分中。

[0081] 水性组合物的 pH 通常为 5.0-7.5, 更一般为 5.0-6.0 (最佳稳定性), 或者为 6.0-7.0。

[0082] 本发明组合物优选为无菌组合物。

[0083] 本发明组合物优选无热原, 如每剂量含有 < 1EU (内毒素单位, 标准量度), 优选每剂量 < 0.1EU。

[0084] 本发明组合物可以不含谷蛋白。

[0085] 一些本发明的疫苗不含佐剂。其他本发明的疫苗包含佐剂。不含佐剂的疫苗可通过混合不含佐剂的组分进行制备。含佐剂的疫苗可通过组合多种含佐剂组分, 通过组合含佐剂和不含佐剂组分, 或者通过组合不含佐剂组分与佐剂而进行制备。

[0086] 如果抗原是吸附性的, 组合物可以是具有混浊外观的悬浮液。这种外观意味着微生物污染不容易发现, 因此疫苗可包含防腐剂。当疫苗包装在多剂量容器中时这点尤其重要。所包含的有用的防腐剂是 2- 苯氧基乙醇和硫柳汞。然而, 如果可能的话, 建议不用汞防腐剂 (如硫柳汞)。本发明组合物优选包含小于约 25ng/ml 的汞。这种防腐剂可包含在水性和 / 或冻干组分中。

[0087] 以 Al^{3+} 表示的组合物中铝盐的浓度优选小于 5 毫克 / 毫升, 例如 ≤ 4 毫克 / 毫升、 ≤ 3 毫克 / 毫升、 ≤ 2 毫克 / 毫升、 ≤ 1 毫克 / 毫升、 ≤ 0.85 毫克 / 毫升等。

[0088] 本发明组合物可以 0.5ml 的剂量给予患者。应理解, 0.5ml 的剂量包括正常差异, 如 $0.1ml \pm 0.01ml$ 。

[0089] 佐剂

[0090] 本发明组合物可包含佐剂, 佐剂可包括一种或多种铝盐, 具体是磷酸铝佐剂和 / 或氢氧化铝佐剂。用于制备本发明组合物的抗原组分可以在使用前包含铝佐剂, 即“预先混合”或者“预先吸附”于佐剂。

[0091] 目前使用的铝佐剂通常称为“氢氧化铝”或“磷酸铝”佐剂。这些名称是为方便起见, 但它们都不是所代表的实际化合物的准确描述 [例如参见参考文献 77 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。

[0092] 称为“氢氧化铝”的佐剂一般是羟基氧化铝盐 (通常至少部分为晶体)。羟基氧化铝以分子式 $AlO(OH)$ 表示, 与其它铝化合物, 例如氢氧化铝 $Al(OH)_3$ 的区别在于红外 (IR) 光谱, 特别是在 $1070cm^{-1}$ 处存在吸收带和在 $3090-3100cm^{-1}$ 处存在强烈的肩峰 [参考文献 77 的第 9 章]。

[0093] 称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝, 这些佐剂也常含有少量硫酸根。可通过沉淀获得这些佐剂, 沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代该盐中羟基的程度。羟基磷酸盐中 PO_4/Al 摩尔比通常在 0.3-0.99 之间。羟基磷酸盐因存在羟基而有别于严格的 $AlPO_4$ 。例如, $3164cm^{-1}$ 的 IR 光谱带 (例如, 当加热至 $200^\circ C$ 时) 表明存在结构性羟基 [参考文献 77 的第 9 章]。

[0094] 磷酸铝佐剂的 PO_4/Al^{3+} 摩尔比通常为 0.3-1.2, 优选为 0.8-1.2, 更优选为 0.95 ± 1 。磷酸铝通常是无定形的, 尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为 0.84-0.92 的无定形的羟基磷酸铝, 包含 $0.6mg Al^{3+}/ml$ 。磷酸铝通常是颗粒。抗原吸附后

颗粒直径一般是 0.5-20 μm (如约 5-10 μm)。

[0095] 磷酸铝的 PZC 与磷酸对羟基的取代程度逆相关,这种取代程度可能取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根=更多酸性 PZC)或加入缓冲剂如组氨酸缓冲剂(使 PZC 碱性更强)改变 PZC。本发明所用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0-7.0,更优选为 5.0-6.5,例如约为 5.7。

[0096] 用于制备本发明组合物的磷酸铝溶液可以,但不一定含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或 Tris 缓冲液)。磷酸铝溶液优选为无菌和无热原。磷酸铝溶液可含有游离的水性磷酸根离子,如浓度为 1.0-20mM,优选 5-15mM,更优选约 10mM 的磷酸根离子。磷酸铝溶液也可含有氯化钠。氯化钠的浓度优选为 0.1-100 毫克/毫升(例如 0.5-50 毫克/毫升,1-20 毫克/毫升,2-10 毫克/毫升),更优选约 3 ± 1 毫克/毫升。NaCl 的存在有助于在抗原吸附前正确测定 pH。

[0097] 可包含的其他抗原

[0098] 除了包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌和 Hib 糖,组合物还可包含一种或多种其他抗原。例如,组合物可包含来自其他病原体(具体是细菌和/或病毒)的抗原。合适的其他抗原可选自:

[0099] • 白喉类毒素 (“D”)

[0100] • 破伤风类毒素 (“T”)

[0101] • 百日咳抗原 (“P”),通常是无细胞 (“aP”)

[0102] • 乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原 (“HBsAg”)

[0103] • 灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗 (IPV)

[0104] • 甲型肝炎病毒 (HAV) 抗原

[0105] • 来自肺炎链球菌的荚膜糖

[0106] 这些抗原通常源自本发明的水性组分。

[0107] 白喉类毒素

[0108] 白喉棒状杆菌导致白喉。可处理(例如用福尔马林或甲醛)白喉毒素使其脱毒,同时保留其在注射后诱导特异性抗毒素抗体的能力。参考文献 1 的第 13 章更详细地公开了白喉疫苗中使用的白喉类毒素。优选的白喉类毒素是经过甲醛处理的毒素。用可以补充牛提取物的生长培养基(如 Fenton 培养基,或 Linggoud 和 Fenton 培养基)培养白喉棒状杆菌,接着进行甲醛处理、超滤和沉淀,从而获得白喉类毒素。通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理此类毒素化物质。

[0109] 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) [78,79] 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 [80]。例如, NIBSC 提供的‘简易白喉类毒素’ (Diphtheria Toxoid, Plain) [81], 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) [102], 其含有 900Lf/ 安瓿。

[0110] 组合物通常包含 20-80Lf 的白喉类毒素,典型地约 50Lf。

[0111] 通过 IU 测定,组合物通常包含至少 30IU/ 剂量。

[0112] 白喉类毒素有用地吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0113] 破伤风类毒素

[0114] 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) 导致破伤风。破伤风毒素经过处理得到保护性类毒素。参考文献 1 的第 27 章更详细地公开了破伤风疫苗中使用的类毒素。优选的破伤风类毒素是经过甲醛处理的毒素。用生长培养基 (如衍生自牛酪蛋白的 Latham 培养基) 培养破伤风梭菌 (*C. tetani*), 然后进行甲醛处理、超滤和沉淀, 从而获得破伤风类毒素。然后通过包括无菌过滤和 / 或透析的方法处理此物质。

[0115] 可用国际单位 (IU) 表示破伤风类毒素的量。例如, NIBSC 提供了 ' 吸附的破伤风类毒素的第三国际标准 2000 ' [83,84], 其含有 469IU/ 安瓿。作为 IU 系统的替代形式, ' Lf ' 单位 (" 絮凝单位 " 或 " 边界絮凝剂量 ") 定义为与一个国际单位的抗毒素混合时, 产生最优絮凝混合物的类毒素量 [80]。例如, NIBSC 提供了 ' 用于絮凝试验的破伤风类毒素的第一国际参比试剂 ' [85], 其含有 1000Lf/ 安瓿。

[0116] 组合物通常包含 5-50Lf 的破伤风类毒素, 典型地约 20Lf。

[0117] 通过 IU 测定,组合物通常包含至少 40IU/ 剂量。

[0118] 破伤风类毒素可以 (但不一定) 吸附于氢氧化铝佐剂 (例如, 吸附占破伤风类毒素总量 0-10%)。

[0119] 百日咳抗原

[0120] 百日咳博德特菌可导致百日咳。疫苗中的百日咳抗原是细胞 (全细胞, 灭活的 B. 百日咳杆菌细胞) 或无细胞形式。已经详尽记录了细胞百日咳抗原的制备 (参见例如参考文献 1 的第 21 章), 例如, 可通过加热灭活百日咳博德特菌的 I 期培养物获得该抗原。然而, 作为替代形式, 可采用无细胞抗原。

[0121] 如果使用无细胞抗原, 优选使用一种、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) 丝状血细胞凝集素 ("FHA"); (3) 百日咳杆菌粘附素 (也称为 "69 千道尔顿外膜蛋白")。优选从改良的 Stainer-Scholte 液体培养基培养的百日咳博德特菌培养物中分离制备这三种抗原。可从发酵肉汤中 (如通过吸附于羟基磷灰石凝胶) 分离 PT 和 FHA, 但可通过加热处理和絮凝 (如采用氯化钡) 从细胞中提取百日咳杆菌粘附素。可用连续的色谱和 / 或沉淀步骤纯化抗原。可通过疏水性层析、亲和层析和大小排阻层析纯化 PT 和 FHA。可通过离子交换层析、疏水性层析和大小排阻层析纯化百日咳杆菌粘附素。在用于本发明之前, 可用甲醛处理 FHA 和百日咳杆菌粘附素。可以通过甲醛和 / 或戊二醛处理使 PT 脱毒。作为这种化学脱毒方法的替代形式, PT 可以通过诱变降低了酶活性的突变 PT [86], 但化学处理脱毒更加常见。

[0122] 无细胞百日咳抗原可吸附到一种或多种铝盐佐剂上。作为替代形式, 它们也可以非吸附状态添加。如果加入百日咳杆菌粘附素, 优选其已经吸附在氢氧化铝佐剂上。PT 和 FHA 可吸附到氢氧化铝佐剂或者磷酸铝上。所有 PT、FHA 和百日咳杆菌粘附素都吸附于氢氧化铝是有用的。

[0123] 组合物通常包含: 1-50 μ g/ 剂量的 PT; 1-50 μ g/ 剂量的 FHA; 和 1-50 μ g 百日咳杆菌粘附素。

[0124] 除了 PT、FHA 和百日咳杆菌粘附素之外, 无细胞百日咳疫苗中还可包含噬菌体伞

毛 (fimbriae) (例如凝集原 2 和 3)。

[0125] 乙型肝炎病毒表面抗原

[0126] 乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种已知的可导致病毒性肝炎的物质。HBV 病毒颗粒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称为 HBV 表面抗原,或者更通常称为 'HBsAg' 的蛋白质,这通常是一种分子量约为 24kDa 的由 226 个氨基酸的蛋白质。所有现有乙肝疫苗均含 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。

[0127] 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颗粒形式的抗原,这是因为慢性乙肝携带者的肝脏中会合成大量 HBsAg 并在 HBV 感染期间释放到血流中。第二种方法涉及通过重组 DNA 法表达蛋白质。本发明方法中使用的 HBsAg 优选是在酵母细胞中重组表达的。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。

[0128] HBsAg 通常是非糖基化的。不同于天然 HBsAg (即质粒纯化产品中的 HBsAg),酵母表达的 HBsAg 通常是非糖基化的,且这是可用于本发明的最优选 HBsAg 形式,因为它是高度免疫原性的,且制造时没有血液产品污染风险。

[0129] HBsAg 通常是基本呈球形的颗粒形式 (平均直径约为 20nm),包括含有磷脂的脂质基质。酵母表达的 HBsAg 颗粒可含有在天然 HBV 病毒颗粒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 [87]。HBsAg 可以是包括含有磷脂、磷脂酰肌醇和聚山梨酯 20 的脂质基质的颗粒形式。

[0130] 所有已知的 HBV 亚型都含有共同的决定簇 'a'。与其它决定簇和亚决定簇联合,鉴定到九种亚型:ayw1,ayw2,ayw3,ayw4,ayr,adw2,adw4,adrq- 和 adrq+。除了这些亚型,已经出现其它变体,如在免疫个体中检测到的 HBV 突变体 ("逃逸突变体")。本发明常用的 HBV 亚型是亚型 adw2。

[0131] 除 'S' 序列以外,表面抗原可包含所有或部分前-S 序列,如所有或部分前-S1 和 / 或前-S2 序列。

[0132] HBsAg 的量通常以微克表示,每个疫苗剂量中 HbsAg 的一般含量在 5 至 5 μ g 之间,例如 10 μ g/ 剂量。

[0133] 虽然最终疫苗中 HBsAg 可吸附于氢氧化铝佐剂 (例如公知的 ENGERIX-B™ 产品),或者可保持未吸附,但通常吸附于磷酸铝佐剂 [88]。

[0134] 灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗

[0135] 脊髓灰质炎病毒可导致脊髓灰质炎。除了使用口服脊髓灰质炎病毒疫苗,本发明可使用 IPV,如参考文献 1 第 24 章详细披露的。

[0136] 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 细胞宜作为培养的微载体。培养后,可用诸如超滤、渗滤和层析等技术纯化病毒颗粒。施用于患者之前,脊髓灰质炎病毒必需被灭活,这可通过甲醛处理来实现。

[0137] 脊髓灰质炎可能由三种类型的脊髓灰质炎病毒之一引起。这三种类型相似,并且引起相同的症状,但它们的抗原性差异很大,被一种类型感染后并不能保护其免受其它类型的感染。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)。优选将病毒单独培养、纯化和灭活,然后合并以得到用于本发明的散装三价混合物。

[0138] IPV 的量通常用 ‘DU’ 单位 (“D- 抗原单位” [89]) 表示。通常,每剂量每种病毒类型包含 1-100DU,例如 80DU 的 1 型脊髓灰质炎病毒,约 16DU 的 2 型脊髓灰质炎病毒,约 64DU 的 3 型脊髓灰质炎病毒。

[0139] 在用于制备本发明组合物之前,脊髓灰质炎病毒抗原优选不吸附于任何铝盐佐剂,但它们可以在储存期间吸附到疫苗组合物中的铝盐佐剂上。

[0140] 甲型肝炎病毒抗原

[0141] 甲型肝炎病毒 (HAV) 是一种已知的可导致病毒性肝炎的物质。参考文献 1 的第 15 章公开了 HAV 疫苗。有用的 HAV 组分基于灭活病毒,可通过甲醛处理实现灭活。可以在人胚肺双倍体成纤维细胞,如 MRC-5 细胞上培养病毒。有用的 HAV 毒株是 HM175,虽然也可使用 CR326F。可以在允许病毒生长的条件下培养细胞。裂解细胞,可通过超滤和凝胶渗透层析纯化得到的悬液。

[0142] 以 EU (Elisa 单位) 计, HAV 抗原的含量一般为至少约 500EU/ml。

[0143] 肺炎球菌糖

[0144] 偶联的肺炎球菌抗原包含偶联于载体蛋白的肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 的荚膜糖抗原 [例如,参考文献 90-92]。通常包含来自肺炎链球菌一种以上血清型的糖:广泛采用 23 种不同血清型的多糖的混合物,如同采用 5-11 中不同血清型的多糖的偶联疫苗 [93]。例如,PREVNAR™ [94] 含有来自 7 种血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F) 的抗原,其中各糖通过还原胺化单独偶联于 CRM197,每 0.5ml 剂量含有 2 μ g 各糖 (4 μ g 血清型 6B)。

[0145] 本发明组合物至少包含血清型 6B、14、19F 和 23F 的糖抗原。其它血清型可选自:1, 3, 4, 5, 7F, 9V 和 18C。7-价 (如 PREVNAR™ 所述), 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) 和 11-价 (例如,PREVNAR 中的 7 种血清型加上 1、3、5 和 7F) 覆盖度的肺炎球菌血清型尤其有用。

[0146] 通常,每剂量中组合物包含的各存在的血清型为 1-20 μ g (以糖计)。

[0147] 冻干偶联物与水包油乳液佐剂

[0148] 本发明其他方面的目的是提供包含脑膜炎球菌偶联物的改良疫苗制剂,使用水包油乳液重建包含来自多种脑膜炎球菌血清群的荚膜糖的冻干脑膜炎球菌组分。

[0149] 因此,本发明提供了一种试剂盒,其包括:(i) 水包油乳液组分;和 (ii) 冻干组分,包含来自一种以上脑膜炎奈瑟氏菌血清群的荚膜糖的偶联物。为给予患者,乳液和冻干组分组合形成适合注射的液体疫苗。

[0150] 本发明还提供了制备疫苗的方法,该方法包括组合以下组分的步骤:(i) 水包油乳液组分;和 (ii) 冻干组分,包含来自一种以上脑膜炎奈瑟氏菌血清群的荚膜糖的偶联物。

[0151] 本发明还提供了一种疫苗,其包含在水包油乳液中的脑膜炎奈瑟菌荚膜糖的偶联物,通过将水包油乳液组分与来自一种以上脑膜炎奈瑟菌血清群的冻干的荚膜糖偶联物组合进行制备。疫苗可包含冻干稳定剂 (如下所述)。

[0152] 本发明还提供以下组分在制备用于给予患者的药物中的应用:(i) 水包油乳液组分;和 (ii) 冻干组分,包含来自一种以上脑膜炎奈瑟氏菌血清群的荚膜糖偶联物。

[0153] 本发明还提供了用于免疫接种的组合：其包含 (i) 水包油乳液组分；和 (ii) 冻干组分，包含来自一种以上脑膜炎奈瑟氏菌血清群的荚膜糖偶联物。

[0154] 本发明该方面的冻干组分的特征如上所述，只是总是包含一种以上血清群的偶联物。此外，如果使用水包油乳液，冻干组分通常不含佐剂。

[0155] 上文也描述了包装（例如试剂盒形式、独立容器、多室注射器、小瓶等）、重建、给予（例如患者、方案、注射等）、偶联（例如载体蛋白、糖：蛋白质比例、连接键等）以及最终组成（例如载体、重量克分子渗透浓度、缓冲剂、pH 等）的特征。乳液可以与上述水性 Hib 组分相同（作必要修正）的方式使用。

[0156] 本发明该方面的组合物可还包含非脑膜炎球菌抗原，如上所述，例如 D、T、P、HBV、IPV、HAV 和 / 或肺炎球菌抗原。如上所述，它们可以在水性组分中，例如在乳液佐剂中。

[0157] 除了脑膜炎球菌偶联物和乳液之外，本发明该方面的疫苗优选还包含 Hib 偶联物。Hib 偶联物最初是冻干形式，例如与冻干的脑膜炎球菌偶联物组合，或者是水性形式。在一些实施方式中，Hib 偶联物可与乳液混合，使用 Hib/ 乳液混合物来重建冻干的脑膜炎球菌偶联物。

[0158] 本发明提供了一种疫苗，其在水包油乳液中包含来自两种或更多种（例如，2、3 或 4 种）脑膜炎奈瑟氏菌血清群的荚膜糖的偶联物和 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖。本发明该方面使用的 Hib 偶联物的特征在上文中详细揭示，例如关于 (i) 偶联，(ii) 糖部分的长度，(iii) 载体蛋白以及 (iv) 相对于脑膜炎球菌偶联物的剂量比。

[0159] 本发明所用的具体的水包油乳液包括但不限于：

[0160] • 鲨烯、吐温 80 和司盘 85 的亚微米乳液。该乳液的体积组成可以是约 5% 鲨烯、约 0.5% 聚山梨酯 80 和约 0.5% 司盘 85（或者对于 2X 浓缩物是双倍剂量）。以重量计，这些含量变为 4.3% 鲨烯、0.5% 聚山梨酯 80 和 0.48% 司盘 85。这种佐剂称为 ‘MF59’。MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子，如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0161] • 鲨烯、生育酚和吐温 80 的乳液。该乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。它也可含有司盘 85（如 1%）和 / 或卵磷脂。这些乳液可含有 2-10% 鲨烯、2-10% 生育酚和 0.3-3% 吐温 80，鲨烯：生育酚的重量比优选 ≤ 1 （例如 0.90），因为这能提供更稳定的乳液。角鲨烯和吐温 80 的体积比可以约为 5：2，或者重量比约为 11：5。可通过下述方法制备一种这样的乳液：将吐温 80 溶解于 PBS 得到 2% 溶液，然后将 90ml 该溶液与 5g DL- α -生育酚和 5ml 鲨烯的混合物混合，然后使该混合物微流体化。得到的乳液可含有（如）平均直径为 100-250nm，优选约 180nm 的亚微米油滴。该乳液也可包含 3d-MPL 和 / 或皂苷（如 QS21）。

[0162] • 鲨烯、生育酚和曲通去污剂（如曲通 X-100）的乳液。该乳液也可含有 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A（‘3d-MPL’）。该乳液可含有磷酸盐缓冲液。

[0163] • 含有鲨烯、普朗尼克 F-68 嵌段共聚物、卵磷脂酰胆碱、甘油和生育酚的乳液 [95]。

[0164] • 含有鲨烯、聚山梨酯（如聚山梨酯 80）、曲通去污剂（如曲通 X100）和生育酚（如琥珀酸 α -生育酚）的乳液。该乳液可包含这三种组分，其质量比约为 75：11：10（如 750 微克 / 毫升聚山梨酯 80、110 微克 / 毫升曲通 X-100 和 100 微克 / 毫升琥珀酸 α -生育酚），这些浓度应包括抗原中这些组分的贡献。该乳液也可包含 3d-MPL。该乳液也可包含皂苷，如 QS21。水相可含有磷酸盐缓冲液。

[0165] • 含有鲨烯、水性溶剂、聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子型表面活性剂（如聚氧乙烯（12）十六十八醚）和疏水性非离子型表面活性剂（如脱水山梨糖醇酯或二缩甘露醇酯，如失水山梨糖醇单油酸酯或‘司盘 80’）的乳液。该乳剂优选为热可逆的和 / 或其中至少 90% 油滴（以体积计）的尺寸小于 200nm[96]。该乳剂也可含有以下一种或多种物质：糖醇；低温保护剂（例如，糖，如十二烷基麦芽苷和 / 或蔗糖）；和 / 或烷基聚糖苷（alkylpolyglycoside）。也可包含 TLR4 激动剂，如化学结构不含糖环的 TLR4 激动剂 [97]。这类乳液可以被冻干。

[0166] • 角鲨烯、泊洛沙姆-105 和 Abil-Care 的乳液 [98]。含佐剂疫苗中这些组分的终浓度（重量）是 5% 鲨烯、4% 泊洛沙姆-105（普流罗尼多元醇）和 2% Abil-Care 85（双-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 二甲硅油；辛酸 / 癸酸甘油三酯）。

[0167] • 鲨烯、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401（“普流罗尼克™ L121”）的乳液。可以用磷酸盐缓冲盐水，pH 7.4 配制该乳液。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体，已在“SAF-I”佐剂（0.05-1% Thr-MDP、5% 鲨烯、2.5% 普朗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）中与苏氨酸基-MDP 一起使用 [99]。也可不与 Thr-MDP 一起使用，例如用“AF”佐剂（5% 鲨烯、1.25% 普朗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80）[100]。优选微流体化。

[0168] • 含有 0.5-50% 油、0.1-10% 磷脂和 0.05-5% 非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 101 所述，优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴尺寸。

[0169] • 不可代谢油（如轻质矿物油）和至少一种表面活性剂（如卵磷脂、吐温 80 或司盘 80）的亚微米水包油乳液。可包含添加剂，例如 QuilA 皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂体偶联物（如通过葡糖醛酸的羧基将脂族胺加到酰基皂苷上而产生的 GPI-0100，参见参考文献 102）、二甲基二-十八烷基溴化铵和 / 或 N，N'-二-十八烷基-N，N'-双（2-羟乙基）丙二胺。

[0170] • 皂苷（如 QuilA 或 QS21）和固醇（如胆固醇）结合成螺旋胶束的乳液 [103]。

[0171] • 包含矿物油、非离子亲脂性乙氧基化脂肪醇和非离子亲水性表面活性剂（例如，乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物）的乳液 [104]。

[0172] • 包含矿物油、非离子亲水性乙氧基化脂肪醇和非离子亲脂性表面活性剂（例如，乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物）的乳液 [104]。

[0173] 优选包含角鲨烯的乳液。

[0174] 概述

[0175] 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 组成或可包含其它物质，例如 X+Y。

[0176] 术语“基本上”不排除“完全”，如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。必要时，可从本发明定义中省去术语“基本上”。

[0177] 与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x \pm 10\%$ 。

[0178] 除非另有说明，包括混合两种或更多种组分的步骤的方法不需要任何特定的混合顺序。因此，可以任何顺序混合这些组分。有三种组分时，两种组分可以彼此混合，然后将该组合再与第三种组分混合，等等。

[0179] 偶联物的浓度在这里定义为糖的质量，以避免由于载体选择而导致的差异。

[0180] 将抗原抗原描述为“吸附”于佐剂时,优选至少吸附了 50 重量%的该抗原,例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更多。优选的是,白喉类毒素和破伤风类毒素均完全吸附,即上清液中检测不到。也优选 HBsAg 完全吸附。

[0181] 将动物(特别是牛)材料用于培养细胞时,它们应获自未患传染性海绵状脑病(TSE),特别是未患牛海绵状脑病(BSE)的来源。

[0182] 本发明实施方式

[0183] 根据参考文献 22 所述制备脑膜炎球菌糖偶联物。在不含佐剂情况下组合各血清群 A、C、W135 和 Y 的偶联物,形成四价脑膜炎球菌偶联物的混合物。该混合物在稳定剂,例如蔗糖/甘露醇混合物的存在下冻干,形成以后在需要时可以重建的冻干脑膜炎球菌组分。冻干材料填充到小瓶内,剂量为重建后各 5 μ g 糖(血清群 A 是 10 μ g)。

[0184] 购得 HIBTITER™ 疫苗(惠氏(Wyeth))和液体 PEDVAXHIB™。HIBTITER™ 疫苗不含佐剂,而液体 PEDVAXHIB™ 包含铝盐佐剂。两种疫苗均以玻璃瓶形式提供。

[0185] 通过针头将玻璃瓶内容物抽取到注射器中,并注入含冻干材料的小瓶中。轻柔混合后,通过针头将内容物抽取到新的注射器中。用注射针头更换注射器的针头,将重建的疫苗注入测试对象。

[0186] 在最初的动物研究中,使用 8 组 CD1 小鼠(每组 10 只)。组 1 接受将冻干的 MenA 偶联物与液体 MenCWY 混合物混合制备的 MenACWY 偶联物疫苗,如参考文献 22 所述。组 2 接受水性重建冻干的 MenACWY 而制备的 MenACWY 疫苗。组 3-5 接受与组 2 相同的疫苗,但用以下试剂重建:(3) 含羟基硫酸硫酸铝佐剂的 Hib-OMPC 偶联物,例如 PEDVAXHIB™;(4) 吸附于磷酸铝的 CRM197-Hib 偶联物;或(5) 未吸附的 CRM197-Hib 偶联物,例如 HIBTITER™。组 6-8 给予这三种液体 Hib 疫苗但不给予脑膜炎球菌偶联物,分别与组 3-5 配对。

[0187] 在第 0、14 和 28 天皮下给予 200 μ l 体积的疫苗。剂量是 1 μ g MenCWY 糖,2 μ g MenA 糖和 2.5 μ g Hib 糖。第 0、28 和 42 天取血清,测定对脑膜炎球菌菌株的杀菌活性以及抗-PRP 应答。在这些实验的变型中,组 4 接受含佐剂但非吸附于磷酸铝的 CRM197-Hib 偶联物。

[0188] 在研究 SS-07-02 中,三次剂量后的免疫原性结果如下,对于 5 种偶联物,以应答对象%表示,对于脑膜炎球菌偶联物,以几何平均效价(GMT)表示:

[0189]

	MenA		MenC		MenW135		MenY		Hib
	GMT	%	GMT	%	GMT	%	GMT	%	%
1	272	100	154	100	146	100	111	100	-
2	656	100	239	100	106	100	233	100	-
3	1882	100	1533	100	1380	100	530	100	37.5
4	116	87.5	205	100	231	100	91	87.5	87.5
5	111	100	70	87.5	66	75	38	75	75
6	-	-	-	-	-	-	-	-	50
7	-	-	-	-	-	-	-	-	62.5
8	-	-	-	-	-	-	-	-	50

[0190] 因此,液体 Hib 与冻干 MenACWY 的组合可提供保留针对所有五种细菌效力的组合物。组 3(用液体 Hib 偶联物与羟基磷酸硫酸铝佐剂重建)和组 4(用液体 Hib 偶联物与磷酸铝佐剂重建)可见优良结果。组 3 抗-脑膜炎球菌效价最高,对所有血清群 100%应答,

但对 Hib 抗原的应答对象数量中等。组 4 可见最佳抗-Hib 应答,抗-脑膜炎球菌应答也合理,尤其是针对血清群 W135[3]。

[0191] 两次剂量后组 3 和 4 也显示优良的免疫应答(数据未显示),与组 1、2 或 5 相比,这两组中抗-MenY 应答尤其高(GMT 和应答对象%都是这样)。2 次剂量后,组 4 显示最高的抗-脑膜炎球菌效价,对所有血清群 100%应答。

[0192] 在组 4 和 5 中,脑膜炎球菌偶联物的存在可提高对 Hib 糖的免疫应答(比较组 8 与组 5,组 7 与组 4)。在组 3 和 4 中,如果液体 Hib 抗原含佐剂,Hib 偶联物的存在可提高抗-W135 效价(与组 2 相比),但在使用不含佐剂的 Hib 的组 5 中未见这种提高。

[0193] 在平行实验中,用水包角鲨烯乳液(MF59)重建偶联物。三组(9-11)接受以下试剂:(9)冻干的 MenACWY 偶联物,(10)CRM197-Hib 偶联物或(11)两者的混合物。3 次剂量后的免疫原性结果如下所示:

	MenA		MenC		MenW135		MenY		Hib
	GMT	%	GMT	%	GMT	%	GMT	%	%
[0194] 2 和 8	656	100	239	100	106	100	233	100	50
9	1011	100	501	100	423	100	501	100	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	87.5
11	1470	100	600	100	640	100	374	100	100

[0195] 因此,水包角鲨烯乳液能改善脑膜炎球菌和 Hib 偶联物的效力, MenACWY+Hib+ 乳液组合可提供优异的免疫原性。

[0196] 室温下,采用 NMR 研究组合产品 4 和 5 中 MenA 和 Hib 糖偶联物在 24 小时期间的稳定性。这些糖均包含磷酸二酯键,因此,以水性形式储存期间易水解断裂。然而,用液体 Hib 重建冻干的 MenACWY 混合物之后,不论是否存在磷酸铝佐剂, MenA 和 Hib 糖保持完全稳定,没有可检测的解聚。

[0197] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,可在本发明的范围和构思内进行修改。

[0198] 参考文献(将其内容纳入本文作参考)

[0199] 《疫苗》(Vaccines)(Plotkin 和 Orenstein 编)。第四版,2004,ISBN: 0-7216-9688-0。

[0200] W002/00249。

[0201] W02005/032583。

[0202] Ramsay 等(2001)Lancet 357(9251):195-196。

[0203] Lindberg(1999)Vaccine 17 Suppl 2:S28-36。

[0204] Buttery & Moxon(2000)J R Coll Physicians Lond 34:163-168。

[0205] Ahmad & Chapnick(1999)Infect Dis ClinNorth Am 13:113-133, vii。

[0206] Goldblatt(1998)J. Med. Microbiol. 47:563-567。

[0207] 欧洲专利 0477508。

[0208] 美国专利 5,306,492。

[0209] W098/42721。

[0210] 《偶联疫苗》(Conjugate Vaccines)(Cruse 等编)ISBN 3805549326,具体是第 10 卷:48-114。

[0211] Hermanson(1996)《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques)ISBN:0123423368

或 012342335X。

- [0212] W097/00697。
- [0213] Karura 等 (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42 :421-427。
- [0214] Ravenscroft 等 (2000) Dev Biol (Basel) 103 :35-47。
- [0215] W. H. O. Tech. Rep. Ser. 594 :51, 1976。
- [0216] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2 :47-49。
- [0217] Costantino 等 (1992) Vaccine 10 :691-8。
- [0218] Lieberman 等 (1996) JAMA 275 :1499-503。
- [0219] W002/058737。
- [0220] W003/007985。
- [0221] Rennels 等 (2002) Pediatr Infect Dis J 21 :978-979。
- [0222] Campbell 等 (2002) J Infect Dis 186 :1848-1851。
- [0223] W003/080678。
- [0224] Glode 等 (1979) J Infect Dis 139 :52-56。
- [0225] W094/05325 ; 美国专利 5, 425, 946。
- [0226] Arakere & Frasc (1991) Infect. Immun. 59 :4349-4356。
- [0227] Michon 等 (2000) Dev. Biol. 103 :151-160。
- [0228] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141 :4357-4362。
- [0229] W02005/033148。
- [0230] W02007/000314。
- [0231] W02007/000327。
- [0232] W02007/000322。
- [0233] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077。
- [0234] Anderson (1983) Infect Immun 39(1) :233-238。
- [0235] Anderson 等 (1985) J Clin Invest 76(1) :52-59。
- [0236] EP-A-0372501。
- [0237] EP-A-0378881。
- [0238] EP-A-0427347。
- [0239] W093/17712
- [0240] W094/03208。
- [0241] W098/58668。
- [0242] EP-A-0471177。
- [0243] W091/01146
- [0244] Falugi 等 (2001) Eur J Immunol 31 :3816-3824。
- [0245] Baraldo 等 (2004) Infect Immun 72(8) :4884-7。
- [0246] EP-A-0594610。
- [0247] Ruan 等 (1990) J Immunol 145 :3379-3384。
- [0248] W000/56360。
- [0249] Kuo 等 (1995) Infect Immun 63 :2706-13。

- [0250] W002/091998。
- [0251] W001/72337
- [0252] W000/61761。
- [0253] W02007/000341。
- [0254] W096/40242
- [0255] Lees 等 (1996)Vaccine 14 :190-198。
- [0256] W095/08348。
- [0257] 美国专利 4, 882, 317
- [0258] 美国专利 4, 695, 624
- [0259] Porro 等 (1985)Mol Immunol 22 :907-919。
- [0260] EP-A-0208375
- [0261] W000/10599
- [0262] Gever 等 Med. Microbiol. Immunol, 165 :171-288 (1979)。
- [0263] 美国专利 4, 057, 685。
- [0264] 美国专利 4, 673, 574 ;4, 761, 283 ;4, 808, 700。
- [0265] 美国专利 4, 459, 286。
- [0266] 美国专利 4, 965, 338
- [0267] 美国专利 4, 663, 160。
- [0268] 美国专利 4, 761, 283
- [0269] 美国专利 4, 356, 170
- [0270] W02007/000342。
- [0271] Lei 等 (2000)Dev Biol (Basel) 103 :259-264。
- [0272] W000/38711 ;美国专利 6, 146, 902。
- [0273] Gennaro (2000)《雷明登药物科学与实践》(Remington :The Science and Practice of Pharmacy), 第 20 版, ISBN :0683306472。
- [0274] 《疫苗设计:亚单位和佐剂进展》(Vaccine Design :The Subunit abd Adjuvant Approach) (Powell 和 Newman 编) 普莱美出版社 (Plenum press) 1995 (ISBN 0-306-44867-X)。
- [0275] Sesardic 等 (2001)Biologicals 29 :107-22。
- [0276] NIBSC 编码 :98/560。
- [0277] 世界卫生组织的《免疫的免疫学基础系列丛书》(The immunological basis for immunization series) 的第 1 辑 (Galazka)。
- [0278] NDBSC 编码 :69/017。
- [0279] NIBSC 编码 :DEFT。
- [0280] Sesardic 等 (2002)Biologicals 30 :49-68。
- [0281] NIBSC 编码 :98/552。
- [0282] NDBSC 编码 :TEFT。
- [0283] Rappuoli 等 (1991)TIBTECH 9 :232-23%。
- [0284] Vanlandschoot 等 (2005)J Gen Virol 86 :323-31。

- [0285] W093/24148。
- [0286] 世界卫生组织 (WHO) 的《免疫的免疫学基础系列丛书》(The immunological basis for immunization series) 的第 6 辑 (Robertson)
- [0287] Watson(2000) *Pediatr Infect Dis J* 19 :331-332。
- [0288] Rubin(2000) *Pediatr Clin North Am* 47 :269-285, v。
- [0289] Jedrzejewski(2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65 :187-207。
- [0290] Zielen 等, (2000) *Infect. Immun.* 68 :1435-1440。
- [0291] Darkes & Plosker(2002) *Paediatr Drugs* 4 :609-630。
- [0292] W099/056776。
- [0293] US-2007/0014805。
- [0294] W02007/080308。
- [0295] Suli 等 (2004) *Vaccine* 22(25-26) :3464-9。
- [0296] Allison & Byars(1992) *Res Immunol* 143 :519-25。
- [0297] Hariharan 等 (1995) *Cancer Res* 55 :3486-9。
- [0298] W095/11700。
- [0299] 美国专利 6,080,725。
- [0300] W02005/097181。
- [0301] W02006/113373。