

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02824128.2

[51] Int. Cl.

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100354297C

[22] 申请日 2002.10.3 [21] 申请号 02824128.2

[30] 优先权

[32] 2001.10.3 [33] US [31] 60/326,929

[32] 2002.4.5 [33] US [31] PCT/US02/10869

[32] 2002.4.17 [33] US [31] 60/373,547

[32] 2002.5.13 [33] US [31] 60/380,677

[32] 2002.9.24 [33] US [31] 10/254,438

[32] 2002.9.24 [33] US [31] PCT/US02/30423

[32] 2002.10.3 [33] US [31] 10/265,083

[32] 2002.10.3 [33] US [31] PCT/US02/31486

[86] 国际申请 PCT/US2002/031726 2002.10.3

[87] 国际公布 WO2003/028661 英 2003.4.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.2

[73] 专利权人 希龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 D·欧哈根 N·瓦里安特

[56] 参考文献

WO0022430A 2000.4.20

WO0050006A 2000.8.31

WO9957280A 1999.11.11

WO0050075A 2000.8.31

CN1286727 2001.3.7

US6239116B 2001.5.29

审查员 王景华

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

辅助的脑膜炎球菌组合物

[57] 摘要

CpG 寡核苷酸和聚合物微粒的组合是奈瑟球菌抗原的极有效的佐剂。因此发明提供的组合物包括：(a) 奈瑟球菌抗原；(b) CpG 寡核苷酸；(c) 可生物降解的聚合物微粒。

1. 一种免疫原性组合物，其特征在于，所述组合物包括(a)奈瑟球菌抗原；(b)CpG寡核苷酸；(c)可生物降解的含聚(D, L-丙交酯-共-乙交酯)的聚合物微粒。
2. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，奈瑟球菌抗原是蛋白质抗原。
3. 如权利要求2所述的组合物，其特征在于，奈瑟球菌抗原包括的脑膜炎奈瑟球菌蛋白质选自NadA蛋白；287蛋白质；741蛋白质；953蛋白质。
4. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，CpG寡核苷酸包括6至100个脱氧核糖核苷酸。
5. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，奈瑟球菌抗原包埋在微粒内。
6. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，奈瑟球菌抗原吸附到微粒上。
7. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，CpG寡核苷酸包埋在微粒内。
8. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，CpG寡核苷酸吸附到微粒上。
9. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述组合物包括MF59佐剂。
10. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述组合物包括银盐佐剂。
11. 如前面权利要求任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物进一步包括药学上可接受载体。
12. 权利要求1所述组合物用于制造防止或治疗哺乳动物中奈瑟球菌感染的药物的用途。

辅助的脑膜炎球菌组合物

本文引用的所有文献全部纳入本文供参考。

技术领域

发明涉及疫苗，更具体的是抗脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*) 疫苗。

背景领域

已报导脑膜炎奈瑟球菌(脑膜炎球菌)血清组 A[1]和 B[2, 3]的基因组序列。研究血清组 B 序列以鉴定疫苗抗原[如参考文献 4 到 9]和候选抗原，操作候选抗原以改进异源表达[参考文献 10 到 12]。

抗原一般需要共施用佐剂以提高它们在疫苗中的免疫原性[13]。弗氏佐剂已用于血清组 B 脑膜炎球菌[9]，得到许可的抗血清组 C 的疫苗 Menjugate™ 使用氢氧化铝[14]。已报导使用含 CpG 基序的寡核苷酸佐剂增强奈瑟球菌 (*Neisseria*) 抗原的杀菌活性[15]。

发明的一个目的是提供进一步且改进的奈瑟菌抗原的佐剂。

发明的揭示

已发现 CpG 寡核苷酸和聚合物微粒的组合是极有效的奈瑟球菌抗原佐剂，组合产生的结果比任一单独成分好很多。因此发明提供的组合物包括：(a) 奈瑟球菌抗原；(b) CpG 寡核苷酸；(c) 可生物降解的聚合物微粒。

奈瑟球菌抗原

奈瑟球菌抗原可以是蛋白质抗原、编码蛋白质抗原的核酸或糖类抗原。抗原优选在受体哺乳动物中引起杀菌或保护性免疫应答(如抗体反应)。

抗原可来源于任何奈瑟球菌菌株，包括淋病奈瑟球菌 (*N. gonorrhoeae*)、乳糖奈瑟球菌 (*N. lactamica*) 和脑膜炎奈瑟球菌。优选脑膜炎奈瑟球菌抗原且可来自任何血清组。当抗原来自血清组 B 时，优选使用蛋白质抗原；当来自血

清组 A、C、W135 或 Y 时，优选使用糖类抗原。使用糖类抗原时，这些一般来源于细菌荚膜多糖(例如寡糖，如通过水解获得的寡糖)，它们通常与载体蛋白缀合(如与 CRM₁₉₇)。

来源于血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌的优选蛋白质抗原是：

参考文献 4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述蛋白质(特别是参考文献 4 中所示 446 个偶数 SEQ IDs(即 2、4、6、...、890、892)，参考文献 5 中所示 45 个偶数 SEQ IDs(即 2、4、6、...、88、90)和参考文献 6 中所示 1674 个偶数 SEQ IDs 2-3020、偶数 SEQ IDs 3040-3114 和所有 SEQ IDs 3115-3241)；

一种蛋白质，它包含参考文献 4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述的一个或多个蛋白质的免疫原性片段。

一种蛋白质，所含序列与参考文献 4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述的一个或多个蛋白质有序列同一性(优选大于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。

参考文献 10、11 或 12 中任一项所述的蛋白质。

一种蛋白质，所含序列与参考文献 10、11 或 12 中任一项所述的一个或多个蛋白质有序列同一性(优选大于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。

来自血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌的特别优选蛋白质抗原是蛋白质‘287’。此蛋白质可以野生型形式使用[如 GenBank 登录号 gi:7228690；287 的多态型排列示于参考文献 8 的图 5&15]，但可使用野生型蛋白质的衍生物。例如可使用的蛋白质与 gi:7228690 有 50%或更高的序列同一性(如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。可使用含截短的蛋白质或蛋白质缺失变体，如参考文献 10 到 12 中所述 N-末端截短形式(特定是‘ Δ G287’，其中多达且包括 6 个重复甘氨酸残基的蛋白质 N-末端被缺失)。可使用含如 287 序列的融合蛋白。所有这些 287 形式，更特别是保持野生型 287 蛋白质的免疫原性的形式，适合本文所用‘287’的含意。

来自血清组 B 脑膜炎奈瑟球菌的另一特别优选蛋白质抗原是蛋白质‘961’，也称为‘NadA’[16]。此蛋白质可以野生型形式使用[如 GenBank 登录号 gi:7227256；961 的等位基因揭示于参考文献 17]，但可使用野生型蛋白质的衍生物。例如可使用的蛋白质与 gi:7227256 有 50%或更高的序列同一性(如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。可使用含截短的蛋白质或蛋白质缺

失变体，如参考文献 10 到 12 中所述(特别是‘961c’，它缺乏 C-末端膜锚)。可使用含如 961 序列的融合蛋白。所有这些 961 形式，特别是保持野生型 961 蛋白质的免疫原性的形式，适合本文所用‘961’的含意。

其它优选蛋白质抗原是蛋白质‘741’和蛋白质‘ORF46.1’以及蛋白质‘ORF1’、‘ORF4’、‘ORF25’、‘ORF40’、‘ORF83’、‘NMB1343’、‘230’、‘233’、‘292’、‘594’、‘687’、‘736’、‘907’、‘919’、‘936’、‘953’和‘983’。其它优选蛋白质抗原是参考文献 10 到 12 中所述杂合蛋白质，特别是包含一个或多个：287 蛋白质、953 蛋白质、963 蛋白质和/或 741 蛋白质的杂合蛋白质。

蛋白质抗原可来源于任何脑膜炎奈瑟球菌菌株。优选使用的抗原来自菌株 2996、MC58、95N477 和 394/98。

除了菌株变体，单个或多个保守性氨基酸取代可根据本发明改变所用抗原的免疫原性来进行。

除了或取代蛋白质抗原，编码蛋白质抗原的核酸可包括在发明的组合物内。一旦施用给哺乳动物受体，核酸会在体内表达并产生蛋白质抗原。这种核酸免疫已熟知[如参考文献 18 到 23 等]。核酸通常是 DNA 质粒。

来源于血清组 C 脑膜炎奈瑟球菌的优选糖类抗原是 Menjugate™ 中所用寡糖缀合物[24、25]，它包含 12 到 22 个来自血清组 C 荚膜多糖的单糖单位。

来源于血清组 A 的优选糖类抗原是一种寡糖，其中组成单糖单位上的一个或多个羟基被阻断基团取代[26]。

获得自血清组 A、W135 和 Y 的更多寡糖抗原揭示于参考文献 27。

发明的组合物可包括大于一个的炎奈瑟球菌抗原。当来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 和 C 的糖类都包括时，优选 MenA 糖：MenC 糖的比例(w/w)大于 1(如 2:1、3:1、4:1、5:1、10:1 或更高)

发明的组合物优选是免疫原性组合物或疫苗。这种组合物包括免疫有效量的抗原。“免疫有效量”指施用给个体的发明组合物所包含的抗原量(单剂量或一系列的部分)有效提高治疗或预防性免疫应答。此量的变化取决于待治疗个体的健康和身体情况、年龄、待治疗个体的分类组(如非人的灵长类动物、灵长类动物等)、个体合成抗体的免疫系统能力、所需保护程度、疫苗的制剂、主治医师对医学情况的评估和其它相关因素。量可在相对宽的范围内，范围能通过常规试验确定。抗原通常以至少各 1 μg/ml 的浓度存在。

计量治疗可以是单剂量或多剂量安排(如包括加强剂量)。

CpG 寡核苷酸

已知 CpG 寡核苷酸用作疫苗佐剂[如参考文献 28]且它们诱发强的 Th1 免疫应答。它们用作肠胃外和粘膜佐剂[29]。

根据本发明使用的 CpG 寡核苷酸是一种核酸，它包括至少一个 CpG 二核苷酸即后面有鸟苷核苷酸的胞嘧啶核苷酸。寡核苷酸可含多个 CpG 二核苷酸。

寡核苷酸中的 CG 序列可有 5'侧翼的两个嘌呤和 3'侧翼的两个嘧啶，即 RRCGYT。

CpG 寡核苷酸中的胞嘧啶核苷酸可以是甲基化的，但优选它们应是非甲基化的。

胞嘧啶和鸟苷核苷酸优选是脱氧核糖核苷酸且核酸优选是 DNA。为提高核酸酶抗性，寡核苷酸可包括修饰的主链，如硫代磷酸主链。除了使用 DNA，可能使用 PNA(肽核酸)。此外，寡核苷酸可包括糖部分和含氮碱基部分的取代。

寡核苷酸优选包括约 6 和约 100 个间的核苷酸，更优选约 8 和约 50 个间的核苷酸，最优选约 10 和约 40 个间的核苷酸。

含至少 1 个 CG 二核苷酸的寡核苷酸可使用常规寡核苷酸合成方法方便地制备。

CpG 寡核苷酸佐剂的例子发现于参考文献 30 到 55。

可生物降解的聚合的微粒

已知可生物降解的聚合物微粒用作疫苗佐剂[如参考文献 56]。它们用作肠胃外和粘膜佐剂[29]。

除可生物降解，用于制备微粒的聚合物一般可灭菌且无毒(生物相容)。合适的可生物降解聚合物可商业购买，包括的聚合物来源于多羟基丁酸；聚己内酯；聚原酸酯；聚酐；聚(羟基丁酸)；和聚(α -羟酸)。优选的聚合物形成自一个或多个聚(α -羟酸)如聚(L-丙交酯)、聚(D, L-丙交酯)、D, L-丙交酯和乙交酯的共聚物(如聚(D, L-丙交酯-共-乙交酯)或 D, L-丙交酯和己内酯的共聚物。优选形成自聚(D, L-丙交酯-共-乙交酯) ('PLG')的微粒。

这些聚合体有多种分子量，特定抗原的合适分子量可容易地确定。对于聚(L-丙交酯)，合适分子量相当于约 2000 到 250,000。对于 PLG，合适分子量范围一般从约 10,000 到 200,000，优选约 15,000 到约 150,000，最优选约 50,000 到 100,000。

对于 PLG 微粒，可使用多种丙交酯：乙交酯比例，且比例选择主要是部分取决于共施用抗原和所需降解速度。例如，一个 50:50 PLG 聚合物含 50% D, L-丙交酯和 50%乙交酯，它快速再吸附共聚物而 75:25 PLG 降解更缓慢，由于丙交酯成分增加，85:15、90:10 甚至更缓慢。丙交酯：乙交酯的合适比例在抗原性质和所讨论疾病基础上容易地确定。此外，不同丙交酯：乙交酯比例的微粒混合物用于制剂以获得所需特定抗原的释放动力学并提供初次和二次免疫应答。本发明微粒的降解速度也可通过因素如聚合物分子量和结晶性来控制。

如本文所用，术语‘微粒’指直径约 100nm 到约 150 μm 的颗粒，更优选直径约 200nm 到约 30 μm ，最优选直径约 500nm 到约 10 μm 。优选的微粒直径可肠胃外施用而不需阻塞针或毛细管。微粒大小容易由本领域熟知技术确定，如光子相关光谱法、激光衍射测法和/或扫描电子显微镜。术语‘微粒’包括其范围内的‘纳米颗粒’[57]。优选微粒是微球体，尽管也可使用薄片状颗粒[58]。

微粒可用任何本领域熟知的任何一些方法制备[如参考文献 59]。例如，双重乳剂/溶剂蒸发技术[如参考文献 60&61]可用于形成微粒。这些技术包括形成原始乳剂，乳剂由含抗原的聚合物溶液的微滴组成(如果抗原待包埋在微粒中)，随后与含颗粒稳定剂/表面活性剂的连续水相混合。

更具体的是，油包水水包油(water-in-oil-in-water)(w-o-w)溶剂蒸发系统可用于形成微粒，如参考文献 62、63 和 64 所述。在此技术中，特定聚合物结合有机溶剂，如乙酸乙酯、二甲基氯化物(也称为二氯甲烷和二氯甲烷)、乙腈、丙酮、氯仿等。聚合物提供在约 2-15%溶液、有机溶剂中。加入约等量的抗原溶液(如在水中)且聚合物/抗原溶液用如匀浆器乳化。乳剂然后结合大体积的乳剂稳定剂的水溶液，如聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯吡咯烷酮。乳剂稳定剂通常提供在约 2-15%溶液中，更通常在约 4-10%溶液中。然后匀浆混合物以产生稳定的 w/o/w 双乳剂。然后蒸发有机溶剂。

可操作制剂参数以制备小(<5 μm)和大(>30 μm)微粒[如 63、65]。例如，减少搅拌产生较大微粒，分散相体积增加也如此。小颗粒通过低水相体积的高浓度 PVA 产生。

微粒也可用喷雾-干燥和凝聚[如参考文献 66、67&68]；空气-悬浮包衣技术如锅式包衣法和沃斯特包衣法[69、70]；离子胶凝[71]来形成。

使用微粒前，一般确定抗原含量从而合适量的微粒可传递给受试者以引起适当免疫应答。

微粒的抗原含量可根据本领域已知方法确定，如分裂微粒和提取包埋的抗原。例如微粒可溶于二甲基氯化物且蛋白质被提取到蒸馏水中[如参考文献72、73、74]。另外，微粒可分散在含5%(w/v)SDS的0.1M NaOH中。搅拌样品、离心且上清用合适测定法分析。

抗原和/或 CpG 寡核苷酸可在微粒内或上定位。包埋一般通过微粒形成中存在抗原/寡核苷酸来完成，而表面吸附通过将抗原/寡核苷酸加入预形成微粒来完成。

吸附抗原/寡核苷酸到制备微粒上的一种方法如下。微粒再水合并分散到微粒的本质单体悬浮液，使用可透析的阴离子或阳离子洗涤剂。有用的洗涤剂包括但不限于任何不同的N-甲基葡糖酰胺(glucamide)(称为MEGAs)，如庚酰-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-7)、辛酰-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-8)、壬酰-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-9)和癸酰-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-10)；胆酸；胆酸钠；脱氧胆酸；脱氧胆酸钠；牛磺胆酸；牛磺胆酸钠；牛磺脱氧胆酸；牛磺脱氧胆酸钠；3-3[(3-胆氨基丙基)二甲氨基]-1-丙烷-磺酸盐(CHAPs)；N-辛莫基葡糖苷、3-3[(3-胆氨基丙基)二甲氨基]-2-羟基-1-丙烷-磺酸盐(CHAPSO)；N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙烷-磺酸盐(ZWITTERGENT 3-12)；N,N-双-(3-D-葡糖氨基丙基)-脱氧胆酰胺(DEOXY-BIGCHAP)；蔗糖单月桂酸酯；甘氨酸胆酸/甘氨酸胆酸钠；月桂肌氨酸(laurosarcosine)(钠盐)；甘氨酸脱氧胆酸/甘氨酸脱氧胆酸钠；十二烷基磺酸钠(SDS)；溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)；溴化十二烷基三甲基铵；溴化十六烷基三甲基铵；溴化十四烷基三甲基铵；溴化苄基十二烷基二甲基铵；氯化苄基十六烷基二基甲铵；溴化苄基十四烷基二甲基铵。以上洗涤剂可商业购买。本领域已知的多种阳离子脂质类也可用作洗涤剂[76、77]。

然后微粒/洗涤剂混合物例如用瓷研钵和杵物理碾磨，直到形成光滑浆。然后加入适当水缓冲液如磷酸缓冲盐水(PBS)或Tris缓冲盐水，所得混合物用超声波处理或匀浆直到微粒充分悬浮。抗原/寡核苷酸然后加入微粒悬浮液且系统透析以去除洗涤剂。优选聚合物微粒和洗涤剂系统使抗原/寡核苷酸吸附到微粒表面而仍保持活性。所得含表面吸附抗原/寡核苷酸的微粒可洗涤到无未结合抗原/寡核苷酸并作为合适缓冲制剂中的悬浮液保存，或用适当赋形剂冻干，如下进一步所述。

抗原/CpG/微粒组合

发明组合物的三种基本成分间可能有多种物理关系。这些是因为微粒具有

内体积和表面，两者任一种可用于定位 CpG 寡核苷酸和/或抗原。

因此抗原可包埋在微粒内，它可吸附到微粒，或可与微粒简单混合而没有包埋或吸附。优选吸附。

类似地，CpG 寡核苷酸可包埋在微粒内，它可吸附到微粒，或可与微粒简单混合。吸附能用洗涤剂如 CTAB 完成。

CpG 寡核苷酸和抗彼此都与微粒有相同的物理关系，或它们可不同。同样 CpG 寡核苷酸和抗原可吸附到相同微粒上或 CpG 寡核苷酸和抗原可吸附到不同微粒上。所有可能的组合包括在本发明内：

		CpG 寡核苷酸		
		包埋	吸附	混合
抗	包埋	是	是	是
	吸附	是	是	是
	混合	是	是	是

发明组合物可包括上面的混合物，如组合物内的一些微粒包埋抗原，一些则吸附抗原。

药物组合物

对于药学用途，发明组合物一般包括药学上可接受载体。这产生了发明的药物组合物。药学上可接受载体可以是任何物质，自身不诱导产生对接受组合物病人有害的抗体且可没有不适当毒性地施用。合适载体可以是大的、缓慢代谢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和失活病毒颗粒。这种载体对于本领域普通技术人员是熟知的。药学上可接受载体可包括液体如水、盐水、甘油和乙醇。辅助物质如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等，也可存在于这种载体中。脂质体是合适的载体。药物载体的充分讨论在参考文献 78 中。

发明的组合物可以多种形式制备。例如，组合物能制备为可注射的液体溶液或悬浮液。注射前也可制备适合溶于或悬浮于液体载体的固体形式。组合物可制备用于局部施用，如作为软膏剂、霜剂或粉剂。组合物可制备用于口服，如作为片剂或胶囊或作为糖浆(任选调味的)。组合物可制备用于肺部施用如作为吸入器，使用精细粉剂或喷雾。组合物可制备为栓剂或阴道栓剂。组合物可制备用于鼻、耳或眼施用，如作为滴剂、喷雾或粉剂[如 79]。

药物组合物优选是无菌的。它优选没有热原。它优选缓冲的，如在 pH6 和 pH8 之间，一般 pH7 左右。

药物组合物可以冻干。

发明也提供含发明药物组合物的传递装置。装置可以是例如注射器。

医学治疗和使用

发明组合物可用于治疗(即治疗现有的奈瑟球菌感染)或预防(即防止将来的奈瑟球菌感染)。

发明提供用作药物的发明组合物。

发明也提供方法用于提高哺乳动物中的抗体反应，包括施用发明的药物组合物给哺乳动物。抗体反应优选是 IgA 和 IgG 反应且优选是杀菌的。

发明也提供方法用于治疗患奈瑟球菌感染和/或疾病的哺乳动物，包括施用发明的药物组合物给病人。

发明同样提供方法用于保护哺乳动物免受奈瑟球菌感染和/或疾病，包括施用发明的药物组合物给哺乳动物。

发明也提供在药物生产中使用 (a) 奈瑟球菌抗原，(b) CpG 寡核苷酸和 (c) 可生物降解的聚合物微粒以防止或治疗哺乳动物中的奈瑟球菌疾病和/或感染。

哺乳动物优选是人。人可以是成人，或优选儿童。发明的组合物特别用于免疫儿童和青少年。

发明的使用和方法特别用于治疗/保护抗脑膜炎奈瑟球菌感染。使用和方法特别用于防止/治疗疾病，包括细菌性脑膜炎。

治疗的功效可通过监控发明组合物施用后奈瑟球菌感染来测试。预防治疗的功效可通过监控组合物施用后抗奈瑟球菌的免疫反应来测试。

发明的组合物一般直接施用给病人。完成直接传递可通过肠胃外注射(如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内，或组织的间隙)、直肠、口头、阴道、局部、经皮肤、眼、鼻、耳或肺部施用。优选注射和鼻内施用。

剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

进一步的成分

除了 CpG 寡核苷酸和聚合物微粒，发明的组合物可包括佐剂。优选的更多佐剂包括但不限于：(A) 铝化合物(如氢氧化铝、磷酸铝、磷酸氢铝、氢氧化合物、正磷酸盐、硫酸盐等[例如参见参考文献 13 的第 8&9 章])，或不同铝化合物的混合物，化合物采取任何合适的形式(如凝胶、结晶、非晶形等)，优选吸

附；(B)MF59(5%鲨烯、0.5%吐温80和0.5%Span85，用微流化剂配制成亚微米微粒)[参见13的第10章，也参见参考文献80]；(C)脂质体[参见参考文献13的第13和14章]；(D)ISCOMs[参见参考文献13的第23章]，可以没有另外的洗涤剂[81]；(E)SAF，含10%鲨烯、0.4%吐温80和5% pluronic-阻断聚合物L121和thr-MDP，微流化成亚微米乳剂或涡旋产生较大颗粒大小的乳剂[参见参考文献13的第12章]；(F)Ribi™佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem)，含20%鲨烯、0.2%吐温80以及一种或多种细菌细胞壁成分，细胞壁成分来自单磷酸脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸(TDM)和细胞壁骨架(CWS)，优选MPL+CWS(Detox™)；(G)皂角苷佐剂，如QuilA或QS21[参见参考文献13的第12章]，也称为Stimulon™[82]；(H)脱乙酰壳多糖[如83]；(I)完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)；(J)细胞因子，如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素(如干扰素-γ)、巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等[参见参考文献13的第27&28章]；(K)单磷酸脂质A(MPL)或3-O-脱酰MPL(3d MPL)[如参考文献13的第21章]；(L)3d MPL与例如QS21和/或水包油型乳剂的组合[84]；(M)聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯[85]；(N)聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂结合辛苯昔醇[86]或聚氧乙烯烷基醚或者酯表面活性剂结合至少一种另外的非离子表面活性剂如辛苯昔醇[87]；(O)金属盐的颗粒[88]；(P)皂角苷和水包油型乳剂[89]；(Q)皂角苷(QS21)+3d MPL+IL-12(任选+固醇)[90]；(R)大肠杆菌热不稳定肠毒素(“LT”)或其去毒突变体，如K63或R72突变体[如参考文献91的第5章]；(S)霍乱毒素(“CT”)或其去毒突变体[如参考文献91的第5章]；(T)双链RNA和(U)其它物质，作为免疫刺激剂增强组合物的效力[如参考文献13的第7章]。铝(特别是磷酸铝和/或氢氧化铝)和MF59进一步优选作为肠胃外免疫的佐剂。突变体毒素是优选的粘膜佐剂。

胞壁酰肽包括N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(去甲-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸基氧)-乙胺(MTP-PE)等。

除了奈瑟球菌抗原，发明可进一步包括抗原性成分。可包含在发明组合物中的抗原包括：

来自幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的抗原，如CagA[92到95]、

VacA[96、96]、NAP[98、99、100]、HopX[如 101]、HopY[如 101]和/或脲酶。

来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的外膜小泡 (OMV) 制备物, 如参考文献 102、103、104、105 等所示。

来自肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的糖类抗原 [如 106、107、108]。

来自甲肝病毒的抗原, 如失活病毒 [如 109、110]。

来自乙肝病毒的抗原, 如表面和/或核心抗原 [如 110、111]。

来自丙肝病毒的抗原 [如 112]。

来自百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 的抗原, 如百日咳全毒素 (PT) 和来自百日咳博德特氏菌的丝状血凝素 (FHA), 任选也与百日咳杆菌粘附素 (pertactin) 和/或凝集原 2 和 3 组合 [如参考文献 113&114]。

白喉抗原, 如白喉类毒素 [如参考文献 115 的第 3 章], 例如 CRM₁₉₇ 突变体 [如 116]。

破伤风抗原, 如破伤风类毒素 [如参考文献 115 的第 4 章]。

来自流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) B 的糖类抗原 [如 23]。

来自肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 的抗原 [如 117、118、119、120、121、122、123]。

来自沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 的抗原 [如 124]。

来自芽龈卟啉单孢菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的抗原 [如 125]。

脊髓灰质炎抗原 [如 126、127], 例如 IPV 或 OPV。

狂犬病抗原 [如 128], 例如冻干的失活病毒 [如 129, RabAvert™]。

麻疹、腮腺炎和/或风疹抗原 [如参考文献 115 的第 9、10&11 章]。

来自流感病毒的抗原 [如参考文献 115 的第 19 章], 例如血凝素和/或神经氨酸酶表面蛋白。

来自副粘病毒的抗原, 如呼吸道合胞病毒 (RSV [130、131] 和/或副流感病毒 (PIV3 [132]))。

来自粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) 的抗原 [如 133]。

来自无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 组链球菌) 的抗原 [如 134、135]。

来自酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌) 的抗原 [如 135、136、137]。

来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抗原 [如 138]。

来自炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 的抗原 [如 139、140、141]。

来自黄病毒科家族 (黄病毒属) 病毒的抗原, 如来自黄热病毒、日本脑炎病毒、4 种登革热病毒的血清型、蜱传脑炎病毒、西尼罗河病毒。

瘟病毒属抗原, 如来自经典猪热病毒、牛病毒腹泻病毒和/或边境病病毒。

细小病毒抗原, 如来自细小病毒 B19。

朊病毒蛋白质 (如 CJD 朊病毒蛋白质)。

淀粉样蛋白质, 如 β 肽 [142]。

癌抗原, 如参考文献 143 的表 1 或参考文献 144 的表 3&4 所列。

组合物可包括一个或多个这些进一步的抗原。

需要时毒性蛋白质抗原可被去毒 (如通过化学和/或遗传方法使百日咳毒素去毒)。

当白喉抗原包括在组合物中时, 也优选包括破伤风抗原和百日咳毒素。类似地, 当包括破伤风抗原时, 也优选包括白喉抗原和百日咳毒素。类似地, 当包括百日咳毒素时, 也优选包括白喉抗原和破伤风抗原。

抗原优选吸附到铝盐。

组合物中的抗原通常以至少各 $1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度存在。一般, 特定抗原的浓度足以引起抗该抗原的免疫应答。

除了使用发明组合物中的蛋白质抗原, 可使用编码抗原的核酸。因此发明组合物的蛋白质成分可被编码该蛋白的核酸 (优选 DNA, 如以质粒形式) 取代。

定义

术语“包含”指“包括”以及“由...组成”, 如组合物“包含”X 可完全由 X 组成或可包括另外一些成分如 X+Y。

两个氨基酸序列间百分比序列同一性指当排列时, 比较两个序列的氨基酸百分比相同。此排列和百分比同源性或序列同一性可用本领域已知的软件程序确定, 例如参考文献 145 的 7.7.18 部分所述。优选排列通过 Smith-Waterman 同源搜索算法用仿射间隙搜索来确定, 间隔开放罚分为 12 且间隔延伸罚分为 2, BLOSUM 矩阵为 62。Smith-Waterman 同源搜索算法教授于参考文献 146。

完成发明的模式

用脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 抗原肠胃外致敏和粘膜加强

参考文献 6 揭示了来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的蛋白质，称为 ‘287’。参考文献 10 到 12 揭示了改进其表达的方法。一种方法包括缺失蛋白质 N-末端且包括 6 个重复甘氨酸残基。此蛋白质称为 ‘ Δ G287’。

小鼠用来自菌株 2996 的 MenB Δ G287 抗原 (20 μ g/剂量) 致敏并加强，此抗原通过吸附到 PLG 微粒来制成用于肌肉内 (IMU) 施用，这可以有或没有 CpG 寡核苷酸 (也吸附到微粒)。另一种鼻内 (IN) 施用的制剂使用 LT-K63 佐剂。小鼠接受 3 次 IM 剂量或 2 次 IM 然后 2 次 IN 剂量 (剂量：0 天；第 28 天；第 84 天；任选第 98 天)。

组	制剂	途径	剂量	抗体 GMT 2 周后		
				剂量 2	剂量 3	剂量 4
1	PLG/287	IM	1, 2, 3	10, 729	2, 853	-
2	PLG/287+PLG/CpG	IM	1, 2, 3	15, 673	4, 163	-
3	PLG/287	IM	1, 2	9, 064	7, 948	9, 412
	287+LT-K63	IN	3, 4			
4	PLG/287+PLG/CpG	IM	1, 2	34, 891	15, 167	16, 556
	287+LT-K63	IN	3, 4			

因此，包含 CpG 寡核苷酸提高抗肌肉内施用 MenB 蛋白质 287 的抗体滴度 (比较组 1&2)。抗体滴度可通过用 2 次鼻内剂量取代第 3 次肌肉内剂量来提高 (比较组 1&3)。CpG 提高也发现于肌肉内/鼻内方案 (比较组 3&4)。

比较用于 MenB 蛋白质 287 的佐剂

Δ G287 用多种佐剂制成并施用给小鼠。来自小鼠的血清用杀菌抗体 (BCA) 测定评估且滴度如下：

佐剂	BCA 后-2	BCA 后-3
弗氏佐剂	2048	8192
铝	<4	256
铝+CpG 寡核苷酸	256	4097
MF59	<4	<4
CpG 寡核苷酸	<4	128
PLG 微粒 (吸附)	8	1024
PLG 微粒 (吸附)+CpG	2048	16384

因此 CpG 寡核苷酸仅适度有效作为佐剂，几乎可与铝比较。PLG 微粒比铝和 CpG 更有效，但没有弗氏佐剂有效。然而显著相反的是，CpG 和 PLG 混合物

在二免疫阶段后与弗氏佐剂的佐剂性相称，且在第三次免疫后超过弗氏佐剂。

用 CpG 提高 PLG 佐剂性也在单独研究(02-0279)中发现：

佐剂	GMT 后 2	GMT 后 3
MF59	6967	13417
PLG 微粒(吸附)	7070	11367
PLG 微粒(吸附)+CpG	15099	26833

吸附对佐剂性的效果

研究了吸附对佐剂性的效果。蛋白质 Δ G287 用 DSS 表面活性剂或 SDS 吸附到 PLG 微粒上或者用颗粒简单混合。免疫在第 0、21 和 35 天进行且滴度在第 35 和 49 天评估。结果如下：

制剂	BCA	2 周后抗体滴度	
		剂量 2	剂量 3
CpG+PLG (DSS) 上吸附的 287	4096	45817	67921
CpG+PLG (SDS) 上吸附的 287	4096	39730	29911
CpG+287+PLG (没有吸附)	<16	62	1065
DSS+铝上吸附的 287	<16	1209	1249
CpG+铝上吸附的 287	1024	4054	12236
铝上吸附的 287	128	646	2454

因此当抗原吸附到微粒时，CpG 和用于 Δ G287 的微粒混合物的佐剂性最佳。

参考文献 6 揭示了来自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的一种蛋白质，称为‘961’（现在也称为‘NadA’ [16、17]）。参考文献 10 到 12 揭示了改进 NadA 表达的方法。一种方法包括缺失蛋白质的 C-末端以去除其膜锚（即去除菌株 2996 的氨基酸 341-405）以及天然去除其前导肽。此蛋白质称为‘961c’。如上面关于 287 所述，当共施用 CpG 时，研究了吸附对 PLG 佐剂性的效果：

制剂	BCA	剂量 3 后 2 周的抗体滴度
PLG (SDS) 上吸附的 961	2048	20661
961+PLG (没有吸附)	256	1706
PLG 上吸附的 287	4096	63057
PLG 上吸附的 287+可溶 961	4096	287:86052;961:1924
PLG 上吸附的 287+ PLG 上吸附的 961	8192	287:107142;961:11717

287(没有吸附)+961(没有吸附)+‘空白’ PLG	1024	287:1266;961:145
287(吸附)+961(吸附)+‘空白’ PLG	8092	287:78176;961:20876

因此对于 Δ G287, 当抗原吸附到微粒时, CpG 和用于 961c 的微粒混合物的佐剂性最佳。这对于抗原本身和抗原结合 Δ G287 时也是适用的。

因此对于单独和结合的 Δ G287 和 961c, 当抗原吸附到 PLG 微粒上时, CpG 和 PLG 混合物的佐剂性最佳。

PLG、CpG、铝和 MF59

测试 PLG、CpG、铝和 MF59 的不同组合用于表达为 His-标记产物的蛋白质 Δ G287。3 次免疫后血清杀菌滴度如下:

佐剂	滴度
铝	2048
铝+CpG	32768
MF59	8192
MF59+CpG	32768
PLG(抗原吸附到 PLG)	1024
PLG+CpG(抗原和 CpG 都吸附到 PLG)	4096
PLG+ MF59(抗原吸附到 PLG)	2048
PLG+ MF59+CpG(抗原吸附到 PLG)	8192
完全弗氏佐剂	32768
PLG+完全弗氏佐剂(抗原吸附到 PLG)	2048

进行类似的试验且结果如下:

佐剂	滴度
PLG(抗原吸附到 PLG)	1024
PLG+CpG(抗原吸附到 PLG)	16384
PLG+CpG(抗原和 CpG 都吸附到 PLG)	16384
PLG+铝(抗原吸附到 PLG)	1024
PLG+铝+CpG(抗原吸附到 PLG)	16384
PLG+铝+CpG(抗原和 CpG 都吸附到 PLG)	8192

PLG+ MF59 (抗原吸附到 PLG)	4096
PLG+ MF59+CpG (抗原吸附到 PLG)	16384
铝 (抗原吸附到铝)	256
CpG	128
铝+CpG	1024
铝+CpG+ PLG (抗原吸附到铝; CpG 吸附到 PLG)	4096
CpG+PLG (CpG 吸附到 PLG; 抗原没有吸附)	64

因此 MF59 和铝可进一步提高 CpG/ PLG 混合物的功效, CpG 吸附到 PLG 微粒对于佐剂性不是必需的, 但再次看到抗原吸附到微粒最佳。

抗原混合物

对于单独和结合的蛋白质 Δ G287 和 961c, 研究了吸附对佐剂性的效果。3 次剂量后抗体滴度如下:

制剂	抗体 GMT 抗	
	287	961
CpG+ PLG 上吸附的 961	-	20661
CpG+961+ PLG (没有吸附)	-	1706
CpG+961+ PLG 上吸附的 287	86052	1924
CpG+ PLG 上吸附的 961+ PLG 上吸附的 287	107142	11717
CpG + PLG 上吸附的 287	63057	-
CpG + PLG 上共吸附的 287 和 961	57306	6251
CpG+ PLG 上吸附的 961+ PLG 上吸附的 287+PLG	78176	20876
287+961+PLG (没有吸附抗原)	1266	145

因此对于 Δ G287, 当抗原吸附到微粒时, CpG 和用于蛋白质 961c 的微粒混合物的佐剂性最佳。

对于蛋白质 Δ G287 和 961c, 进一步测试佐剂与 PLG 微粒的组合。CpG 可溶或吸附到 PLG 微粒。结果如下:

制剂+ PLG 微粒	BCA	GMT 抗

		287	961
287 (PLG 上吸附)+961 (PLG 上吸附)	256	5719	2412
287 (PLG 上吸附)+961 (PLG 上吸附)+ CpG	512	17553	8627
287 (PLG 上吸附)+961 (PLG 上吸附)+ CpG (PLG 上吸附)	1024	16906	6720
287 (PLG 上吸附)+961 (PLG 上吸附)+MF59	64	4636	3969
287 (PLG 上吸附)+961 (PLG 上吸附)+MF59+ CpG	2048	23642	48446

对 10 只 CD-1 小鼠组进行类似的工作，使用 20 μ g 每 PLG-吸附抗原每 IM 剂量 (0、21 和 35 天)。当 CpG 存在时，给予 10 μ g 每剂量。ELISA 滴度 (GMT) 计算为 OD_{450nm}0.5 的交互血清稀释，测试两种抗原的血清。血清杀菌活性滴度 (SBA) 计算为杀死 50% 靶细菌的交互血清稀释，测试血清抗 2996 菌株和抗异源菌株 MC58 的活性。49 天的滴度 (第三次剂量后 2 周) 如下：

287	961	额外佐剂	GMT		SBA	
			287	961	2996	M58
X	-	-	8375	-	512	<4
X	-	可溶 CpG	33736	-	1024	128
X		PLG-吸附的 CpG	32058	-	1024	64
-	X	-	-	3818	nd	nd
-	X	可溶 CpG	-	14149	2048	<4
-	X	PLG-吸附的 CpG	-	18526	2048	<4
X	X	-	13557	2476	nd	nd
X	X	可溶 CpG	21664	6557	8192	64
X	X	PLG-吸附的 CpG	27259	7510	2048	128
X	X	可溶 CpG+MF59	27981	26826	2048	256
对照：可溶 287 与 CFA			37889	-	1024	<32

对照：可溶 961 与 CFA	-	50453	4096	<4
对照：可溶 287 和 961 与 CFA	16781	27069	512	<32

Nd 未检测出

参考文献 12 揭示了三种蛋白质的组合，在它们间包括 5 个不同的脑膜炎奈瑟球菌抗原：(1)961_{C2996}；(2) Δ G287_{NZ}-953₂₉₉₆；(3)936₂₉₉₆- Δ G741_{MC58}。参考文献 12 中抗原混合物用氢氧化铝佐剂测试。根据本发明，抗原混合物通过吸附到可生物降解的聚合物微粒加上寡核苷酸辅佐。第三次剂量后滴度如下：

免疫	ELISA GMT				SBA(抗 7 个菌株)							
	961	287	741	953	2996	MC58	BZ133	39498	NGH38	F6124	4476	
(1)铝上的961	12346	-	-	-	4096	<4	<4	<4	<4	64	<4	
(2)铝上的287-953	-	6415	-	585	1024	1024	256	1024	4096	256	1024	
(2)铝上的936-741	-	-	10625	-	<4	32678	16384	1024	128	16384	32768	
铝上的(1),(2)和(3)	42302	18206	33881	4549	8192	32768	32768	2048	4096	32768	65536	
(1)铝上的961	14185	-	-	-	2048	4	<4	<4	16	256	<4	
(2)铝上的287-953	-	43515	-	478	2048	128	2048	2048	8192	4096	128	
(2)铝上的936-741	-	-	16150	-	<4	32768	16384	1024	512	8192	262144	
铝上的(1),(2)和(3)	6735	24304	13801	1214	4096	65536	32768	2048	4096	32768	65536	
铝上的(1),(2)和(3)+ CpG	10896	40697	26966	2301	8192	262144	65536	4096	8192	32768	262144	

与参考文献 12 所用铝佐剂相比，PLG+CpG 混合物产生较低的总抗体滴度(除了蛋白质 287)，但重要的是给出抗广范围菌株的较高杀菌滴度。因此尽管绝对滴度较低，发明的佐剂使抗体产生有利地趋向杀菌抗体。

要理解的是发明仅以例子方式描述，可在发明范围和精神内作出修改。

参考文献（其中内容已结合在说明书中）

- [1] Parkhill 等, (2000) Nature 404:502-506
- [2] Tettelin 等, (2000) Science 287:1809-1815
- [3] W000/66791
- [4] W099/24578
- [5] W099/36544
- [6] W099/57280
- [7] W000/22430
- [8] W000/66741
- [9] Pizza 等, (2000) Sciece 287:1816-1820
- [10] W001/64920
- [11] W001/64922
- [12] PCTIIB02/03904
- [13] Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [14] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49
- [15] W000/50075
- [16] Comanducci 等, (2002) J. Exp. Med. 195:1445-1454
- [17] PCT/IB02/03396
- [18] Strugnell 等, (1997) Immunol Cell Biol 75(4):364-369
- [19] Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunol 9:271-283
- [20] Donnelly et al (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648
- [21] DNA Vaccination - Genetic Vaccination (eds. Koprowski 等, ; 1998)
ISBN 3540633928
- [22] Brunham 等, (2000) J Infect Dis 181 Suppl 3:S538-43
- [23] Svanholm 等, (2000) Scand J Immunol 51(4):345-53
- [24] Costantino 等, (1992) Vaccine 10:691-698
- [25] Costantino 等, (1999) Vaccine 17:1251-1263
- [26] UK 专利申请 0207117.3 & 0220195.2
- [27] PCT/1B02/03 191
- [28] McCluskie 等, (2001) Curr. Opin. Investig. Drugs 2:35-39
- [29] McCluskie 等, (2001) Crit. Rev. Inmmunol. 21:103-120
- [30] Krieg 等, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12631-12636,
- [31] Klinman 等, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2879-2883

- [32] Weiner 等, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10833-10837
- [33] Chu 等, (1997) J. Exp. Med., 186, 1623-1631
- [34] Brazolot-Millan 等, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15553-15558
- [35] Ballas 等, (1996) J. Immunol., 157, 1840-1845
- [36] Cowdery 等, (1996) J. Immunol., 156, 4570-4575
- [37] Halpern 等, (1996) Cell. Immunol., 167, 72-78
- [38] Yamamoto 等, (1988) Jpn. J. Cancer Res., 79, 866-873
- [39] Stacey 等, (1996) J. Immunol., 157, 2116-2122
- [40] Messina 等, (1991) J. Immunol., 147, 1759-1764
- [41] Yi 等, (1996) J. Immunol., 157, 4918-4925
- [42] Yi 等, (1996) J. Immunol., 157, 5394-5402
- [43] Yi 等, (1998) J. Immunol., 160, 4755-4761
- [44] Roman 等, (1997) Nat. Med., 3, 849-854
- [45] Davis 等, (1998) J. Immunol., 160, 870-876
- [46] Lipford 等, (1997) Eur. J. Immunol., 27, 2340-2344
- [47] Moldoveanu 等, (1988) Vaccine, 16, 1216-1224
- [48] Yi 等, (1998) J. Immunol., 160, 5898-5906
- [49] W096/02555
- [50] W098/16247
- [51] W098/18810
- [52] W098/40100
- [53] W098/55495
- [54] W098/37919a
- [55] W098/52581
- [56] Gupta 等, (1998) Adv Drug Deliv Rev 32:225-246
- [57] Ravi Kumar (2000) J Pharm Pharm Sci 3:234-258
- [58] Jabbal-Gill 等, (2001) Adv Drug Deliv Rev 51:97-111
- [59] Jam (2000) Biomaterials 21:2475-2490
- [60] U. S. 3, 523, 907
- [61] Ogawa 等, (1988) Chem. Pharm. Bull. 36:1095-1103
- [62] O'Hagan 等, (1993) Vaccine 11, :965-969
- [63] Jeffery 等, (1993) Pharm. Res. 10:362-368
- [64] WO 00/06133
- [65] McGee 等, (1997) J Microencapsul. 14:197-210

- [66] Thomasin 等, (1996) *J. Controlled Release* 41:131*ff*
- [67] U.S. 2,800,457
- [68] Masters, K. (1976) *Spray Drying* 2nd Ed., Wiley, New York
- [69] Hall 等, (1980) *The "Wurster Process" in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications* (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida
- [70] Deasy, P.B. (1988) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* S(2):99-139
- [71] Lim 等, (1980) *Science* 210:908-910
- [72] Cohen 等, (1991) *Pharm. Res.* 8:713*ff*
- [73] Eldridge 等, (1991) *Infect. Immun.* 59:2978*ff*
- [74] Eldridge 等, (1990) *J. Controlled Release* 11:205*ff*
- [75] O'Hagan 等, (1994) *Int. J. Pharm.* 103:37-45
- [76] Balasubramaniam 等, (1996) *Gene Ther.* 3:163-172
- [77] Gao & Huang (1995) *Gene Ther.* 2:7110-7122
- [78] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th Ed, ISBN:0683306472
- [79] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467
- [80] W090/14837
- [81] W000/07621
- [82] W000/62800
- [83] W099/27960
- [84] 欧洲专利申请 0835318, 0735898 和 0761231
- [85] W099/52549
- [86] W001/21207
- [87] W001/21152
- [88] W000/23105
- [89] W099/11241
- [90] W098/57659
- [91] Del Giudice 等, (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, No.1
- [92] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592
- [93] W093/18150
- [94] Covacci 等, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795
- [95] Turnmuru 等, (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809
- [96] Marchetti 等, (1998) *Vaccine* 16:33-37

- [97] Telford 等, (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658
- [98] Evans 等, (1995) *Gene* 153:123-127
- [99] W096/01272 & W096/01273, 尤其 SEQ ID NO:6
- [100] W097/25429
- [101] W098/04702
- [102] W001/52885
- [103] Bjune 等, (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096
- [104] Pukasawa 等, (1999) *Vaccine* 17:2951-2958
- [105] Rosenqvist 等, (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333
- [106] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332
- [107] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285,
- [108] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207
- [109] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188
- [110] Iwarson (1995) *APMLS* 103:321-326
- [111] Gerlich 等, (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80
- [112] Hsu 等, (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915
- [113] Gustafsson 等, (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355
- [114] Rappuoli 等, (1991) *TIBTECH* 9:232-238
- [115] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0
- [116] Del Giudice 等, (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70
- [117] W002/02606
- [118] Kahnan 等, (1999) *Nature Genetics* 21:385-389
- [119] Read 等, (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406
- [120] Sbirai 等, (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527
- [121] W099/27105
- [122] W000/27994
- [123] W000/37494
- [124] W099/28475
- [125] Ross 等, (2001) *Vaccine* 19:4135-4142
- [126] Sutter 等, (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308
- [127] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126
- [128] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6
- [129] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19
- [130] Anderson (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S59-65
- [131] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262

-
- [132] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415-421
- [133] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107
- [134] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6
- [135] W002/34771
- [136] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii
- [137] Ferretti 等, (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663
- [138] Kuroda 等, (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; 另见 p. 1218-1219
- [139] *J Toxicol Clin: Toxicol* (2001) 39:85-100
- [140] Demicheli 等, (1998) *Vaccine* 16:880-884
- [141] Stepanov 等, (1996) *J Biotechnol* 44:155-160
- [142] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307
- [143] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384
- [144] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326
- [145] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 等, eds., 1987)
Suppl. 30
- [146] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489