



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104717977 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 17

(21) 申请号 201380045555. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 03

A61K 39/09(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/744, 880 2012. 10. 03 US

61/799, 123 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/070656 2013. 10. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/053612 EN 2014. 04. 10

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 G·格兰迪 I·马格里特 伊 若斯

D·迈文

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 沈端

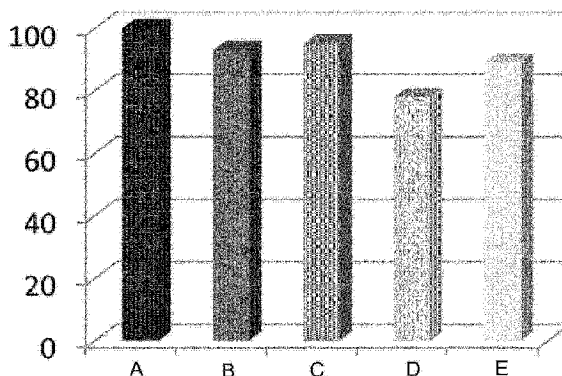
权利要求书2页 说明书25页 附图10页

(54) 发明名称

免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明提供一种免疫原性组合物,其包含:a)与运载体蛋白偶联的GBS血清组 Ia的荚膜糖的偶联物;b)与运载体蛋白偶联的GBS血清组 Ib的荚膜糖的偶联物;c)与运载体蛋白偶联的GBS血清组 III的荚膜糖的偶联物;d)与运载体蛋白偶联的GBS血清组 II的荚膜糖的偶联物;和e)与运载体蛋白偶联的GBS血清组 V的荚膜糖的偶联物。



1. 一种免疫原性组合物,其包含:a)与运载体蛋白偶联的GBS血清组Ia的荚膜糖的偶联物;b)与运载体蛋白偶联的GBS血清组Ib的荚膜糖的偶联物;c)与运载体蛋白偶联的GBS血清组III的荚膜糖的偶联物;d)与运载体蛋白偶联的GBS血清组II的荚膜糖的偶联物;和e)与运载体蛋白偶联的GBS血清组V的荚膜糖的偶联物。

2. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其特征在于,GBS荚膜糖的总量 $\leq 70 \mu\text{g}$ 。

3. 如权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其特征在于,各GBS荚膜糖以每单位剂量 $1 \mu\text{g}$ 至 $30 \mu\text{g}$ 的量存在。

4. 如权利要求3所述的免疫原性组合物,其特征在于,各GBS荚膜糖以每单位剂量 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 或 $20 \mu\text{g}$ 的量存在。

5. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,每单位剂量的所述GBS血清组Ia、Ib、II、V和III的量选自下组: $20 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 和 $20 \mu\text{g}$; $10 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 和 $10 \mu\text{g}$;以及 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 和 $5 \mu\text{g}$ 。

6. 如权利要求5所述的免疫原性组合物,其特征在于,每单位剂量的所述GBS血清型Ia、Ib、II、V和III荚膜糖的量是 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 和 $5 \mu\text{g}$ 。

7. 如权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其特征在于,各GBS荚膜糖以每单位剂量 $0.1 \mu\text{g}$ 至 $5 \mu\text{g}$ 的量存在。

8. 如权利要求7所述的免疫原性组合物,其特征在于,各GBS荚膜糖以每单位剂量 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $2.5 \mu\text{g}$ 或 $5 \mu\text{g}$ 的量存在。

9. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述GBS血清组Ia、Ib、II、V和III荚膜糖的质量比为 $1:1:1:1:1$ 。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物以一个单位剂量给予,然后在给予第一单位剂量3个月后给予第二单位剂量。

11. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物以一个单位剂量给予,然后在给予第一单位剂量1个月后给予第二单位剂量。

12. 如权利要求1-9和11中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物以单剂给予。

13. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物不含铝盐佐剂。

14. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物不含任何佐剂。

15. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,a)、b)、c)、d)和e)中的所述运载体蛋白是白喉类毒素、破伤风类毒素或CRM197。

16. 如权利要求15所述的免疫原性组合物,其特征在于,a)、b)、c)、d)和e)中的所述运载体蛋白是CRM197。

17. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,GBS血清组Ia的荚膜糖具有 $150-300\text{kDa}$ 范围的MW;GBS血清组Ib的荚膜糖具有 $150-300\text{kDa}$ 范围的MW;GBS血清组III的荚膜糖具有 $50-200\text{kDa}$ 范围的MW;GBS血清组II的荚膜糖具有 $150-300\text{kDa}$ 范围的MW;并且GBS血清组V的荚膜糖具有 $150-300\text{kDa}$ 范围的MW。

18. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述与运载体蛋白

偶联的 GBS 血清组 Ia 的荚膜糖的偶联物具有约 1 : 1 至 1 : 2 的糖 : 蛋白比 (w/w) ;所述与运载体蛋白偶联的 GBS 血清组 Ib 的荚膜糖的偶联物具有约 1 : 1 至 1 : 2 的糖 : 蛋白比 (w/w) ;所述与运载体蛋白偶联的 GBS 血清组 II 的荚膜糖的偶联物具有约 1 : 1 至 1 : 2 的糖 : 蛋白比 (w/w) ;所述与运载体蛋白偶联的 GBS 血清组 V 的荚膜糖的偶联物具有约 1 : 1 至 1 : 2 的糖 : 蛋白比 (w/w) ;并且所述与运载体蛋白偶联的 GBS 血清组 III 的荚膜糖的偶联物具有约 3 : 1 至 1 : 1 的糖 : 蛋白比 (w/w) 。

19. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物用于肌肉内给予。

20. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是可注射的液体溶液或悬浮液。

21. 如权利要求 1-19 中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是冻干的。

22. 如权利要求 21 所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含甘露醇以稳定所述偶联物。

23. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含磷酸二氢钾缓冲液。

24. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物包含氯化钠。

25. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物是疫苗。

26. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物对人给予。

27. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物给予选自育龄妇女、妊娠妇女和年老患者的人。

28. 如权利要求 27 所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物给予妊娠妇女。

29. 如权利要求 26-28 中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,在给予之前,所述的人具有检测不到的水平的针对 GBS 血清型 Ia 的荚膜糖、GBS 血清型 Ib 的荚膜糖、GBS 血清型 II 的荚膜糖、GBS 血清型 V 的荚膜糖和 / 或 GBD 血清型 III 的荚膜糖的抗体。

30. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物用作药物。

31. 如权利要求 30 所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述组合物用于预防和 / 或治疗无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 导致的疾病。

32. 如权利要求 31 所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述疾病是新生儿败血症、菌血症、新生儿肺炎、新生儿脑膜炎、子宫内膜炎、骨髓炎或脓毒性关节炎。

免疫原性组合物

技术领域

[0001] 本发明是包含无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 荚膜糖和运载体蛋白的偶联物的免疫原性组合物的领域。所述组合物用于免疫。

背景技术

[0002] 细菌荚膜糖已在抵御有荚膜细菌的疫苗中使用多年。然而,由于糖是 T 非依赖性抗原,它们的免疫原性较弱。与运载体偶联可将 T 非依赖性抗原转化成 T 依赖性抗原,从而增强记忆反应并能发展出保护性免疫。因此,最有效的糖疫苗基于糖偶联物,原型偶联疫苗针对乙型流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) (“Hib”)[例如见 Vaccines(《疫苗》)(2004)Plotkin 和 Orenstein 编. ISBN 0-7216-9688-0 的第 14 章]。

[0003] 其偶联物疫苗已有描述的另一细菌是无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*),也称作“B 组链球菌”,或简单称作“GBS”。Dennis Kasper 及其同事进行了许多这方面的工作,在例如参考文献 1-9 中进行了描述。已显示 GBS 血清型 Ia、Ib、II、III 和 V 各自的偶联疫苗在人体中安全且具有免疫原性 [10 和 11]。然而,这些仍然需要进一步和改善的 GBS 偶联物疫苗。

发明内容

[0004] 本发明提供一种免疫原性组合物,其包含 :i) 与运载体蛋白偶联的来自 GBS 血清型 Ia 的荚膜糖 ;ii) 与运载体蛋白偶联的来自 GBS 血清型 Ib 的荚膜糖 ;iii) 与运载体蛋白偶联的来自 GBS 血清型 III 的荚膜糖 ;iv) 与运载体蛋白偶联的来自 GBS 血清型 V 的荚膜糖 ;和 v) 与运载体蛋白偶联的来自 GBS 血清型 II 的荚膜糖。

[0005] 通常,免疫原性组合物不会包含除了特别提到的那些以外的任何偶联物,特别是含有来自除了特别提到的那些 GBS 血清型以外的荚膜糖的偶联物。然而,在一些实施方式中,所述组合物可以包含其他偶联物,包括含有其他 GBS 血清型的荚膜糖的偶联物。例如,所述组合物可以包含与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 VI 的荚膜糖的偶联物。在另一种可能中,所述组合物可包含与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 VIII 的荚膜糖的偶联物。

[0006] 上述免疫原性组合物每单位剂量可以包含任何合适量的荚膜糖。合适量的荚膜糖可以是每单位剂量 0.1 μ g-50 μ g。通常,各 GBS 荚膜糖存在的量是 1 μ g-30 μ g,例如 2 μ g-25 μ g,并且特别是 5 μ g-20 μ g。合适量的荚膜糖可以包括每单位剂量 5、10 和 20 μ g。

[0007] 可以进一步使每单位剂量的荚膜糖的量最小化。具体而言,合适量的荚膜糖可以是 0.1-5 μ g/单位剂量。因此,各 GBS 荚膜糖通常可以 0.1-5 μ g,如 0.5、2.5 或 5 μ g/单位剂量的量存在。例如,各 GBS 荚膜糖可以 0.5-5 μ g、1-4 μ g、2-3 μ g 或约 2.5 μ g/单位剂量的量存在。

[0008] 在所述免疫原性组合物包含超过一种偶联物的上述实施方式中,给定荚膜糖的质量与其他荚膜糖的质量的比率可以变化。然而,GBS 血清型 Ia、Ib、II、III 和 V 荚膜糖的质量比一般为 1 : 1 : 1 : 1。

[0009] 下面讨论给予本发明的免疫原性组合物的方法。简而言之,本发明的免疫原性组合合物可以单剂或多剂给予。给予单剂本发明免疫原性组合合物是有效的。因此本发明优选给予单剂,特别是对这些实施方式而言。

[0010] 或者,一个单位剂量后接第二个单位剂量可以是有效的。通常,所述第二(或第三、第四、第五等)单位剂量与第一单位剂量相同。所述第二单位剂量可以在第一单位剂量后的任何合适时间给予,具体是1、2或3个月后。例如,第二单位剂量可在给予第一单位剂量3个月后给予。在另一个示例中,第二单位剂量可在给予第一单位剂量1个月后给予。通常,肌肉内给予本发明的免疫原性组合物,如下文所述肌肉内给予到大腿或上臂。

[0011] 如下所述,本发明免疫原性组合物可以包含一种或多种佐剂。然而,使用未佐剂化的组合物也可以是有效的。可能有益的是,省去佐剂以降低潜在毒性。因此,本发明优选使用不包含任何佐剂(特别不包含任何铝盐佐剂)的免疫原性组合物,特别对这些实施方式而言。

[0012] 荚膜糖

[0013] 本发明基于无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的荚膜糖。所述荚膜糖共价连接到GBS的肽聚糖骨架上,并且与B组抗原不同,B组抗原是连接到肽聚糖骨架上的另一种糖。

[0014] 所述GBS荚膜糖在化学上相关,但是在抗原性的观点上非常不同。所有GBS荚膜多糖共有以下三糖核心:

[0015] β -D-GlcpNAc(1 → 3) β -D-Galp(1 → 4) β -D-Glcp

[0016] 各种GBS血清型的区别在于修饰其核心的方式。例如,血清型Ia和III的区别在于,核心中采用GlcNAc(Ia)还是Gal(III)来连接连续的三糖核心。血清型Ia和Ib的核心中都具有与GlcNAc相连的[α -D-NeupNAc(2 → 3) β -D-Galp-(1 →)]二糖,只是连接键是1 → 4(Ia)或1 → 3(Ib)。

[0017] GBS-相关疾病主要是由血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII引起,超过85%是由以下五种血清型引起的:Ia、Ib、III和V。本发明优选使用来自这四种血清型中一种或多种的糖,特别是来自血清型Ia、Ib和III中的一种或多种。这4种血清型的荚膜糖各包括:(a)末端N-乙酰基-神经氨酸(NeuNAc)残基(一般称为唾液酸),在所有情况下2 → 3连接至半乳糖残基;和(b)三糖核心内的N-乙酰基-葡糖胺残基(GlcNAc)。

[0018] 所有四种糖包含所述三糖核心中的半乳糖残基,但是血清型Ia、Ib、II和III也包含各重复单位中的其他半乳糖残基。

[0019] 相对于与天然情况下发现的荚膜糖,可对该糖进行化学修饰。例如,糖可被去-O-乙酰化(部分或全部)、去-N-乙酰化(部分或全部)、N-丙酸酯化(部分或全部)等。可在偶联之前、期间或之后进行去乙酰化,但优选在偶联前进行。根据具体的糖,去乙酰化可能会影响或不影响免疫原性。参考文献12讨论了各种血清型中GBS糖上O-乙酰化的相关性,且在一些实施方式中,第7、8和/或9位的唾液酸残基的O-乙酰化在偶联前、期间和之后都保留,例如通过保护/去保护、通过再乙酰化等。然而,本发明所用的GBS糖通常在第7、8和/或9位处基本没有唾液酸残基的O-乙酰化。特别地,当所述GBS糖通过下述碱提取纯化时,那么通常丧失O乙酰化(参考文献12)。可用常规实验评价去乙酰化等的影响。可如参考文献13和14所述对血清型V荚膜糖进行修饰。例如,可以使用如参考文

献 13 和 14 所述已经基本上脱唾液酸化的血清型 V 荚膜糖。脱唾液酸化的 GBS 血清型 V 荚膜糖可通过以下方式制备：在温和酸性条件下（例如 0.1M 硫酸，80℃ 持续 60 分钟）处理纯化的 GBS 血清型 V 荚膜糖或者用神经氨酸酶处理，如参考文献 13 所述。一种优选的制备脱唾液酸化 GBS 血清型 V 荚膜糖的方法是在 81℃ +/-3℃ 用 1M 乙酸处理纯化的糖 2 小时。

[0020] 具体地，GBS 血清型 V 荚膜多糖的唾液酸氧化程度低于 40%、低于 25%、低于 20%、低于 17%、低于 15%、低于 10%，例如，约 12%、约 9%、约 8%、约 7%。具体地，当与天然 GBS 血清型 V 荚膜多糖比较（其中 NeuNAc 含量被认为是约 100%）时，GBS 血清型 V 荚膜多糖的 N-乙酰基神经氨酸（NeuNAc 或唾液酸）含量超过 50%、超过 60%、超过 70%、超过 75%、超过 80%、超过 85%、超过 90%、超过 95%。具体地，GBS 血清型 V 多糖是完全唾液酸化的或是“天然多糖”。例如，当与天然 GBS 血清型 V 多糖比较时，唾液酸含量为约 100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、约 90%（或这些数值之间的任意范围）。具体地，V 型多糖含摩尔比为 3 : 2 : 1 : 1 的 D-葡萄糖、D-半乳糖、2-乙酰氨基-2-脱氧-葡萄糖和唾液酸。

[0021] 本发明所用的糖可以是如天然发现的基本全长的荚膜多糖，或可短于天然长度。可解聚全长多糖以提供用于本发明的较短片段，例如，通过在温和酸中水解、通过加热、通过尺寸层析等。已有报道称，链长影响 GBS 糖在兔子中的免疫原性 [4]。特别地，本发明使用的所述血清型 II 和 / 或 III 荚膜糖可以如参考文献 15 和 16 所述进行解聚。这些文献描述了通过温和和去氨基切割为含还原末端 2,5-脱水-D-甘露糖残基的抗原片段来部分解聚 II 型和 III 型荚膜糖。简单说，使所述荚膜糖溶解于 0.5N NaOH 中，随后加热到 70℃ 约 1-4 小时。这个培育长度控制解聚程度，后者可由标准方法（如由参考文献 15 所述的 HPLC）测定。所述样品在冰水浴中冷却，然后加入冰醋酸将 pH 调到 4。然后，通过加入 5% (wt/vol) NaNO₂ 在 4℃ 搅拌 2h 来使部分 N-脱酰化的产物脱氨。如下所述，所述新形成的 2,5-脱水-D-甘露糖残基的游离醛可以用于偶联运载体蛋白。

[0022] 已经报道了用内-β-半乳糖苷酶解聚血清型 III 荚膜糖 [参考文献 1 和 4-6]，包括采用所述解聚材料与破伤风类毒素运载体形成偶联物。来自 GBS 血清型 III 和 VIII 荚膜多糖的臭氧分解也已被用于解聚 [17]。优选使用 MW > 30kDa 的糖，并且可采用基本全长的荚膜多糖。对血清型 Ia 而言，优选使用 MW 范围为 150-300kDa 的多糖，特别是 175-275kDa。通常，使用 MW 约 200kDa 或约 260kDa 的血清型 Ia 糖。对血清型 Ib 而言，优选使用 MW 范围为 150-300kDa 的多糖，特别是 175-250kDa。通常，使用 MW 约 200kDa 或约 230kDa 的血清型 Ib 糖。对血清型 III 而言，优选使用 MW 为 50-200kDa，特别是 80-150kDa 的多糖。通常，使用 MW 约 100kDa 或约 140kDa 的血清型 III 糖。对血清型 V 而言，也优选使用 MW 多至约 50kDa 的多糖。通常，使用 MW 约 100kDa 的血清型 V 糖。这些分子量可通过凝胶过滤相对于葡聚糖标准品，如购自 PSS 公司 (Polymer Standard Service) 的标准品测定 [18]。

[0023] 可通过已知技术例如本文引用的参考文献（如参考文献 2 和 19）所述来纯化荚膜糖。典型的方法包括碱提取、离心、过滤、RNA 酶 / DNA 酶处理、蛋白酶处理、浓缩、尺寸排阻层析、超滤、阴离子交换层析和进一步超滤。也使用酶变溶菌素处理 GBS 细胞，酶变溶菌素剪切细菌细胞壁以释放所述细胞壁的成分。

[0024] 作为替代，可使用参考文献 20 所述的纯化过程。这涉及碱提取、乙醇 / CaCl₂ 处理、CTAB 沉淀和再溶。参考文献 21 中记载了另一种替代方法。

[0025] 本发明不限于纯化自天然来源的糖,然而,可通过其它方法如全合成或部分合成获得所述糖。

[0026] 偶联

[0027] 本发明采用的偶联物是各自与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 Ia、Ib、II、III 和 V 的荚膜糖。一般地,糖与运载体的共价偶联增强糖的免疫原性,因为这将糖由 T 非依赖性抗原转变为 T- 依赖性抗原,由此能够引发免疫记忆。偶联对于儿科疫苗特别有用 [例如参考文献 22],而且是公知技术 [例如在参考文献 23-31 中综述的]。因此,本发明的方法可包括将经纯化糖与运载体分子偶联的其他步骤。

[0028] 已广泛报道 GBS 糖的偶联,例如参见参考文献 1。尽管多糖具有免疫原性,多糖与运载体蛋白的偶联能够促进或加强免疫原性。因此,本文所用的术语“运载体”指的是一种免疫原性物质,当其与抗原(例如多糖)偶联并给予动物时,将诱导或加强该动物中的免疫应答,尤其是保护性免疫应答,并且引发产生特异性结合所述抗原(例如上述多糖)的抗体。GBS 糖偶联的典型现有技术方法通常涉及将纯化的糖还原性胺化到运载体蛋白,例如破伤风类毒素(TT)或 CRM197[2]。还原胺化涉及运载体氨基酸侧链上的胺基与糖上的醛基。由于 GBS 荚膜糖在其天然形式中不包括醛基,因此,通常在偶联之前通过氧化(如高碘酸盐氧化)一部分(如 5-40%,特别 10-30%,优选约 20%)糖唾液酸残基而产生醛基 [2, 32]。已显示此方法制备的偶联疫苗就各 GBS 血清型 Ia、Ib、II、III 和 V 而言在人体中安全且具有免疫原性 [10]。通常,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的所有偶联物。然而,当本发明使用脱唾液酸化的血清型 V 荚膜糖时,可在偶联前通过氧化(如高碘酸盐氧化)该糖的部分(如 5-40%,特别 10-30%,优选约 20%)半乳糖残基来在这种糖中生成醛基 [14]。一个替代的偶联方法涉及使用糖中的 $-NH_2$ 基团(来自去 N-乙酰化或在引入胺后)以及双功能接头,如参考文献 33 中所述。在这些实施方式中,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的一种或多种偶联物。参考文献 15 和 16 中记载了另一种替代方法。在这个方法中,II 型或 III 型荚膜糖通过温和去氨基切割解聚所产生的末端 2,5-脱水-D-甘露糖残基的游离醛基被用于通过还原性氨化进行偶联。在一些实施方式中,以这种方式制备本发明所述免疫原性组合物中的一种或多种偶联物。

[0029] 本发明包括使用运载体分子,它们一般是蛋白质。有用的运载体蛋白包含细菌毒素或类毒素,如白喉毒素或破伤风类毒素。还可使用毒素或类毒素的片段,例如破伤风类毒素的片段 C[34]。

[0030] 白喉毒素的 CRM197 突变体 [35-37] 是用于本发明的特别有用的运载体。交叉反应物质(CRM197)是白喉毒素的遗传性脱毒化制剂。CRM197 与白喉毒素(DT)仅有单个氨基酸差异,因而与 DT 具有高度交叉反应性(CRM = 交叉反应物质)。白喉毒素的该突变体并不需要用甲醛脱毒,并且能够容易地获得纯化抗原的均匀制备物,例如,来自酪蛋白氨基酸和酵母提取物培养基中生长的白喉棒状杆菌菌株 C7(β 197)的培养物。或者,可根据 US5,614,382 重组制备 CRM197。CRM197 是经许可用于人类应用的用于若干荚膜多糖抗原的运载体蛋白,并且是通过甲醛处理制备的传统白喉类毒素的可能的替代物。

[0031] 其他合适的运载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌(*N. meningitidis*)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]、人血清白蛋白(优选是重组的)、包含多种来自各种病原体衍生抗

原的人 CD4⁺T 细胞表位的人工蛋白 [46] 例如 N19 [47]、来自流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) 的蛋白 D [48, 49]、肺炎球菌表面蛋白 PspA [50]、肺炎球菌溶血素 [51]、摄铁蛋白 [52]、来自艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A 或 B [53]、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 胞外蛋白 A (rEPA) [54] 等。

[0032] 优选通过在例如运载体蛋白中赖氨酸残基侧链或精氨酸残基侧链或在 N 末端的 -NH₂ 基团与运载体连接。也可通过 -SH 基团, 如半胱氨酸残基侧链中的 -SH 基团连接。

[0033] 可以使用多于一种的运载体蛋白, 以例如降低运载体抑制的风险。因此, 不同的运载体蛋白可用于不同的 GBS 血清型, 如血清型 Ia 糖可以偶联至 CRM197, 而血清型 Ib 糖可以偶联至破伤风类毒素。具体地, 血清型 Ia、Ib 和 III 糖可与第一运载体如 CRM197 偶联, 而血清型 II 和 V 糖可与第二 (不同) 运载体如破伤风类毒素 (-TT) 偶联。更具体地, 血清型 Ia、Ib、III 和 V 糖可与第一运载体如 CRM197 偶联, 而血清型 II 糖可与第二 (不同) 运载体如 -TT 偶联。

[0034] 本发明的示例性免疫原性组合物包含 a) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ia 的荚膜糖的偶联物 ; b) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ib 的荚膜糖的偶联物 ; c) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 III 的荚膜糖的偶联物 ; d) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 II 的荚膜糖的偶联物 ; 和 e) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 V 的荚膜糖的偶联物。本发明的另一个示例性免疫原性组合物包含 a) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ia 的荚膜糖的偶联物 ; b) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ib 的荚膜糖的偶联物 ; c) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 III 的荚膜糖的偶联物 ; d) 与破伤风类毒素偶联的 GBS 血清组 II 的荚膜糖的偶联物 ; 和 e) 与破伤风类毒素偶联的 GBS 血清组 V 的荚膜糖的偶联物。本发明的另一个示例性免疫原性组合物包含 a) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ia 的荚膜糖的偶联物 ; b) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ib 的荚膜糖的偶联物 ; c) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 III 的荚膜糖的偶联物 ; d) 与破伤风类毒素偶联的 GBS 血清组 II 的荚膜糖的偶联物 ; 和 e) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 V 的荚膜糖的偶联物。本发明的另一个示例性免疫原性组合物包含 a) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ia 的荚膜糖的偶联物 ; b) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 Ib 的荚膜糖的偶联物 ; c) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 III 的荚膜糖的偶联物 ; d) 与 CRM197 偶联的 GBS 血清组 II 的荚膜糖的偶联物 ; 和 e) 与破伤风类毒素偶联的 GBS 血清组 V 的荚膜糖的偶联物。也可以对特定糖抗原使用多于一种的运载体蛋白, 例如血清型 III 糖可以分为两组, 一些偶联于 CRM197 且其它偶联于破伤风类毒素。然而, 通常优选所有糖使用同一种运载体蛋白。

[0035] 单个运载体蛋白可携带一种以上的糖抗原 [55, 56]。例如, 单个运载体蛋白可以偶联于来自血清型 Ia 和 Ib 的糖。为了实现这一目的, 可以在偶联反应之前混合不同糖。然而, 通常优选使各血清组具有各自的偶联物, 并在偶联之后混合不同的糖。各偶联物可基于同一运载体。

[0036] 通常使用糖 : 蛋白质之比 (w/w) 为 1 : 5 (即蛋白质过量) 至 5 : 1 (即糖过量) 的偶联物, 特别是比率 1 : 5 至 2 : 1。对于与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 Ia 的荚膜糖的偶联物, 糖 : 蛋白质的比率 (w/w) 通常是约 1 : 1 至 1 : 2, 特别是约 1 : 1.3。对于与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 Ib 的荚膜糖的偶联物, 该比率通常是约 1 : 1 至 1 : 2, 特别是约 1 : 1.3。对于与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 III 的荚膜糖, 糖 : 蛋白质的比率 (w/w) 通常是约 3 : 1 至 1 : 1, 特别是约 2 : 1。然而也可使用糖 : 蛋白质比率 (w/w) 约

1 : 1-1 : 5(特别是约 1 : 3.3) 的运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 III。对于与运载体蛋白偶联的 GBS 血清型 V 的荚膜糖的偶联物, 该比率通常是约 2 : 1 至 1 : 1, 特别是约 1.1 : 1。因此通常糖过量, 特别对更长的糖链而言。

[0037] 如果使用脱唾液酸化的 GBS 血清型 V 多糖, 则特别使用不同水平的多糖与蛋白质交联。例如, 通过改变蛋白-多糖比率来调节交联的水平。具体地, 糖: 蛋白质比 (w/w) 低于 1 : 1.5、低于 1 : 1、低于或约为 1 : 0.5。

[0038] 组合物可包含少量游离的运载体 [57]。当给定运载体蛋白在本发明组合物中以游离和偶联形式存在时, 未偶联形式优选整体上不多于组合物中运载体蛋白总量的 5%, 更优选以少于 2% 重量存在。

[0039] 偶联后, 可将游离和偶联的糖分开。有许多合适的方法, 包括疏水色谱、切向超滤、透析等 [也参见参考文献 58 和 59 等]。参考文献 60 中记载了优选方法。

[0040] 若本发明组合物包含解聚寡糖, 优选在偶联前进行解聚。

[0041] 药学方法和应用

[0042] 本发明的免疫原性组合物还包含药学可接受的运载体。通常“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代谢慢的大分子, 如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖 [61]、海藻糖 [62]、乳糖和脂质聚集体 (如油滴或脂质体)。这类运载体为本领域普通技术人员熟知。疫苗也可含有稀释剂, 如水、盐水、甘油等。此外, 也可存在辅助剂, 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一种典型运载体。药学上可接受的赋形剂的全面讨论参见参考文献 63。

[0043] 本发明组合物可以是水性形式 (即溶液或悬浮液) 或干燥形式 (如冻干)。如果使用干燥的疫苗, 则在注射前将其在液体介质中重建。冻干偶联物疫苗为本领域已知, 如 Menjugate™ 产物以冻干形式存在。当本发明免疫原性组合物包括含有来自多于一种 GBS 血清型的荚膜糖的偶联物时, 对偶联物通常单独制备、混合和然后冻干。这种方式中, 可以制备包含两种、三种或四种等本文所述偶联物的冻干组合物。为了在冻干过程中稳定偶联物, 优选可以在组合物中加入例如 1mg/ml-30mg/ml (如约 25mg/ml) 的糖醇 (如甘露醇) 和/或二糖 (如蔗糖或海藻糖)。推荐使用蔗糖作为 GBS 偶联物疫苗的稳定剂 (参考文献 64)。然而, 本发明的稳定剂通常是甘露醇。当干燥疫苗在注射前于液体介质中重建时, 残留甘露醇的浓度通常是约 2-20mg/ml, 如 3.75mg/ml、7.5mg/ml 或 15mg/ml。使用甘露醇是有优势的, 因为甘露醇在化学上不同于 GBS 荚膜糖的单糖亚基。这意味着检测荚膜糖 (例如质量控制分析) 能基于没有甘露醇干扰的糖亚基存在。相反, 稳定剂如蔗糖包含葡萄糖, 可以干扰糖中葡萄糖亚基的检测。

[0044] 组合物可装在药瓶中, 或者可装在填充好的注射器中。注射器可装有或未装有针头。注射器可包含一剂组合物量, 而小瓶可包含一剂或多剂。

[0045] 本发明的水性组合物也适用于从冻干形式重建其它疫苗。本发明组合物用于所述临用前重建时, 本发明提供药盒, 其可包括两个药瓶, 或可包括一个已填充注射器和一个药瓶, 其中在注射前用所述注射器的内容物再活化药瓶的内容物。

[0046] 本发明组合物可以包装成单位剂型或多剂型。就多剂型而言, 与预填充注射器相比更优选药瓶。可用常规方法确定有效剂量体积, 但组合物的人用注射剂量一般为 0.5ml

体积,例如用于肌肉注射时。

[0047] 所述组合物的 pH 优选为 6-8, 优选约 7。可使用缓冲剂来维持稳定的 pH。本发明的免疫原性组合物通常包含磷酸二氢钾缓冲液。所述磷酸二氢钾缓冲液可以包含约 1-10mM 磷酸二氢钾, 如 1.25mM、2.5mM 或 5.0mM。如果组合物包含氢氧化铝盐, 则优选采用组氨酸缓冲液 [65]。所述组合物可以是无菌和 / 或无热原的。本发明的组合物可以与人体等张。

[0048] 本发明组合物有免疫原性, 更优选是疫苗组合物。本发明的疫苗可以是预防性 (即预防感染) 或治疗性 (即治疗感染) 疫苗, 但通常是预防性疫苗。本发明组合物有免疫原性, 更优选是疫苗组合物。本发明疫苗可以是预防性 (即预防感染) 或治疗性 (即治疗感染) 疫苗, 但一般是预防性疫苗。预防性疫苗不保证完全保护不患疾病, 因为即便患者发展出抗体, 在免疫系统能够击退感染之前也有滞后和延迟。因此, 为了避免疑问, 术语预防性疫苗还可指改善未来感染的影响的疫苗, 例如, 通过降低此类感染的严重性或缩短感染时间。术语“针对感染的保护”和 / 或“提供保护性免疫力”指的是对象的免疫系统已经预先准备好 (例如, 通过疫苗接种) 触发免疫应答并击退感染。具体而言, 被触发的免疫应答能够击退针对大量病原体, 例如不同细菌菌株的感染。因此, 经疫苗接种的对象可能被感染, 但能够比对照对象更好地击退该感染。

[0049] 用作疫苗的免疫原性组合物包含免疫有效量的抗原, 以及需要的任何其它组分。“免疫学有效量”是指以一剂或多剂中的一部分给予个体的对治疗或预防有效的量。一般而言, 所需的结果是产生抗原 (例如病原体)- 特异性免疫应答, 该免疫应答能够保护对象抵抗该病原体。该量根据所治疗个体的健康和身体状况、年龄、所治疗个体的分类组 (例如, 非人的灵长动物、灵长动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗配方、治疗医生对医学情况的评估和其它相关因素而变化。预计所述量将落入可通过常规试验可确定的相对较宽范围内。

[0050] 在各剂量内, 单个糖抗原的量通常是 0.1-50 μ g (以糖质量计), 具体是 1-50 μ g 或 0.5-25 μ g, 更具体是 2.5-7.5 μ g, 如约 1 μ g、约 2.5 μ g、约 5 μ g、约 10 μ g、约 15 μ g、约 20 μ g 或约 25 μ g。在各剂量内, GBS 荚膜糖的总量通常 \leq 70 μ g (以糖质量计), 如 \leq 60 μ g。具体而言, 所述总量可以是 \leq 40 μ g (如 \leq 30 μ g) 或 \leq 20 μ g (如 \leq 15 μ g)。本发明中优选使用这些总量。每单位剂量的荚膜糖总量减小可能有利于降低可能的毒性。因此, 优选总量 \leq 20 μ g, 如 \leq 15 μ g、 \leq 7.5 μ g 或 \leq 1.5 μ g。

[0051] GBS 影响身体的各个部分, 因此本发明的组合物可以制备成各种形式。例如, 可将所述组合物制备为液体溶液或悬浮液形式的注射剂。所述组合物可以制备成使用细粉或喷雾的肺部给药制剂, 例如吸入剂。所述组合物可制备为栓剂或子宫托。该组合物可制备成用于鼻腔、耳内或眼部给药的制剂, 例如喷雾剂、滴剂、凝胶剂或粉末剂 [如参考文献 66 和 67]。已报道成功地经鼻给予肺炎球菌糖 [68, 69]、Hib 糖 [70]、MenC 糖 [71] 和 Hib 与 MenC 糖偶联物的混合物 [72]。

[0052] 本发明的组合物也可与 aP/wP、TT、DT 和 / 或 IPV 抗原结合, 即非细胞百日咳抗原, 例如百日咳丝状血凝素 (FHA)、百日咳杆菌粘附素 (PRN, 69K-OMP)、百日咳菌毛 (FIM)、或细胞百日咳抗原、全细胞百日咳抗原、百日咳类毒素或百日咳毒素 (PT)、破伤风类毒素、白喉类毒素和 / 或灭活的脊髓灰质炎病毒抗原。例如, 这可通过将本发明的组合物与已经市售的制剂, 包括 ANATETALL®、DIFTETALL®、PENTACEL® 或 DAPTACEL®

组合来进行。

[0053] 本发明组合可包含抗微生物剂,特别是以多剂量形式包装时。

[0054] 本发明组合可包含去污剂,如吐温(聚山梨酯),如吐温 80。去污剂的含量水平通常较低,如 $< 0.01\%$ 。

[0055] 本发明组合可含有钠盐(如氯化钠)以产生张力。 NaCl 浓度通常为 $10 \pm 2\text{mg/ml}$ 。在一些实施方式中,可以使用浓度为 $4\text{--}10\text{mg/ml}$ 的 NaCl ,如 9.0 、 7.0 、 6.75 或 4.5mg/ml 。

[0056] 本发明组合通常包括缓冲剂。一般是磷酸盐缓冲剂。

[0057] 本发明组合可与其它免疫调节剂联用。具体说,组合包括一种或多种佐剂。这类佐剂包括但不限于:

[0058] A. 含有矿物质的组合

[0059] 适用作本发明佐剂的含有矿物质的组合包括矿物盐,例如铝盐和钙盐(或其混合物)。钙盐包括磷酸钙(如参考文献 73 公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等,所述盐可采用任何合适形式(例如凝胶、结晶、非晶态形式等)。优选吸附于这些盐。也可将含有矿物质的组合制成金属盐的颗粒 [74]。

[0060] 可采用称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规名称,但仅为方便使用,因为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 75 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”佐剂。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)。称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝,也常常含有少量硫酸盐(即羟基磷酸硫酸铝)。它们可通过沉淀获得,沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中羟基的程度。

[0061] 氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态(例如电子透射显微照片所见的)。氢氧化铝佐剂的 pI 通常约 11,即在生理 pH 下佐剂本身具有表面正电荷。据报道,在 $\text{pH } 7.4$ 时,氢氧化铝佐剂的吸附能力为 $1.8\text{--}2.6\text{mg 蛋白质/mg Al}^{+++}$ 。

[0062] 磷酸铝佐剂的 PO_4/Al 摩尔比通常为 $0.3\text{--}1.2$,优选 $0.8\text{--}1.2$,更优选 0.95 ± 0.1 。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 $0.84\text{--}0.92$ 的无定形羟基磷酸铝,包含 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 。磷酸铝通常是颗粒(如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态)。抗原吸附后颗粒直径一般是 $0.5\text{--}20\ \mu\text{m}$ (如约 $5\text{--}10\ \mu\text{m}$)。据报道, $\text{pH } 7.4$ 时磷酸铝佐剂的吸附容量为 $0.7\text{--}1.5\text{mg 蛋白质/mg Al}^{+++}$ 。

[0063] 磷酸铝的零电点(PZC)与磷酸根取代羟基的程度逆相关,且这种取代程度可根据用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度而变化。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)来改变 PZC。本发明所用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0 至 7.0 ,更优选为 5.0 至 6.5 ,例如约为 5.7 。

[0064] 用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以但不必需含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或 Tris 缓冲液)。优选所述悬浮液是无菌且无热原的。悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子,如存在浓度为 $1.0\text{--}20\text{mM}$,优选 $5\text{--}15\text{mM}$,更优选约 10mM 。所述悬浮液也可含有氯化钠。

[0065] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。在这种情况下,磷酸铝比氢氧化铝多,例如重量比为至少 $2 : 1$,例如 $\geq 5 : 1$ 、 $\geq 6 : 1$ 、 $\geq 7 : 1$ 、 $\geq 8 : 1$ 、 $\geq 9 : 1$ 等。

[0066] 给予患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选小于 10mg/ml, 例如 $\leq 5\text{mg/ml}$ 、 $\leq 4\text{mg/ml}$ 、 $\leq 3\text{mg/ml}$ 、 $\leq 2\text{mg/ml}$ 、 $\leq 1\text{mg/ml}$ 等。优选的范围是 0.3 至 1mg/ml。优选最大值 0.85mg/剂 量。

[0067] 典型的佐剂磷酸铝佐剂是无定形羟基磷酸铝, PO_4/Al 摩尔比为 0.84-0.92, 包括约 0.6mg Al^{3+}/ml 。可采用低剂量磷酸铝吸附, 如每剂量 50-100 μg Al^{3+} / 偶联物。

[0068] B. 油乳剂

[0069] 适合用作本发明佐剂的油乳剂组合物包含鲨烯-水乳剂, 如 MF59 (5% 鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% 司盘 85, 用微流化床配制成亚微米颗粒) [参考文献 75 的第 10 章; 也参见参考文献 76-78]。将 MF59 用作 FLUAD™ 流感病毒三价亚单位疫苗的佐剂。

[0070] 用于组合物的特别优选的佐剂是亚微米水包油乳液。本文所用的优选亚微米水包油乳剂是任选地含有各种含量的 MTP-PE 鲨烯/水乳剂, 如含有 4-5% w/v 鲨烯、0.25-1.0% w/v 吐温 80 (聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯) 和 / 或 0.25-1.0% 司盘 85 (山梨聚糖三油酸酯), 以及任选的 N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰基-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) 的亚微米水包油乳剂。参考文献 76 和 79-80 详细描述了亚微米水包油乳剂、其制备方法和免疫刺激剂 (如胞壁酰肽) 在本发明组合物中的应用。

[0071] 也可将完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA) 用作本发明中的佐剂。

[0072] C. 皂苷制剂 [参考文献 75 的第 22 章]

[0073] 皂苷制剂也可以用作本发明的佐剂。皂苷是在许多种类植物的树皮、叶、茎干、根甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。已广泛研究了作为佐剂的分离自皂树 (*Quillaja saponaria*) Molina 树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜 (*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。

[0074] 已采用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定纯化组分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。所述皂苷优选 QS21。制备 QS21 的方法参见参考文献 81。皂苷制剂也可以包含甾醇, 如胆固醇 [82]。

[0075] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒 [参考文献 75 的第 23 章]。ISCOM 通常还包含磷脂, 如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任意已知的皂苷均可用于 ISCOM 中。ISCOM 优选包含 QuilA、QHA 和 QHC 中的一种或多种。参考文献 82-84 中进一步描述了 ISCOM。任选地, ISCOM 可不含其它去污剂 [85]。

[0076] 关于开发基于皂苷的佐剂的综述可以参见参考文献 86 和 87。

[0077] D. 病毒小体和病毒样颗粒

[0078] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也可以用作本发明的佐剂。这些结构通常包含任选与磷脂组合或一起配制的一种或多种病毒蛋白质。其通常无病原性, 非复制型, 且通常不含任意天然病毒基因组。所述病毒蛋白可重组生成或分离自全病毒。这些适用于病毒体或 VLP 的病毒蛋白包括衍生自流感病毒 (例如 HA 或 NA)、乙肝病毒 (例如核心蛋白或衣壳蛋白)、戊肝病毒、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、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、Q β -噬菌体 (如外壳蛋白)、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 在参考文献 88-93 中有进一步描

述。病毒体在例如参考文献 94 中有进一步描述。

[0079] E. 细菌或微生物衍生物

[0080] 适用于本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物,如肠细菌的脂多糖(LPS)的无毒衍生物、脂质 A 衍生物、免疫刺激性寡核苷酸和 ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物。

[0081] LPS 的无毒衍生物包括单磷酸脂质 A(MPL) 和 3-O-脱酰基 MPL(3dMPL)。3dMPL 是 3 脱-O-酰基单磷酸脂质 A 与 4、5 或 6 条酰化链的混合物。

[0082] 3 脱-O-酰基单磷酸脂质 A 的优选“小颗粒”形式见参考文献 95 中所述。3dMPL 的这种“小颗粒”小到足以在过滤除菌时通过 0.22 μm 膜 [95]。其它无毒 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物,如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸盐衍生物,例如 RC-529 [96, 97]。

[0083] 脂质 A 衍生物包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 如 OM-174 的脂质 A 衍生物。例如参考文献 98 和 99 中描述了 OM-174。

[0084] 适用作本发明佐剂的免疫刺激性寡核苷酸包括含 CpG 基序的核苷酸序列(含有通过磷酸键与鸟苷连接的非甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)。含回文或聚(dG)序列的双链 RNA 和寡核苷酸也显示具有免疫刺激作用。

[0085] CpG 可以包含核苷酸修饰/类似物如硫代磷酸酯修饰,且可以是双链或单链。参考文献 100、101 和 102 公开了可能的类似物取代,例如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献 103-108 中进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂作用。

[0086] 所述 CpG 序列可以导向 TLR9, 例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT [109]。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫反应, 如 CpG-A ODN, 或更特异地诱导 B 细胞反应, 如 CpG-B ODN。参考文献 110-111 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。优选 CpG 为 CpG-A ODN。

[0087] 优选构建 CpG 寡核苷酸从而 5' 末端可被受体识别。任选将两个 CpG 寡核苷酸序列的 3' 端相连接形成“免疫聚体”。

[0088] 参见例如, 参考文献 109 和 113-115。

[0089] 细菌 ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物可以用作本发明的佐剂。优选所述蛋白衍生自大肠杆菌(大肠杆菌不耐热肠毒素“LT”)、霍乱菌(“CT”)或百日咳菌(“PT”)。参考文献 116 中描述了将脱毒的 ADP-核糖基化毒素用作粘膜佐剂, 参考文献 117 中描述了将其用作胃肠道外佐剂。所述毒素或类毒素优选全毒素形式, 包含 A 和 B 亚基。A 亚基优选含有脱毒突变; B 亚基优选不突变。佐剂优选脱毒的 LT 突变体如 LT-K63、LT-R72 和 LT-G192。参考文献 118-125 中描述了 ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物, 特别是 LT-K63 和 LT-R72 作为佐剂的用途。优选根据参考文献 73 中提出的 ADP-核糖基化毒素的 A 和 B 亚基的排列对比对氨基酸取代基编号 1, 该参考文献的全部内容特别纳入本文作为参考。

[0090] F. 人免疫调节剂

[0091] 适合用作本发明佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子, 如白介素(如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 [127] 等) [128], 干扰素(如干扰素-γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0092] G. 生物粘着剂和粘膜粘着剂

[0093] 生物粘着剂和粘膜粘着剂也可以用作本发明的佐剂。合适的生物粘着剂包括酯化透明质酸微球 [129] 或粘膜粘着剂, 如聚(丙烯酸)交联衍生物、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素。壳聚糖及其衍生物也可以用作本发明的佐剂 [130]。

[0094] H. 微粒

[0095] 微粒也可以用作本发明的佐剂。微粒（即直径约 100nm 至约 150 μm，更优选约 200nm 至约 30 μm，最优选约 500nm 至约 10 μm 的颗粒）由生物可降解的无毒材料（例如聚（α-羟酸）、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己内酯等）形成，优选聚（丙交酯-共-乙交酯共聚物），并任选经处理而具有带负电荷的表面（例如用 SDS 处理）或带正电荷的表面（例如用阳离子去污剂处理，如 CTAB）。

[0096] I. 脂质体（参考文献 75 的第 13 和 14 章）

[0097] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子见参考文献 131-133 所述。

[0098] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0099] 适合用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯 [134]。该类制剂还包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯糖醇的组合 [135]，以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种另外的非离子表面活性剂如辛苯糖醇的组合 [136]。优选的聚氧乙烯醚选自下组：聚氧乙烯-9-月桂醚（月桂醇聚醚 9）、聚氧乙烯-9-硬脂醚、聚氧乙烯-8-硬脂醚、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。

[0100] K. 聚磷腈 (PCPP)

[0101] PCPP 制剂参见例如参考文献 137 和 138。

[0102] L. 胞壁酰肽

[0103] 适合用作本发明佐剂的胞壁酰肽的例子包括 N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺（正-MDP）和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 MTP-PE)。

[0104] M. 咪唑并喹诺酮 (Imidazoquinolone) 化合物

[0105] 适合用作本发明佐剂的咪唑并喹诺酮化合物的例子包括咪唑莫特及其同系物（例如，“瑞喹莫德 3M”），见参考文献 139 和 140 所述。

[0106] N. 缩氨基硫脲化合物

[0107] 缩氨基硫脲化合物的例子，以及配制、制造和筛选适合用作本发明佐剂的所有这类化合物的方法包括参考文献 141 所述内容。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF-α 方面特别有效。

[0108] O. 色胺酮化合物

[0109] 色胺酮化合物的例子，以及配制、制造和筛选适合用作本发明佐剂的所有这类化合物的方法包括参考文献 142 所述内容。色胺酮化合物在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF-α 方面尤其有效。

[0110] 本发明也可包含以上鉴定的一种或多种佐剂各方面的组合。例如，以下组合可用作本发明佐剂组合物：(1) 皂苷和水包油乳液 [143]；(2) 皂苷（例如 QS21）+ 无毒 LPS 衍生物（例如 3dMPL）[144]；(3) 皂苷（例如 QS21）+ 无毒 LPS 衍生物（如 3dMPL）+ 胆固醇；(4) 皂苷（例如 QS21）+ 3dMPL + IL-12（任选 + 固醇）[145]；(5) 3dMPL 与（例如）QS21 和 / 或水包油乳液的组合 [146]；(6) SAF，含有 10% 角鲨烷、0.4% 吐温 80、5% 普流罗尼-嵌段聚合物 L121 和 thr-MDP，微流体化形成亚微米乳液或涡旋产生粒度较大的乳液。(7) RibitTM 佐剂系统 (RAS)（瑞比免疫化学公司 (Ribi Immunochem)），含有 2% 鲨烯、0.2% 吐温 80 和一种

或多种细菌细胞壁组分,所述组分选自单磷酸脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS),优选 MPL+CWS (Detox™);和 (8) 一种或多种无机盐 (如铝盐)+LPS 的无毒衍生物 (如 3dMPL)。

[0111] 用作免疫刺激剂的其它物质可参见参考文献 75 的第 7 章。

[0112] 特别优选使用铝盐佐剂,抗原通常吸附于这类盐。可本发明组合中使某些抗原吸附于氢氧化铝,而使另一些抗原结合磷酸铝。然而,通常优选只使用一种盐,如氢氧化物或磷酸盐,但二者不同时使用。并非所有偶联物都需要吸附,即某些或全部偶联物可在溶液中游离。

[0113] 治疗方法

[0114] 本发明还提供了一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,包含将本发明的药物组合给予所述哺乳动物。免疫反应优选为保护性,优选涉及抗体。所述方法可以产生加强的应答。

[0115] 所述哺乳动物优选人。当疫苗用于预防性用途时,人优选为儿童 (例如,幼童或婴儿) 或青少年;当疫苗用于治疗用途时,人优选为成人。意图用于儿童的疫苗也可给予成年人,例如,以评估安全性、剂量、免疫原性等。优选治疗的人类别是育龄女性 (如青少年和更大)。另一种优选类别是妊娠妇女。老年患者 (如大于 50、60、70、80 或 90 等年龄特别是大于 65 岁年龄的那些),特别是生活在 GBS 感染风险可能增加的疗养院中那些 ([147]),是另一类优选治疗的人。在一些实施方式中,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 Ia 荚膜糖的抗体水平检测不到。在另一些实施方式中,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 Ib 荚膜糖的抗体水平检测不到。在另一些实施方式中,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 III 荚膜糖的抗体水平检测不到。在另一些实施方式中,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 II 荚膜糖的抗体水平检测不到。在另一些实施方式中,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 V 荚膜糖的抗体水平检测不到。特别地,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 Ia 荚膜糖的抗体水平检测不到,和针对 GBS 血清型 Ib 荚膜糖的抗体水平检测不到。或者或此外,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 III 荚膜糖的抗体水平检测不到。或者或此外,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 II 荚膜糖的抗体水平检测不到。或者或此外,在给予药物组合前,所述人中针对 GBS 血清型 V 荚膜糖的抗体水平检测不到。可使用本领域已知的技术,如 ELISA 测定针对荚膜糖的抗体水平。所述抗体水平可以是如给予前一个月的水平,特别地在给予前一个月内的水平 (如两周内,一周内或在给予当天)。针对荚膜糖的抗体水平检测不到的女性可能在其新生儿中具有更高的 GBS 感染率。这是因为针对 GBS 荚膜糖的更高水平的母体抗体与新生儿中疾病下降的风险相关 [参考文献 148 和 149]。因此,本发明特定设想向这些妇女给药。

[0116] 本发明也提供用作药物的本发明组合。药物优选能够引起哺乳动物的免疫反应 (即它是一种免疫原性组合),并且更优选是疫苗。

[0117] 本发明也提供本发明组合在制备引起哺乳动物免疫反应的药物中的应用。

[0118] 这些应用和方法优选是预防和 / 或治疗由无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 引起的疾病,如新生儿败血症或菌血症、新生儿肺炎、新生儿脑膜炎、子宫内膜炎、骨髓炎、脓毒性关节炎等。

[0119] 所述预防疾病的对象可以与接受本发明偶联物的对象不相同。例如,可以给予女性偶联物(怀孕前或怀孕期间)以保护后代(所谓的“母体免疫”[150-152])。妊娠女性的免疫通过被动母体免疫来为婴儿提供抗体介导的免疫。当母方抗体通过胎盘转移至胎儿时,自然发生被动免疫。被动免疫对于婴儿特别重要,因为他们出生时不具有任何主动获得的免疫力。向妊娠女性给予本发明的组合物增强该女性的免疫力,并且抗体通过胎盘到达新生儿,使该婴儿具有被动母体免疫力。然而,婴儿的被动免疫仅仅是临时性的,并且在出生最初数周或数月之后开始减少。因为被动免疫仅是暂时性的,其对于婴儿接受给予的本发明的组合物而言是重要的,以在该被动免疫减少之前诱导婴儿内的主动免疫。在出生后给予婴儿第二次免疫原性组合物诱导该婴儿内的主动免疫,并且延长妊娠过程中从母亲传递过来的免疫力。

[0120] 本文中所述,婴儿是年龄低于一岁的个体(例如,小于1天、1周、2周、3周、4周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、小于12个月)。

[0121] 可对所述妊娠女性在其妊娠过程中的任何时间给予本发明的组合物。例如,可对该女性在其妊娠的第一、第二或第三个三月期给予所述组合物。在一些实施方式中,对所述女性在妊娠的末6-12周(例如,28周孕期、29周孕期、30周孕期、31周孕期、32周孕期、33周孕期、34周孕期、35周孕期、36周孕期、37周孕期、38周孕期、39周孕期)给予该组合物。特别地,在递送给婴儿前至少四周将本发明的组合物给予妊娠女性。在一些实施方式中,在第32周~36周孕期给予该妊娠女性单剂方案。在其它实施方式中,给予该妊娠女性两剂方案,其中第一剂在约32周孕期时给予,而第二剂在约36周孕期时给予。

[0122] 可在出生后第一年的任何时间对婴儿给予所述组合物,之后可按需给予。一般而言,在婴儿出生后第一年中对该婴儿给予一次、两次、三次、四次或更多次所述组合物。例如,可选择在婴儿出生时、2周龄、4周龄、6周龄、2月龄、3月龄、4月龄、6月龄、9月龄和12月龄给予该婴儿一次或多次本发明组合物。具体而言,在母方抗体已减少到非保护效价之前的某一时刻给予婴儿本发明的组合物。可在任何所需的确定时间进行后续给予。

[0123] 在一个实施方式中,提供保护婴儿抵抗由无乳链球菌所致的疾病的方法,所述方法包括如下步骤(a)向怀有所述婴儿的妊娠期间的女性给予本发明的组合物;和(b)任选地向由该妊娠女性生产的婴儿给予本发明的组合物。具体地,一种保护婴儿抵抗由无乳链球菌血清型Ia、Ib、III、II和V所致的早发疾病。具体地,该疾病是在出生0至168小时内,更具体地出生0至72小时内、更具体地出生24至72小时内、并且更具体地出生48至72小时内发生的脓毒血症。

[0124] 也提供了一种保护婴儿抵抗由无乳链球菌血清型Ia、Ib、III、II和V所致的迟发疾病。具体地,在出生后7天至90天内或更晚发生的疾病。

[0125] 检测治疗性治疗功效的一种方式包括在给予本发明组合物后监测GBS感染。监测预防性治疗的功效的一种方式包括监测给予该组合物后对GBS抗原产生的免疫反应。

[0126] 本发明中的优选组合物能在可接受百分比的对象中产生优于各抗原组分血清保护标准的抗体效价。众所周知抗原的关联抗体效价,高于该效价就认为宿主针对所述抗原发生血清转化,该类效价由诸如WHO的组织公布。优选多于80%的具有统计学显著性的对象样品发生血清转化,更优选多于90%,更优选多于93%,最优选96-100%。

[0127] 本发明的组合物通常直接给予患者。可以通过胃肠外注射（例如，皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内或给予到组织间隙），或通过直肠、口服、阴道、外用、透皮、鼻内、眼部、耳部、肺部或其它粘膜给药途径完成直接递送。优选肌肉内给予到大腿或上臂。注射可以通过针头（例如皮下针头）进行，但也可以采用无针注射。肌肉剂量通常是 0.5ml。对妊娠女性和婴儿的给予可通过相同途径或不同途径。

[0128] 本发明可用来引发全身和 / 或粘膜免疫。

[0129] 剂量治疗可采用单剂方案或多剂方案。多剂可用于初次免疫方案和 / 或加强免疫方案。初次给药方案之后，可以进行加强给药方案。可以常规确定初次剂量之间（例如 4-16 周）以及初次和加强剂量之间的适当时机。

[0130] 概述

[0131] 术语“包括”涵盖“包含”以及“由……组成”，例如，“包括”X 的组合物可以仅由 X 组成或可包含其它物质，例如 X+Y。

[0132] 术语“由……组成”指“仅由……组成”。组合物“由 X 组成”可不包含任何其它组分。组合物“基本由 X 组成”可不包含任何其它活性组分。术语“基本由……组成”意味着组合物、方法或结构可包括额外的成分、步骤和 / 或部分，但仅在额外成分、步骤和 / 或部分不会在物质上改变所要求的组合物、方法或结构的基本和新颖的特征。

[0133] 与数值 x 相关的术语“约”表示例如， $x \pm 10\%$ 。

[0134] 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。如有需要，“基本上”一词可从本发明的定义中省略。

[0135] 应理解糖环可以是开放或闭合形式，而且虽然本文结构式中显示的是闭合形式，但本发明也包括开放形式。类似的，应理解糖可以吡喃糖和呋喃糖形式存在，而且虽然本文的结构式中显示的是吡喃糖形式，但也包括呋喃糖形式。还可包含糖的不同异头形式。

[0136] 除非另有明确说明，包括混合两种或更多种组分的步骤的工艺不要求任何特定的混合顺序。因此，组分可以任何顺序混合。在有三种组分时，可将两种组分相互合并，然后将组合与第三种组分混合等。

[0137] 抗体通常对于其靶标是特异性的。因此，其对靶标的亲和性高于无关对照蛋白，例如牛血清白蛋白。

[0138] 除非另外说明，优选通过 MPSRCH 程序（牛津分子公司 (Oxford Molecular)）执行的 Smith-Waterman 同源性搜索算法，利用仿射缺口搜索测定多肽序列之间的相同性，其中参数为缺口开放罚分 = 12、缺口延伸罚分 = 1。

附图说明

[0139] 图 1 显示了在新生幼仔攻击模型中小鼠的存活率（保护%）。用各自与 CRM197 偶联的 (A)GBS Ia、(B)GBS Ib、(C)GBS III、(D)GBS II 和 (E)GBS V 来进行母体免疫。用相应的抗原来攻击小鼠。

[0140] 图 2 显示了针对各自与 CRM197 偶联的 (A)GBS Ia、(B)GBS Ib、(C)GBS III、(D)GBS II 和 (E)GBS 的 OPK 效价。用相应的抗原来免疫小鼠。

[0141] 图 3 显示了针对 GBS V 的 IgG 效价（图 3A）和 OPK 效价（图 3B）。用 (A) 铝盐、(B)CRM 偶联的 GBS V、(C)CRM 偶联的 GBS V+ 三价疫苗 (CRM 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、以

及 (D) CRM 偶联的 GBS V+CRM 偶联的 GBS II+ 三价疫苗 (CRM 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III) 来免疫小鼠。

[0142] 图 4 显示了针对 GBS II 的 IgG 效价 (图 4A) 和 OPK 效价 (图 4B)。用 (A) 铝盐、(B) CRM 偶联的 GBS II、(C) CRM 偶联的 GBS II+ 三价疫苗 (CRM 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、以及 (D) CRM 偶联的 GBS II+CRM 偶联的 GBS V+ 三价疫苗 (CRM 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III) 来免疫小鼠。

[0143] 图 5A 和 5B 显示了针对 GBS Ia、Ib、II、III 和 V 的 IgG 效价 (5A) 和针对菌株 515Ia、H36B、COH1、5401、CJB111 的 OPK 效价 (5B)。用 (A) 三价疫苗 :CRM 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III 以及 (B) 五价疫苗 :CRM 偶联的 GBS Ia、Ib、II、III 和 V 免疫小鼠。

[0144] 图 6 显示了针对 GBS V 的 IgG 效价。用 (A) PBS/ 铝盐、(B) CRM 偶联的 GBS V、(C) CRM 偶联的 GBS V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、(D) CRM 偶联的 GBS II 和 V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 Ia、Ib、III)、(E) TT 偶联的 GBS V、(F) TT 偶联的 GBS V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、(G) TT 偶联的 GBS II 和 V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 Ia、Ib、III) 免疫小鼠。

[0145] 图 7 显示了针对 GBS II 的 IgG 效价。用 (A) PBS/ 铝盐、(B) CRM 偶联的 GBS II、(C) CRM 偶联的 GBS II+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、(D) CRM 偶联的 GBS II 和 V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 Ia、Ib、III)、(E) TT 偶联的 GBS II、(F) TT 偶联的 GBS II+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、(G) TT 偶联的 GBS II 和 V+ 三价疫苗 (CRM197 偶联的 Ia、Ib、III) 免疫小鼠。

[0146] 图 8 显示了具有来自 CRM-Ia 的不同唾液酸含量的样品的效能分析,通过来自用 2 次剂量的 $1 \mu\text{g}$ 偶联物 / 小鼠的免疫得到。A) OPK 效价,由横线表示来自三种实验方案的平均值。B) :来自三种实验方案的受攻击的后代的累积存活百分比%。C) :给予的批次的 IVRP 效能值。

[0147] 图 9 显示了对脱唾液酸化的 CRM-Ib 样品 (由用 $1 \mu\text{g}$ 的偶联物 / 小鼠免疫得到) 的效能分析。组图 A 显示在用 2 剂量的用铝盐 (Alum) 配制的脱唾液酸化的 Ia-CRM197 样品免疫的小鼠所得的 OPKA (效价) (合并的血清)。三角形显示来自制剂 1 的数据,圆形显示来自制剂 2 的数据;在 X 轴上显示了两种制剂中的 SA 百分比。横线显示了 ELISA GMT 和 OPKA 效价的平均值。B) :受攻击的后代的存活百分比 (三种实验方案的平均值)。C) 制剂的 IVRP 效能值。

[0148] 图 10 显示了对脱唾液酸化的 CRM-III 样品 (由用 $0.2 \mu\text{g}$ 的偶联物 / 小鼠免疫得到) 的效能分析。组图 A 显示了用 2 次 $0.2 \mu\text{g}$ 剂量的 Ia-CRM197 脱唾液酸化样品免疫的小鼠血清中的 OPKA 效价,该样品来自在铝盐中配制的制剂 1 ;(A) 圆圈代表来自各单只小鼠的 IgG 效价,横线表示 ELISA GMT 的平均值。(b) 圆圈代表来自相同实验方案的合并的血清的 OPKA 效价。组图 B 显示了来自免疫的雌性小鼠受攻击后代的存活百分比。

具体实施方式

[0149] 疫苗

[0150] 研究 1-4 中所用的 GBS 单价疫苗全部与 CRM197 偶联。

[0151] 所有研究中使用的 GBS 三价疫苗由各自与 CRM197 偶联的源自血清型 Ia、Ib 和 III

的荚膜多糖组成。

[0152] 研究 1

[0153] 用新生幼仔攻击模型研究了对小鼠的保护水平 (Maione 等, Science 2005 年 7 月 1 日:卷 309,5731 期,第 148-150 页)。向母体给予 3 剂用铝盐 (400 μ g) 佐剂化的 GBS 单价疫苗 (1 μ g 抗原)。测试的 GBS 单价疫苗是各自与 CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib、II、III 和 V。结果示于图 1。

[0154] 也进行 OPK 测试,并且图 2 显示了结果。评估疫苗功效的有活力的方法是采用保护的替代,其在 GBS 情况中是血清抗体的调理活性。调理吞噬杀伤试验检测血清抗体调理 GBS 以通过补体存在下的效应细胞杀伤的能力。ELISA IgG Abs 和 OPK 效价之间一般有良好的关联。可以看到由 GBS II 和 GBS V 产生的保护和 OPA 水平与由 GBS Ia、Ib 和 III 产生的相当。

[0155] 研究 2

[0156] 用 3 剂铝盐 (400 μ g) 佐剂化的单价或多价疫苗 (各抗原 1 μ g) 免疫小鼠。测试的疫苗是 (1)GBS V、(2) 含 GBS V 和 GBS 三价疫苗的四价疫苗、以及 (3) 含 GBS II、GBS V 和 GBS 三价疫苗的五价疫苗。单独用铝盐免疫的小鼠作为阴性对照。进行 ELISA 和 OPK 测试 (使用 V 型 CJB111 菌株) (重复 2 次)。

[0157] 这些实验的结果见图 3 所示。可以看到,在 GBS V 和其他抗原之间没有观察到明显的免疫干扰。

[0158] 用 GBS V 攻击经免疫的小鼠,并且结果示于表 1。

[0159] 表 1. 针对 GBS V 型菌株 (V 型 CJB111) 攻击的结果

[0160]

抗原	用 GBS V 攻击 受保护的\经处	
	理的	保护%
PBS	39/100	39
CRM-V	108/119	91
CRM-Ia/Ib/III	32/102	31
CRM-Ia/Ib/III + CRM-V	60/70	86
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II+ CRMV-V	89/95	94

[0161] 研究 3

[0162] 用 3 剂铝盐 (400 μ g) 佐剂化的单价或多价疫苗 (各抗原 1 μ g) 免疫小鼠。测试的疫苗是 (1)GBS II、(2) 含 GBS II 和 GBS 三价疫苗的四价疫苗、以及 (3) 含 GBS II、GBS V 和 GBS 三价疫苗的五价疫苗。单独用铝盐免疫的小鼠作为阴性对照。进行 ELISA 和 OPK 测试 (使用 II 型 5401 菌株) (重复 2 次)。

[0163] 结果示于图 4。在 GBS II 和其他抗原之间没有观察到明显的干扰。

[0164] 用 GBS II 攻击经免疫的小鼠, 结果示于表 2。

[0165] 表 2. 针对 GBS II 型菌株 (II 型 5401) 攻击的结果

[0166]

抗原	用 GBS II 攻击 受保护的\经处	
	理的	保护%
PBS	37/120	31
CRM-II	55/80	69
CRM-Ia/Ib/III	15/100	15
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	72/99	73
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	62/129	48

[0167] 研究 4

[0168] 用 3 剂用铝盐 (400 μ g) 佐剂化的三价或五价疫苗 (各抗原 1 μ g) 免疫小鼠。测试的疫苗是 (1)GBS II、(2)GBS 三价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III)、(3)GBS 四价疫苗 (CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib、II 和 III 或 CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III+TT 偶联的 GBS II) 以及 (4) 五价疫苗 (含 CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib、II、III 和 V 或 CRM197 偶联的 GBS Ia、Ib 和 III+TT 偶联的 GBS II 和 V)。单独用铝盐免疫的小鼠作为阴性对照。进行 ELISA 和 OPK 测试 (使用 II 型 5401 菌株) (重复 2 次)。

[0169] 用 GBS II 攻击经免疫的小鼠, 并且结果示于表 3。

[0170] 表 3. 针对 GBS II 型菌株 (II 型 5401) 攻击的结果

[0171]

抗原	用 GBS II 攻击 受保护的\经处	
	理的	保护%
PBS	19/60	31%
CRM-II	23/30	77%

[0172]

CRM-Ia/Ib/III	8/30	26%
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	40/50	80%
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	32/77	41%
CRM-Ia/Ib/III + TT-II	62/77	80%
CRM-Ia/Ib/III + TT-II + TT-V	75/77	97%

[0173] 研究 5

[0174] 用 3 剂用铝盐 (400 μ g) 佐剂化的三价或五价疫苗 (各抗原 1 μ g) 免疫小鼠。进行 ELISA 和 OPK 测试 (使用 II 型 5401 菌株) (重复 2 次)。

[0175] 结果示于图 5A 和 5B。在三价和五价疫苗之间没有观察到明显的干扰。

[0176] 偶联物 Ia、Ib 和 III 的免疫原性和保护不受加入 PS-II 和 V 的影响。针对五价制剂中各 PS 的 ELISA 和 OPK 效价相当。

[0177] 研究 6

[0178] 研究了与不同的运载体蛋白偶联的 GBS 糖的免疫原性。

[0179] 用含与 CRM197 (“CRM”) 或破伤风类毒素 (“TT”) 偶联的 GBS II 和 / 或 V 的组合物免疫小鼠。通过 ELISA 分析针对 GBS V 的抗体效价。结果示于图 6 和 7。单独用 PBS/铝盐免疫的小鼠作为阴性对照。

[0180] 可以看到 CRM 和 TT 偶联物都提供了针对相应抗原的明显的免疫应答。对于 GBS II, 在 GBS II 和多价疫苗中的其他抗原之间没有观察到明显的免疫干扰, 与其是否与 CRM 或 TT 偶联无关。类似地, 对于 GBS V, 在 GBS V 和多价疫苗中的其他抗原之间没有观察到明显的免疫干扰, 与其是否与 CRM 或 TT 偶联无关。

[0181] 研究 7

[0182] 为了研究唾液酸组分的影响, 测试了与 CRM197 偶联的无乳链球菌荚膜多糖抗原 Ia、Ib 和 II。制备了具有不同唾液酸含量的疫苗批次, 并将其用于免疫小鼠, 测定小鼠母体免疫 / 新生幼仔攻击模型中的 IgG 效价、诱导的抗体的功能活性和针对 GBS 引发的保护。通过在弱酸性条件 (例如, 80 $^{\circ}$ C 下 pH 4.75 持续不同孵育时间) 中处理天然偶联物来产生具有不同唾液酸含量 (100% 至 < 5%) 的多糖 -CRM197 偶联物的单价批次。由 IVRP 评价效能。通过 ELISA 和体外调理吞噬试验 (Osonophagocytosis Assay) (OPKA) 分析来自用脱唾液酸化批次免疫的小鼠的血清, 以分别测试诱导的抗体的疫苗免疫原性和功能活性。也进行存活实验来研究接受疫苗的雌性小鼠所生的后代中的保护。

[0183] 简而言之, 通过用氘代乙酸钠处理来对 GBS 偶联物进行脱唾液酸化。通过 NMR 技

术来监测唾液酸含量。对于所有的制剂,3mg 的偶联物(由总糖含量测定)在真空中干燥(Genevac mod. EZ-2Plus)并溶解在 3mL 的氘代(D₂O-奥德里奇(Aldrich)151882-100G Lot#STBC04462V)pH 4.75 的 50mM 乙酸钠(西格玛(Sigma)S80750-500G Lot#050M0213V)中;在 80°C 孵育混合物不同的时间,并且如下表征所得的制剂的整份:(1) 1H NMR 分析来估计结合/游离的唾液酸含量的比率,(2) 基于半乳糖(Gal)测定的对糖含量的估计,(3) 蛋白含量的测定,(4) SDS-PAGE 分析和(5) 毛细管电泳(数据未显示)。

[0184] 在铝盐中配制含不同 SA(从 100%(天然未处理的物质)至 0%)的多糖-CRM197 偶联物的单价批次,并且在第 1 天和第 21 天通过腹膜内(i. p.)注射来免疫一组 5 周龄的 CD1 雌性小鼠。在第 21 天的第二次免疫之后,使雌性小鼠交配并且用 LD90 剂量的相同血清型的 GBS 攻击后代(GBS 090 用于血清型 Ia、GBS H36b 用于 Ib 并且 GBS M781 用于血清型 III)。攻击后每天记录死亡率,持续 3 天。通过对在最后一次疫苗注射 2 周后收集的血清分析针对各血清型特异性抗原(Ia、Ib 和 III)的抗体的存在来测试疫苗免疫原性。通过 ELISA 对针对各多糖的特异性 IgG 抗体效价进行定量。使用调理吞噬试验(OPKA)并通过新生幼仔攻击来基于来自接受相同疫苗的动物的合并血清评价功能性抗体活性。

[0185] 对于多糖 Ia-CRM197,在用 1 μg 疫苗剂量免疫的动物中的 IgG 效价与除了 < 5% 以外的其它所有样品相似,该 < 5% 产生与天然多糖相比约 4 倍的统计学上显著的减少(P = 0.0067,曼-惠特尼检验)。从 19% 和 < 5% (OPKA 杀伤)和 < 5% 唾液酸(存活)可理解抗体功能活性的降低。关于 IVRP 结果,含等于或低于 33% 的唾液酸的样品的效能值降低至不到十分之一(图 8)。

[0186] 对于多糖 Ib-CRM197,与含较高唾液酸含量的样品相比,含不到 5% SA 的样品诱导较低的 ELISA 效价,OPKA 效价和存活率(图 9)。

[0187] 对于多糖 III-CRM197,与用含较高 SA 含量的样品免疫的动物相比,在接受含少于 66% SA 的样品的动物中,针对 PS III 的 IgG GMT 明显较高(P < 0.01,曼-惠特尼检验)。功能性抗体的水平与接受 1 μg 剂量的天然和脱唾液酸化的样品的动物相似。然而,在接受 0.2 μg 剂量的偶联物的动物中可发现存在差异,接受含 39% SA 的样品的动物 OPKA 效价显著降低且在 24% SA 下存活率较低(图 10)。

[0188] 研究 8

[0189] 为了研究唾液酸组分的影响,测试了与 CRM197 偶联的无乳链球菌荚膜多糖抗原 V。制备了具有不同唾液酸含量的疫苗批次并用于免疫小鼠。通过在弱酸性条件(例如,80°C 下 pH 4.75 持续不同孵育时间)中处理天然偶联物来产生具有不同唾液酸含量(100% 至 25%)的多糖-CRM197 偶联物的单价批次。

[0190]

PSV-CRM197 疫苗	% NeuNAc	保护% (CJB111)
Lot 1+ 铝盐	100	66
Lot 2+ 铝盐	100	81
Lot 3+ 铝盐	100	69

Lot 4+ 铝盐	100	73
Lot 5+ 铝盐	75	45
Lot 6+ 铝盐	50	22
Lot 7+ 铝盐	50	36
Lot 8+ 铝盐	50	46
Lot 9+ 铝盐	25	38
Lot 10+ 铝盐	25	17
Lot 11+ 铝盐	25	10
对照 (仅铝盐)	-	11
对照 2(仅铝盐)	-	2

[0191]

[0192] 去除 NeuNAc 似乎影响了小鼠中免疫后的保护。这些实验表明 NeuNAc 含量超过 75% 的 V 型多糖偶联物是可用的。

[0193]

CRM197:PSV	%NeuN Ac	保护% (CJB111)	交联水平
0.25:1.0	0	100	低 ↓ 高
0.5:1.0	0	79	
0.5:1.0	0	48	
1.0:1.0	0	32	
1.0:1.0	0	46	
1.5:1.0	0	42	
1.5:1.0	0	43	
2.0:1.0	0	13	
3.0:1.0	0	37	
4.0:1.0	0	31	
对照 (仅铝盐)	0	5	

[0194] 多糖 V-CRM197 脱唾液酸化的多糖偶联物的免疫原性与其交联水平呈反比。因此，

当免疫原性组合物包含 V 型多糖,尤其是脱唾液酸化的多糖时,具有较低的蛋白:多糖交联水平的偶联物可能有益。

[0195] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,在本发明的范围和构思内可对其进行修改。

[0196] 参考文献

[0197] [1]Paoletti 等.(1990)J Biol Chem 265 :18278-83.

[0198] [2]Wessels 等.(1990)J Clin Invest 86 :1428-33.

[0199] [3]Paoletti 等.(1992)Infect Immun 60 :4009-14.

[0200] [4]Paoletti 等.(1992)J Clin Invest 89 :203-9.

[0201] [5]Wessels 等.(1987)Proc Natl Acad Sci USA 84 :9170-4.

[0202] [6]Wang 等.(2003)Vaccine 21 :1112-7.

[0203] [7]Wessels 等.(1993)Infect Immun 61 :4760-6

[0204] [8]Wessels 等.(1995)J Infect Dis 171 :879-84.

[0205] [9]Baker 等.(2004)J Infect Dis 189 :1103-12.

[0206] [10]Paoletti 和 Kasper(2003)Expert Opin Biol Ther 3 :975-84.

[0207] [11]W02012/035519

[0208] [12]Lewis 等.(2004)PNAS USA 101 :11123-8.

[0209] [13]W02006/050341

[0210] [14]Guttormsen 等.(2008)Proc Natl Acad Sci U S A. 105(15) :5903-8. Epub 2008 年 3 月 31 日.

[0211] [15]W096/40795

[0212] [16]Michon 等.(2006)Clin Vaccine Immunol. 2006 年 8 月 ;13(8) :936-43.

[0213] [17]US 专利 6027733 和 6274144.

[0214] [18]www.polymer.de

[0215] [19]Wessels 等.(1989)Infect Immun 57 :1089-94.

[0216] [20]W02006/082527.

[0217] [21]2007 年 12 月 20 日提交的 US 专利申请 US 61/008,941, 标题为“FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM(培养链球菌的发酵方法和获得其 CPS 的纯化方法)”,和国际专利申请 WO 2009/081276.

[0218] [22]Ramsay 等.(2001)Lancet 357(9251) :195-196.

[0219] [23]Lindberg(1999)Vaccine 17 Suppl 2 :S28-36.

[0220] [24]Buttery 和 Moxon(2000)J R Coll Physicians Lond 34 :163-68.

[0221] [25]Ahmad 和 Chapnick(1999)Infect Dis Clin North Am 13 :113-33, vii.

[0222] [26]Goldblatt(1998)J. Med. Microbiol. 47 :563-7.

[0223] [27] 欧洲专利 0477508.

[0224] [28]US 专利 5,306,492.

[0225] [29]W098/42721.

[0226] [30]Dick 等. Conjugate Vaccines(《偶联物疫苗》)(Cruse 等编)Karger, Basel,

1989, 10 :48-114.

[0227] [31]Hermanson Bioconjugate Techniques(《生物偶联技术》), 学术出版社(Academic Press), 圣迭戈 (1996) ISBN :0123423368.

[0228] [32]US 专利 4356170.

[0229] [33]W02006/082530.

[0230] [34]W02005/000346

[0231] [35]Anonymous(2002年1月)Research Disclosure,453077.

[0232] [36]Anderson(1983)Infect Immun 39(1) :233-238.

[0233] [37]Anderson等.(1985)J Clin Invest 76(1) :52-59.

[0234] [38]EP-A-0372501.

[0235] [39]EP-A-0378881.

[0236] [40]EP-A-0427347.

[0237] [41]W093/17712

[0238] [42]W094/03208.

[0239] [43]W098/58668.

[0240] [44]EP-A-0471177.

[0241] [45]W091/01146

[0242] [46]Falugi等.(2001)Eur J Immunol 31 :3816-24.

[0243] [47]Baraldo等.(2004)Infect Immun 72 :4884-87.

[0244] [48]EP-A-0594610.

[0245] [49]W000/56360.

[0246] [50]W002/091998.

[0247] [51]Kuo等.(1995)Infect Immun 63 :2706-13.

[0248] [52]W001/72337

[0249] [53]W000/61761.

[0250] [54]W000/33882

[0251] [55]W099/42130.

[0252] [56]W02004/011027.

[0253] [57]W096/40242.

[0254] [58]Lei等.(2000)Dev Biol(Basel)103 :259-264.

[0255] [59]W000/38711 ;US 专利 6, 146, 902.

[0256] [60] 国际专利申请 PCT/IB2008/02690, ‘CONJUGATE PURIFICATION(偶联物纯化)’ ,要求 GB-0713880. 3(NOVARTIS AG) 作为优先权,公开号为 WO 2009/010877.

[0257] [61]Paoletti等.(2001)Vaccine 19 :2118-2126.

[0258] [62]W000/56365.

[0259] [63]Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿:药物科学和实践》). 第20版, ISBN :0683306472.

[0260] [64]Paoletti(2001)Vaccine 19(15-16) :2118-26.

[0261] [65]W003/009869.

- [0262] [66]Almeida 和 Alpar(1996)J. Drug Targeting 3 :455-467.
- [0263] [67]Agarwal 和 Mishra(1999)Indian J Exp Biol 37 :6-16.
- [0264] [68]W000/53221.
- [0265] [69]Jakobsen 等. (2002)Infect Immun 70 :1443-1452.
- [0266] [70]Bergquist 等. (1998)APMIS 106 :800-806.
- [0267] [71]Baudner 等. (2002)Infect Immun 70 :4785-4790.
- [0268] [72]Ugozzoli 等. (2002)J Infect Dis 186 :1358-1361.
- [0269] [73]US 专利 6355271.
- [0270] [74]W000/23105.
- [0271] [75]Vaccine Design(《疫苗设计》)(1995)Powell 和 Newman 编. ISBN : 030644867X. Plenum.
- [0272] [76]W090/14837.
- [0273] [77]Podda(2001)Vaccine 19 :2673-80.
- [0274] [78]Frey 等. (2003)Vaccine 21 :4234-7.
- [0275] [79]US 专利 6, 299, 884.
- [0276] [80]US 专利 6, 451, 325.
- [0277] [81]US 专利 5, 057, 540.
- [0278] [82]W096/33739.
- [0279] [83]EP-A-0109942.
- [0280] [84]W096/11711.
- [0281] [85]W000/07621.
- [0282] [86]Barr 等. (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :247-271.
- [0283] [87]Sjolanderet 等. (1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32 :321-338.
- [0284] [88]Niikura 等. (2002)Virology 293 :273-280.
- [0285] [89]Lenz 等. (2001)J Immunol 166 :5346-5355.
- [0286] [90]Pinto 等. (2003)J Infect Dis 188 :327-338.
- [0287] [91]Gerber 等. (2001)Virology 75 :4752-4760.
- [0288] [92]W003/024480
- [0289] [93]W003/024481
- [0290] [94]Gluck 等 (2002)Vaccine 20 :B10-B16.
- [0291] [95]EP-A-0689454.
- [0292] [96]Johnson 等. (1999)Bioorg Med Chem Lett 9 :2273-2278.
- [0293] [97]Evans 等. (2003)Expert Rev Vaccines 2 :219-229.
- [0294] [98]Meraldi 等. (2003)Vaccine 21 :2485-2491.
- [0295] [99]Pajak 等. (2003)Vaccine 21 :836-842.
- [0296] [100]Kandimalla 等. (2003)Nucleic Acids Research 31 :2393-2400.
- [0297] [101]W002/26757.
- [0298] [102]W099/62923.
- [0299] [103]Krieg(2003)Nature Medicine 9 :831-835.

- [0300] [104]McCluskie 等. (2002)FEMS Immunology and Medical Microbiology 32 : 179-185.
- [0301] [105]W098/40100.
- [0302] [106]US 专利 6, 207, 646.
- [0303] [107]US 专利 6, 239, 116.
- [0304] [108]US 专利 6, 429, 199.
- [0305] [109]Kandimalla 等. (2003)Biochemical Society Transactions 31(第 3 部分) :654-658.
- [0306] [110]Blackwell 等. (2003)J Immunol 170 :4061-4068.
- [0307] [111]Krieg(2002)Trends Immunol 23 :64-65.
- [0308] [112]W001/95935.
- [0309] [113]Kandimalla 等. (2003)BBRC 306 :948-953.
- [0310] [114]Bhagat 等. (2003)BBRC 300 :853-861.
- [0311] [115]W003/035836.
- [0312] [116]W095/17211.
- [0313] [117]W098/42375.
- [0314] [118]Beignon 等. (2002)Infect Immun 70 :3012-3019.
- [0315] [119]Pizza 等. (2001)Vaccine 19 :2534-2541.
- [0316] [120]Pizza 等. (2000)Int J Med Microbiol 290 :455-461.
- [0317] [121]Scharton-Kersten 等. (2000)Infect Immun 68 :5306-5313.
- [0318] [122]Ryan 等. (1999)Infect Immun 67 :6270-6280.
- [0319] [123]Partidos 等. (1999)Immunol Lett 67 :209-216.
- [0320] [124]Peppoloni 等. (2003)Expert Rev Vaccines 2 :285-293.
- [0321] [125]Pine 等. (2002)J Control Release 85 :263-270.
- [0322] [126]Domenighini 等. (1995)Mol Microbiol 15 :1165-1167.
- [0323] [127]W099/40936.
- [0324] [128]W099/44636.
- [0325] [129]Singh 等, (2001)J Cont Release 70 :267-276.
- [0326] [130]W099/27960.
- [0327] [131]US 专利 6, 090, 406
- [0328] [132]US 专利 5, 916, 588
- [0329] [133]EP-A-0626169.
- [0330] [134]W099/52549.
- [0331] [135]W001/21207.
- [0332] [136]W001/21152.
- [0333] [137]Andrianov 等. (1998)Biomaterials 19 :109-115.
- [0334] [138]Payne 等. (1998)Adv Drug Delivery Review 31 :185-196.
- [0335] [139]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27 :571-577.
- [0336] [140]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4 :214-218.

- [0337] [141]W004/60308
- [0338] [142]W004/64759.
- [0339] [143]W099/11241.
- [0340] [144]W094/00153.
- [0341] [145]W098/57659.
- [0342] [146] 欧洲专利申请 0835318、0735898 和 0761231.
- [0343] [147]Hennings 等. (2001)J Infect Dis. 183(7) :1138-42. Epub 2001 年 3 月 1 日.
- [0344] [148]Lin 等. (2001)J Infect Dis. 184(8) :1022-8.
- [0345] [149]Lin 等. (2004)J Infect Dis. 190(5) :928-34
- [0346] [150]Glezen 和 Alpers(1999)Clin. Infect. Dis. 28 :219-224
- [0347] [151]Madoff 等. (1994)J Clin Invest 94 :286-92.
- [0348] [152]Paoletti 等. (1994)Infect Immun 62 :3236-43.

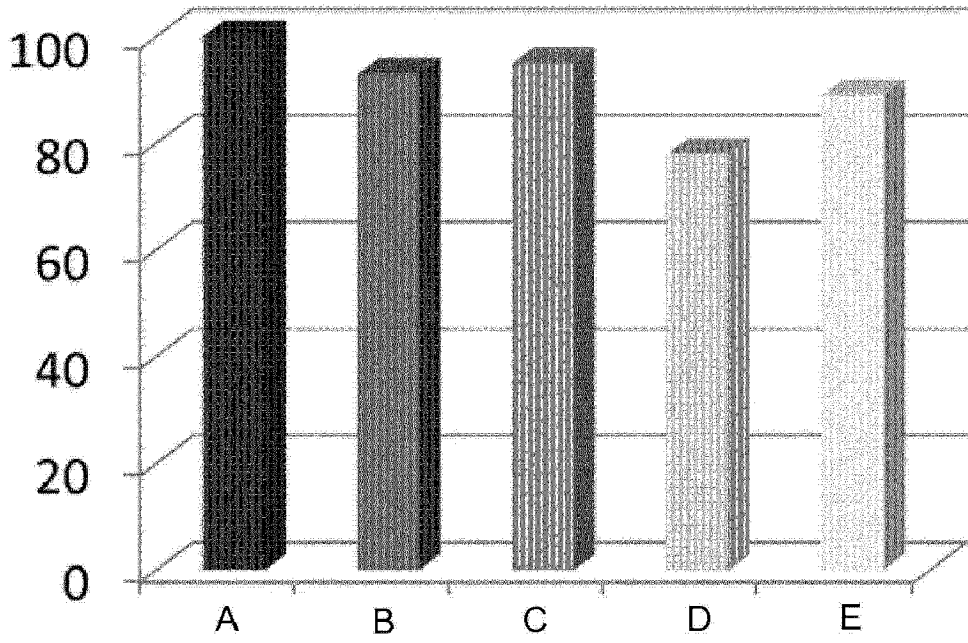


图 1

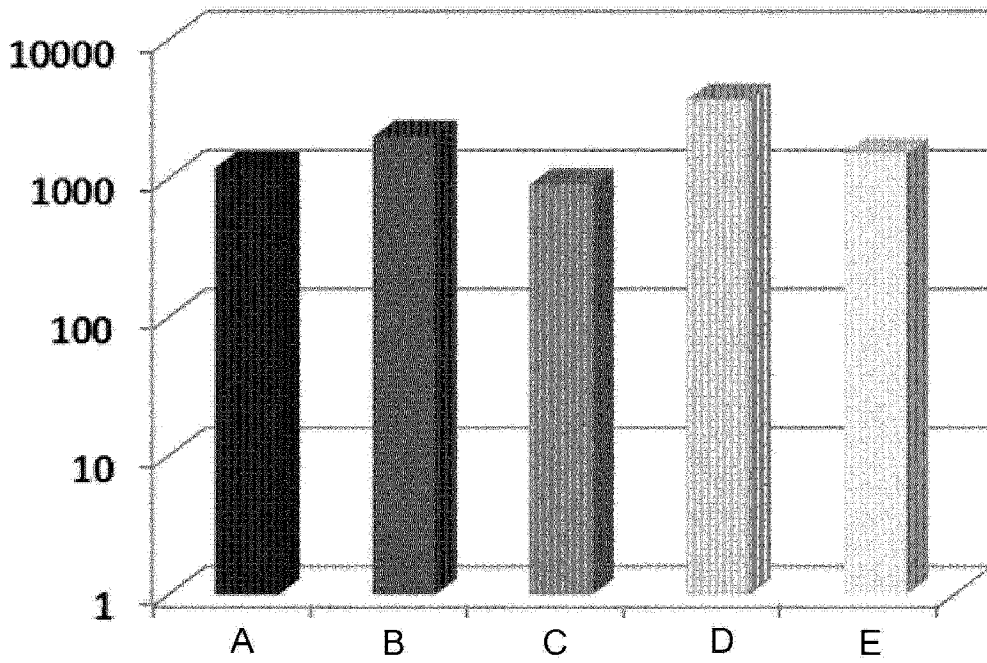


图 2

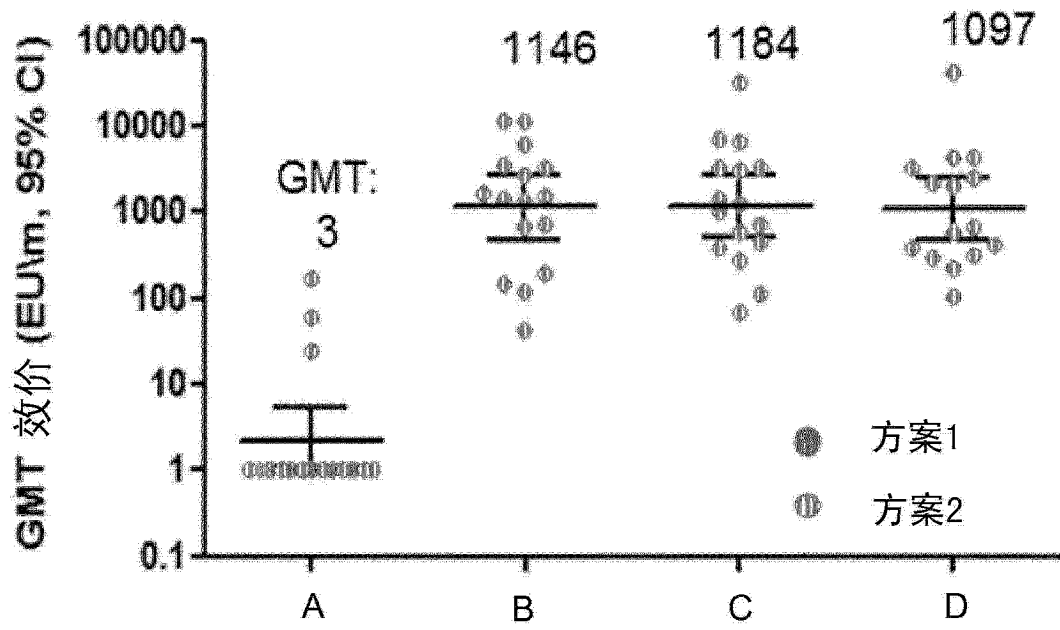


图 3A

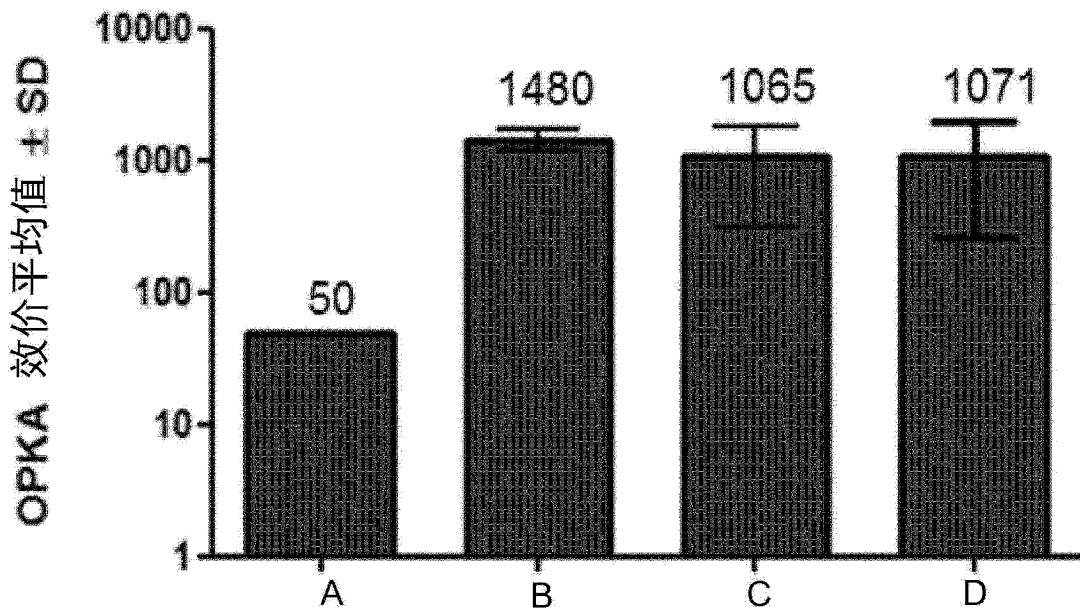


图 3B

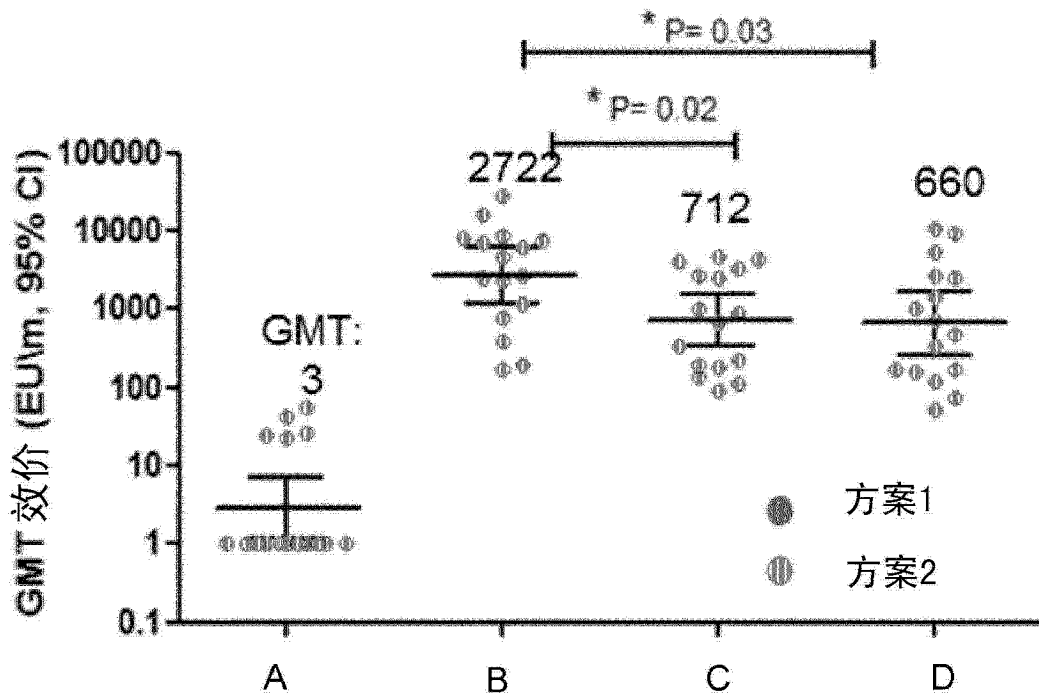


图 4A

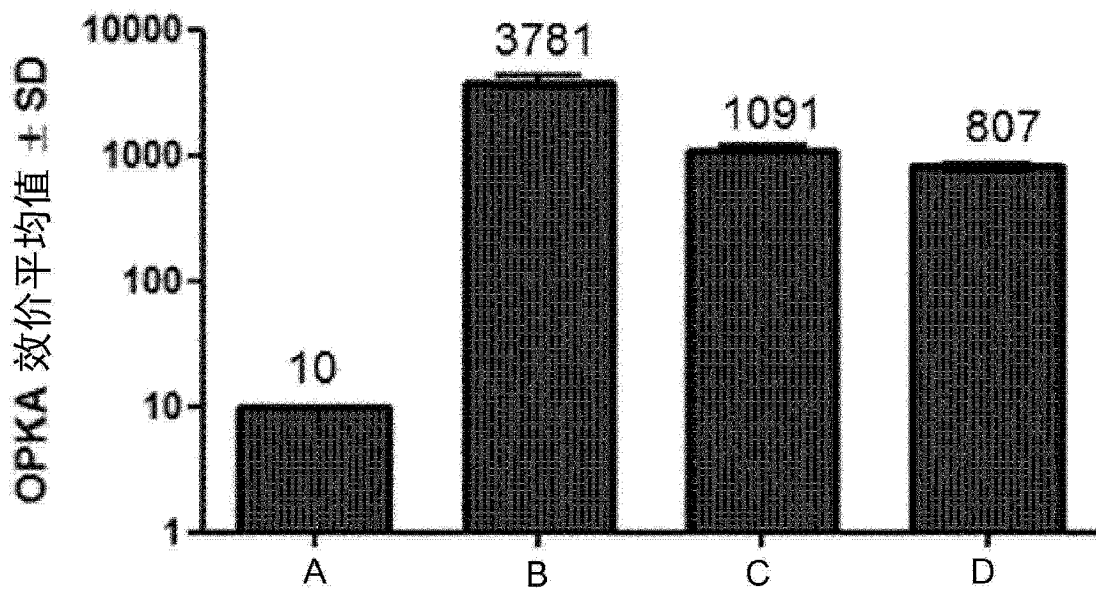


图 4B

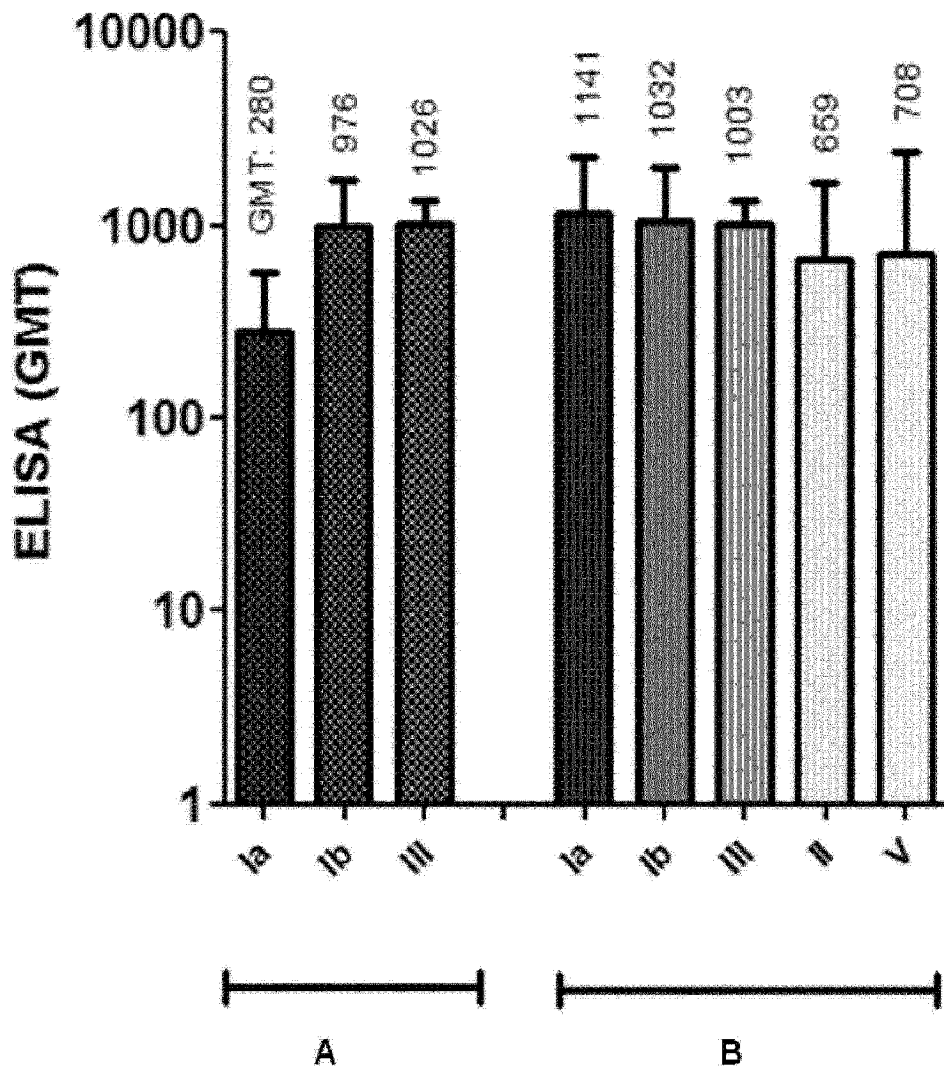


图 5A

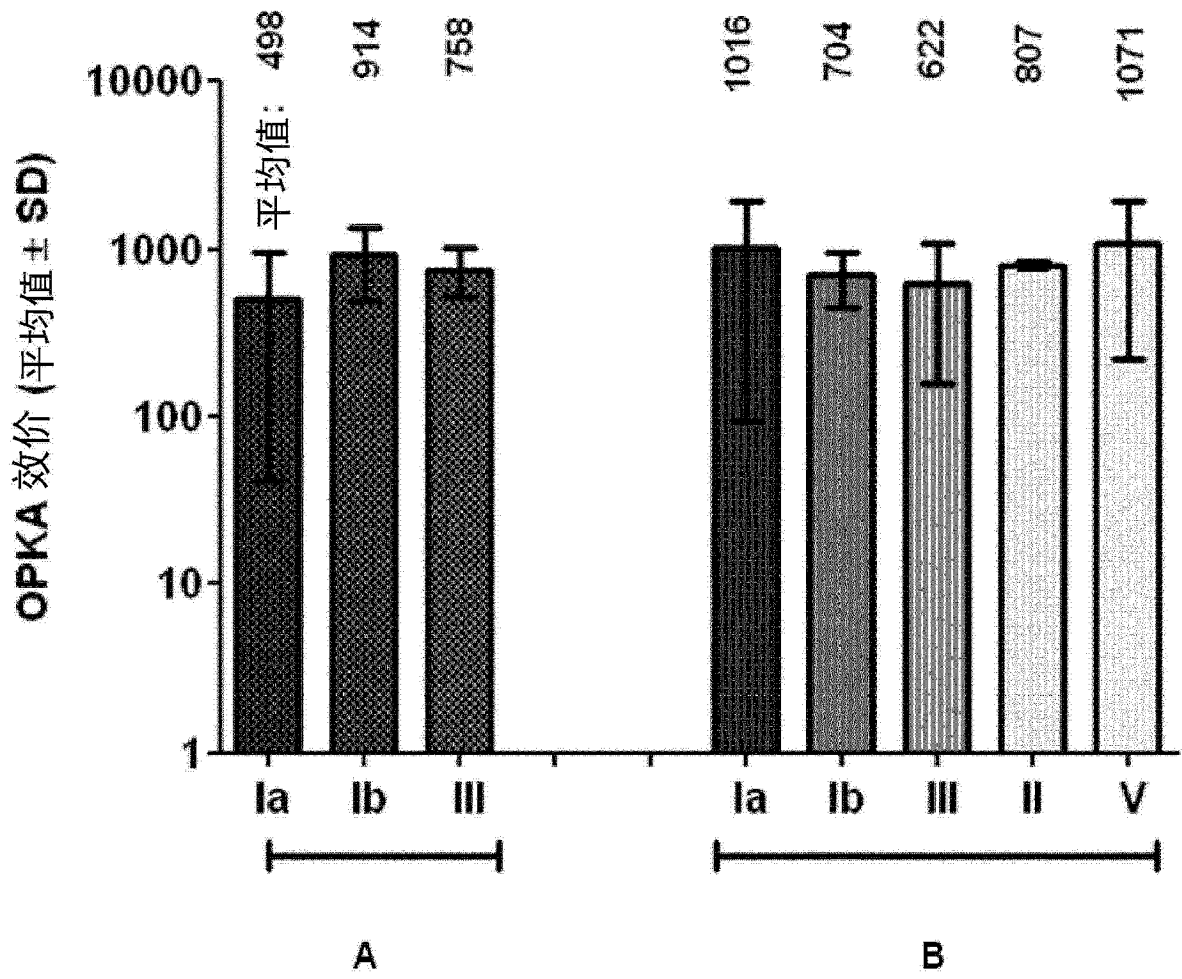


图 5B

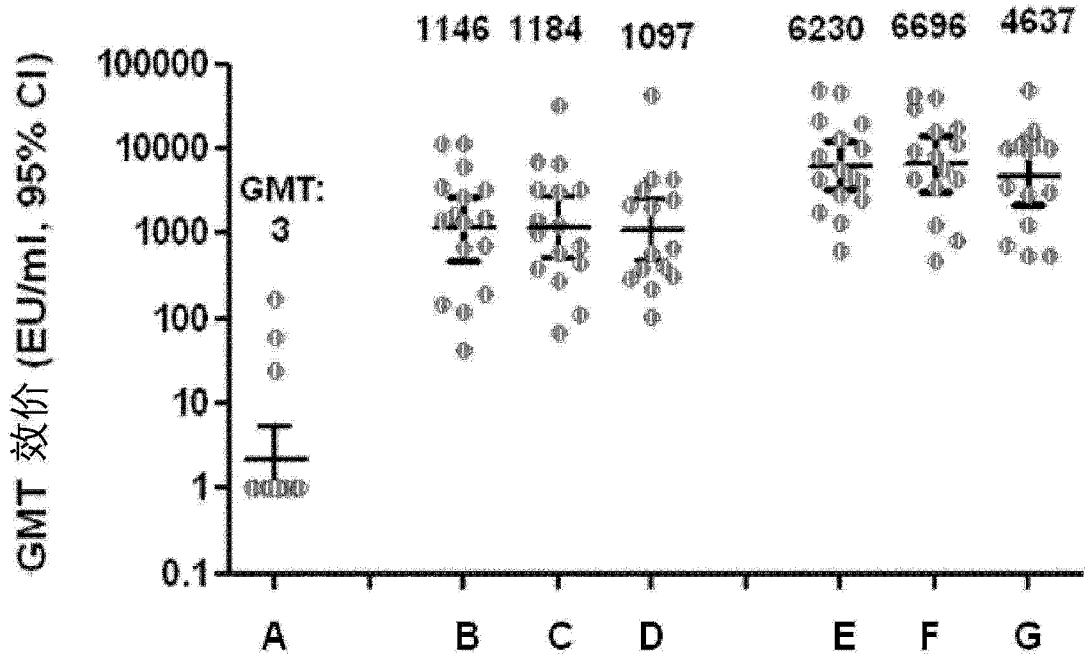


图 6

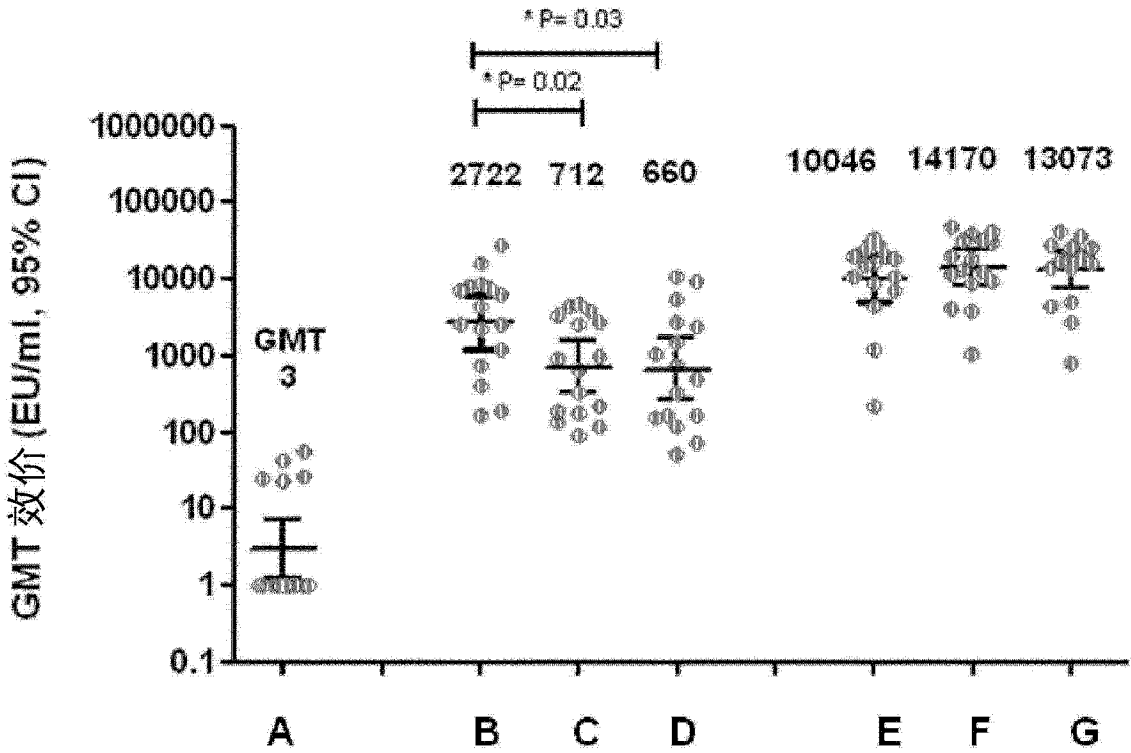


图 7

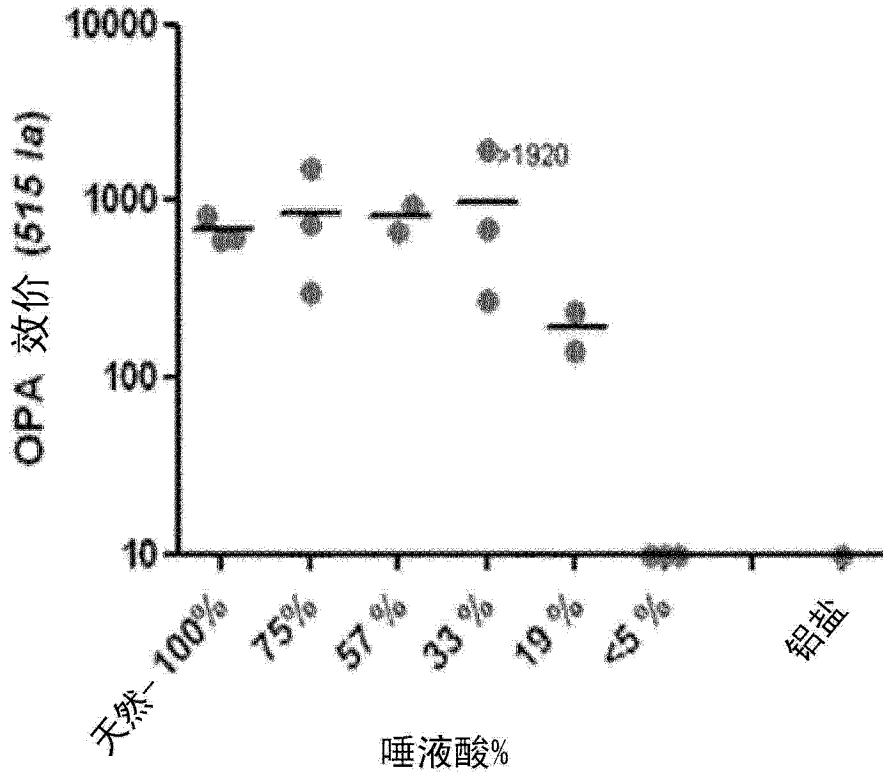


图 8A

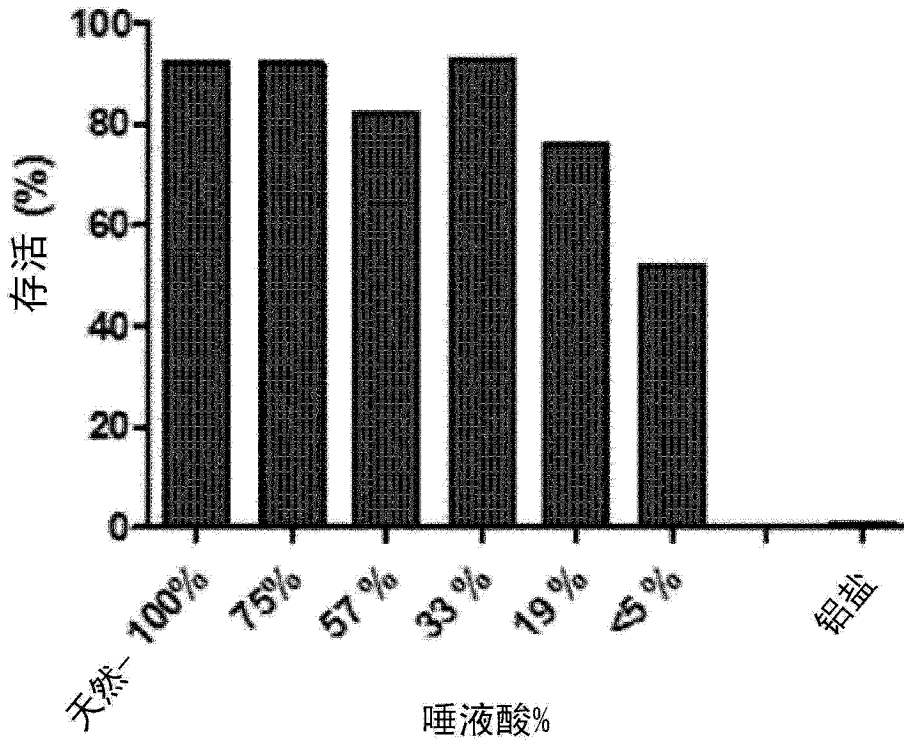


图 8B

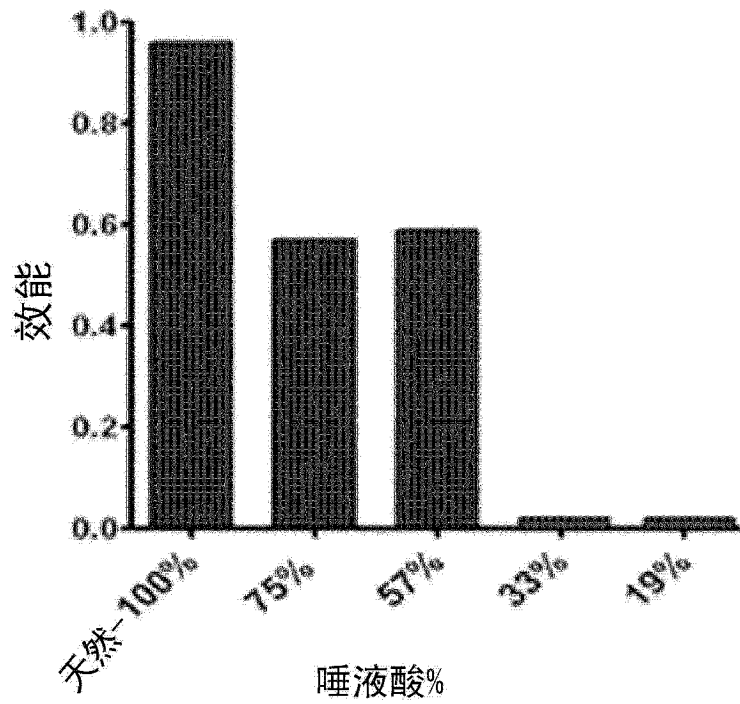


图 8C

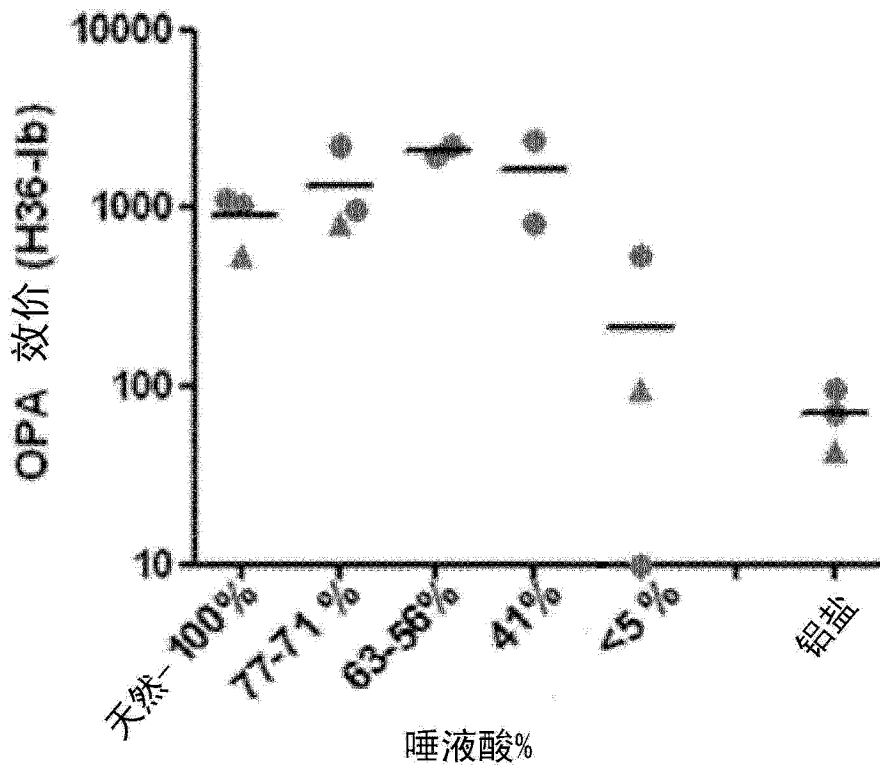


图 9A

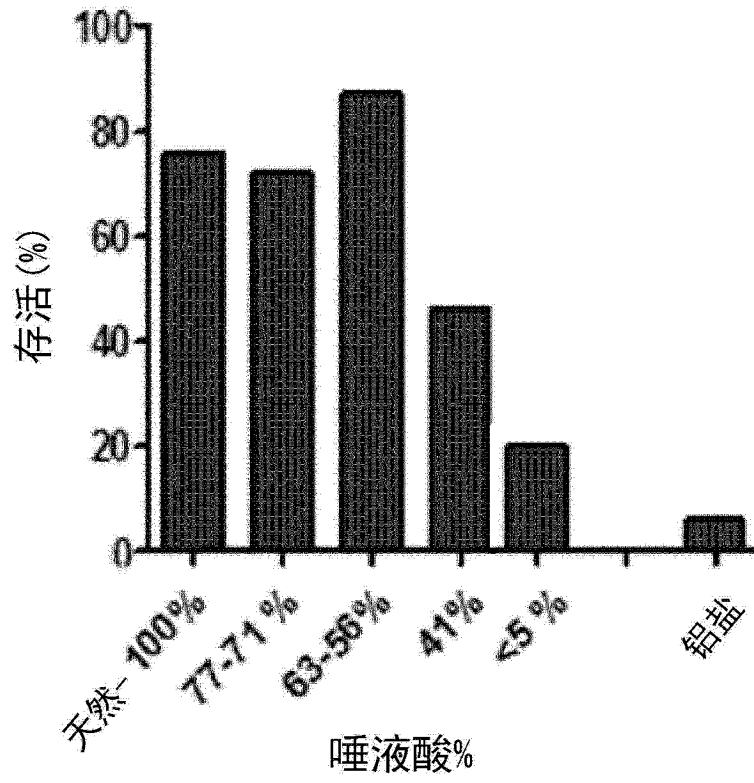


图 9B

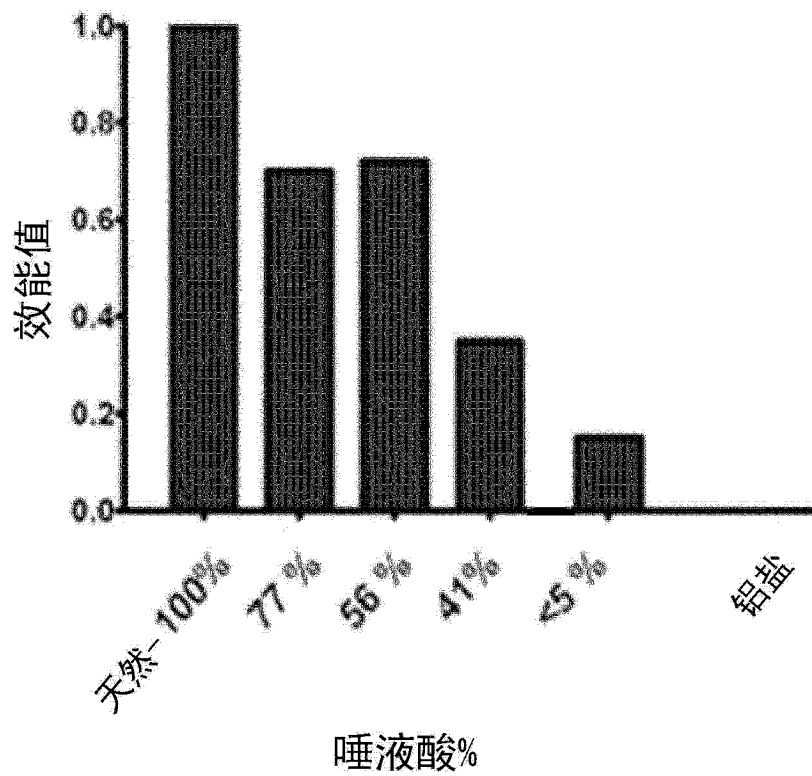


图 9C

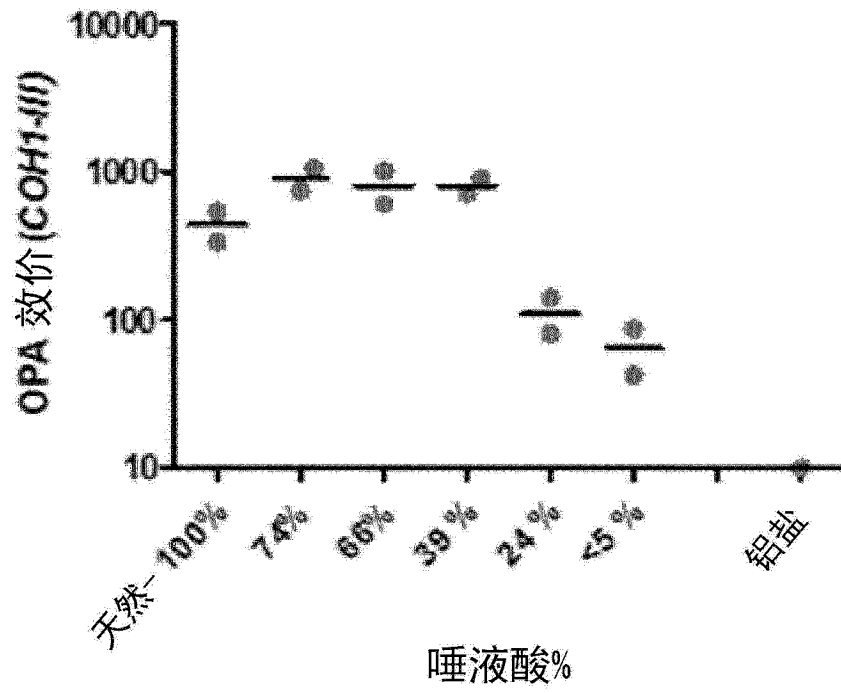


图 10A

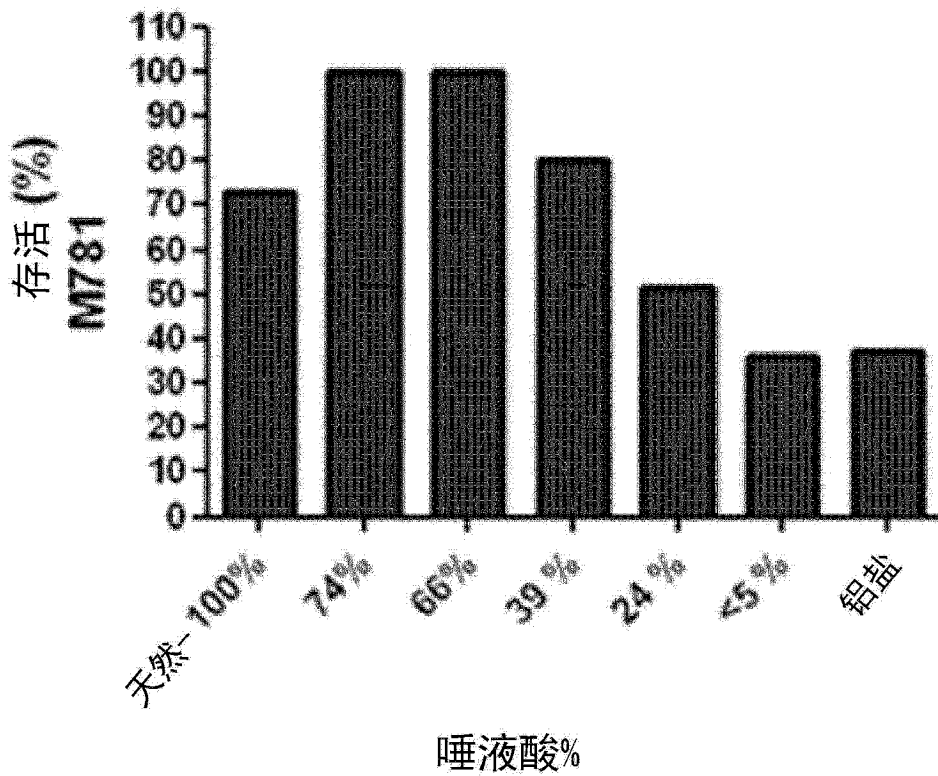


图 10B