



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105079800 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510490666. 4

A61K 39/09(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 12. 10

A61K 39/39(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 31/04(2006. 01)

11/644, 207 2006. 12. 22 US

(62) 分案原申请数据

200780051596. 6 2007. 12. 10

(71) 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 W·P·豪斯多夫 G·R·西贝尔

P·R·帕拉迪索 A·K·普拉萨德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 柴云峰 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/385(2006. 01)

权利要求书2页 说明书36页 附图3页

(54) 发明名称

多价肺炎球菌多糖-蛋白缀合物组合物

(57) 摘要

本发明描述了具有 13 种不同的多糖-蛋白质缀合物和任选地铝类佐剂的免疫原性组合物。每种缀合物含有缀合到载体蛋白的从不同血清型的肺炎链球菌 (1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型) 制备的荚膜多糖。配制为疫苗的免疫原性组合物总体上增加了对婴儿和幼儿中肺炎球菌疾病的覆盖, 并且提供了对血清型 6A 型和 19A 型的覆盖, 其不依赖于血清群交叉保护的覆盖。本发明还描述了一种制备免疫原性缀合物的方法, 所述缀合物包含共价连接到载体蛋白的肺炎球菌血清型 1 型多糖, 所述方法包括通过在碱性 pH 缓冲液中温和水解多糖的部分脱氧乙酰化。

1. 一种制备免疫原性缀合物的方法,所述缀合物包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 1 型多糖,所述方法包括:

(a) 将纯化的血清型 1 型多糖与碱性 pH 缓冲液反应,生成部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖,其中脱氧乙酰化进行到大约 40 摩尔百分数;

(b) 将部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖与弱酸反应,生成中和的,部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖;

(c) 将中和的,部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖与氧化剂反应,生成活化的血清型 1 型多糖;

(d) 将活化的血清型 1 型多糖与载体蛋白配合;

(e) 共同冻干配合的、活化的血清型 1 型多糖与载体蛋白;

(f) 将配合的,活化的血清型 1 型多糖和载体蛋白与还原剂反应,生成血清型 1 型多糖:载体蛋白缀合物;及

(g) 封闭血清型 1 型多糖:载体蛋白缀合物中未反应的醛,生成包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型 1 型多糖的免疫原性缀合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,在与载体蛋白配合前,进一步包括纯化活化的血清型 1 型多糖。

3. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包括纯化所述免疫原性缀合物。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述碱性 pH 缓冲液是碳酸氢盐 / 碳酸盐缓冲液。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述弱酸是乙酸。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述弱酸是低离子浓度的无机酸。

7. 权利要求 6 所述的方法,其中所述低离子浓度的无机酸是盐酸。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,其中所述氧化剂是高碘酸钠。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中所述载体蛋白是 CRM₁₉₇。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述还原剂是氰基硼氢化钠。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其中所述封闭未反应的醛包括将血清型 1 型多糖:载体蛋白缀合物与硼氢化钠反应。

12. 一种制备免疫原性缀合物的方法,所述免疫原性缀合物包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型 1 型多糖,所述方法包括:

(a) 将纯化的血清型 1 型多糖与碳酸氢盐 / 碳酸盐缓冲液反应,生成部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖,其中脱氧乙酰化进行到大约 40 摩尔百分数;

(b) 将所述部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖与乙酸反应,生成中和的,部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖;

(c) 将所述中和的、部分脱氧乙酰化的血清型 1 型多糖与高碘酸钠反应,生成活化的血清型 1 型多糖;

(d) 纯化所述活化的血清型 1 型多糖;

(e) 将所述活化的血清型 1 型多糖与载体蛋白配合;

(f) 将所述配合的、活化的血清型 1 型多糖和载体蛋白共同冻干;

(g) 将共同冻干的、活化的血清型 1 型多糖和载体蛋白与氰基硼氢化钠反应,生成血清型 1 型多糖:载体蛋白缀合物;及

(h) 用硼氢化钠封闭血清型 1 型多糖：载体蛋白缀合物中未反应的醛，生成包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型 1 型多糖的免疫原性缀合物。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其还包括纯化免疫原性缀合物。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述载体蛋白是 CRM₁₉₇。

15. 制备包含 13 种不同的多糖-蛋白质缀合物以及生理学上可接受的载体的多价免疫原性组合物的方法，其中每种缀合物含有缀合到载体蛋白的不同荚膜多糖，并且其中该荚膜多糖自肺炎链球菌的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型制备，其中所述血清型 1 型多糖：蛋白质缀合物根据权利要求 1-14 中任一项所述的方法制备，并且其中在纯化各个多糖缀合物之后，配合它们以配制该免疫原性组合物。

16. 如权利要求 15 的方法，其中 CRM₁₉₇ 用作载体蛋白。

17. 如权利要求 16 的方法，其中所述多价免疫原性组合物还包含佐剂。

18. 如权利要求 17 的方法，其中佐剂是铝类佐剂。

19. 如权利要求 18 的方法，其中佐剂选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

多价肺炎球菌多糖－蛋白缀合物组合物

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 12 月 10 日、发明名称为“多价肺炎球菌多糖－蛋白缀合物组合物”的中国专利申请 200780051596.6 (国际申请号 PCT/US2007/086976) 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及医学领域,更具体地涉及微生物学、免疫学、疫苗和通过免疫对细菌病原体感染的预防。

[0003] 发明背景

[0004] 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 是全世界婴儿和幼儿中脑膜炎、肺炎和严重侵入性疾病的主要病因。多年前就批准了多价肺炎球菌多糖疫苗并且已经证明其在老年人和高危病人中预防肺炎球菌疾病是有价值的。然而,婴儿和幼儿对多数肺炎球菌多糖应答很弱。7 价肺炎球菌缀合疫苗 (7vPnC, **Prevnar**[®]) 是第一种表明对婴儿和幼儿中侵入性疾病和中耳炎高度免疫原性和有效的疫苗。该疫苗现在在世界上许多国家被批准。Prenvar 含有来自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 型的荚膜多糖,每种多糖缀合到称作 CRM₁₉₇ 的载体蛋白。Prenvar 在美国、欧洲和世界的其他地区分别覆盖约 80-90%,60-80% 和 40-80% 的侵入性肺炎球菌疾病 (IPD) [1, 2]。Prenvar 引入后数年中收集的监视数据已经清楚地表明如所预期的,在美国婴儿中减少了侵入性肺炎球菌疾病 (图 1) [3, 4]。

[0005] 在 Prenvar 引入前美国婴儿中进行的 IPD 监视表明由于血清群 6 和 19 的疾病的大部分是由于 6A (约 1/3) 和 19A (约 1/4) 血清型 [5, 6]。在 Prenvar 批准后,在美国进行的肺炎球菌侵入性疾病监视表明大部分的疾病仍然归因于血清型 6A 型和 19A 型 (图 1) [3]。此外,这两种血清型造成比血清型 1、3、5 和 7F 型总和还要多的侵入性疾病病例 (100,000 个 2 岁及 2 岁以下儿童中为 8.2 对 3.3 例)。此外,血清型 6A 和 19A 型与高比率的抗生素抗性有关 (图 2) [7, 8, 9]。尽管随着更多儿童被免疫,可能血清群交叉保护将导致血清型 6A 和 19A 型疾病的下降,但是有证据表明该下降将有限制,并且仍将保持由于这些血清型造成的疾病的显著负担 (见下文)。

[0006] 考虑到由于血清型 1、3、5、6A、7F 和 19A 型造成的侵入性肺炎球菌疾病的相对负担和重要性,向 Prenvar 制剂中加入这些血清型将在美国 and 欧洲增加其对侵入性疾病的覆盖率到 >90%,在亚洲和拉丁美洲高达 70% -80%。该疫苗将显著扩大超过 Prenvar 的覆盖度,并且提供对 6A 和 19A 型的覆盖,其不依赖于血清群交叉保护的有限限制。

[0007] 发明概述

[0008] 因此,本发明主要提供了包含 13 种不同的多糖－蛋白质缀合物的多价免疫原性组合物,其中每种缀合物含有缀合到载体蛋白的来自不同血清型的肺炎链球菌的荚膜多糖,以及生理学上可接受的载体。任选地,在该制剂中包含佐剂,如铝类佐剂。更特别地,本发明提供了 13 价肺炎球菌缀合物 (13vPnC) 组合物,其包含 7vPnC 疫苗中的 7 种血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 型) 加上 6 种额外的血清型 (1、3、5、6A、7F 和 19A 型)。

[0009] 本发明还提供了多价免疫原性组合物,其中荚膜多糖来自肺炎链球菌的血清型 1、

3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型,并且载体蛋白是 CRM₁₉₇。

[0010] 本发明还提供了多价免疫原性组合物,其中荚膜多糖来自肺炎链球菌的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型,载体蛋白是 CRM₁₉₇,并且佐剂是铝类佐剂,如磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。在本发明的具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0011] 本发明还提供了多价免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物以及生理学上可接受的载体,其中每种缀合物包含缀合到载体蛋白的来自肺炎链球菌的不同血清型的荚膜多糖,并且所述荚膜多糖从血清型 3 型和至少一种额外的血清型制备。

[0012] 在该多价免疫原性组合物的一個实施方案中,额外的血清型选自血清型 1、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型。在另一实施方案中,载体蛋白是 CRM₁₉₇。在再一个实施方案中,组合物包含佐剂,如选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的铝类佐剂。在一个具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0013] 本发明还提供了多价免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物与生理学上可接受的载体,其中每种缀合物包含缀合到载体蛋白的来自肺炎链球菌的不同血清型的荚膜多糖,并且该荚膜多糖从血清型 4、6B、9V、14、18C、19F、23F 型和至少一种额外的血清型制备。

[0014] 在该多价免疫原性组合物的一個实施方案中,额外的血清型选自血清型 1、3、5、6A、7F 和 19A 型。在另一实施方案中,载体蛋白是 CRM₁₉₇。在再一个实施方案中,组合物包含佐剂,如选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的铝类佐剂。在一个具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0015] 本发明还提供了诱导对肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的免疫应答的方法,其包括对人施用免疫有效量的任何前述免疫原性组合物。

[0016] 本发明还提供了施用的任何免疫原性组合物是单次的 0.5mL 剂量,其经配制成含有:除了 4 μg 6B 外,每种糖 2 μg;约 29 μg CRM₁₉₇载体蛋白;0.125mg 元素铝(0.5mg 磷酸铝)佐剂;和作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲剂。

[0017] 还提供了制备免疫原性缀合物的方法,该缀合物包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型 1 型(Pn 1)多糖。在一个实施方案中,该方法包括:(i)纯化的 Pn 1 多糖与碱性 pH 缓冲液反应,生成部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖;(ii)部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与弱酸反应,生成中和的、部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖;(iii)中和的、部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与氧化剂反应,生成活化的 Pn 1 多糖;(iv)活化的 Pn 1 多糖与载体蛋白配合;(v)配合的、活化的 Pn 1 多糖和载体蛋白与还原剂反应,生成 Pn 1 多糖:载体蛋白缀合物;及(vi)封闭 Pn 1 多糖:载体蛋白缀合物中未反应的醛,生成包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌 Pn 1 多糖的免疫原性缀合物。

[0018] 在又一个的实施方案中,该方法包括:(i)纯化的 Pn 1 多糖与碳酸氢盐/碳酸盐缓冲液反应,生成部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖;(ii)部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与乙酸反应,生成中和的、部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖;(iii)中和的、部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与高碘酸钠反应,生成活化的 Pn 1 多糖;(iv)纯化活化的 Pn 1 多糖;(v)活化的 Pn 1 多糖与载体蛋白配合;(vi)配合的、活化的 Pn 1 多糖和载体蛋白共同冻干;(vii)共同冻干的、活化的 Pn 1 多糖和载体蛋白与氰基硼氢化钠反应,生成 Pn 1 多糖:载体蛋白缀合物;及(viii)用硼氢化钠封闭 Pn 1 多糖:载体蛋白缀合物中未反应的醛,生成包含共价连接到载体蛋白的

肺炎链球菌 Pn 1 多糖的免疫原性缀合物。

[0019] 提供一种制备活化的肺炎链球菌 Pn 1 多糖的方法。该方法包括：(i) 纯化的 Pn 1 多糖与碱性 pH 缓冲液反应，生成部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖；(ii) 部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与弱酸反应，生成中和的，部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖；(iii) 中和的，部分脱氧乙酰化 Pn 1 多糖与氧化剂反应，生成活化的 Pn 1 多糖。

附图说明

[0020] 图 1 描绘了在美国年龄小于 2 岁的儿童从基线 (1998/1999) 到 2001 年按照血清型的 IPD 比率的变化。

[0021] 图 2 描绘了在小于 5 岁的儿童中具有青霉素 (PCN) 抗性的肺炎球菌分离菌的分布 (1998)。

[0022] 图 3 描绘了来自 D118-P16Pneumovax 试验的第三次剂量后 OPA 的反向累积分布曲线 (RCDC)。

[0023] 发明详述

[0024] Pneumovax 血清型 4、6B、9V、14、18C、19F、23F 型的包括

[0025] 来自 1995-1998 年间 IPD 监视的数据估计 Pneumovax 中的 7 种血清型造成小于 2 岁年龄的儿童中约 82% 的 IPD [5]。在加利福尼亚北部功效试验地点，Pneumovax 血清型占婴儿和幼儿中所有 IPD 病例的 90% [10]。自从在 2000 年引入 Pneumovax 疫苗，由于该疫苗血清型引起的疾病的下降，总的 IPD 率显著降低 [3, 4]。因此，在此时没有理由从下一代肺炎球菌缀合疫苗中除去任一种 Pneumovax 血清型，而是要加入血清型以得到更宽的覆盖范围。

[0026] 血清型 1、3、5 和 7F 型的包括

[0027] 在美国，5 岁以下儿童中血清型 1 型引起的 IPD 率小于 2%，对于血清型 3 和 7F 型的每一种大概是相同的比率 [1, 6]。血清型 1 和 5 型占侵入性肺炎球菌疾病高危美国人口中的 IPD 的较高发病率。特别地，血清型 1 型引起阿拉斯加小于 2 岁的本地儿童中 3.5% 的 IPD，和 2-4 岁儿童中 18% 的 IPD [11]。血清型 1 型和血清型 5 型在世界的其他地方和发达国家的土著人口中显著致病 [12, 13, 14]。

[0028] 与其他肺炎球菌血清型相比，血清型 1 型也与更严重的疾病有关 [15]。该观察是基于美国和欧洲之间病例鉴定率的差异，和医疗实践中相关的差异。总体上，IPD 的发病率在欧洲低于美国。然而，在欧洲血清型 1 型引起的 IPD 的百分比不成比例地高于美国（分别为 6-7% 与 1-2%）。在欧洲，血液培养物主要从住院儿童得到。在美国，在门诊病人从发热 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 并且白细胞数升高的儿童得到血液培养物是常规的医疗实践。考虑到医疗实践的差异，推测在美国血清型 1 型引起疾病的较低百分比可能被引起较轻疾病的其他血清型的较高比率稀释，而欧洲的较高百分比反映了更严重的疾病。此外，具有并发肺炎的儿童的血清流行病学研究表明血清型 1 型被不成比例地表示 [16, 17, 18]。这提示血清型 1 型的包括可以降低严重肺炎球菌疾病的量，以及促进侵入性肺炎球菌疾病的总的减少。

[0029] 加入血清型 3 和 7F 型将在世界上的多数地区增加对 IPD 的覆盖率约 3% -7%，在亚洲为约 9%。从而，11 价疫苗将覆盖亚洲中 IPD 的约 50% 和所有其他地区中 IPD 的约 80% [1, 2]。这些血清型对于中耳炎覆盖率也是重要的 [19]。在引起中耳炎的肺炎球菌血清型的多国家研究中，Hausdorff 等人发现血清型 3 型在所有中耳液分离物中最普遍血

清型中的第 8 位 [20]。血清型 3 占与中耳炎相关的肺炎球菌血清型的至多 8.7%。因此,在中耳炎以及 IPD 中血清型 3 和 7F 型的重要性保证它们包括在肺炎球菌缀合物疫苗中。

[0030] 然而,产生表现出关于血清型 3 型多糖的显著免疫原性的多价肺炎球菌缀合疫苗的尝试没有成功。例如,在 11 价肺炎球菌蛋白 D 缀合疫苗 (11-Pn-PD) 的免疫原性和安全性研究中,在接受三剂疫苗接着接受相同疫苗或者肺炎球菌多糖疫苗的加强剂量的婴儿中没有观察到对于血清型 3 型的引发效果 (Nurkka 等人 (2004) *Ped. Inf. Dis. J.*, 23:1008-1014)。在另一研究中,来自已经接受 11-Pn-PD 剂量的婴儿的调理吞噬测定 (OPA) 没有显示出对血清型 3 型的与其他测试血清型水平相当的抗体应答 (Gatchalian 等人, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster No. 4, PIA Poster Session 1, Istanbul Turkey, Mar. 27, 2001)。在再一个评估 11-Pn-PD 在预防急性中耳炎中功效的研究中,疫苗没有提供对血清型 3 型引起的发作的保护 (Prymula 等人 *Lancet*, 367:740-748 (2006))。因此,包含来自血清型 3 型的荚膜多糖并能够引起对血清型 3 型多糖的免疫原性应答的肺炎球菌缀合疫苗提供了对本领域现状的显著改善。

[0031] 血清型 6A 和 19A 型的包括

[0032] a. 血清型 6A 和 19A 型的流行病学

[0033] 文献中的监视数据提示血清型 6A 和 19A 型与血清型 1、3、5、和 7F 型组合相比,造成美国小于 2 岁的儿童中更多的侵入性肺炎球菌疾病 (图 1) [1, 5]。此外,这些血清型通常与抗生素抗性有关 (图 2) 并且在中耳炎中起重要作用 [6, 19, 20]。当前的 Prevnar 疫苗保护 6A 和 19A 型引起的疾病的能力还不清楚。下面讨论在 13vPnC 疫苗中包括 6A 和 19A 型组分的原理。

[0034] b. 6B 和 19F 型多糖诱导的对 6A 和 19A 型的应答

[0035] 所批准的未缀合的肺炎球菌多糖疫苗 (用于至少 2 岁的人中) 已经含有 6A 或 6B 型荚膜多糖,但是不含有两者 [21]。在配制 23 价肺炎球菌多糖疫苗时产生的免疫原性数据表明 6B 单价疫苗诱导针对 6A 和 6B 型荚膜的抗体。使用游离多糖和使用肺炎球菌缀合疫苗在许多群体中评估 IgG 和调理吞噬测定 (OPA) 应答的几个试验的数据表明针对 6A 的 IgG 应答通过 6B 抗原诱导,但是该应答通常较低,并且使用 6A 生物的 OPA 活性与使用 6B 生物的不同 [22, 23, 24, 25]。此外,以高 6B 抗体应答的受试者可以对 6A 有很小活性或无活性。

[0036] 与 6A 和 6B 荚膜多糖的化学组成相比 (其中存在高度相似性), 19A 和 19F 荚膜由于在 19A 多糖中存在两条额外侧链而相当不同。不令人惊奇的是,在用 19F 多糖疫苗免疫的人类志愿者中测量的免疫应答表明在 80% 的受试者中诱导了对 19F 的应答,但是仅在 20% 的受试者中具有对 19A 的应答 [26]。用 19F 多糖免疫后对血清型 19A 型的低水平的交叉反应性 IgG 和 OPA 应答也已经在使用缀合疫苗的试验中阐述 [24, 26]。

[0037] 已经从在美国婴儿中进行的 7vPnC 桥接试验 (D118-P16) 产生了关于对 6A 和 19A 的交叉反应性 OPA 应答的内部数据 (图 3)。这些研究与其他人的发现一致,并且表明用 6B 多糖免疫后诱导对 6A 多糖的交叉反应性功能抗体无论如何也在较低水平,和用 19F 免疫后对 19A 有极低的功能抗体。

[0038] 动物模型中 6B 和 19F 免疫对 6A 和 19A 的影响

[0039] 已经用动物模型评估用多糖免疫的交叉保护的潜力。在 Giebink 等人开发的中耳炎模型中,用四价多糖外膜蛋白 (OMP) 缀合疫苗 (含有 6B、14、19F、23F 糖类) 或安慰剂免

疫灰鼠 [27]。在该试验中,似乎对 6A 有一定的交叉保护;然而,这没有达到统计学显著性并且保护水平低于用 6B 对中耳炎的保护水平。在该相同模型中,存在对 19F 中耳炎的 100% 保护,但是对 19A 中耳炎仅仅有 17% 的保护。

[0040] Saeland 等人在肺感染模型中,使用来自用 8 价肺炎球菌破伤风缀合疫苗(含有 6B 和 19F)免疫的幼仔血清被动免疫小鼠,然后用 6A 生物进行鼻内攻击 [28]。在 59 个血清样品中,53% 的经保护的小鼠抵抗 6B 引起的菌血症,37% 的经保护小鼠抵抗 6A 引起的菌血症。在相同模型中用来自 4 剂 11 价肺炎球菌缀合疫苗(含有缀合到破伤风类毒素的 19F)免疫的幼仔血清被动免疫的小鼠受到给予 19A 生物的鼻内攻击 [29]。在 100 只被动免疫然后攻击的小鼠中,60 只小鼠在肺组织中没有检测到 19A 生物,而在给予盐水安慰剂的所有小鼠中鉴定到该生物。然而,在该模型中,被动免疫不能保护用 19F 生物的攻击;因此,该模型对于血清群 19 的相关性是可疑的。通常,这些模型提供证据证明 6B 免疫对 6A 生物的一定的生物学影响,但是对异源血清型的影响没有用同源血清型观察到的大。从这些模型还没有很好地了解 19F 免疫对 19A 生物的影响。

[0041] 6B 和 19F 多糖缀合物免疫对功效/有效性试验中 6A 和 19F 型疾病的影响

[0042] 在表 1 中指出了在 7vPnC 和 9vPnC(7vPnC 加血清型 1 和 5 型)功效试验中由于 6B、6A、19F 和 19A 血清型造成的疾病病例数 [30,10,31]。侵入性疾病病例的数目太小而不能对血清型 6A 和 19A 型得出任何结论。然而,Finnish 中耳炎试验产生了许多肺炎球菌分离菌 [32]。在符合方案分析(per protocol analysis)中,7vPnC 对由于血清型 6B 引起的中耳炎为 84% (95% CI 62%, 93%) 有效,对由于血清型 6A 引起的中耳炎为 57% (95% CI 24%, 76%) 有效(表 1)。相比,对由于 19F 或者 19A 引起的中耳炎没有阐明使用 7vPnC 的血清型特异性功效。

[0043] 表 1. 在使用 7vPnC 和 9vPnC 疫苗的功效试验中,由于血清型 6B、6A、19F 和 19A 型引起的肺炎球菌疾病的病例

[0044]

	6B	6A	19F	19A
--	----	----	-----	-----

[0045]

	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
Kaiser 功效试验 – 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Navajo 功效试验 – 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
South African 功 效试验 – 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
South African 功 效试验 – 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Finnish 中耳炎试 验–7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

[0046] * 阐明的统计学显著功效

[0047] 来自参考文献 30、10 和 33, 和个人交流

[0048] Contr = 对照

[0049] ITT = 打算治疗分析

[0050] PP = 符合方案分析

[0051] 还可以从疾病控制中心进行的病例 – 对照试验得到上市后 IPD 监视数据以评估 Prevnar 的有效性 [33]。在监视实验室中鉴定了 3 到 23 个月大的幼儿中发生肺炎球菌侵入性疾病的病例并通过年龄和邮政编码与三个对照病例匹配。得到知情同意后, 从病例和对照的父母和医学提供者得到医疗和免疫史 (如果受试者接受了至少一剂 Prevnar, 那么认为他们是被免疫的)。初步结果在 2003 年 ICAAC 会议上给出并且在表 2 中给出对 6B、19F、19A 和 6A 疾病的发现总结。这些数据表明 Prevnar 能够预防由于 6A 引起的疾病, 尽管其预防水平比预防血清型 6B 型引起的疾病低一些。这些数据还表明对由于 19A 引起的侵入性疾病的交叉保护是有限的。

[0052] 表 2. CDC 进行的病例对照试验的初步结果 (在 2003 年 ICAAC 上给出)

[0053]

血清型	信息集, n	VE* (95% CI)
疫苗类型, 全部	115	94 (87, 97)
相关的疫苗, 全部	36	70 (38, 86)
非疫苗类型, 全部	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

[0054] * 比较接种的 (≥ 1 剂) 对比未接种的疫苗有效性, 并根据潜在的条件调节

[0055] 参考文献 40 和个人 / 私密交流

[0056] Prevnar 使用的经公布的分析 [3] 也表明在 2 岁以下儿童中血清型 6B 和 19F 型使得血清型 6A 和 19A 型引起的 IPD 适度减少 ([3] 中的表 1)。在血清型 6A、9A、9L、9N、18A、18B、18F、19A、19B、19C、23A 和 23B 型 (“都是疫苗相关的血清型”) 引起的未免疫成年人中的疾病发生率有一定的降低 ([3] 中的表 2)。这些数据确定来自 2 岁以下儿童中使用 Prevnar 的群体免疫对于血清型 6A 和 19A 型是中等的, 并且提供了在本发明的 13vPnC 疫苗中包括血清型 6A 和 19A 型的基础。

[0057] 加入 6A 和 19A 型的结论

[0058] 在图 1 和表 2 中使用 7vPnC 疫苗的上市后监视数据和病例 - 对照研究结果表明, 与上述在动物模型中关于免疫应答和性能的其他信息相一致, 可能存在对 6A 型疾病的一定的交叉保护, 但是比对 6B 型疾病的交叉保护程度较低。此外, 似乎对 19A 型的保护是有限的。因此, 含有血清型 6A 和 19A 型的 13vPnC 疫苗提供了覆盖, 其不依赖于通过血清型 6B 和 19F 型的血清群交叉保护的局限性。

[0059] 因此, 本发明提供了包含 13 种不同的多糖 - 蛋白质缀合物以及生理学上可接受载体的多价免疫原性组合物, 其中每种缀合物含有缀合到载体蛋白的不同的荚膜多糖缀合

物,并且其中从肺炎链球菌的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型制备荚膜多糖。一种此类载体蛋白是称作 CRM₁₉₇ 的白喉毒素。免疫原性组合物可以还包含佐剂,如铝类佐剂,如磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

[0060] 通过本领域技术人员已知的标准技术制备荚膜多糖。在本发明中,从肺炎链球菌的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型制备荚膜多糖。通过单独的方法制备这些肺炎球菌缀合物并配制成单剂量制剂。例如,在一个实施方案中,在基于大豆的培养基中培养每种肺炎球菌多糖血清型。然后通过离心、沉淀、超滤和柱层析纯化各种多糖。将纯化的多糖化学活化以使得该糖能够与载体蛋白反应。

[0061] 一旦活化,将每种荚膜多糖单独缀合到载体蛋白以形成复合糖。在一个实施方案中,每种荚膜多糖缀合到相同的载体蛋白。在该实施方案中,通过还原胺化实现缀合。

[0062] 通过常规方法实现多糖的化学活化和随后缀合到载体蛋白。见,例如,美国专利号 4,673,574 和 4,902,506 [34, 35]。

[0063] 载体蛋白优选是无毒并且无反应原性的蛋白质并且可以以足够的量和纯度得到。载体蛋白应该适合标准的缀合步骤。在本发明的具体实施方案中,将 CRM₁₉₇ 用作载体蛋白。

[0064] CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) 是白喉毒素的非毒性变体 (即,类毒素),该白喉毒素从在酪蛋白氨基酸和基于酵母提取物的培养基中生长的白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*) 菌株 C7 (β 197) 的培养物中分离。通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换层析纯化 CRM₁₉₇。备选地,根据美国专利号 5,614,382 重组制备 CRM₁₉₇,将该专利引入本文作为参考。其他白喉类毒素也适于用作载体蛋白。

[0065] 其他合适的载体蛋白包括灭活的细菌毒素,如破伤风毒素、百日咳毒素、霍乱毒素 (例如,如国际专利申请 W02004/083251 中所述 [38])、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、和来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的外毒素。也可以使用细菌外膜蛋白,如外膜复合物 c (OMPC),孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素、肺炎球菌表面蛋白 A (PspA)、肺炎球菌黏附素蛋白 (PsaA)、来自链球菌组 A 或者组 B 的 C5a 肽酶、或者流感嗜血杆菌蛋白 D。其他蛋白质,如卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA) 或者结核菌素的纯化的蛋白质衍生物 (PPD) 也可以用作载体蛋白。

[0066] 荚膜多糖缀合到载体蛋白后,通过多种技术纯化多糖-蛋白质缀合物 (关于多糖-蛋白质缀合物的量的富集)。这些技术包括浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱、柱层析和深层过滤 (depth filtration)。见下面的实施例。

[0067] 纯化各复合糖后,将它们配合以配制本发明的免疫原性组合物,其可以用作疫苗。使用本领域公知的方法可以完成本发明的免疫原性组合物的配制。例如,可以用生理学上可接受的载体配制 13 种各自的肺炎球菌缀合物以制备组合物。此类载体的实例包括,但不限于,水、缓冲盐水、多元醇 (例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇) 和葡萄糖溶液。

[0068] 在一些实施方案中,免疫原性组合物将包含一种或多种佐剂。如本文定义的,“佐剂”是用于增强本发明免疫原性组合物的免疫原性的物质。从而,通常给予佐剂以加强免疫应答并且佐剂是技术人员公知的。用于增强组合物的有效性的合适的佐剂包括,但不限于:

[0069] (1) 铝盐 (alum),如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝,等等;

[0070] (2) 水包油乳液制剂 (有或者没有其他特定免疫刺激剂,如胞壁酰基肽 (下文定

义) 或者细菌细胞壁组分), 如,

[0071] (a) MF59 (PCT 公布号 WO 90/14837), 含有 5% 鲨稀, 0.5% Tween80, 和 0.5% Span 85 (任选含有不同量的 MTP-PE (见下文, 尽管不是必需的), 使用 microfluidizer 如 110Y 型 microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA) 配制成亚微米颗粒,

[0072] (b) SAF, 含有 10% 鲨稀, 0.4% Tween 80, 5% 普卢兰尼克阻断的聚合物 L121, 和 thr-MDP (见下文), 微流化成亚微米乳液或者经涡旋以产生较大颗粒大小的乳液, 和

[0073] (c) RibiTM 佐剂系统 (RAS), (Corixa, Hamilton, MT), 含有 2% 鲨稀, 0.2% Tween 80, 和选自美国专利号 4,912,094 中描述的 3-O-脱酰化的单磷酸脂 A (MPLTM) (Corixa), 海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 的一种或多种细胞壁组分, 优选 MPL+CWS (DetoxTM);

[0074] (3) 皂苷佐剂, 可以使用如 Quil A 或 STIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (美国专利号 5,057,540) 或者从其产生的颗粒, 如 ISCOMs (免疫刺激复合物);

[0075] (4) 细菌脂多糖, 合成的脂类 A 类似物, 如氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯化合物 (AGP), 或者其衍生物或类似物, 其可以从 Corixa 得到, 并且在美国专利号 6,113,918 中描述; 一种此类 AGP 是 2-[(R)-3-十四酰氧基十四酰基氨基]乙基 2-脱氧-4-O-磷酰基-3-O-[(R)-3-十四酰氧基十四酰基]-2-[(R)-3-十四酰氧基十四酰基氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷, 其也称作 529 (以前称作 RC529), 其配制为水性形式或者稳定的乳剂, 合成的多核苷酸, 如含有 CpG 基序的寡核苷酸 (美国专利号 6,207,646);

[0076] (5) 细胞因子, 如白介素 (例如, IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18 等), 干扰素 (例如, γ 干扰素), 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), 肿瘤坏死因子 (TNF), 共刺激分子 B7-1 和 B7-2, 等等;

[0077] (6) 细菌 ADP-核糖基化毒素的脱毒突变体, 如野生型或者突变型的霍乱毒素 (CT), 例如, 其中氨基酸位置 29 的谷氨酸由另一种氨基酸, 优选组氨酸替换 (根据公布的国际专利申请号 WO 00/18434 (也见 WO02/098368 和 WO 02/098369)), 百日咳毒素 (PT), 或者大肠杆菌不耐热毒素 (LT), 尤其是 LT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129 (见例如 WO 93/13302 和 WO 92/19265); 和

[0078] (7) 作为免疫刺激剂以增强组合物的有效性的其他物质。

[0079] 胞壁酰基肽包括, 但不限于 N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酸-D-异谷酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2' 二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺 (MTP-PE) 等等。

[0080] 本发明的疫苗组合物可以用于保护或者治疗对肺炎球菌感染敏感的人, 这可通过全身或者粘膜途径施用疫苗来完成。这些施用可以包括通过肌内、腹膜内、皮内或者皮下途径注射, 或者通过粘膜施用于口/消化道、呼吸道或者泌尿生殖道。在一个实施方案中, 鼻内施用用于治疗肺炎或者中耳炎 (因为肺炎球菌的鼻咽携带可以更有效预防, 从而减轻在其最早阶段的感染)。

[0081] 每个疫苗剂量中缀合物的量选择为诱导免疫保护而无显著副作用的量。此类量可以取决于肺炎球菌血清型而变。通常, 每剂将包含 0.1 到 100 μ g 多糖, 尤其包含 0.1 到 10 μ g 多糖, 更尤其包含 1 到 5 μ g 多糖。

[0082] 通过包括观察受试者合适的免疫应答的标准研究可以确定具体疫苗的组分的最佳量。最初接种后,受试者可以接受适当间隔的一次或几次加强免疫。

[0083] 在本发明的具体实施方案中,13vPnC 疫苗是各自缀合到 CRM₁₉₇的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型的肺炎球菌荚膜多糖的无菌液体制剂。每 0.5mL 剂量被配制成含有:除了 4 μg 6B 之外,每种糖 2 μg :约 29 μg CRM₁₉₇载体蛋白 :0.125mg 元素铝 (0.5mg 磷酸铝) 佐剂 ;和作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲剂。将液体填充到没有防腐剂的单剂量注射器中。摇动后,疫苗是均匀的,白色混悬液可用于肌内施用。

[0084] 13vPnC 疫苗的剂量水平的选择类似于上市的 7vPnC 疫苗 (Prevnar)。为所有血清型选择 2 μg 糖剂量水平,只是对于 6B 型为每剂 4 μg。7vPnC 疫苗对于血清型 4、9V、14、18C、19F 和 23F 型在 2 μg 的糖剂量水平和对于 6B 型在 4 μg 的糖剂量水平已经显示出对于 IPD 的所希望的安全性、免疫原性和功效。

[0085] 免疫方案可以按照为 7vPnC 疫苗指定的方案。例如,针对由于 13vPnC 疫苗中包括的血清型引起的肺炎链球菌侵入性疾病的婴儿和刚学步的小孩的常规方案是 2、4、6 和 12-15 个月的年龄。本发明的组合物也适于更大的儿童、青少年和成人使用。

[0086] 本发明的组合物可以还包括一种或多种额外的抗原,其用于抵抗其他细菌感染引起的中耳炎。此类细菌包括非典型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、粘膜莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) (以前称作粘膜布兰汉球菌 (*Branhamella catarrhalis*)) 和耳炎差异球菌 (*Alloiococcus otitidis*)。

[0087] 适于包括的非典型流感嗜血杆菌抗原的实例包括 P4 蛋白,也称作蛋白“e”(美国专利号 5,601,831;国际专利申请 W003/078453),P6 蛋白,也称作 PAL 或者 PBOMP-1 蛋白(美国专利号 5,110,908;国际专利申请 W00100790),P5 蛋白(美国再版专利号 37,741),嗜血杆菌粘附和穿透蛋白(美国专利号 6,245,337 和 6,676,948),LKP 尖端黏附素蛋白(美国专利号 5,643,725) 和 NucA 蛋白(美国专利号 6,221,365)。

[0088] 适于包括的粘膜莫拉菌抗原的实例包括 UspA2 蛋白(美国专利号 5,552,146, 6,310,190),CD 蛋白(美国专利号 5,725,862),E 蛋白(美国专利号 5,948,412) 和 74 千道尔顿外膜蛋白(美国专利号 6,899,885)。

[0089] 适于包括的耳炎差异球菌抗原的实例包括国际专利申请 W003/048304 中鉴定的那些。

[0090] 本发明的组合物还可以包括一种或多种来自肺炎链球菌的蛋白质。适于包括的肺炎链球菌蛋白质的实例包括国际专利申请 W002/083855 中鉴定的那些以及国际专利申请 W002/053761 中描述的那种。

[0091] 本发明的组合物可以还包括一种或多种来自 B 型脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 的蛋白质。适于包括的 B 型脑膜炎奈瑟氏球菌蛋白质的实例包括国际专利申请 W003/063766, W02004/094596, W001/85772, W002/16612 和 W001/87939 中鉴定的那些。

[0092] 用于缀合的肺炎链球菌血清型 1 型多糖的活化

[0093] 多糖中部分氧化的糖已有效地用于生成醛基,随后该基团偶联到载体蛋白的赖氨酸残基生成免疫原性缀合物(即,组合物,例如疫苗,用于在脊椎动物中刺激或引起具体的免疫应答)。生成醛基的通常的必要条件是存在邻位的(邻近的)羟基。一些多糖中,一些羟基基团由于被其他官能团阻断而不可用。在 Pn 1 情况中,0-乙酰基是有效氧化的一个

障碍,并且选择性地去除这些基团的一些(即,氧化前进行多糖的温和脱氧乙酰化)有助于氧化和促进缀合的效率。

[0094] 为保持氧化反应的一致性直至达到理想程度,Pn 1 多糖首先在碱性 pH 缓冲液中通过温和水解而部分脱氧乙酰化。典型的碱性 pH 缓冲液包括,但不限于,碳酸氢盐/碳酸盐缓冲液(例如碳酸氢钠/碳酸钠),甘氨酸,咪唑,和 TRIS-EDTA。脱氧乙酰化接着是使用弱酸进行中和,例如乙酸,柠檬酸或碳酸,或低离子强度无机酸(例如,盐酸)。中和之后使用控制量的氧化剂而实现部分氧化以产生“活化的”Pn 1 多糖。可以采用任何选择性的氧化剂以氧化末端羟基为醛基,包括具体的糖氧化酶,(例如,高碘酸钠或钾)。然后活化的 Pn 1 多糖任选地纯化(例如,通过以缓冲盐渗滤)。

[0095] 活化的 Pn 1 多糖可以与载体蛋白配合。选择载体蛋白以增加结合的 Pn 1 多糖的免疫原性和/或引起抗载体蛋白的抗体,其是诊断,分析和/或治疗有益的。抗原分子(例如多糖)到载体的共价连接赋予增强的免疫原性和 T 细胞依赖(Pozsgay 等人(1999)PNAS, 96:5194-97;Lee 等人(1976)J. Immunol., 116:1711-18;Dintzis 等人(1976)PNAS, 73:3671-75)。正如本文所述,有益的载体蛋白质包括灭活细菌毒素,如破伤风类毒素、百日咳毒素、霍乱毒素(如国际专利申请 W02004/083251 所述)、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST 和铜绿假单胞菌的外毒素 A。也可以使用细菌外膜蛋白,如外膜复合物 c、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素、肺炎链球菌表面蛋白 A、肺炎链球菌黏附素蛋白、链球菌 A 组或 B 组的 C5a 肽酶、或流感嗜血杆菌蛋白 D。其他蛋白质,如卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白,或纯化的结核菌素蛋白衍生物也可作为载体蛋白质。优选的载体蛋白是突变的白喉毒素 CRM₁₉₇。与载体蛋白配合后,活化的 Pn 1 多糖/载体蛋白混合物任选地冷冻(例如壳式冷冻(shell frozen))并共冻干。

[0096] 缀合是通过将活化的 Pn 1 多糖/载体蛋白混合物与还原剂反应而实现,例如氰基硼氢化钠。未反应的醛随后通过硼氢化钠还原封闭。缀合物经纯化(例如,通过用磷酸盐缓冲液,接着缓冲盐渗滤),得到在缓冲盐溶液中的复合糖的最终批次浓缩物。

[0097] 上面的公开一般性描述了本发明。通过下面的特定实施例可以更完全地理解本发明。这些实例仅仅用于阐明的目的并且不意在限定本发明的范围。

实施例

[0098] 实施例 1

[0099] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 1 型

[0100] 制备主细胞库和工作细胞库

[0101] 从美国典型培养物保藏中心 ATCC 菌株 6301 得到肺炎链球菌血清型 1 型。产生几代种子原种以便扩大菌株和除去动物来源的组分(F1,F2 和 F3 代)。产生两个额外代的种子原种。从 F3 瓶得到第一额外的世代,从第一个额外世代瓶得到随后的世代。冷冻保存(<-70℃)种子瓶,用合成的甘油作为冷冻保藏剂。除了冷冻瓶外,对于 F4 代制备冻干的瓶。为了制备细胞库,在基于大豆的培养基中生长所有培养物。冷冻前,通过离心浓缩细胞,除去用尽的培养基,将细胞沉淀物重悬浮在含有冷冻保藏剂如合成甘油的新鲜培养基中。

[0102] 发酵和收获

[0103] 来自工作细胞库的培养物用于接种含有基于大豆的培养基的种子瓶。将瓶子在

36°C ± 2°C, 不搅拌下温育直到满足生长要求。种子瓶用于接种含有基于大豆的培养基的种子发酵罐。用无菌碳酸钠溶液保持约 7.0 的 pH。达到目标光密度后, 用种子发酵罐接种含有基于大豆的培养基的生产发酵罐。用无菌碳酸钠溶液保持 pH。生长停止后或者达到发酵罐的工作体积后终止发酵。向培养物加入合适量的无菌的 12% 脱氧胆酸钠以裂解细菌细胞和释放细胞相关的多糖。裂解后, 冷却发酵罐内容物。用乙酸调节裂解的培养液的 pH 到约 pH 6.6。通过连续流动离心接着深层过滤和 0.45 μm 微孔过滤澄清裂解物。

[0104] 在备选方法中, 用 3N NaOH 保持约 7.0 的发酵 pH。达到目的光密度后, 用种子发酵罐接种含有基于大豆的培养基的生产发酵罐。用 3N NaOH 保持 pH。生长停止后或者达到发酵罐的工作体积后终止发酵。向培养物加入合适量的无菌的 12% 脱氧胆酸钠以在培养液中得到 0.12% 的浓度, 以裂解细菌细胞和释放细胞结合的多糖。裂解后, 在 7°C 到 13°C 的温度下, 进行搅拌并对发酵罐内容物保持 8 到 24 小时的时间间隔, 以确保已经发生了完全的细胞裂解和多糖释放。该保持期间的搅拌防止裂解沉积物沉淀在发酵罐壁和 pH 探头上, 从而允许保持 pH 探头完整性。接着, 将裂解的细胞培养液的 pH 用 50% 乙酸调节到约 pH5.0。无搅拌下, 在 15°C 到 25°C 的温度下保持 12 到 24 小时的时间间隔后, 显著量的之前溶解的蛋白质作为固体沉淀物从溶液析出, 多糖几乎没有损失或者降解, 其仍保留在溶液中。然后通过连续流动离心, 接着通过深层过滤和 0.45 μm 微孔过滤澄清具有沉淀物的溶液。

[0105] 纯化

[0106] 肺炎球菌多糖的纯化由几个浓缩 / 渗滤操作、沉淀 / 洗脱、柱层析和深层过滤步骤组成。除非另外指出, 所有步骤都在室温下进行。

[0107] 用 100kDa MWCO (千道尔顿分子量截留) 滤器将来自肺炎链球菌血清型 1 型的发酵罐培养物的经澄清的培养液浓缩并渗滤。使用中性 pH 的磷酸钠缓冲液完成渗滤。渗滤从较高分子量的生物聚合物, 如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0108] 通过加入来自贮存液的十六烷基三甲基溴化铵 (HB) 以得到 1% HB (w/v) 的终浓度, 从经浓缩和渗滤的溶液沉淀多糖。在深层滤器上捕获多糖 / HB 沉淀物并丢弃滤液。再溶解多糖沉淀物并使用再循环氯化钠溶液通过含有沉淀物的深层滤器进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液冲洗滤器。

[0109] 向多糖溶液中加入来自碘化钠 (NaI) 贮存液的 NaI 至终浓度为 0.5% 以沉淀 HB。通过深层过滤除去沉淀物。滤液含有目标多糖。用 NaCl/NaI 溶液冲洗沉淀容器和滤器并将冲洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 0.2 μm 滤器过滤多糖。

[0110] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0111] 通过浸渍活性炭的深层滤器过滤, 进一步纯化部分纯化的多糖溶液。过滤后, 用氯化钠溶液冲洗碳滤器。将冲洗液与多糖溶液合并, 然后将其通过 0.2 μm 滤器过滤。

[0112] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用 1M 磷酸钠缓冲液调节以实现 0.025M 终浓度的磷酸钠。检查 pH 并调节到 7.0 ± 0.2。

[0113] 用含有氯化钠的磷酸钠缓冲液平衡陶瓷羟基磷灰石 (HA) 柱, 以得到合适的电导率 (<15 μS)。然后将多糖溶液装载到柱子上。在这些条件下, 杂质结合到树脂并且从柱子的洗脱液回收多糖。多糖溶液通过位于柱子之前和之后的 0.2 μm 线内滤器过滤。

[0114] 使用 30kDa MWCO 滤器浓缩多糖溶液。然后用注射用水 (WFI) 渗滤浓缩液。

[0115] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2 μm 滤膜过滤到聚丙烯瓶中。取出样品用于释放测试

(release testing) 并将纯化的多糖在 $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 冷冻保藏。

[0116] 表征

[0117] 通过指定给多糖分子的质子的信号的分配, 1H-NMR 数据与化学结构相一致。 1H-NMR 谱显示一系列分辨率良好的信号 (来自甲基的质子), 其用以定量多糖中的 O-乙酰基官能团。

[0118] 使用特异性抗血清, 通过对流免疫电泳证实单价多糖的身份。

[0119] 使用配备折射率和多角度激光散射 (MALLS) 检测器的高效凝胶过滤层析和样品浓缩物以计算分子量。

[0120] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘多糖的相对分子大小分布。

[0121] 实施例 2

[0122] 制备血清型 1 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合物

[0123] 活化和缀合

[0124] 将含纯化的多糖的容器解冻并合并到反应容器中。向容器中加入 pH9.0 的 0.2M 碳酸钠用于在 50°C 部分脱乙酰化 (水解) 3 小时。将反应物冷却到 20°C 并通过 0.2M 乙酸进行中和。通过在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 温育, 在高碘酸钠存在下进行氧化, 并搅拌混合物 15-21 小时。

[0125] 浓缩活化反应混合物并使用 30K MWCO 膜用 0.9% NaCl 渗滤 10 次。将存留物用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。将活化的糖装入 100mL 玻璃冻干瓶中并在 -75°C 壳式冷冻并冻干。

[0126] “壳式冷冻”是一种制备用于冻干 (冷冻干燥) 的样品的方法。在含有醇或任何其他合适的液体的冷冻水浴中通过电机驱动的滚筒自动旋转烧瓶。产物的薄涂层围绕瓶的内“壳”均匀冷冻, 允许在每次冷冻干燥运行期间安全地处理更大体积的物质。这些自动化的冷冻单元提供了一次预冷冻许多烧瓶的简单和有效的方法, 在内部产生所希望的涂层, 并为有效的冷冻干燥提供了足够的表面积。

[0127] 将含经冻干物质的瓶恢复到室温并以糖 / 蛋白质比为 2:1 重悬浮在 CRM₁₉₇ 溶液中。向该糖 / 蛋白质混合物中加入 1M 磷酸钠缓冲液至最终 0.2M 离子浓度和 7.5 的 pH, 然后加入氰基硼氢化钠。反应物在 23°C 温育 18 小时, 接着在 37°C 再次温育 72 小时。氰基硼氢化物温育后, 用冷的盐水稀释反应混合物, 接着加入 1M 碳酸钠以调节反应混合物到 pH9.0。通过加入硼氢化钠, 在 23°C 温育 3-6 小时淬灭未反应的醛。

[0128] 将反应混合物用盐水稀释 2 倍并通过 $0.45-5\text{ }\mu\text{m}$ 预过滤器转移到存留物容器中。用 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH 6) 渗滤反应混合物 30 次, 用盐水渗滤 20 次。通过 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤存留物。

[0129] 将缀合物溶液用 0.9% 盐水稀释到 0.5mg/mL 的目标浓度, 然后在 Class100 通风厨中无菌过滤到最终体相浓缩物 (final bulk concentrate) (FBC) 容器中。缀合物在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0130] 表征

[0131] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘缀合物的相对分子大小分布。

[0132] 使用特异抗血清通过狭线印迹测定法证实缀合物的身份。

[0133] 分别通过糖醛酸和 Lowry 测定法测定糖和蛋白质浓度。通过下面的计算得到共价结合的缀合物复合物中糖与蛋白质的比率:

[0134]

$$\text{比率} = \frac{\mu\text{g/mL 糖}}{\mu\text{g/mL 蛋白质}}$$

[0135] 通过 Hestrin 方法 (Hestrin 等人, J. Biol. Chem. 1949, 180, 第 249 页) 测量 O- 乙酰基含量。O- 乙酰基浓度与总糖浓度的比率得到每毫克糖的 O- 乙酰基微摩尔数。

[0136] 实施例 3

[0137] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 3 型

[0138] 制备主细胞库和工作细胞库

[0139] 肺炎链球菌血清型 3 型从宾夕法尼亚州费城宾夕法尼亚大学的 Robert Austrian 博士处得到。细胞库系统的制备见实施例 1。

[0140] 发酵和收获

[0141] 来自工作细胞库的培养物用于接种含有基于大豆的培养基的种子瓶。将瓶子在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 无搅拌下温育, 直到满足生长需要。用种子瓶接种含有基于大豆的培养基的种子发酵罐。用无菌碳酸钠溶液保持 pH 约 7.0。达到目标光密度后, 用种子发酵罐接种中间种子发酵罐。达到目标光密度后, 用中间种子发酵罐接种生产发酵罐。用无菌碳酸钠溶液保持 pH。达到发酵罐的工作体积后终止发酵。向培养物中加入合适量的无菌 12% 脱氧胆酸钠以裂解细菌细胞和释放细胞相关的多糖。裂解后, 冷却发酵罐内容物。用乙酸调节裂解的培养液的 pH 到约 pH6.6。通过连续流动离心接着深层过滤和 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔过滤澄清裂解物。

[0142] 纯化

[0143] 肺炎球菌多糖的纯化由几个浓缩 / 渗滤操作、沉淀 / 洗脱、柱层析和深层过滤步骤组成。除非另外指出, 所有步骤都在室温下进行。

[0144] 用 100kDa MWCO 滤器将来自肺炎链球菌血清型 3 型的发酵罐培养物的经澄清的培养液浓缩并渗滤。使用中性 pH 的磷酸钠缓冲液完成渗滤。渗滤从较高分子量的生物聚合物, 如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0145] 加入十六烷基三甲基溴化铵 (HB) 前, 向经浓缩和渗滤的多糖溶液中加入经计算体积的 NaCl 贮存液以得到 0.25M NaCl 的终浓度。然后加入来自贮存液的 HB 至得到 1% HB (w/v) 的终浓度以沉淀多糖。在深层滤器上捕获多糖 / HB 沉淀物并丢弃滤液。再溶解多糖沉淀物并通过再循环氯化钠溶液对含有沉淀物的深层滤器进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液冲洗滤器。

[0146] 向多糖溶液中加入来自碘化钠 (NaI) 贮存液的 NaI 至终浓度 0.5% 以沉淀 HB。通过深层过滤除去沉淀物。滤液含有目标多糖。用 NaCl/NaI 溶液冲洗沉淀容器和滤器并将冲洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤多糖。

[0147] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0148] 通过浸渍活性炭的深层滤器过滤, 进一步纯化部分纯化的多糖溶液。过滤后, 用氯化钠溶液冲洗碳滤器。将冲洗液与多糖溶液合并, 然后将其通过 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤。

[0149] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用 1M 磷酸钠缓冲液调节以实现 0.025M 终浓度的磷酸钠。检查 pH 并调节到 7.0 ± 0.2 。

[0150] 用含有氯化钠的磷酸钠缓冲液平衡陶瓷羟基磷灰石 (HA) 柱, 以得到合适的电导率 ($15 \mu\text{S}$)。然后将多糖溶液装载到柱子上。在这些条件下, 杂质结合到树脂并且从柱子的洗脱液回收多糖。用缓冲液冲洗柱子释放多糖并通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤多糖。

[0151] 使用 30kDa MWC0 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液。

[0152] 将渗滤的多糖溶液通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤到不锈钢容器中。取出样品用于释放测试并将纯化的多糖在 $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ 冷冻保藏。

[0153] 表征

[0154] 通过指定给多糖分子的质子的信号的分配, 1H-NMR 数据与化学结构相一致。

[0155] 使用特异性抗血清, 通过对流免疫电泳证实单价多糖的身份。

[0156] 使用配备折射率和多角度激光散射 (MALLS) 检测器的高效凝胶过滤层析和样品浓缩物计算分子量。

[0157] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘多糖的相对分子大小分布。

[0158] 实施例 4

[0159] 血清型 3 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合物的制备

[0160] 活化和缀合

[0161] 将含纯化的血清型 3 型糖的容器解冻并合并反应容器中。向该容器中加入 WFI 和 2M 乙酸至终浓度 0.2M 和 2mg/ml 糖。将溶液的温度升高到 85°C 1 小时以水解多糖。冷却反应物到 $\leq 25^\circ\text{C}$ 并加入 1M 氯化镁至终浓度为 0.1M。通过在 23°C 温育 16-24 小时, 在高碘酸钠存在下进行氧化。

[0162] 使用 100K MWC0 膜浓缩活化反应混合物并用 WFI 渗滤 10 次。通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤存留物。

[0163] 为了配制, 向活化的糖中加入 0.2M 磷酸钠 (pH7.0) 至 10mM 终浓度和 6.0-6.5 的 pH。将 CRM₁₉₇ 载体蛋白与糖溶液混合至 2g 糖 / 1g CRM₁₉₇ 的比率。将合并的糖 / 蛋白质溶液装入 100mL 玻璃冻干瓶中, 目标填充为 50mL, 在 -75°C 壳式冷冻, 并冻干。

[0164] 使含共同冻干的糖 / 蛋白质物质瓶恢复至室温, 并重悬浮在 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中至 20mg/mL 的最终糖浓度。调节 pH 到 6.5, 然后加入 0.5 摩尔当量的氰基硼氢化钠。在 37°C 温育反应物 48 小时。氰基硼氢化物温育后, 用冷的 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水缓冲液稀释反应混合物。通过加入硼氢化钠并在 23°C 温育 3-6 小时淬灭未反应的醛。通过 $0.45\text{--}5 \mu\text{m}$ 预过滤器转移反应混合物到存留物容器中。

[0165] 用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH9) 渗滤反应混合物 30 次, 用 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH6) 渗滤反应混合物 20 次, 用 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水渗滤反应混合物 20 次。通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤存留物。

[0166] 将缀合物溶液稀释到目标糖浓度为 0.5mg/mL, 然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 保存缀合物。

[0167] 表征

[0168] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘缀合物的相对分子大小分布。

[0169] 使用特异抗血清通过狭线印迹测定法证实缀合物的身份。

[0170] 分别通过 Anthrone 和 Lowry 测定法测定糖和蛋白质浓度。通过下面的计算得到共价结合的缀合物复合物中糖与蛋白质的比率:

[0171]

$$\text{比率} = \frac{\mu\text{g/mL 糖}}{\mu\text{g/mL 蛋白质}}$$

[0172] 实施例 5

[0173] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 5 型

[0174] 肺炎链球菌血清型 5 型从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到。细胞库系统的制备见实施例 1。发酵、收获、多糖的纯化和表征见实施例 1。

[0175] 备选发酵方法

[0176] 来自工作细胞库的培养物用于接种含有基于大豆的培养基和 10mM 无菌 NaHCO_3 溶液的种子瓶。将瓶子在 $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 无搅拌下温育直到满足生长要求。用种子瓶接种含有基于大豆的培养基和 10mM 无菌 NaHCO_3 溶液的种子发酵罐。用 3N NaOH 保持 pH 约 7.0。达到目标光密度后,用种子发酵罐接种含有基于大豆的培养基与 10mM 浓度的 NaHCO_3 的生产发酵罐。用 3N NaOH 保持 pH。生长停止后或者达到发酵罐的工作体积时停止发酵。向培养物中加入合适量的无菌 12% 脱氧胆酸钠以得到其在培养液中的浓度为 0.12%, 以裂解细菌细胞和释放细胞相关的多糖。裂解后,搅拌下,在 7°C 到 13°C 的温度下保持发酵罐内容物 8 到 24 小时的时间间隔,以确保已经发生了完全细胞裂解和多糖释放。该保持期间的搅拌防止裂解沉积物沉淀在发酵罐壁和 pH 探头上,从而允许保持 pH 探头完整性。接着,将裂解的细胞培养液的 pH 用 50% 乙酸调节到约 pH4.5。无搅拌下,在 15°C 到 25°C 的温度下保持 12 到 24 小时的时间间隔后,显著部分的以前溶解的蛋白质作为固体沉淀物从溶液析出,多糖几乎没有损失或者降解,其仍保留在溶液中。然后通过连续流动离心,接着通过深层过滤和 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔过滤澄清具有沉淀物的溶液。

[0177] 实施例 6

[0178] 制备血清型 5 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合物

[0179] 活化和缀合

[0180] 将含血清型 5 型糖的容器解冻并合并并在反应容器中。向该容器中加入 0.1M 乙酸钠 (pH4.7),接着在高碘酸钠存在下通过在 23°C 温育 16-22 小时进行氧化。

[0181] 使用 100K MWCO 膜浓缩活化反应混合物并用 WFI 渗滤 10 次。通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤存留物。

[0182] 将血清型 5 型活化的糖与 CRM₁₉₇ 以 0.8:1 的比例合并。将合并的糖 / 蛋白质溶液装入 100mL 玻璃冻干瓶 (50mL 目标填充) 中并在 -75°C 壳式冷冻,并共同冻干。

[0183] 让含共同冻干的物质的瓶子恢复到室温并重悬浮在 0.1M 磷酸钠 (pH7.5) 中,加入氰基硼氢化钠。反应物在 30°C 温育 72 小时,接着再次加入氰基硼氢化钠并在 30°C 温育 20-28 小时。

[0184] 氰基硼氢化钠温育后,用盐水稀释反应混合物 2 倍并通过 $0.45\text{--}5 \mu\text{m}$ 预过滤器转移到存留物容器中。将反应混合物用 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH8) 渗滤 30 次,用 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH6) 渗滤 20 次,并用盐水渗滤 20 次。通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤存留物。

[0185] 将缀合物溶液稀释到糖目标浓度为 0.5mg/mL,然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 2-8℃保存缀合物。

[0186] 缀合物的表征见实施例 2。

[0187] 实施例 7

[0188] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 6A 型

[0189] 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到肺炎链球菌血清型 6A 型。细胞库系统的制备见实施例 1。发酵、收获和多糖的纯化见实施例 1,只是在纯化期间,在层析步骤前省略了 30kDa MWC0 浓缩步骤。

[0190] 实施例 8

[0191] 制备血清型 6A 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇缀合物

[0192] 活化和缀合

[0193] 血清型 6A 型多糖是高分子量聚合物,其必须在氧化前减小大小。解冻含血清型 6A 型糖的容器并将其合并并在反应容器中。向容器中加入 2M 乙酸至 0.1M 的终浓度,用于在 60℃水解 1.5 小时。将反应物冷却到 23℃并通过用 1M NaOH 调节反应混合物至 pH6 进行中和。在高碘酸钠存在下,通过在 23℃温育 14-22 小时进行氧化。

[0194] 使用 100K MWC0 膜浓缩活化反应混合物并用 WFI 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0195] 将血清型 6A 型用蔗糖配制并填充到 100mL 玻璃冻干瓶 (50mL 目标填充) 并在 -75℃壳式冷冻并冻干。

[0196] 将含冻干物质的瓶子恢复到室温并以 1:1 的糖 / 蛋白质比率重悬浮在二甲基亚砜 (DMSO) 中。加入氰基硼氢化钠后,在 23℃温育反应混合物 18 小时。氰基硼氢化钠温育后,用冷盐水稀释反应混合物。通过加入硼氢化钠,通过在 23℃温育 3-20 小时淬灭未反应的醛。

[0197] 通过 5 μm 预过滤器将稀释的反应混合物转移到存留物容器中。将反应混合物用 0.9% NaCl 渗滤 10 次,用琥珀酸盐缓冲的 NaCl 渗滤 30 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0198] 将缀合物溶液稀释到糖目标浓度为 0.5mg/mL,然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 2-8℃保存缀合物。

[0199] 缀合物的表征见实施例 2。

[0200] 实施例 9

[0201] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 7F 型

[0202] 肺炎链球菌血清型 7F 型从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到。细胞库系统的制备和多糖的发酵和收获见实施例 3。关于备选发酵和收获方法,见实施例 1 中描述的备选方法。

[0203] 纯化

[0204] 肺炎链球菌多糖的纯化由几个浓缩 / 渗滤操作、沉淀 / 洗脱、柱层析和深层过滤步骤组成。除非另外指出,所有步骤都在室温下进行。

[0205] 用 100kDa MWC0 滤器将来自肺炎链球菌血清型 7F 型的发酵罐培养物的经澄清的培养液浓缩并渗滤。使用磷酸钠缓冲液在中性 pH 下完成渗滤。渗滤从较高分子量的生物聚合物,如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0206] 血清型 7F 型不与 HB 形成沉淀。而是,通过将来自贮存液的 HB 加入并达到 1% HB 的终浓度而从经浓缩和渗滤的溶液中沉淀杂质。在深层滤器上捕获沉淀物并丢弃滤器。滤液中含有多糖。

[0207] 向多糖溶液中加入来自碘化钠 (NaI) 贮存液的 NaI 至终浓度 0.5% 以沉淀 HB。通过深层过滤除去沉淀物。滤液含有目标多糖。用 NaCl/NaI 溶液冲洗沉淀容器和滤器并将冲洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 0.2 μm 滤器过滤多糖。

[0208] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0209] 通过浸渍活性炭的深层滤器过滤,进一步纯化部分纯化的多糖溶液。过滤后,用氯化钠溶液冲洗碳滤器。将冲洗液与多糖溶液合并,然后将其通过 0.2 μm 滤器过滤。

[0210] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用 1M 磷酸钠缓冲液调节以实现 0.025M 终浓度的磷酸钠。检查 pH 并调节到 7.0 ± 0.2 。

[0211] 用含有氯化钠的磷酸钠缓冲液平衡陶瓷羟基磷灰石 (HA) 柱,以得到合适的电导率 (15 μS)。然后将多糖溶液装载到柱子上。在这些条件下,杂质结合到树脂并且从柱子的洗脱液回收多糖。用缓冲液冲洗穿过柱子洗脱多糖并通过 0.2 μm 滤器过滤多糖。

[0212] 使用 30kDa MWCO 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液。

[0213] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2 μm 滤膜过滤到不锈钢容器中。取出样品用于释放测试并将纯化的多糖在 $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$ 冷冻保藏。

[0214] 多糖的表征见实施例 3。

[0215] 实施例 10

[0216] 制备血清型 7F 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合物

[0217] 活化和缀合

[0218] 通过在 23°C 温育 16-24 小时,在高碘酸钠存在下进行氧化。

[0219] 使用 100K MWCO 膜浓缩活化反应混合物并用 10mM NaOAc, pH4.5 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0220] 将血清型 7F 型填充到 100mL 玻璃冻干瓶 (50ml 目标填充),在 -75°C 壳式冷冻并冻干。

[0221] 将冻干的血清型 7F 型和 CRM₁₉₇ 的瓶子恢复室温并以 1.5:1 的糖 / 蛋白质比例重悬浮在 DMSO 中。加入氰基硼氢化钠后,在 23°C 温育反应物 8-10 小时。通过加入硼氢化钠,在 23°C 温育 16 小时淬灭未反应的醛。

[0222] 将反应混合物用冷盐水稀释 10 倍,并通过 5 μm 预过滤器转移到存留物容器中。将反应混合物用 0.9% 盐水渗滤 10 次并用琥珀酸盐缓冲的盐水渗滤 30 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0223] 将缀合物溶液用 0.9% 盐水稀释到糖目标浓度为 0.5mg/mL,然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存缀合物。

[0224] 缀合物的表征见实施例 4。

[0225] 实施例 11

[0226] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 19A 型

[0227] 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到肺炎链球菌血清型 19A 型。关于制备细胞库系统,见实施例 1。多糖的发酵、收

获和纯化见实施例 7。表征见实施例 3。

[0228] 实施例 12

[0229] 制备血清型 19A 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇缀合物

[0230] 活化和缀合

[0231] 将含血清型 19A 型糖的容器解冻并合并并在反应容器中。加入乙酸钠至 10mM(pH5.0)并在高碘酸钠存在下通过在 23°C 温育 16-24 小时进行氧化。

[0232] 使用 100K MWC0 膜浓缩活化反应混合物并用 10mM 乙酸盐, pH5.0 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0233] 用蔗糖配制活化的糖接着加入 CRM₁₉₇。将血清型 19A 型活化的糖和 CRM₁₉₇混合物 (0.8:1 比例) 填充到 100ml 玻璃冻干瓶 (50mL 目标填充) 并在 -75°C 壳式冷冻并冻干。

[0234] 将冻干物质的瓶子恢复到室温并重悬浮在 DMSO 中。向糖 / 蛋白质混合物中加入氰基硼氢化钠 (100mg/ml)。将反应物在 23°C 温育 15 小时。氰基硼氢化物温育后, 通过加入硼氢化钠, 在 23°C 温育 3-20 小时淬灭未反应的醛。

[0235] 将反应混合物用冷盐水稀释 10 倍并通过 5 μm 预过滤器转移到存留物容器中。将反应混合物用 0.9% NaCl 渗滤 10 次, 0.45 μm 过滤, 并用 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% NaCl 缓冲液, pH6 渗滤 30 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0236] 用 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水将缀合物溶液稀释到目标浓度为 0.5mg/mL, 然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 2-8°C 保存缀合物。

[0237] 缀合物的表征见实施例 4。

[0238] 实施例 13

[0239] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 型

[0240] 制备肺炎链球菌种子培养物

[0241] 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到肺炎链球菌血清型 4、6B、9V、18C、19F 和 23F 型。肺炎链球菌血清型 14 型从 ATCC 菌株 6314 得到。

[0242] 单独地将每种目标血清型的肺炎链球菌的一瓶用于开始批次发酵。用碳酸钠将含有基于大豆的培养基和酚红的两瓶调节到 7.4±0.2 的 pH 范围, 然后向瓶中加入所需体积的 50% 葡萄糖 / 1% 硫酸镁溶液。将两个瓶子接种不同量的种子。瓶子在 36°C ±2°C 培育直到培养基变成黄色。培育后, 从每个瓶子取出样品, 并测试光密度 (OD) (0.3 到 0.9) 和 pH (4.6 到 5.5)。选择两个瓶子之一用于接种种子发酵罐。

[0243] 将基于大豆的培养基转移到种子发酵罐并灭菌。然后向发酵罐中加入一定体积的 50% 葡萄糖 / 1% 硫酸镁溶液。监视并控制种子发酵罐的 pH (pH6.7 到 7.4) 并搅拌。温度保持在 36°C ±2°C。种子接种物 (瓶) 无菌连接到种子发酵罐并转移接种物。保持发酵罐处于控制的 pH 下并定期取出样品测试 OD 和 pH。当在 600nm 达到所需的 OD 0.5 时, 用来自种子发酵罐的发酵液接种中间发酵罐。

[0244] 将基于大豆的培养基转移到中间发酵罐并灭菌。然后向发酵罐加入一定体积的 50% 葡萄糖 / 1% 硫酸镁溶液。监视并控制中间发酵罐的 pH (pH6.7 到 7.4) 并搅拌。温度保持在 36°C ±2°C。将种子发酵罐的内含物转移到中间发酵罐中。保持发酵罐处于控制的 pH 下并定期取出样品测试 OD 和 pH。当在 600nm 达到所需的 OD 0.5 时, 用来自中间发酵罐

的发酵液接种生产发酵罐。

[0245] 将基于大豆的培养基转移到生产发酵罐并灭菌。然后向发酵罐加入一定体积的 50% 葡萄糖 / 1% 硫酸镁溶液。监视并控制生产发酵罐的 pH (pH 6.7 到 7.4) 并搅拌。温度保持在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。保持发酵罐处于控制的 pH 下并定期取出样品并测试 OD 和 pH, 直到发酵完成。

[0246] 向发酵罐中加入脱氧胆酸钠至约 0.12% w/v 的终浓度。将培养物混合最少 30 分钟并将温度调节点降低到 10°C 。过夜培养培养物并且证实失活后, 如必要, 用 50% 乙酸调节培养物的 pH 到 6.4 到 6.8。升高发酵罐的温度至 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 并将内含物转移到澄清保持槽中。

[0247] 通过以每小时 25 到 600 升的流速离心处理澄清保持槽中的内含物 (保持细胞碎片) (血清型 4 型除外, 其中丢弃细胞碎片并将流速收紧在每小时 25 到 250 升)。取出上清液的样品并测试 OD。在离心期间所需的 OD 为 ≤ 0.15 。

[0248] 最初, 通过深层滤器装置再循环上清液, 直到实现 0.05 ± 0.03 的 OD。然后, 上清液穿过深层滤器装置并且通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜以过滤到滤液保持槽中。

[0249] 随后, 产物通过闭管转移到纯化区用于处理。

[0250] 所有上面的操作 (离心、过滤和转移) 都在 10°C 到 30°C 之间进行。

[0251] 关于血清型 4 和 6B 型的备选发酵和收获方法, 见实施例 1 中描述的备选方法。

[0252] 纯化

[0253] 每种肺炎链球菌多糖的纯化由几个浓缩 / 渗滤操作、沉淀 / 洗脱、柱层析和深层过滤步骤组成。除非另外指出, 所有步骤都在室温下进行。

[0254] 用 100kDa MWC0 滤器将来自目的肺炎链球菌血清型的经发酵罐培养物的澄清的培养液浓缩并渗滤。使用磷酸钠缓冲液在 pH 小于 9.0 下完成渗滤。渗滤从较高分子量的生物聚合物, 如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0255] 通过加入来自贮存液的 HB 并达到 1% HB (w/v) 的终浓度 (血清型 23F 型除外, 其具有 2.5% 的终浓度) 而从浓缩和渗滤的溶液沉淀多糖。在深层滤器上捕获多糖 / HB 沉淀物并丢弃滤液 (注意: 血清型 14 型不沉淀; 因此保留滤液)。再溶解多糖沉淀物并用再循环氯化钠溶液通过含有沉淀物的深层滤器进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液冲洗滤器。

[0256] 向多糖溶液中加入来自碘化钠 (NaI) 贮存液的 NaI 至终浓度 0.5% 以沉淀 HB (血清型 6B 型除外, 其具有 0.25% 的 HB 终浓度)。通过深层过滤除去沉淀物。滤液含有目标多糖。丢弃滤器。然后通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤多糖。

[0257] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0258] 通过浸渍活性炭的深层滤器过滤, 进一步纯化部分纯化的多糖溶液。过滤后, 用氯化钠溶液冲洗碳滤器。将冲洗液与多糖溶液合并, 然后将其通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤。

[0259] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液冲洗滤器。检查 pH 并调节到 7.0 ± 0.3 。

[0260] 用含有氯化钠的磷酸钠缓冲液平衡陶瓷羟基磷灰石 (HA) 柱, 直到 pH 为 7.0 ± 0.3 并且电导率为 $26 \pm 4 \mu\text{S}$ 。然后将多糖溶液装载到柱子上。在这些条件下, 杂质结合到树脂并且从柱子的洗脱液回收多糖。多糖溶液通过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤。

[0261] 使用 30kDa MWC0 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液直到电导率小于

15 μ S。

[0262] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2 μ m 滤膜过滤到大体积容器 (bulk container) 中并在 2-8°C 保存。

[0263] 实施例 14

[0264] 制备针对血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 型的肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合物

[0265] 活化方法

[0266] 如本实施例所述,不同的血清型糖按照不同的途径活化(活化前水解或者不水解)和缀合(水性或者 DMSO 反应)。

[0267] 将多糖从大体积容器转移到反应器容器中。然后用 WFI 和磷酸钠稀释多糖至 1.6-2.4mg/mL 的终浓度范围。

[0268] 步骤 1

[0269] 对于血清型 6B、9V、14、19F 和 23F 型,调节 pH 至 pH6.0 $\pm$ 0.3。

[0270] 对于血清型 4 型,加入盐酸(0.01M 最终酸浓度)并在 45°C $\pm$ 2°C 下温育 25-35 分钟。通过冷却到 21-25°C 并加入 1M 磷酸钠至目标 pH6.7 $\pm$ 0.2 而终止水解。进行过程中测试以证实合适水平的脱丙酮酰化(depyruvylation)。

[0271] 对于血清型 18C,加入冰乙酸(0.2M 最终酸浓度)并在 94°C $\pm$ 2°C 下温育溶液 205-215 分钟。然后降低温度至 21-25°C 并加入 1-2M 磷酸钠至目标 pH6.8 $\pm$ 0.2。

[0272] 步骤 2:高碘酸盐反应

[0273] 使用总的糖含量(除了血清型 4 型之外)确定肺炎球菌糖活化所需的高碘酸钠摩尔当量。对于血清型 4 型,使用每摩尔糖 0.8-1.2 摩尔高碘酸钠的比例。通过充分混合,对于除了 19F 型的所有血清型,让氧化反应在 21-25°C 下进行 16 到 20 小时,对于 19F 型的反应温度为小于等于 15°C。

[0274] 步骤 3:超滤

[0275] 在 100kDa MWCO 超滤膜(对于 18C 使用 5kDa 超滤膜)上浓缩氧化的糖并用 WFI(对于血清型 19F 型使用 0.01M 磷酸钠缓冲液 pH6.0)渗滤。丢弃渗透液并通过 0.22 μ m 滤器过滤存留物。

[0276] 步骤 4:冻干

[0277] 对于血清型 4、9V 和 14 型,将浓缩的糖与 CRM₁₉₇ 载体蛋白混合,装入玻璃瓶中,壳式冷冻并在小于等于 -65°C 保存。冷冻浓缩的糖 -CRM₁₉₇ 进行冻干并在 -25°C $\pm$ 5°C 保存。

[0278] 对于血清型 6B、19F 和 23F 型,加入特定量的蔗糖,所述量经计算为在缀合反应混合物中达到 5% $\pm$ 3% 的蔗糖浓度。血清型 18C 型不需要蔗糖加入。然后将浓缩的糖装入玻璃瓶中,壳式冷冻并在小于等于 -65°C 保存。冷冻浓缩的糖进行冻干并在 -25°C $\pm$ 5°C 保存。

[0279] 缀合方法

[0280] 使用两种缀合方法:水性缀合用于血清型 4、9V、14 和 18C 型,DMSO 缀合用于血清型 6B、19F 和 23F 型。

[0281] 水性缀合

[0282] 步骤 1:溶解

[0283] 对于血清型 4、9V 和 14 型,解冻冻干的活化的糖 -CRM₁₉₇ 混合物并在室温平衡。然

后以特定比例在 0.1M 磷酸钠缓冲液中重构冻干活化的糖 -CRM₁₉₇:

[0284] ●对于血清型 4 和 9V 型,每 16-24g 糖 1L 缓冲液

[0285] ●对于血清型 14 型,每 6-10g 糖 1L 缓冲液

[0286] 对于血清型 9V 型,在 37°C ±2°C 下温育反应混合物直到完全溶解,对于血清型 4 和 14 型,在 23°C ±2°C 下温育反应混合物直到完全溶解。

[0287] 对于血清型 18C 型,在 CRM₁₉₇,1M 磷酸氢二钠的溶液中以每 1L CRM₁₉₇溶液 0.11L 磷酸钠的比例重构冻干的糖。在 23°C ±2°C 下温育反应混合物 (8-12g/L 糖浓度) 直到完全溶解。

[0288] 在该阶段检测 pH 作为生产条件下控制。

[0289] 步骤 2 :缀合反应

[0290] 对于血清型 4 和 9V 型,通过加入氰基硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以实现每摩尔糖 1.0-1.4 摩尔氰基硼氢化钠,而启动缀合反应。在 37°C ±2°C 温育反应混合物 44-52 小时。然后降低温度至 23°C ±2°C 并向反应器中加入 0.9%氯化钠。加入硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以实现每摩尔糖 1.8-2.2 摩尔当量的硼氢化钠。在 23°C ±2°C 温育混合物 3-6 小时。用氯化钠 0.9% 稀释混合物并冲洗反应器。使用 1.2 μm 预过滤器将稀释的缀合混合物过滤到储存容器中。

[0291] 对于血清型 14 和 18C 型,通过加入氰基硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以实现每摩尔糖 1.0-1.4 摩尔氰基硼氢化钠,而启动缀合反应。在 23°C ±2°C 温育反应混合物 12-24 小时。然后升高温度至 37°C ±2°C 并将反应物温育 72-96 小时。然后降低温度至 23°C ±2°C 并向反应器中加入 0.9%氯化钠。加入硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以实现每摩尔糖 1.8-2.2 摩尔当量的硼氢化钠。在 23°C ±2°C 温育混合物 3-6 小时。用 0.9%氯化钠稀释混合物并冲洗反应器。使用 1.2 μm 预过滤器将稀释的缀合混合物过滤到储存容器中。

[0292] 步骤 3 :100kDa 超滤

[0293] 在 100kDa MWCO 超滤膜上浓缩稀释的缀合混合物并使用最小 15 倍体积 (血清型 4 型) 或者 40 倍体积 (血清型 9V、14 和 18C 型) 的 0.9%氯化钠渗滤。

[0294] 丢弃渗透液。

[0295] 对于血清型 4 型,通过 0.45 μm 滤器过滤存留物。

[0296] 在该步骤进行生产条件下控制 (糖含量)。

[0297] 步骤 4 :HA 柱纯化

[0298] 该步骤仅对于血清型 4 型缀合物进行。

[0299] 首先用 0.5M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0±0.3) 中和 HA 柱,然后用 0.9%氯化钠平衡。将过滤的存留物 (血清型 4 型) 以 1.0L/min 的流速加到柱上。用 0.9%氯化钠以小于等于 2.0L/min 流速洗涤柱子。然后用 0.5M 磷酸钠缓冲液以小于等于 2.0L/min 流速洗脱产物。

[0300] 然后在 100kDa MWCO 膜上浓缩 HA 级分并用最小 20 倍体积的 0.9%氯化钠渗滤。丢弃渗滤液。

[0301] 步骤 5 :过滤除菌

[0302] 100kDa MWCO 渗滤后的存留物通过 0.22 μm 滤器过滤。对过滤的产物进行生产条件下控制 (糖含量,游离蛋白质,游离糖和氰化物)。对过滤的存留物进行生产条件下控制以确定是否需要额外的浓缩、渗滤和 / 或稀释以满足 FBC 目标。用 FBC 样品重复这些和额

外的测试。

[0303] 如需要,用 0.9%氯化钠稀释过滤的缀合物以便实现小于 0.55g/L 的终浓度。在该阶段进行糖含量、蛋白质含量和糖:蛋白质比例的释放测试。

[0304] 最后,过滤缀合物 (0.22 μ m) 并以 2.64g/罐的典型量装入 10L 不锈钢罐中。在该阶段,进行产量、糖含量、蛋白质含量、pH、糖:蛋白质比例和赖氨酸含量作为生产条件下控制。在该阶段进行释放测试(外观、游离蛋白质、游离糖、内毒素、分子大小测定、残留氰化物、糖身份鉴定、CRM₁₉₇身份鉴定)。

[0305] DMSO 缀合

[0306] 步骤 I:溶解

[0307] 将冻干活化的糖血清型 6B、19F、23F 型和冻干的 CRM₁₉₇载体蛋白在室温平衡并用 DMSO 重构。溶解浓度通常为每升 DMSO 含 2-3g 糖 (2-2.5g 糖)。

[0308] 步骤 II:缀合反应

[0309] 将活化的糖和 CRM₁₉₇载体蛋白在 23°C $\pm$ 2°C 以 0.6g-1.0g 糖/g CRM₁₉₇ (对于血清型 6B 和 19F 型) 或者 1.2-1.8g 糖/g CRM₁₉₇ (对于血清型 23F 型) 的比例范围混合 60-75 分钟。

[0310] 通过以 0.8-1.2 摩尔当量的氰基硼氢化钠对 1 摩尔活化糖的比例加入氰基硼氢化钠溶液 (100mg/ml) 启动缀合反应。向反应混合物加入 WFI 至 1% (v/v) 的目标并在 23°C $\pm$ 2°C 温育混合物 40 小时以上。

[0311] 向反应物中加入硼氢化钠溶液,100mg/mL (通常每摩尔活化糖 1.8-2.2 摩尔当量硼氢化钠) 和 WFI (目标 5% v/v) 并在 23°C $\pm$ 2°C 温育混合物 3-6 小时。该步骤还原糖上任何未反应的醛。然后在小于 15°C 将反应混合物转移到含有 0.9%氯化钠的稀释罐中。

[0312] 步骤 III:100kDa 超滤

[0313] 将稀释的缀合物混合物通过 1.2 μ m 滤器过滤并在 100kDa MWCO 膜上浓缩和用最少 15 倍体积的 0.9%氯化钠渗滤 (0.01M 磷酸钠 / 0.05M NaCl 缓冲液用于血清型 23F 型)。丢弃渗透液。通过 0.45 μ m 滤器过滤存留物。在该阶段取生产条件下糖含量样品。

[0314] 步骤 IV:DEAE 柱纯化

[0315] 该步骤仅对血清型 23F 型进行。

[0316] 用 0.01M 磷酸钠 / 0.05M 氯化钠缓冲液平衡 DEAE 柱。将过滤的存留物 (血清型 23F 型) 装载到柱上并用 0.01M 磷酸钠 / 0.05M 氯化钠缓冲液洗涤。用 0.01M 磷酸钠 / 0.9% NaCl 缓冲液洗涤柱子。然后用 0.01M 磷酸钠 / 0.5M 氯化钠缓冲液洗脱产物。

[0317] 步骤 V:100kDa 超滤

[0318] 浓缩来自 6B 和 19F 型的存留物并用至少 30 倍体积的 0.9%氯化钠渗滤。丢弃渗透液。

[0319] 浓缩来自血清型 23F 型的洗脱物并用最少 20 倍体积的 0.9%氯化钠渗滤。丢弃渗透液。

[0320] 步骤 VI:过滤除菌

[0321] 100kDa MWCO 渗滤后的存留物通过 0.22 μ m 滤器过滤。对过滤的产物进行生产条件下控制 (糖含量、游离蛋白质、游离糖、残留 DMSO 和残留的氰化物)。对过滤的存留物进行生产条件下控制以确定是否需要额外的浓缩、渗滤和 / 或稀释以满足 FBC 目标。用 FBC

样品重复这些和额外的测试。

[0322] 如需要,用 0.9%氯化钠稀释过滤的缀合物以便实现小于 0.55g/L 的终浓度。在该阶段进行糖含量、蛋白质含量和糖:蛋白质比例的释放测试。

[0323] 最后,过滤缀合物(0.22 μ m)并以 2.64g/罐的量装入 10L 不锈钢罐中。在该阶段,进行产量、糖含量、蛋白质含量、pH、糖:蛋白质比例和赖氨酸含量作为生产条件下控制。在该阶段进行释放测试(外观、游离蛋白质、游离糖、内毒素、分子大小测定、残留氯化物、残留 DMSO、糖身份鉴定、CRM₁₉₇身份鉴定)。

[0324] 实施例 15

[0325] 多价肺炎球菌缀合物疫苗的配制

[0326] 13 种缀合物的最终本体浓缩物含有 0.85%氯化钠。3、6A、7F 和 19A 型本体浓缩物也含有 5M pH5.8 的琥珀酸钠缓冲剂。基于批次体积和本体糖浓度计算本体浓缩物的所需体积。向贴标签前的制剂容器加入 80%的 0.85%氯化钠(生理盐水)和所需量的琥珀酸盐缓冲液后,加入本体浓缩物。然后使用 Millipore Durapore 膜滤器单位,将制备物通过 0.22 μ m 膜过滤除菌到第二个容器中。用剩余的 20%的 0.85%氯化钠洗涤第一个容器并将该溶液通过相同的滤器并收集到所述第二个容器中。在加入磷酸铝的量期间和之后温和混合配制的本体。检查 pH 并且如果需要,调节 pH。将配制的本体产品在 2-8°C 保存。

[0327] 将配制的本体产品装入从 Becton Dickinson 得到的 1 型硼硅酸盐玻璃注射器中。定期监测疫苗的混浊度以确保填充操作的均匀性。填充的疫苗(最终产品)在 2-8°C 保存。

[0328] 实施例 16

[0329] 13 价缀合疫苗的免疫原性

[0330] 迄今,已经在兔中对 13vPnC 疫苗进行了临床前研究。设计研究 #HT01-0021 和 #HT01-0036 以独立地检查来自肺炎链球菌的荚膜多糖(PS)与 CRM₁₉₇的化学缀合物的作用和磷酸铝($AlPO_4$)佐剂对兔中 13vPnC 疫苗的免疫应答的影响。这些效果通过抗原特异性 ELISA 测定血清 IgG 浓度和通过调理吞噬测定法(OPA)测定抗体功能来表征。

[0331] 研究 #HT01-0021

[0332] 研究 #HT01-0021 检查具有 $AlPO_4$ 佐剂的 13vPnC 疫苗引起疫苗血清型特异性免疫应答的能力。在 13vPnC 疫苗中代表的肺炎球菌血清型包括 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型。第二个目标包括评估抗体应答的动力学和持续时间。在第 0 周和第 2 周计划的人临床剂量的用或不用 $AlPO_4$ (100 μ g/剂)配制的每种多糖(每种 PS 为 2 μ g,只是 6B 为 4 μ g)肌肉免疫新西兰大白兔。在不同时间点收集血清。通过 ELISA 测量血清特异性 IgG 并通过 OPA 评估功能活性。

[0333] 表 3 显示了在两剂 13vPnC 疫苗后,在合并的血清样品中实现的几何平均滴度(GMT)。用 IgG GMT 的比率比较第 4 周与第 0 周的应答。这些数据表明与没有佐剂的相同疫苗相比,在 13vPnC 制剂中包括 $AlPO_4$ 引起了更高水平的 IgG 抗体。尽管当在制剂中包括 $AlPO_4$ 时抗体应答更大,但是这些增加不是统计学上显著的。

[0334] 用这两种 13vPnC 制剂免疫后,还在兔中评估了功能性抗体应答(表 4)。当比较有或者没有佐剂的疫苗制剂时,在 13vPnC+ $AlPO_4$ 疫苗治疗组中观察到更高的 OPA GMT。在两个组中,在第 4 周合并血清中对所有疫苗血清型都检测了 OPA 滴度。对于多数血清型,在第 4 周测量的 OPA 滴度比第 0 周的 OPA 滴度(基线)高至少 4 倍。

[0335] 用来自两个治疗组的合并血清评估了对 13vPnC 疫苗每种血清型的动力学反应。从第 0 周和第 1、2、3、4、8、12、26 和 39 周抽取的血液测量了对每种血清型的 IgG 滴度,然后比较。除了血清型 1 型之外,在接受加佐剂疫苗的动物中的抗体应答好于接受无佐剂疫苗的那些动物中的抗体应答,并且在免疫方案的第二周达到峰值(数据未显示)。

[0336] 总之,数据表明用磷酸铝配制的 13vPnC 疫苗在兔中是免疫原性的,引起针对疫苗中所含的肺炎球菌荚膜多糖的实质性抗体应答并且这些应答与功能活性有关。用 13vPnC+AlPO₄免疫后对 7 种核心血清型观察到的应答与兔对 7 价制剂的历史应答相一致。

[0337]

表 3. 用两剂 13 价肺炎球菌复合糖免疫后的兔 IgG 免疫应答 (GMT)

血清型	具有 ALPO ₄ 的稀释剂 ^a				13vPnC ^a		比率	第 0 周	13vPnC + ALPO ₄ ^a		比率	第 4 周	比率
	第 0 周	第 4 周	比率	Wk4:Wk0	第 0 周	第 4 周			第 0 周	第 4 周			
1	<100	<100	1.0	50	5,926 (2,758-12,733)	119	50	11,091 (5,327-23,093)	222	58	133	271	584
3	<100	<100	1.0	50	6,647 (2,773-15,932)	133	50	16,443 (7,096-38,106)	284	58	133	271	584
4	<100	<100	1.0	50	13,554 (8,031-22,875)	271	50	29,183 (15,342-55,508)	584	50	271	584	584
5	134	<100	0.4	50	5,859 (2,450-14,009)	117	50	16,714 (6,959-40,140)	334	50	117	303	768
6A	141	<100	0.4	74	22,415 (11,987-41,914)	303	83	63,734 (21,141-192,146)	768	83	303	768	768
6B	<100	<100	1.0	57	8,108 (3,564-18,444)	142	54	23,505 (11,286-48,955)	435	54	142	444	496
7F	3,859	579	0.2	171	43,591 (26,931-70,557)	444	143	84,888 (46,445-155,151)	496	143	444	496	496

[0338]

9V	289	995	3.4	205	15,780 (7,193-34,616)	125	208	43,331 ^b (23,256-71,510)	217
14	437	177	0.4	61	6,906 (3,416-13,962)	113	70	16,076 (9,649-26,785)	322
18C	<100	<100	1.0	50	21,283 (15,770-28,725)	426	50	35,040 (24,708-49,692)	701
19A	<100	<100	1.0	121	113,599 (54,518-236,707)	939	144	280,976 (119,587-660,167)	1,951
19F	<100	<100	1.0	50	14,365 (7,346-28,090)	287	50	24,912 (9,243-67,141)	498
23F	<100	<100	1.0	50	5,323 (1,894-14,962)	106	50	15,041 (4,711-48,018)	301

a: 来自组内每只兔的等体积血清组成的合并血清的 GMT

b: 没有 ALPO₄ 的治疗组的统计学上差异 (p=0.022)

[0339] 表 4. 用 2 剂 13 价肺炎球菌复合糖免疫后 NZW 兔合并血清的肺炎链球菌 OPA GMT
[0340]

		<u>13vPnC^a</u>			<u>13vPnC + ALPO₄^a</u>	
血清 型	第 0 周	第 4 周	比率 Wk4:Wk0	第 0 周	第 4 周	比率 Wk4:Wk0
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1,024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1,024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

[0341] a: 由治疗组 (n = 12) 内各只兔的等体积血清组成的合并血清

[0342] 研究 #HT01-0036

[0343] 研究 #HT01-0036 比较用缀合或未缀合 CRM₁₉₇蛋白质的 13vPnC 疫苗免疫后, 兔对疫苗中所含的多糖 (PS) 的免疫应答。在第 0 和 2 周时, 用每种 PS 为 2.2 μg (6B 为 4.4 μg) 的剂量肌肉免疫新西兰大白兔。动物接受三种疫苗制剂之一: (a) 13vPnC (PS 直接缀合到 CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS (游离 PS) 或者 (c) 13vPnPS+CRM₁₉₇ (游离 PS 与 CRM₁₉₇ 混合)。所有疫苗制剂都含有作为佐剂的 125 μg/剂量的 AlPO₄。

[0344] 用 IgG ELISA 评估对所有疫苗制剂的血清型特异性免疫应答并用补体介导的 OPA 测量功能性抗体。比较治疗组之间的免疫应答。

[0345] 表 5 给出了用抗原特异性 IgG ELISA 分析的从第 4 周取血得到的 GMT 数据。额外的分析显示了在第 4 周和第 0 周 GMT 值的比率。数据表明缀合物疫苗制剂比游离的 PS 或者游离的 PS+CRM₁₉₇ 疫苗引起了更大的血清 IgG 滴度。除了 14 型肺炎链球菌之外, 13vPnC

疫苗能够在 OPA 中诱导对肺炎链球菌代表性菌株的功能性抗体（表 6）。用 13vPnPS 或 13vPnPS+CRM₁₉₇疫苗免疫两次后,对于所测量的 13 种血清型中的 10 种,两种疫苗都不能在第 4 周时相对于第 0 周诱导大于等于 8 倍的 OPA 滴度（表 6）。

[0346] 总之,这些结果表明 13 价肺炎球菌疫苗多糖的缀合物比仅仅使用游离多糖或者与未缀合的 CRM₁₉₇混合的多糖所观察到的结果产生更高的血清 IgG 滴度和总的更大的功能性抗体活性。

[0347]

表 5. 用 2 剂 13 价肺炎球菌复合糖免疫后，通过 ELISA 测量的对 PnPS 的兔 IgG 应答 (GMT)

	<u>13vPnPS</u> (游离 PS)			13vPnPS = CRM ₁₉₇ (与 CRM ₁₉₇ 混 合的 PS)				<u>13vPnC</u>	
	第 4 周	比率	第 0 周	第 4 周	比率	第 0 周	第 4 周	比率	
血清型	第 0 周	第 4 周	比率	第 0 周	第 4 周	比率	第 0 周	第 4 周	比率
1	378	2,290 (843-5,790)	5.8	395	1,959 (809-4,739)	5.0	472	35,970 (29,130-44,417)	76.2
3	57	240 (64-908)	4.2	89	163 (74-358)	1.8	50	10,414 (10,414-16,676)	208.3
4	50	379 (150-959)	7.6	50	607 (313-1,178)	12.1	50	12,890 (9,117-18,224)	257.8
5	343	226 (113-450)	4.5	50	321 (147-701)	6.4	50	35,264 (24,467-50,824)	705.3
6A	154	466 (316-688)	3.0	98	210 (95-464)	2.1	163	234,245 (167,152-328,283)	1,437.1

[0348]

6B	63	727 (384-1,375)	11.6	62	745 (384-1,440)	12.0	131	33,599 (22,934-49,222)	256.5
7F	50	61 (39-95)	1.2	50	72 (47-111)	1.4	50	35,702 (24,350-52,347)	714.0
9V	50	104 (48-195)	2.1	55	169 (74-390)	3.0	50	50,033 (34,765-72,007)	1,000.7
14	66	298 (117-757)	4.5	50	195 (71-535)	3.9	50	20,121 (12,087-32,138)	402.4
18C	89	1,555 (655-3,688)	17.5	66	761 (300-1,935)	11.5	101	71,451 (32,745-124,641)	707.4
19A	50	89 (44-179)	1.8	50	80 (39-163)	1.6	50	23,485 (12,857-42,723)	469.7
19F	61	1,362 (559-3,317)	22.3	61	991 (370-2,654)	16.3	67	19,358 (12,553-33,173)	288.9
23F	73	1,085 (487-2,420)	14.9	121	638 (311-1,311)	5.3	68	45,972 (25,134-84,089)	676.1

[0349] 表 6. 用 2 剂 13 价肺炎球菌疫苗免疫后,兔血清库的肺炎链球菌 OPA 滴度
[0350]

	OPA滴度						
	无处理	13vPnPS (游离 PS)		13vPnPS + CRM ₁₉₇ (与 CRM ₁₉₇ 混合的游离 PS)		13vPnC	
血清型	第 0 周 ^a	第 4 周	比率 Wk4:Wk0	第 4 周	比率 Wk4:Wk0	第 4 周	比率 Wk4:Wk0
1	4	16	4	16	4	8	32
3	4	4	1	4	1	4	8
4	4	4	1	4	1	4	64
5	4	32	8	16	4	16	64
6A	8	64	8	32	4	32	664
6B	8	64	8	32	4	32	32
7F	16	32	2	16	1	16	16
9V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18C	4	16	4	16	4	8	64
19A	8	8	1	8	1	16	64
19F	4	4	1	4	1	8	64
23F	16	32	2	16	1	32	32

[0351] a: 所有组用作第 0 周的值

[0352] 实施例 17

[0353] 血清型 1 型肺炎球菌糖 -CRM₁₉₇ 缀合备选方法

[0354] 将含纯化的多糖的容器解冻并合并并在反应容器中。向容器中加入 pH9.0 的 30mM 碳酸氢钠 / 碳酸盐缓冲液用于在 50°C 部分脱 -O- 乙酰化 (水解) 3 小时。进行脱 -O- 乙酰化至大约 40 摩尔百分数。将反应物冷却到 20°C 并通过 0.2M 乙酸进行中和至 pH5.0-7.0。通过在 2-8°C 温育, 在高碘酸钠存在下进行部分氧化, 并搅拌混合物 15-21 小时。

[0355] 反应混合物使用 30K MWC0 再生纤维素膜用 0.9% 盐水渗滤 10 次而纯化反应混合物。纯化的, 活化的多糖与 CRM₁₉₇ 以多糖 / 蛋白质比为 2:1 配制, 在 -75°C 壳式冷冻并共同冻干。共同冻干后, 多糖 / CRM₁₉₇ 混合物在 -25° ± 5°C 保存直至缀合。1M 磷酸钠缓冲液加入到共同冻干的多糖 / CRM₁₉₇ 混合物中, 至 0.2M 终离子浓度和 pH7.5, 然后加入氰基硼氢化钠。反应物在 23°C 温育 15-21 小时, 接着在 37°C 再次温育 66-78 小时。氰基硼氢化物温育

后,用冷的盐水稀释反应混合物,接着加入 1M 碳酸钠以调节反应混合物到 pH9.0。通过加入硼氢化钠,在 23℃温育 3-6 小时淬灭未反应的醛。

[0356] 将反应混合物用盐水稀释 2 倍并通过 0.45-5 μm 预过滤器转移到存留物容器中。用 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH 6) 渗滤反应混合物 30 次,用盐水渗滤 20 次。通过 0.2 μm 过滤器过滤存留物。将缀合物溶液用 0.9% 盐水稀释到目标浓度为 0.5mg/mL,然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到最终体相浓缩物容器中。缀合物在 2-8℃保存。

[0357] 缀合物的表征见实施例 2。

[0358] 应该理解前面的讨论和实施例仅仅给出了一些实施方案的详细描述。因此本领域技术人员显而易见的是,可以做出多种修饰和等同方案而不背离本发明的精神和范围。

[0359] 本专利申请中指出的所有杂志文章、其他参考文献、专利和专利申请都完整引入本文作为参考。

[0360] 参考文献

[0361] 1.Hausdorff WP,Bryant J,Paradiso PR,Siber GR.Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease:implications for conjugate vaccine formulation and use,part I.Clin Infect Dis 2000 ;30:100-21

[0362] 2.Hausdorff WP,Bryant J,Kloek C,Paradiso PR,Siber GR.The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations:implications for conjugate vaccine formulation and use,part I.Clin Infect Dis 2000 ;30:122-40

[0363] 3.Whitney CG,Farley MM,Hadler J,et al.Debcline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine.New Engl J Med 2003 ;348(18):1737-46

[0364] 4.Black S,Shinefield H,Hansen J,et al.Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine.Pediatr Infect Dis J 2001 ;20 ;1105-7

[0365] 5.Robinson KA,Baughman W,Rothrock G,et al.Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States,1995-1998:Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era.JAMA 2001 ;285:1729-35

[0366] 6.Butler J,Breiman R,Lipman H,et al.Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae infections among preschool children in the United States,1978-1994.J Infect Dis 1995 ;171:885-9

[0367] 7.Whitney CG,Farley MM,Hadler J,et al.Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States.N Engl J Med 2000 ;343:1917-24

[0368] 8.Hofmann J,Cetron MS,Farley MM,et al.The prevalence of drug-resistant Streptococcus pneumoniae in Atlanta.N Engl J Med 1995 ;333:481-6

[0369] 9.Joloba ML,Windau A,Bajaksouzian S,Appelbaum PC Hausdorff WP,Jacobs MR.Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of Streptococcus pneumoniae

isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. Clin Infect Dis 2001 ;33:1489-94

[0370] 10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Pediatr Infect Dis J 2000 ;19:187-95

[0371] 11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. J Infect Dis 2000 ;182:490-6

[0372] 12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. Pediatr Infect Dis J 1995 ;14:503-10

[0373] 13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. J. Paediatr Child Health 2001 ;37:571-5

[0374] 14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. Clin Infect Dis 1998 ;26:1355-61

[0375] 15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. Lancet 2001 ;357:950-52

[0376] 16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. Pediatr Infect Dis J 2003 ;22:499-504

[0377] 17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. Clin Infect Dis 2002 ;34:434-40

[0378] 18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. Pediatrics 2002 ;110:1-6

[0379] 19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. Pediatr Infect Dis J 2002 ;21:859-65

[0380] 20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. Pediatr Infect Dis J 2002 ;21:1008-16

[0381] 21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with

emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148:1136-59

[0382] 22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703

[0383] 23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76

[0384] 24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184:789-93

[0385] 25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003

[0386] 26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2

[0387] 27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebel CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27

[0388] 28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfssdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60

[0389] 29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9

[0390] 30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8

[0391] 31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61

[0392] 32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9

[0393] 33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et

al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003

[0394] 34. 美国专利号 4, 673, 574

[0395] 35. 美国专利号 4, 902, 506

在美国年龄小于 2 岁的儿童中按照血清型的
IPD 比率从基线 (1998/1999) 到
2001 年的改变 (ABCs 监视)

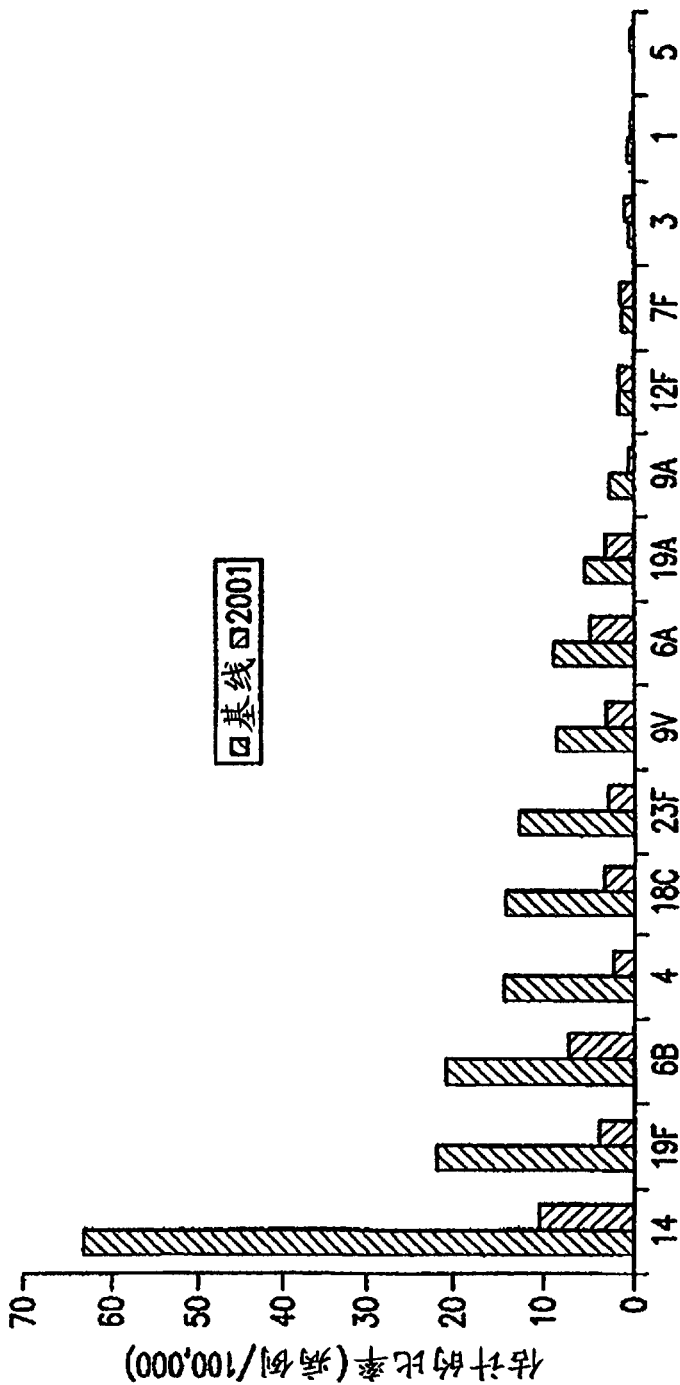


图 1

在小于 5 岁的儿童中具有 PCN 抗性的肺炎球菌
分离菌的分布 (1998)

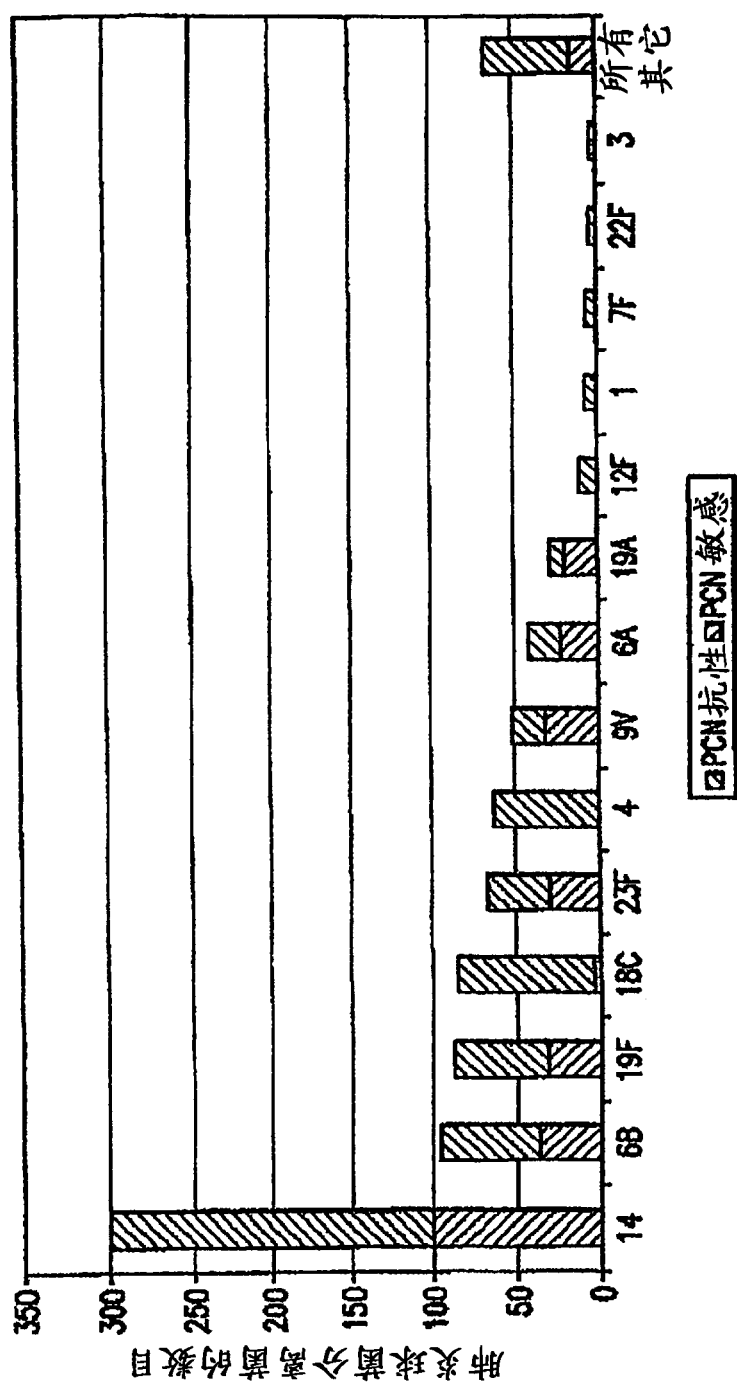


图 2

产生自接受生产等级批次的 Prev(e)nar® 的
D11B-P16 Prev(e)nar 试验组的
第三次剂量后 OPA 的 RCDC (n=98)

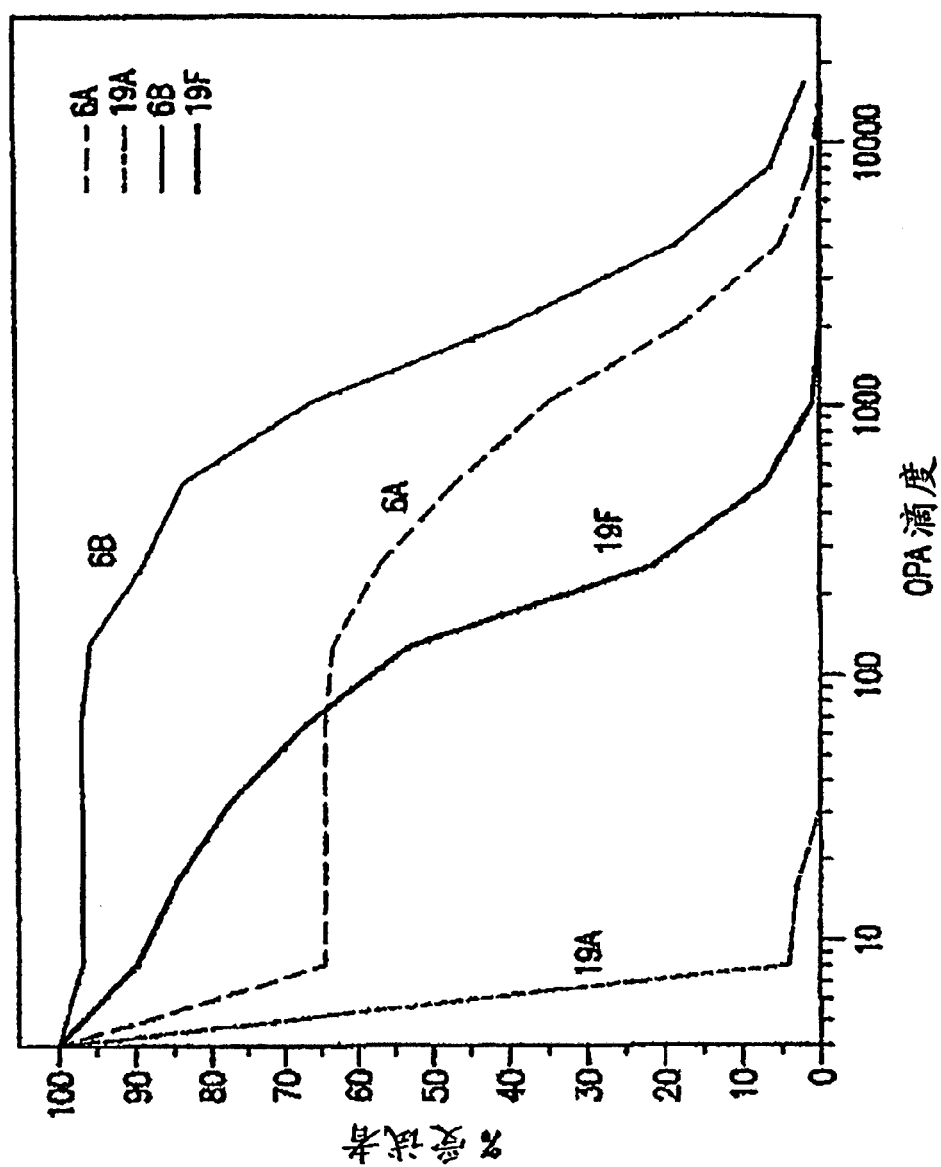


图 3

Abstract

An immunogenic composition having 13 distinct polysaccharide-protein conjugates and optionally, an aluminum-based adjuvant, is described. Each conjugate contains a capsular polysaccharide prepared from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F) conjugated to a carrier protein. The immunogenic composition, formulated as a vaccine, increases coverage against pneumococcal disease in infants and young children globally, and provides coverage for serotypes 6A and 19A that is not dependent on the limitations of serogroup cross-protection. Also described is a method for making an immunogenic conjugate comprising *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 polysaccharide covalently linked to a carrier protein, the method including partial de-O-acetylation of the polysaccharide by mild hydrolysis in an alkaline pH buffer.