



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116870144 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 13

(21) 申请号 202310959227.8

A61K 47/64 (2017.01)

(22) 申请日 2018.01.30

A61K 39/385 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 11/00 (2006.01)

62/452,522 2017.01.31 US

A61P 31/04 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880008847.0 2018.01.30

(71) 申请人 默沙东有限责任公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·巴贾杰 M·A·温特斯 E·温

J·何

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 王北南

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

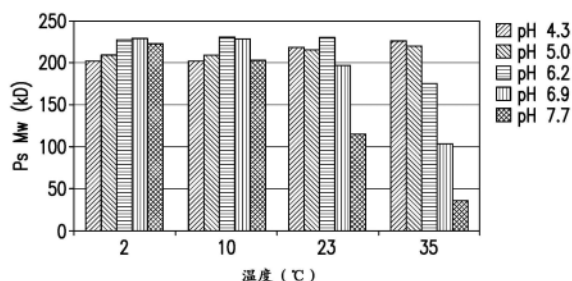
权利要求书1页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

制备多糖-蛋白缀合物的方法

(57) 摘要

本发明提供了制备多糖-蛋白质缀合物的方法,其中在改善缀合反应一致性、增加缀合反应期间蛋白的消耗、产生更高分子量的缀合物和/或降低缀合反应产物中游离氰化物的含量的条件下,通常来自细菌的多糖通过还原胺化与载体蛋白缀合。使用这些方法获得的多糖-蛋白缀合物可用于包含在多价疫苗中。



1. 一种通过高碘酸盐氧化活化肺炎链球菌血清型3多糖的方法,所述方法包括使血清型3多糖与高碘酸盐在水性缓冲液中,在4.3-6.9的pH和2-23℃下,或在4.3-7.7的pH和2-10℃下或在4.3-6.2的pH和2-35℃下反应。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述高碘酸盐是高碘酸钠。

制备多糖-蛋白缀合物的方法

[0001] 本申请是申请号为201880008847.0、申请日为2018年1月30日、名称为“制备多糖-蛋白缀合物的方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供了在能够形成高分子量缀合物和/或使载体蛋白的消耗最大化的条件下通过还原胺化制备多糖-蛋白缀合物的方法。使用这些方法获得的多糖-蛋白缀合物可用于包含在多价疫苗中。

背景技术

[0003] 来自细菌的荚膜多糖已经在疫苗中使用了多年,因为它们诱生能够中和细菌的、具有调理吞噬作用的抗体。然而,大多数多糖是T-非依赖性抗原,因此在婴儿和老年人中它们具有很差的免疫原性。多糖与载体蛋白的共价缀合可以将T-非依赖性抗原转化为T-依赖性抗原,从而增强记忆反应并允许在这些患者群体中形成保护性免疫。因此,用于婴儿的最有效的多糖疫苗是基于糖缀合物的。

[0004] 已知多种方法用于将多糖缀合至载体蛋白。一些方法涉及在通过接头缀合之前随机活化多糖链(例如,用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP))(参见,例如,Watson et al. (1992) Infect Immun. 60 (11):4679-86;和Konadu et al. (1996) Infect Immun. (7):2709-15)。用于将多糖与蛋白缀合的还原胺化方法公开于美国专利No. 4,761,283和欧洲专利No. EP477 508和EP 562 107。

[0005] 在任何一种所述的缀合化学反应中,缀合效率和一致性对于控制过程和产物是至关重要的。特别是,使用现有技术方法由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型3多糖制备的缀合物的免疫原性不太令人满意。参见,例如,Andrews et al., 2014, Lancet Infect Dis; 14:839-46。因此,仍然需要以提高的效率和一致性制备缀合物的进一步更好的方法。

发明内容

[0006] 本发明提供了在能够形成高分子量缀合物和/或使载体蛋白的消耗最大化的条件下通过还原胺化制备多糖-蛋白缀合物的方法。使用这些方法获得的多糖-蛋白缀合物可用于包含在多价疫苗中。

[0007] 在第一方面,本发明提供了一种生产多糖蛋白缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:a)在氰基硼氢化物盐和镍(II)的存在下,使活化的多糖与载体蛋白在水性缓冲液中反应;b)任选地,添加强还原剂;c)纯化缀合反应混合物以除去未反应的多糖、蛋白和缀合试剂。步骤a)可以在6.0-8.5的pH下或在6.5-7.5的pH下进行。镍可以是氯化镍(NiCl_2)或硫酸镍(NiSO_4)的形式。镍可以以0.5mM-15mM,或0.5mM-5mM的浓度存在。在某些实施方案中,在加入氰基硼氢化钠之前将镍加入至反应混合物中。在某些实施方案中,纯化步骤通过超滤进行。

[0008] 本文所述的用于该方法的方法适用于多糖,包括但不限于脑膜炎球菌多糖、肺炎球菌多糖、b型流感嗜血杆菌多糖、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) Vi多糖以及B族链球菌多糖。在本发明的某些实施方案中,多糖是肺炎链球菌荚膜多糖。

[0009] 在该方面的某些实施方案中,缀合反应温度控制在10-30℃或10-22℃。

[0010] 在第二方面,本发明提供了通过还原胺化制备肺炎链球菌血清型3多糖蛋白缀合物的方法,所述方法包括:a)使活化的血清型3多糖与载体蛋白在水性缓冲液中,在氰基硼氢化物盐的存在下,在2-25℃的温度以及7.0以下的pH下或在2-10℃的温度以及7.7以下的pH下,反应;b)任选地,添加强还原剂;c)纯化缀合反应混合物以除去包含游离氰离子的残余反应物。在某些实施方案中,纯化步骤通过超滤进行。

[0011] 在该方面的某些实施方案中,步骤a)在6.0-7.0或6.2-6.9的pH下进行。在该方面的某些实施方案中,步骤a)中的反应温度为2-23℃,4-15℃或8-12℃。

[0012] 在任一方面一个实施方案中,氰基硼氢化物盐可以是氰基硼氢化钠。在任一方面的某些实施方案中,添加强还原剂。在某些实施方案中,强还原剂包含硼氢化物离子,其可以是硼氢化钠的形式。

[0013] 在第三方面,本发明提供了通过高碘酸盐氧化活化肺炎链球菌血清型3多糖的方法,所述方法包括使血清型3多糖与高碘酸盐在水性缓冲液中,在4.3-6.9的pH以及2-23℃的温度下、或在4.3-7.7的pH以及2-10℃的温度下、或在4.3-6.2的pH以及2-35℃的温度下反应。

[0014] 本发明还涉及根据第一方面和第二方面中描述的方法制备的多糖蛋白缀合物和根据第三方面中描述的方法制备的活化的多糖。

[0015] 本文描述的方法适用于载体蛋白,包括但不限于破伤风类毒素、白喉类毒素和CRM₁₉₇。在本发明的某些实施方案中,载体蛋白是CRM₁₉₇。

附图说明

[0016] 图1示出了在用偏高碘酸钠活化并在不同温度(2℃、10℃、23℃或35℃)下,在pH不同的溶液(pH 4.3、5.0、6.2、6.9或7.7的150mM乙酸钠或150mM磷酸钾溶液)中温育10小时后的血清型3多糖的尺寸(通过HPSEC UV-MALS-RI测定)。

具体实施方式

[0017] 本发明提供了在能够形成高分子量缀合物和/或使载体蛋白的消耗最大化的条件下制备多糖蛋白缀合物反应混合物的改良方法。多糖蛋白缀合物可用作包含在多价肺炎球菌缀合物疫苗中的药物物质。

[0018] 不囿于任何理论,在本发明的方面一中,据信向缀合反应中添加的镍与残留的干扰氧化物络合,从而在缀合反应期间增加蛋白的消耗并导致形成更大的、可能更具免疫原性的缀合物。

[0019] 不囿于任何理论,在本发明的方面二中,申请人已经证明,在特定pH范围和温度范围之外,来自血清型3的多糖易于降解。通过在特定的pH和温度参数内进行活化反应和/或缀合反应,可获得更大的、可能更具免疫原性的血清型3多糖-蛋白缀合物。

[0020] 本文所用的术语“多糖”意在包括免疫和细菌疫苗领域中通常使用的任何抗原性

糖元件(或抗原性单元),包括但不限于“糖类”、“寡糖”、“多糖”、“脂糖”、“脂寡糖(LOS)”、“脂多糖(LPS)”、“糖基化物”、“糖缀合物”等。“活化的多糖”是经过化学修饰,例如通过引入醛基,以适于与载体蛋白缀合的多糖。

[0021] 当与本发明的免疫原性组合物一起使用时,本文所用的术语“包含”是指包括任何其他组分(受到用于抗原混合物的“由……组成”的限定),例如佐剂和赋形剂。当与多价多糖-蛋白缀合物混合物一起使用时,术语“由…组成”是指具有那些特定的肺炎链球菌多糖蛋白缀合物而不具有来自不同血清型的其他肺炎链球菌多糖蛋白缀合物的混合物。

[0022] 本文所用的范围(例如pH和温度范围)意在包括端点值。例如,5.0-9.0的pH范围意在包含5.0的pH和9.0的pH。类似地,4-25℃的温度范围意在包括该范围两侧的限值,即4℃和25℃。

[0023] 荚膜多糖

[0024] 细菌荚膜多糖,特别是那些已用作抗原的荚膜多糖,适用于本发明,并且可以通过鉴定免疫原性和/或抗原性多糖的方法容易地鉴定。例如,这些细菌荚膜多糖可以来自脑膜炎奈瑟氏球菌(*N.meningitidis*),特别是血清型A、C、W135和Y;肺炎链球菌,特别是以下血清型:1、2、3、4、5、6A、6B、6C、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24F、33F、35B、35F或38;或无乳链球菌(*S.agalactiae*),特别是血清型Ia、Ib和III;金黄色葡萄球菌(*S.aureus*),特别是来自金黄色葡萄球菌5型和8型;b型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* Type b);伤寒沙门氏菌Vi(*Salmonella enterica* Typhi Vi);和艰难梭菌(*Clostridium difficile*)。

[0025] 非荚膜细菌多糖也可适用于本发明。示例性的非荚膜细菌多糖是化脓性链球菌(*S.pyogenes*)GAS碳水化合物(也称为GAS细胞壁多糖,或GASP)。

[0026] 非细菌多糖也可适用于本发明。例如,本发明可以使用例如来自真菌细胞壁的葡聚糖。代表性的葡聚糖包括昆布多糖和可得然胶。

[0027] 多糖可以以寡聚糖的形式使用。这些寡聚糖可通过纯化的多糖的片段化(例如通过化学水解或物理剪切)并通常随后纯化所需大小的片段而方便地形成。

[0028] 多糖可通过已知技术纯化。然而,本发明不限于从天然来源纯化的多糖,并且多糖可以通过其他方法获得,例如全合成或部分合成。来自肺炎链球菌的荚膜多糖可通过本领域技术人员已知的标准技术制备。例如,多糖可以从细菌中分离,并且可以通过已知方法在一定程度上调整尺寸(参见,例如,欧洲专利No.EP497524和EP497525);优选通过使用均化器完成的微流化或通过化学水解。在一个实施方案中,使对应于每种多糖血清型的肺炎链球菌菌株在基于大豆的培养基中生长。然后通过标准步骤纯化各多糖,所述标准步骤包括离心、沉淀和超滤。参见,例如,美国专利申请公开No.2008/0286838和美国专利No.5,847,112。可以调整多糖的尺寸以降低粘度和/或改善后续缀合产物的过滤性和批次之间的一致性。

[0029] 可以使用标准技术化学活化纯化的多糖,以引入能够与载体蛋白反应的官能团。在一个实施方案中,多糖的化学活化和随后与载体蛋白的缀合通过美国专利No.4,365,170、4,673,574和4,902,506中描述的方法实现。简而言之,使肺炎链球菌多糖与高碘酸盐类氧化剂如高碘酸钠,高碘酸钾或高碘酸反应,导致连位羟基的氧化裂解,产生反应性醛基。合适的高碘酸盐(例如高碘酸钠,偏高碘酸钠等)摩尔当量包括0.05至0.5摩尔当量(高

碘酸盐与多糖重复单元的摩尔比)或0.1至0.5摩尔当量。高碘酸盐反应可在30分钟至24小时之间变化,这取决于二醇构象(例如非环二醇、顺式二醇、反式二醇),二醇构象控制反应性羟基对高碘酸钠的接近。

[0030] 为了实现本发明的目的,术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸;该术语还包括偏高碘酸盐(IO_4^-)和正高碘酸盐(IO_6^-),并且包括高碘酸盐的各种盐(例如高碘酸钠和高碘酸钾)。在一个实施方案中,荚膜多糖在偏高碘酸盐的存在下被氧化,优选在高碘酸钠(NaIO_4)的存在下被氧化。在另一个实施方案中,荚膜多糖在正高碘酸盐的存在下被氧化,优选在高碘酸的存在下被氧化。

[0031] 基于实施例中所示的血清型3的稳定性数据,对于血清型3多糖而言,高碘酸盐活化可以在pH4.3-6.9和2-23℃下发生,在pH4.3-7.7和2-10℃下发生或在pH 4.3-6.2和2-35℃下发生。

[0032] 纯化的多糖也可以与接头连接。一旦被活化或连接至接头,每个荚膜多糖分别与载体蛋白缀合以形成糖缀合物。多糖缀合物可通过已知的偶联技术制备。

[0033] 多糖可以与接头偶联以形成多糖-接头中间体,其中接头的游离末端是酯基。因此,接头是其中至少一个末端是酯基的接头。选择另一个末端使其可以与多糖反应形成多糖-接头中间体。

[0034] 可以利用多糖中的伯胺基团将多糖偶联至接头。在这种情况下,接头通常在两个末端都具有酯基。这允许使一个酯基与多糖中的伯胺基反应通过亲核酰基取代来进行偶联。该反应产生多糖-接头中间体,其中多糖通过酰胺键与接头偶联。因此,接头是双功能接头,其提供用于与多糖中的伯胺基团反应的第一酯基团和用于与载体分子中的伯胺基团反应的第二酯基团。典型的接头是己二酸N-羟基琥珀酰亚胺二酯(SIDEA)。

[0035] 偶联也可以间接进行,即用另外的接头进行,所述另外的接头用于在偶联到所述接头之前衍生多糖。

[0036] 可以利用多糖的还原性末端处的羰基将多糖与所述另外的接头偶联。该偶联包括两个步骤:(a1)使羰基与所述另外的接头反应;以及(a2)使所述另外的接头的游离末端与所述接头反应。在这些实施方案中,所述另外的接头通常在两个末端处具有伯胺基团,从而允许通过使伯胺基团之一与多糖中的羰基反应经由还原胺化进行步骤(a1)。使用的伯胺基团可以与多糖中的羰基反应。酰肼或羟基氨基是合适的。相同的伯胺基团通常存在于所述另外的接头的两个末端,这使得多糖(Ps)-Ps偶联成为可能。该反应产生多糖-另外的接头中间体,其中多糖通过C-N键与所述另外的接头偶联。

[0037] 可以利用多糖中的不同基团,特别是羧基,将多糖与所述另外的接头偶联。该偶联包括两个步骤:(a1)使该基团与所述另外的接头反应;(a2)使所述另外的接头的游离末端与所述接头反应。在这种情况下,所述另外的接头通常在两个末端都具有伯胺基团,从而允许通过使伯胺基团之一与多糖中羰基经由EDAC活化的反应进行步骤(a1)。使用的伯胺基团可以与多糖中经EDAC活化的羧基反应。酰肼基团是合适的。相同的伯胺基团通常存在于所述另外的接头的两个末端。该反应产生多糖-另外的接头中间体,其中多糖通过酰胺键与另外的接头偶联。

[0038] 载体蛋白

[0039] 在本发明的一个具体实施方案中,CRM₁₉₇用作载体蛋白。CRM₁₉₇是白喉毒素的无毒

变体(即,类毒素)。在一个实施方案中,其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棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)菌株C7(B197)的培养物中分离的。在另一个实施方案中,根据美国专利No.5,614,382中描述的方法重组制备CRM₁₉₇。通常,CRM₁₉₇通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换色谱的组合进行纯化。在一些实施方案中,使用Pfenex Expression Technology™(Pfenex Inc., San Diego, CA)在荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)中制备CRM₁₉₇。

[0040] 其他合适的载体蛋白包括另外的灭活细菌毒素,例如DT(白喉类毒素)、TT(破伤风类毒素)或TT的片段C、百日咳类毒素、霍乱类毒素(例如,如国际专利申请公开No.WO 2004/083251中所描述的)、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A。也可以使用细菌外膜蛋白,例如外膜复合物c(OMPc)、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌表面蛋白A(PspA;参见国际专利申请公开No.WO 02/091998)、肺炎球菌表面粘附蛋白(PsaA)、来自A族或B族链球菌的C5a肽酶、或流感嗜血杆菌蛋白D、肺炎球菌肺炎球菌溶血素(Kuo et al., 1995, *Infect Immun* 63:2706-13),包括以某种方式解毒的ply(例如dPLY-GMBS(参见国际专利申请公开No.WO 04/081515)或dPLY-甲醛,PhT_X(包括PhT_A, PhT_B, PhT_D, PhT_E)和PhT蛋白的融合物(例如PhTDE融合物,PhTBE融合物)(参见国际专利申请公开No.WO 01/98334和WO 03/54007)。还可以使用其他蛋白作为载体蛋白,例如卵清蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、PorB(来自脑膜炎奈瑟球菌)、PD(流感嗜血杆菌蛋白D;参见例如欧洲专利No.EP 0 594 610 B)、或其免疫功能等同物、合成肽(参见欧洲专利No.EP0378881和EP0427347)、热休克蛋白(参见国际专利申请公开No.WO 93/17712和WO 94/03208)、百日咳蛋白(参见国际专利申请公开No.WO 98/58668和欧洲专利No.EP0471177)、细胞因子、淋巴因子、生长因子或激素(参见国际专利申请公开No.WO 91/01146)、包含来自各种病原体衍生抗原的多个CD4+T细胞表位的人工蛋白(参见Falugi et al., 2001, *Eur J Immunol* 31:3816-3824)如N19蛋白(参见Baraldoi et al., 2004, *Infect Immun* 72:4884-7)、铁摄取蛋白(参见国际专利申请公开No.WO 01/72337)、艰难梭菌的毒素A或B(参见国际专利公开No.WO 00/61761)和鞭毛蛋白(Ben-Yedidia et al., 1998, *Immunol Lett* 64:9)。

[0041] 在使用多价疫苗的情况下,第二载体可用于多价疫苗中的一种或多种抗原。第二载体蛋白优选是无毒、无反应原性且可以以足够的量和纯度获得的蛋白。第二载体蛋白也与抗原(例如肺炎链球菌多糖)缀合或连接以增强抗原的免疫原性。载体蛋白应该适于标准的缀合程序。在一个实施方案中,未与第一载体蛋白缀合的每个荚膜多糖与相同的第二载体蛋白缀合(例如,每个荚膜多糖分子与单个载体蛋白缀合)。在另一个实施方案中,未与第一载体蛋白缀合的荚膜多糖与两种或更多种载体蛋白缀合(每个荚膜多糖分子与单个载体蛋白缀合)。在此类实施方案中,相同血清型的每种荚膜多糖通常与相同的载体蛋白缀合。其他DT突变体可用作第二载体蛋白,例如CRM₁₇₆、CRM₂₂₈、CRM₄₅(Uchida et al., 1973, *J Biol Chem* 218:3838-3844);CRM₉、CRM₄₅、CRM₁₀₂、CRM₁₀₃和CRM₁₀₇以及Nicholls和Youle在Genetically Engineered Toxins, Ed:Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992中所描述的其他突变;Glu-148缺失或Glu-148突变为Asp、Gln或Ser和/或Ala 158突变为Gly以及美国专利No.4,709,017或美国专利4,950,740公开的其他突变;以下至少一个或多个残基的突变:Lys 516、Lys 526、Phe 530和/或Lys 534以及美国专利No.5,917,017或美国专利No.6,

455,673中公开的其他突变;或美国专利No.5,843,711中公开的片段。

[0042] 通过还原胺化进行缀合

[0043] 多糖与载体蛋白的共价偶联可以通过还原胺化进行,其中多糖上的胺反应性部分直接与蛋白的伯胺基团(主要是赖氨酸残基)偶联。众所周知,还原胺化反应通过两步反应机理进行。首先,通过分子1(R-CHO)上的醛基与分子2上的伯胺基团(R'-NH₂)反应形成式R-CH=N-R'的席夫碱中间体。第二步,还原席夫碱以形成式R-CH₂-NH-R'的氨基化合物。虽然可以使用许多还原剂,但是大多数情况下使用高选择性还原剂,例如氰基硼氢化钠(NaCNBH₃),因为这些试剂会特异性地仅还原希夫碱的亚胺官能团。

[0044] 由于所有多糖均在链末端具有醛官能团(末端醛官能团),所以可以非常普遍地应用包括多糖的还原胺化的缀合方法,并且当重复单元中没有其他醛官能团(链内醛官能团)时,这些方法使得可以获得其中多糖分子与单个载体蛋白分子偶联的缀合物。

[0045] 典型的还原剂是氰基硼氢化物盐,例如氰基硼氢化钠。通常使用的亚胺选择性还原剂是氰基硼氢化钠,但也可以使用其它氰基硼氢化物盐,包括氰基硼氢化钾。在缀合反应中氰基硼氢化钠试剂批次的起始氰化物水平和残留氰化物的差异可导致不一致的缀合性能,导致可变的产物属性,例如缀合物尺寸和缀合物Ps与CRM₁₉₇(Ps-to-CRM₁₉₇)比率。通过控制和/或降低最终反应产物中的游离氰化物含量,可以降低缀合可变性。

[0046] 任选地,通过添加强还原剂(例如硼氢化钠)来还原多糖上残留的未反应的醛。通常,优选使用强还原剂。但是,对于某些多糖而言,优选避免该步骤。例如,肺炎链球菌血清型5含有可容易地与强还原剂反应的酮基。在这种情况下,优选绕过还原步骤以保护多糖的抗原结构。

[0047] 一方面,本发明提供了一种生产多糖蛋白缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:
a) 在氰基硼氢化物盐和镍(II)的存在下,使活化的多糖与载体蛋白在水性缓冲液中反应;
b) 任选地,添加强还原剂;c) 纯化缀合反应混合物以除去氰离子。缀合反应可以在水性溶液中进行。参见,例如,US2015/0231270A1、EP 0471 177B1、US2011/0195086A1。合适的水性溶液包括缓冲液,例如磷酸钠或磷酸钾。步骤a)可以在6.0-8.5的pH下,或在6.5-7.5的pH下进行。

[0048] 镍优选为Ni(II)的形式,例如氯化镍或硫酸镍的形式。镍通常以0.5mM-15mM或0.5mM-5mM的浓度存在。镍可以在氰基硼氢化物之前、同时或之后加入。在优选的实施方案中,在氰基硼氢化钠之前加入镍。

[0049] 镍与来自用于还原胺化的氰基硼氢化钠还原剂的残余的、干扰氰化物络合。参见S Gidley et al.,Biochem J.1982,203:331-334;Jentoft et al.Anal Biochem.1980,106:186-190。在反应混合物中包含镍可以通过实现游离氰化物的去除来提高缀合效率。已知过渡金属(包括镍)与氰化物形成稳定的络合物,并且已知过渡金属(包括镍)改善氰基硼氢化钠对蛋白氨基和甲醛的还原性甲基化(S Gidley et al.,Biochem J.1982,203:331-334;Jentoft et al.Anal Biochem.1980,106:186-190)。通过络合残余的、干扰反应的氰化物,镍的加入增加了缀合过程中蛋白的消耗,并导致形成更大的、可能更具免疫原性的缀合物。

[0050] 在某些实施方案中,添加强还原剂。在某些实施方案中,强还原剂包括硼氢化物离子,其可以是硼氢化钠的形式。

[0051] 在某些实施方案中,反应步骤中的反应温度可以是10-30℃或10-22℃。

[0052] 对于血清型6B多糖,本发明的方法可以产生2000-5000kDa或3000-4000kDa的血清型6B多糖蛋白缀合物。

[0053] 对于血清型3多糖,发现高碘酸盐活化的多糖在较高温度例如35℃下尺寸减小,特别是当保持在较高pH(pH7.7)下时。因此,为了使缀合期间血清型3多糖的降解最小化,可以将反应的温度和/或pH控制在某些参数内。在一个实施方案中,活化的血清型3多糖可以在氰基硼氢化物盐的存在下在水性缓冲液中在2-25℃的温度以及7.0以下的pH下或在2-10℃的温度以及7.7以下的pH下与载体蛋白反应。pH范围可以是6.0-7.0或6.2-6.9。反应温度可以是2-23℃、4-15℃或8-12℃。

[0054] 缀合之后,通过本领域技术人员熟知的任一种或多种技术(包括浓缩/渗滤操作、超滤、沉淀/洗脱、柱层析和深层过滤)纯化多糖-蛋白缀合物以除去过量的缀合试剂以及残留的游离蛋白和游离多糖。参见例如美国专利No.6,146,902。在一个实施方案中,纯化步骤是通过超滤进行。

[0055] 多价多糖-蛋白缀合物疫苗

[0056] 在某些实施方案中,免疫原性组合物可以包含与一种或多种载体蛋白缀合的来自肺炎链球菌血清型的荚膜多糖,所述肺炎链球菌血清型选自1、2、3、4、5、6A、6B、6C、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24F、33F、35B、35F或38中的至少一种。优选地,来自特定血清型的糖不与多于一种载体蛋白缀合。

[0057] 在纯化单独的糖缀合物之后,将它们混合以配制本发明的免疫原性组合物。这些肺炎链球菌缀合物通过分开的过程制备并大量配制成单剂量制剂。

[0058] 药物/疫苗组合物

[0059] 本发明进一步提供了包括药用组合物、免疫原性组合物和疫苗组合物的组合物,其包含以下物质或基本上由以下物质组成或由以下物质组成:任一种上述多糖血清型组合以及药学上可接受的载体和佐剂。在一个实施方案中,所述组合物包含以下物质,基本上由以下物质组成或由以下物质组成:2至3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35种不同的多糖-蛋白缀合物,其中每种缀合物含有与第一载体蛋白或第二载体蛋白缀合的不同的荚膜多糖,并且其中来自肺炎链球菌血清型1、2、3、4、5、6A、6B、6C、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24F、33F、35B、35F或38中的至少一种的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0060] 可以使用本领域公认的方法完成本发明的多糖-蛋白缀合物的配制。例如,可以将15种单独的肺炎链球菌缀合物与生理学上可接受的载体一起配制以制备组合物。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。

[0061] 在优选的实施方案中,将疫苗组合物配制在含有氯化钠的L-组氨酸缓冲液中。

[0062] 本文所定义的“佐剂”是用于增强本发明的免疫原性组合物的免疫原性的物质。免疫佐剂可以增强对当单独施用时具有弱免疫原性的抗原的免疫应答,例如,诱导没有的或弱的抗体滴度或细胞介导的免疫应答,增加对抗原的抗体滴度,和/或降低有效地在个体中实现免疫应答的抗原剂量。因此,通常施用佐剂以增强免疫应答并且是技术人员所熟知的。用于增强组合物有效性的合适佐剂包括但不限于:

[0063] (1) 铝盐(明矾),如氢氧化铝,磷酸铝,硫酸铝等;

[0064] (2) 水包油乳液制剂(含或不含其他特异性免疫刺激剂,如下文定义的胞壁酰肽或细菌细胞壁成分),例如(a)MF59(国际专利申请公开No.WO 90/14837),包含5%角鲨烯,0.5%吐温80和0.5%司盘85(任选含有不同量的MTP-PE),使用微流化器如Model 110Y微流化器(Microfluidics,Newton,MA)配制成亚微米颗粒,(b)SAF,含有10%角鲨烯,0.4%吐温80,5%普朗尼克封端的聚合物L121和thr-MDP,微流化成亚微米乳液或经涡旋以产生更大粒径的乳液,(c)Ribi™佐剂系统(RAS),(Corixa,Hamilton,MT),含有2%角鲨烯,0.2%吐温80以及选自以下的一种或多种细菌细胞壁组分:美国专利No.4,912,094中描述的3-O-脱酰单磷酸脂质A(MPL™)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+CWS(Detox™);(d)Montanide ISA;

[0065] (3) 可以使用皂苷佐剂,例如Quil A或STIMULON™QS-21(Antigenics,Framingham,MA)(参见例如美国专利No.5,057,540)或由其产生的颗粒,例如ISCOM(由胆固醇、皂苷、磷脂和两亲性蛋白的组合形成的免疫刺激复合物)和Iscomatrix®(具有与ISCOM基本相同的结构,但没有蛋白);

[0066] (4) 细菌脂多糖、合成脂质A类似物,例如氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯化合物(AGP)或其衍生物或类似物,其可从Corixa获得,并且描述于美国专利No.6,113,918中;一种这类的AGP是2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰氨基]乙基2-脱氧-4-O-磷基-3-O-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰基]-2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷,其也称为529(以前称为RC529),被配制成水性形式或稳定乳液;

[0067] (5) 合成多核苷酸,例如含有CpG基序的寡核苷酸(美国专利No.6,207,646);和

[0068] (6) 细胞因子,如白细胞介素(如IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-12,IL-15,IL-18等)、干扰素(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;以及

[0069] (7) 补体,如补体组分C3d的三聚体。

[0070] 在另一个实施方案中,佐剂是2种、3种或更多种上述佐剂的混合物,例如,SBAS2(水包油乳液,还含有3-脱酰单磷酸脂质A和QS21)。

[0071] 胞壁酰肽包括但不限于N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(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-羟基磷酸氧基)-乙胺(MTP-PE)等。

[0072] 在某些实施方案中,佐剂是铝盐。铝盐佐剂可以是明矾沉淀的疫苗或明矾吸附的疫苗。铝盐佐剂是本领域熟知的,并且描述于例如Harlow,E.和D.Lane(1988;Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory)和Nicklas,W.(1992;Aluminum salts.Research in Immunology 143:489-493)中。铝盐包括但不限于水合氧化铝、氧化铝水合物、氧化铝三水合物(ATH)、铝水合物、铝三水合物、铝胶、Superfos、Amphogel、氢氧化铝(III)、羟基磷酸硫酸铝(磷酸铝佐剂(APA))、无定形氧化铝、三水合氧化铝或三羟基铝。

[0073] APA是羟基磷酸铝的水性悬浮液。APA通过以1:1的体积比混合氯化铝和磷酸钠以沉淀羟基磷酸铝来制备。在共混过程之后,用高剪切混合器使材料尺寸减小,以实现单分散的粒度分布。然后将产物用生理盐水渗滤并灭菌(蒸汽灭菌或高压灭菌)。

[0074] 在某些实施方案中,使用市售的Al(OH)₃(例如Denmark/Accurate Chemical and

Scientific Co., Westbury, NY的Alhydrogel或Superfos)来吸附蛋白。在另一个实施方案中,蛋白的吸附取决于蛋白的pI(等电点pH)和介质的pH。具有较低pI的蛋白比具有较高pI的蛋白更强地吸附于带正电荷的铝离子。铝盐可以建立抗原贮库,其在2-3周的时间内缓慢释放,参与巨噬细胞的非特异性激活和补体激活,和/或刺激先天免疫机制(可能通过尿酸的刺激)。参见,例如,Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21:23。

[0075] 对于除6B之外的所有血清型,通常将单价的、大的水性缀合物混合在一起并稀释至目标值8 μ g/mL,将血清型6B稀释至16 μ g/mL。稀释后,将该批次过滤除菌,并在无菌条件下加入等体积的磷酸铝佐剂,使最终铝浓度达到250 μ g/mL。将有佐剂的经配制的批料装入一次性0.5mL/剂量小瓶中。

[0076] 在某些实施方案中,佐剂是含CpG的核苷酸序列,例如含CpG的寡核苷酸,特别是含CpG的寡脱氧核苷酸(CpG ODN)。在另一个实施方案中,佐剂是ODN 1826,其可以从Coley Pharmaceutical Group获得。

[0077] “含CpG的核苷酸”,“含CpG的寡核苷酸”,“CpG寡核苷酸”和类似术语是指长度为6-50个核苷酸的核苷酸分子,其含有未甲基化的CpG部分。参见,例如,Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297。在另一个实施例中,可以是该术语的任何其他本领域公认的定义。含有CpG的寡核苷酸包括使用任何合成的核苷间键、修饰的碱基和/或修饰的糖的修饰的寡核苷酸。

[0078] 使用CpG寡核苷酸的方法是本领域熟知的,并且描述于例如Sur et al., 1999, J Immunol. 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139-58; 和Yasuda et al., 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.

[0079] 23:89-110中。

[0080] 施用/剂量

[0081] 本发明的组合物和制剂可通过经由全身或粘膜途径施用疫苗来保护或治疗易感染(例如肺炎球菌感染)的人。在一个实施方案中,本发明提供诱导对肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的免疫应答的方法,所述方法包括向人施用免疫有效量的本发明的免疫原性组合物。在另一个实施方案中,本发明提供了一种对人接种疫苗预防肺炎球菌感染的方法,所述包括对人施用免疫有效量的本发明免疫原性组合物的步骤。

[0082] 通过标准研究(包括观察个体中的适当的免疫应答)可以确定特定疫苗的最佳组分含量。例如,在另一个实施方案中,用于人疫苗接种的剂量通过从动物研究外推至人类数据来确定。在另一个实施方案中,剂量根据经验确定。

[0083] 本发明组合物的“有效量”是指在随后的攻击过程中引发抗体所需的剂量,所述抗体显著降低微生物(例如肺炎链球菌)传染性的可能性或严重性。

[0084] 本发明的方法可用于预防和/或减少由微生物(例如肺炎链球菌)引起的主要临床症状,包括侵袭性感染(脑膜炎、肺炎和菌血症)和非侵袭性感染(急性中耳炎和鼻窦炎)。

[0085] 本发明的组合物的施用可以包括以下一种或多种:经由肌肉内、腹膜内、皮内或皮下途径注射;或通过粘膜施用施用至口腔/食道、呼吸道或泌尿生殖道。在一个实施方案中,鼻内施用用于治疗肺炎或中耳炎(因为可以更有效地预防鼻咽部携带肺炎球菌,从而在其早期阶段减弱感染)。

[0086] 将每剂疫苗中缀合物的量选择为诱导免疫保护反应而没有显著不利影响的量。这

样的量可以根据肺炎球菌血清型而变化。通常,对于多糖类缀合物,每剂包含0.1至100 μ g的每种多糖,特别是0.1至10 μ g,更特别是1至5 μ g。例如,每剂可包含100、150、200、250、300、400、500或750ng,或者1、1.5、2、3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、22、25、30、40、50、60、70、80、90或100g。

[0087] 在一个实施方案中,铝盐的剂量为10、15、20、25、30、50、70、100、125、150、200、300、500或700 μ g,或者1、1.2、1.5、2、3、5mg或更多。在另一个实施方案中,上述明矾盐的剂量是相对于每 μ g克重组蛋白的剂量。

[0088] 根据本发明的任一方法并且在一个实施方案中,个体是人。在某些实施方案中,人类患者是婴儿(小于1岁)、学步儿童(大约12至24个月)或幼儿(约2至5岁)。在其他实施方案中,人类患者是老年患者(>65岁)。本发明的组合物也适用于年龄较大的儿童、青少年和成人(例如,年龄为18至45岁或18至65岁)。

[0089] 在本发明方法的一个实施方案中,本发明的组合物以单次接种施用。在另一个实施方案中,疫苗施用两次、三次或四次或更多次,每次施用充分间隔开。例如,组合物可以以1、2、3、4、5或6个月或其任何组合的间隔施用。免疫时间表可以遵循指定用于肺炎球菌疫苗的时间表。例如,针对由肺炎链球菌引起的侵袭性疾病的婴儿和学步儿童的常规时间表是2、4、6和12-15个月龄。因此,在优选的实施方案中,组合物在2个月、4个月、6个月和12-15个月龄时以4剂系列施用。

[0090] 本发明的组合物还可包括一种或多种来自肺炎链球菌的蛋白。适合包含在内的肺炎链球菌蛋白的实例包括在国际专利申请公开No. WO 02/083855和WO 02/053761中鉴定的那些。

[0091] 制剂

[0092] 本发明的组合物可通过本领域技术人员已知的一种或多种方法向个体施用(例如肠胃外、粘膜、透皮、肌肉内、静脉内、皮内、鼻内、皮下、腹膜内),并相应进行配制。

[0093] 在一个实施方案中,通过表皮注射、肌肉注射、静脉内注射、动脉内注射、皮下注射或呼吸道内粘膜注射液体制剂施用本发明的组合物。用于注射的液体制剂包括溶液等。

[0094] 本发明的组合物可以配制成单剂量小瓶,多剂量小瓶或预填充注射器。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明的组合物口服施用,并因此配制成适于口服施用的形式,即作为固体或液体制剂。固体口服制剂包括片剂、胶囊、丸剂、颗粒剂、丹剂等。液体口服制剂包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油等。

[0096] 用于液体制剂的药学上可接受的载体是水性溶液或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。油的实例是动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、橄榄油、向日葵油、鱼肝油、另一种海洋油或来自牛奶或蛋的脂质。

[0097] 药物组合物可以是等渗的、低渗的或高渗的。然而,通常优选地,用于输注或注射的药物组合物在施用时基本上是等渗的。因此,对于储存而言,药物组合物可以优选是等渗的或高渗的。如果储藏用的药物组合物是高渗的,则可以在施用前将其稀释成等渗溶液。

[0098] 等渗剂可以是离子等渗剂,例如盐或非离子等渗剂如碳水化合物。离子等渗剂的实例包括但不限于氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化钾(KCl)和氯化镁(MgCl_2)。非离子等

渗剂的实例包括但不限于甘露醇、山梨糖醇和甘油。

[0099] 还优选至少一种药学上可接受的添加剂是缓冲剂。出于某些目的,例如,当药物组合物用于输注或注射时,通常希望组合物包含缓冲剂,所述缓冲剂能够将溶液缓冲至pH为4至10,例如5至9,例如6至8。

[0100] 例如,缓冲剂可以选自TRIS、乙酸盐、谷氨酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、甘氨酸盐、组氨酸、甘氨酸、琥珀酸盐和三乙醇胺缓冲剂。

[0101] 此外,缓冲剂可以例如选自USP相容的缓冲剂以用于肠胃外使用,特别是当药物制剂用于肠胃外使用时。例如,缓冲剂可选自一元酸,例如乙酸,苯甲酸,葡糖酸,甘油酸和乳酸;二元酸,如乌头酸,己二酸,抗坏血酸,碳酸,谷氨酸,苹果酸,琥珀酸和酒石酸;多元酸如柠檬酸和磷酸;以及碱,如氨,二乙醇胺,甘氨酸,三乙醇胺和TRIS。

[0102] 胃肠外载体(用于皮下、静脉内、动脉内或肌肉注射)包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液和固定油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。实例是无菌液体,例如水和油,添加或不添加表面活性剂以及其他药学上可接受的佐剂。通常,水、盐水、葡萄糖水溶液和相关糖溶液、二醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对于可注射溶液。油的实例是动物,植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、橄榄油、向日葵油、鱼肝油、另一种海洋油,或来自牛奶或蛋的脂质。

[0103] 本发明的制剂还可包含表面活性剂。优选的表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温);环氧乙烷(EO),环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物,以DOWFAX™商品名出售,例如线性EO/PO嵌段共聚物;辛基聚醇,其重复乙氧基(氧-1,2-乙二基)基团的数量可变化,并且辛基聚醇-9(Triton X-100或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)是特别令人感兴趣的;(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂如磷脂酰胆碱(卵磷脂);壬基酚乙氧基化物,如Tergitol™NP系列;衍生自月桂醇、十六烷醇、硬脂醇和油基醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂),如三乙二醇单月桂醚(Brij 30);以及脱水山梨糖醇酯(通常称为SPAN),如脱水山梨糖醇三油酸酯(司盘85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0104] 表面活性剂的优选量(重量%)是:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯(如PS80)0.01至1%,特别是约0.1%;辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如Triton X-100,或Triton系列中的其它洗涤剂)0.001至0.1%,特别是0.005至0.02%;聚氧乙烯醚(如月桂醇聚醚9)0.1至20%,优选0.1至10%,特别是0.1至1%或约0.5%。

[0105] 所述制剂还包含pH缓冲盐水溶液。缓冲剂可以,例如,选自TRIS、乙酸盐、谷氨酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、甘氨酸盐、组氨酸、甘氨酸、琥珀酸盐、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)和三乙醇胺缓冲剂。缓冲剂能够将溶液缓冲至pH范围为4至10,5.2至7.5,或5.8至7.0。在本发明的某些方面,缓冲剂选自磷酸盐、琥珀酸盐、组氨酸、MES、MOPS、HEPES、乙酸盐或柠檬酸盐。此外,缓冲剂可以例如选自USP兼容的缓冲剂以用于胃肠外使用,特别是当药物制剂用于肠胃外使用时。缓冲剂的浓度范围为1mM至50mM或5mM至50mM。在某些方面,缓冲剂是终浓度为5mM至50mM的组氨酸,或终浓度为1mM至10mM的琥珀酸盐。在某些方面,组氨酸的终浓度为20mM±2mM。

[0106] 虽然盐水溶液(即含NaCl溶液)是优选的,但适用于制剂的其它盐包括但不限于CaCl₂、KCl和MgCl₂及其组合。可以使用非离子等渗剂,包括但不限于蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇和甘油代替盐。合适的盐范围包括但不限于25mM至500mM或40mM至170mM。在一方面,盐水是NaCl,任选以20mM至170mM的浓度存在。

[0107] 在优选的实施方案中,所述制剂包含含有氯化钠的L-组氨酸缓冲液。

[0108] 在另一个实施方案中,药物组合物以控释系统的形式递送。例如,可以使用静脉内输注、透皮贴剂、脂质体或其他施用方式施用。在另一个实施方案中,使用聚合物材料;例如在微球中或植入物中。

[0109] 本发明的组合物还可包括一种或多种来自肺炎链球菌的蛋白。适于包含在内的肺炎链球菌蛋白的实例包括在国际专利申请公开No. WO 02/083855和WO 02/053761中鉴定的那些。

[0110] 已经参考所附说明书和附图描述了本发明的各种实施方案,应该理解,本发明不限于那些精确的实施方案,并且本领域技术人员可以在其中进行各种变化和修改而不脱离由所附权利要求限定的本发明的范围或精神。

[0111] 以下实施例说明但不限制本发明。

[0112] 本申请还包含以下项目:

[0113] 1. 一种通过还原胺化制备多糖蛋白缀合物的方法,所述方法包括:

[0114] a) 在氰基硼氢化物盐和镍的存在下,使活化的多糖与载体蛋白在水性缓冲液中反应以形成缀合反应混合物;

[0115] b) 任选地,添加强还原剂;以及

[0116] c) 纯化所述缀合反应混合物以除去包括游离氰离子的残余反应物。

[0117] 2. 根据项目1所述的方法,其中所述氰基硼氢化物盐是氰基硼氢化钠。

[0118] 3. 根据项目2所述的方法,其中步骤a)在6.0至8.5的pH下进行

[0119] 4. 根据项目3所述的方法,其中步骤a)在6.5至7.5的pH下进行。

[0120] 5. 根据项目1所述的方法,其中步骤a)中的镍是氯化镍或硫酸镍的形式。

[0121] 6. 根据项目5所述的方法,其中镍以0.5mM至15mM的浓度存在。

[0122] 7. 根据项目6所述的方法,其中镍以0.5mM至5mM的浓度存在。

[0123] 8. 根据项目1所述的方法,其中步骤a)中的镍在氰基硼氢化钠之前加入。

[0124] 9. 根据项目1所述的方法,其中步骤b)是添加强还原剂。

[0125] 10. 根据项目1所述的方法,其中所述强还原剂包含硼氢化物离子。

[0126] 11. 根据项目10所述的方法,其中所述强还原剂是硼氢化钠。

[0127] 12. 根据项目1所述的方法,其中c)中的纯化步骤通过超滤进行。

[0128] 13. 根据项目1所述的方法,其中步骤a)中的反应温度为10-30℃。

[0129] 14. 根据项目13所述的方法,其中步骤a)中的反应温度为10-22℃。

[0130] 15. 根据项目1所述的方法,其中所述多糖选自脑膜炎球菌多糖、肺炎球菌多糖、b型流感嗜血杆菌多糖、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)Vi多糖以及B族链球菌多糖。

[0131] 16. 根据项目15所述的方法,其中所述多糖是肺炎链球菌荚膜多糖。

[0132] 17. 根据项目16所述的方法,其中所述肺炎链球菌荚膜多糖来自血清型3。

[0133] 18. 根据项目16所述的方法,其中所述肺炎链球菌荚膜多糖来自血清型6B。

[0134] 19. 根据项目1、17或18所述的方法,其中所述蛋白是选自破伤风类毒素、白喉类毒素和CRM₁₉₇的载体蛋白。

[0135] 20. 根据项目19所述的方法,其中所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0136] 21. 根据项目20所述的方法,其中血清型6B多糖蛋白缀合物的分子量为2000-5000kDa或3000-4000kDa。

[0137] 22. 一种通过还原胺化制备肺炎链球菌血清型3多糖蛋白缀合物的方法,所述方法包括:

[0138] a) 在氰基硼氢化物盐的存在下,使活化的血清型3多糖与载体蛋白在水性缓冲液中,在2-25℃的温度和7.0以下的pH下或在2-10℃的温度和7.7以下的pH下反应,以形成缀合反应混合物;

[0139] b) 任选地,添加强还原剂;和

[0140] c) 纯化所述缀合反应混合物以除去包括游离氰离子的残余反应物。

[0141] 23. 根据项目22所述的方法,其中所述氰基硼氢化物盐是氰基硼氢化钠。

[0142] 24. 根据项目22所述的方法,其中步骤a)在6.0-7.0的pH下进行。

[0143] 25. 根据项目22所述的方法,其中步骤b)是添加强还原剂。

[0144] 26. 根据项目22所述的方法,其中所述强还原剂包括硼氢化物离子。

[0145] 27. 根据项目26所述的方法,其中所述强还原剂是硼氢化钠。

[0146] 28. 根据项目22所述的方法,其中c)中的纯化步骤通过超滤进行。

[0147] 29. 根据项目22所述的方法,其中步骤a)中的反应温度为2-23℃。

[0148] 30. 根据项目29所述的方法,其中步骤a)中的反应温度为8-12℃。

[0149] 31. 根据项目22所述的方法,其中所述蛋白是选自破伤风类毒素、白喉类毒素和CRM₁₉₇的载体蛋白。

[0150] 32. 根据项目31所述的方法,其中所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0151] 33. 一种通过高碘酸盐氧化活化肺炎链球菌血清型3多糖的方法,所述方法包括使血清型3多糖与高碘酸盐在水性缓冲液中,在4.3-6.9的pH和2-23℃下,或在4.3-7.7的pH和2-10℃下或在4.3-6.2的pH和2-35℃下反应。

[0152] 34. 根据项目33所述的方法,其中所述高碘酸盐是高碘酸钠。

[0153] 实施例

[0154] 分析方法

[0155] 使用HPSEC/UV/MALS/RI测定分析缀合物的分子量和浓度

[0156] 注射多糖和缀合物样品并通过高效尺寸排阻层析(HPSEC)进行分离。使用紫外(UV)检测器、多角度光散射(MALS)检测器和折射率(RI)检测器连续完成检测。使用消光系数根据UV280计算蛋白浓度。从缀合蛋白中分辨出游离蛋白,使得能够计算缀合蛋白百分比(表1-3)。使用dn/dc系数由RI信号(由蛋白和多糖两者产生)去卷积多糖浓度,dn/dc系数为随以mL/g报告的溶质浓度的变化的溶液折射率的变化。使用测量的浓度和整个样品峰的光散射信息,通过Astra软件(Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA)计算样品的平均分子量。对于多分散分子,存在多种形式的分子量平均值。例如,数均分子量M_n,重均分子量M_w和z均分子量M_z(Molecules, 2015, 20, 10313-10341)。除非另有说明,否则分子量是重均分子量。

[0157] 游离多糖测试

[0158] 通过首先用脱氧胆酸盐(DOC)和盐酸沉淀游离蛋白和缀合物来测量缀合物样品中的游离多糖(未与CRM197缀合的多糖)。然后滤出沉淀物,通过HPSEC/UV/MALS/RI分析滤液的游离多糖浓度。游离多糖计算为通过HPSEC/UV/MALS/RI测量的总多糖的百分比。

[0159] 氰化物测定

[0160] 将样品调节至碱性pH,然后通过30kDa分子量截留膜过滤以从溶液中除去缀合蛋白。将牛磺酸和萘-2,3-二甲醛(NDA)加入到每个样品中,牛磺酸和萘-2,3-二甲醛一起与氰化物反应以产生荧光产物。通过具有荧光检测的反相HPLC分析样品,并通过与标准曲线比较确定每个样品的氰化物浓度。

[0161] 实施例1:肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0162] 培养肺炎球菌的方法是本领域熟知的。参见,例如,Chase,1967,Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52。制备肺炎球菌荚膜多糖的方法也是本领域熟知的。参见,例如,欧洲专利No.EP0497524。肺炎球菌亚型的分离株可从美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA)获得。细菌被鉴定为是有荚膜的、非运动的、革兰氏阳性的柳叶刀形双球菌,其在血琼脂上是 α -溶血的。可以使用特定抗血清基于荚膜肿胀(Quelling)反应区分亚型。参见,例如,美国专利No.5,847,112。

[0163] 代表存在的每种肺炎链球菌血清型的细胞库以冷冻小瓶的形式从Merck Culture Collection(Rahway,NJ)获得。将解冻的种子培养物转移至含有预先灭菌的适于肺炎链球菌的生长培养基的种子发酵罐中。在温度和pH控制下,培养物在种子发酵罐中生长。将整个体积的种子发酵罐转移到含有预先灭菌的生长培养基的生产发酵罐中。生产发酵是该过程的最终细胞生长阶段。控制温度、pH和搅拌速率。

[0164] 通过添加灭活剂终止发酵过程。灭活后,将批料转移至灭活罐中,在灭活罐中将批料保持在受控的温度和搅拌下。使用离心和过滤的组合除去细胞碎片。将批料超滤并渗滤。然后对批料进行基于溶剂的分馏,所述分馏除去杂质并回收多糖。

[0165] 实施例2:在水性溶液中利用还原胺化将血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23F和33F缀合至CRM₁₉₇

[0166] 使用常规工艺流程将不同血清型多糖分别与纯化的CRM₁₉₇载体蛋白缀合。将多糖溶解,减小尺寸,化学活化并通过超滤进行缓冲液交换。然后在反应混合物中使用NiCl₂(2mM)将纯化的CRM₁₉₇与活化的多糖缀合,所得的缀合物通过超滤纯化,然后进行最终的0.2微米过滤。将每个步骤中的若干工艺参数(例如pH、温度、浓度和时间)控制为如以下部分中所述的血清型特异性的值。

[0167] 多糖的尺寸减小和活化

[0168] 将纯化的肺炎球菌荚膜Ps粉末溶解于水中,除血清型19A外,所有血清型均经过0.45微米过滤。除血清型19A之外,将所有血清型均质化以降低Ps的分子量。血清型19A由于其起始尺寸相对小而没有进行尺寸减小。将均质化压力和通过均化器的次数控制为血清型特异性的目标值(150-1000巴;通过4-7次)以获得血清型特异性的分子量。将血清型3在360-400巴下均质化,通过约5次。对经尺寸减小的多糖进行0.2微米过滤,然后浓缩并使用10kDa NMWC0切向流超滤膜用水渗滤。

[0169] 然后用乙酸钠缓冲液将多糖溶液调节至血清型特异性的温度(4-22℃)和pH(4-

5),以使活化步骤期间的Ps尺寸减小最小化。通过高碘酸盐氧化进行多糖活化。对于血清型4,在活化之前,将批料在约50℃和pH4下温育以使Ps部分去酮化。通过添加偏高碘酸钠溶液开始Ps活化。加入的偏高碘酸钠的量是血清型特异性的,范围约为每摩尔多糖重复单元0.1至0.5摩尔的偏高碘酸钠。选择偏高碘酸钠的血清型特异性电荷以实现目标水平的ps活化(每摩尔Ps重复单元摩尔醛)。血清型3在约22℃下活化6-15小时。

[0170] 除血清型5和7F外,对于所有血清型,使用10kDa NMWC0切向流超滤膜将活化产物用10mM磷酸钾(pH 6.4)渗滤。将血清型5和7F用pH4-5的10mM乙酸钠渗滤。所有血清型的超滤均在2-8℃下进行。

[0171] 多糖与CRM₁₉₇的缀合

[0172] 将氧化的多糖溶液与水 and 1.5M磷酸钾缓冲液(pH 6.0或pH 7.0,取决于血清型)混合。选择缓冲液pH以优化缀合反应期间活化的Ps的稳定性。根据血清型,将通过如先前所述的在荧光假单胞菌中的表达(WO2012/173876A1)获得的纯化的CRM₁₉₇用0.2微米过滤并与缓冲的多糖溶液以多糖与CRM₁₉₇质量比为0.4至1.0w/w合并。选择质量比以控制所得缀合物中多糖与CRM₁₉₇的比例。多糖和磷酸盐浓度是血清型特异性的,根据血清型的不同,范围分别为3.6至10.0g/L和100至150mM。选择血清型特异性的Ps浓度以控制所得缀合物的大小。然后将溶液0.2微米过滤,并根据血清型将溶液温度调节至10℃或22℃。选择温度以优化缀合反应期间活化的Ps的稳定性。然后使用100mM氯化镍溶液添加氯化镍至约2mM。加入氰基硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元2摩尔)。为了最大限度地消耗Ps和蛋白,缀合反应持续时间是血清型特异性的(72至120小时)。在8-12℃下,在150mM磷酸钾(pH6缓冲液)中,使用浓度分别约4.1g/L和6.8g/L的多糖和蛋白浓度缀合血清型3。

[0173] 用硼氢化钠还原

[0174] 在缀合反应后,将批料稀释至Ps浓度为约3.5g/L,冷却至2-8℃,并1.2微米过滤。使用100kDa NMWC0切向流超滤膜,将所有血清型(血清型5除外)在2-8℃下用100mM磷酸钾(pH7.0)渗滤。然后将在渗余物中回收的批料稀释至约2.0g Ps/L,并通过加入1.2M碳酸氢钠(pH9.4)调节pH。加入硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元1摩尔)。然后加入1.5M磷酸钾,pH6.0。使用100kDa NMWC0切向流超滤膜将血清型5用300mM碳酸氢钠(pH9)渗滤。

[0175] 无菌过滤和产品储存

[0176] 然后将批料浓缩,并在4℃下使用300kDa NMWC0切向流超滤膜用在150mM氯化钠中的10mM组氨酸(pH7.0)渗滤。渗余物批料经0.2微米过滤。

[0177] 将血清型19F在22℃下温育约7天,在4℃下,使用100kDa NMWC0切向流超滤膜用在150mM氯化钠中的10mM组氨酸(pH7.0)渗滤,并经0.2微米过滤。

[0178] 用另外的在150mM氯化钠中的10mM组氨酸(pH7.0)将该批料调节至Ps浓度为1.0g/L。将批料分成等分试样并在≤-60℃下冷冻。

[0179] 实施例3:使用镍改善使用氰基硼氢化钠作为还原剂的还原胺化的缀合研究

[0180] 5M氰基硼氢化钠试剂批次中起始氰化物水平的差异导致不一致的缀合性能,导致可变的产物属性,例如缀合物大小和缀合物Ps-to-CRM₁₉₇比率。如表1中针对血清型6B缀合反应所示,当5M氰基硼氢化钠(NaCNBH₃)中的氰离子(CN⁻)较少时,缀合的程度(以较大的缀合物尺寸和缀合的CRM₁₉₇的较高百分比衡量)较高。此外,在将氰化钾(KCN)加入到缀合反应中时,缀合的程度降低。使用高性能尺寸排阻色谱法以及紫外线检测器、多角度光散射检测

器和折射率检测器来测量缀合物大小、缀合物Ps-to-CRM₁₉₇比率和缀合的CRM₁₉₇的百分比。

[0181] 表1:残留氰化物浓度对血清型6B-CRM₁₉₇缀合的影响

[0182]	5 M NaCNBH ₃ 试剂批次标识	5M NaCNBH ₃ 中的初始 CN ⁻ 浓度 (mM)	掺入缀合反应中的 KCN 浓度 (mM)	缀合反应中的总 CN ⁻ 浓度 (mM)	缀合物尺寸 (kDa)	缀合物 Ps-to-CRM ₁₉₇ 比率	缀合的 CRM ₁₉₇ 的百分比
						(w:w)	(%)
[0183]	A	43	0	0.17	2550	1.1	47
	B	250	0	0.98	1400	1.7	30
	A	43	0.81	0.98	1600	1.5	33

[0184] 过渡金属与氰化物形成稳定的络合物,并且已知改善用氰基硼氢化钠对蛋白氨基与甲醛的还原性甲基化(S. Gidley et al., Biochem J. 1982, 203:331-334; Jentoft et al. Anal Biochem. 1980, 106:186-190)。然而,从未研究过载体蛋白和高分子量活化多糖之间的还原胺化(以形成高度支化的缀合产物)的这种效果。高分子量分子之间的反应中的氰化物残留水平的影响也不是很清楚。优选的Ni(II)浓度也不是很清楚。因此,研究了在加入氰基硼氢化钠之前将可溶性Ni(II)加入到缀合反应中的效果。Ni(II)增加了缀合的程度。此外,在使用三批具有不同氰化物水平(43-250mM)的5M氰基硼氢化钠(表2)的研究中,Ni(II)的存在消除了起始氰化物水平对血清型6B缀合程度的影响。在该研究中,缀合物尺寸和缀合物Ps-to-CRM₁₉₇比率的质量属性没有显示出显著的变化。

[0185] 表2:1.5mM镍金属离子(Ni(II))对血清型6B-CRM₁₉₇缀合的影响

[0186]	5 M NaCNBH ₃ 试剂批次标识	5M NaCNBH ₃ 的起始 CN ⁻ 浓度(mM)	缀合反应中的总 CN ⁻ 浓度 (mM)	Ni 浓度 (mM)	缀合物尺寸 (kD)	缀合物 Ps-to-CRM ₁₉₇ 比率(w:w)	缀合的 CRM ₁₉₇ 的百分比(%)
[0187]	A	43	0.17	1.5	3420	0.8	66
	B	76	0.30	1.5	3280	0.8	60
	C	250	0.98	1.5	3480	0.8	62

[0187] 基于这些结果,在0.1至9mM氯化镍(优选2mM)的存在下使用多种血清型(表3)进行缀合反应以改善整体缀合(通过增加蛋白的消耗测量)。随后在缀合后的超滤步骤中清除Ni(II)和镍-氰化物络合物。

[0188] 表3:镍(II)对CRM₁₉₇掺入多种血清型的缀合物中的程度的影响。

[0189]

血清型	镍来源	缀合反应中的镍(II)浓度 (mM)	蛋白缀合的增加百分比 (%), 相对于 0 mM 镍 (II)
1	氯化镍 (II)	0	0
		0.1	4
		0.5	25
		1	29
		5	39
6B	硫酸镍 (II)	0	0
		1.5	50
		9	50
7F	氯化镍 (II)	0	0
		2	24
9V	氯化镍 (II)	0	0
		2	10
18C	氯化镍 (II)	0	0
		2	106
22F	氯化镍 (II)	0	0
		2	37
23F	氯化镍 (II)	0	0
		2	21
		5	26
33F	氯化镍 (II)	0	0
		2	27

[0190] 除Ni (II) 外,还研究了几种其他金属,包括铁,铝,钴,铜,锌和银。然而,由于溶解度的限制,这些金属的效果明显较差。在铜的情况下,观察到CRM₁₉₇的聚集。

[0191] 发现包含多糖-蛋白缀合物(所有这些都是根据本发明的方法制备的)的15价肺炎球菌缀合物疫苗在小鼠,兔,非人灵长类动物和人类中具有免疫原性(数据未显示)。

[0192] 实施例4:pH和温度对活化的血清型3多糖的稳定性的影响

[0193] 研究了pH和温度对活化的血清型3多糖尺寸的影响,以确定最佳多糖稳定性的条件。期望得到最佳的多糖稳定性以使活化或缀合反应期间的多糖尺寸减小最小化,这使得具有较少游离多糖的较大缀合物成为可能。

[0194] 如实施例2所述制备活化的血清型3多糖。在用10mM磷酸钾(pH6.4)渗滤后,将活化的多糖溶液在150mM乙酸钠中调节至pH4.3或5.0,或者在150mM磷酸钾调节至pH6.2、6.9或7.7.,并储存在2℃、10℃、23℃或35℃下。10小时后,通过HPSEC UV-MALS-RI测定溶液以确定Ps大小(Mw)。结果如图1所示。

[0195] 在pH 4.3-6.9和2-23℃下以及在pH 4.3-6.2和2-35℃下观察到最小的Ps尺寸减小(<20%)。在pH 6.9和35℃下以及在pH 7.7以及23-35℃下观察到显著的Ps尺寸减小(尺

寸减小>50%)。这些结果支持了血清型3多糖最佳的高碘酸盐活化条件和最佳的缀合条件为pH 4.3-6.9和2-23℃,以及pH 4.3-6.2和2-35℃。

[0196] 实施例5:在pH6.3和10℃下以及在pH7.7和35℃下活化的血清型3多糖的缀合

[0197] 基于图1中的结果,对如实施例4中所述产生的活化的血清型3多糖进行缀合反应。在用10mM磷酸钾渗滤后,将活化的多糖溶液调节至150mM磷酸钾,pH6.3或pH7.7。然后加入CRM₁₉₇载体蛋白,多糖和蛋白目标浓度分别约4.1g/L和6.8g/L。将pH 6.3溶液调节至0mM或2mM氯化镍。加入氰基硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元2摩尔)以引发缀合。pH 6.3和pH 7.7溶液分别在约10℃和35℃下进行缀合。48小时后,通过HPSEC UV-MALS-RI测定溶液以确定缀合物大小(Mw)。将相对分子量结果以pH6.3,10℃,2mM氯化镍结果作归一化。结果如表4所示。

[0198] 表4:为pH和温度的函数的缀合物尺寸

[0199]	缀合条件	48小时后的相对缀合物尺寸
	pH 6.3,10℃,2mM氯化镍	1.00
	pH 6.3,10℃,0mM氯化镍	0.88
	pH 7.7,35℃,0mM氯化镍	0.27

[0200] 在pH6.3,10℃下进行的缀合反应产生的缀合物比在pH7.7,35℃下产生的缀合物显著更大(约3-4倍)。这些结果与实施例4中描述的多糖稳定性结果一致,表明了用于最佳Ps稳定性的pH和温度条件产生更大的、更理想的缀合物。

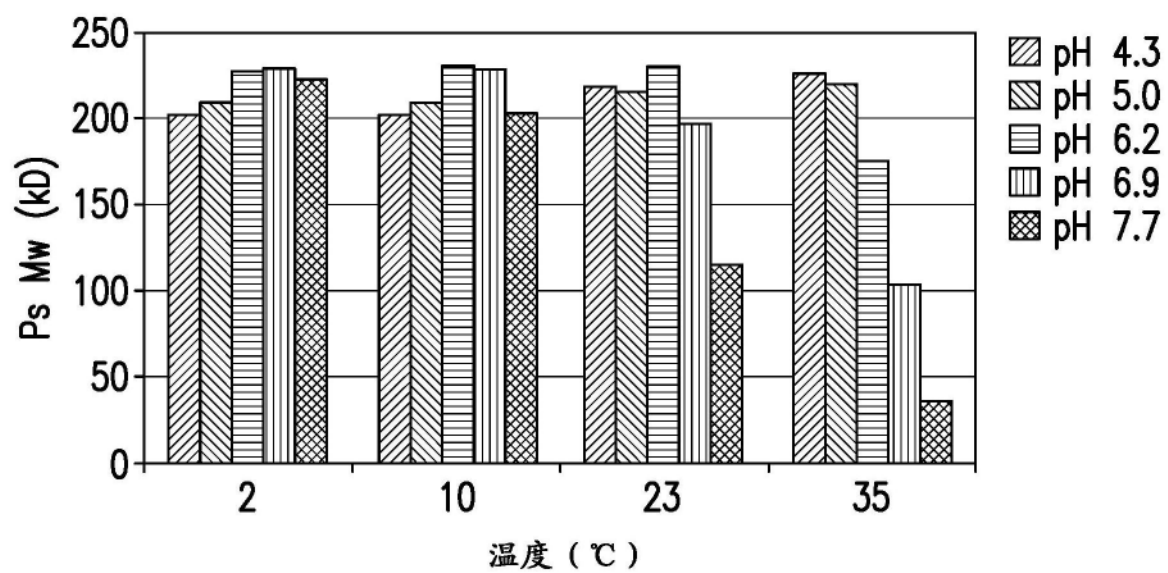


图1