



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101610785 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 200780051661. 5

(22) 申请日 2007. 12. 10

(30) 优先权数据

11/644, 924 2006. 12. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 08. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/086941 2007. 12. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02008/143709 EN 2008. 11. 27

(73) 专利权人 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 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 39/09 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

C07K 14/34 (2006. 01)

C07K 14/315 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2006110381 A1, 2006. 10. 19,

CN 1064217 A, 1992. 09. 09,

CN 1566145 A, 2005. 01. 19,

审查员 潘天耀

权利要求书2页 说明书30页 附图3页

(54) 发明名称

多价肺炎球菌多糖-蛋白质缀合物组合物

(57) 摘要

描述了具有 13 种不同的多糖-蛋白质缀合物和任选地基于铝的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肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的不同血清型 (1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F) 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 和 19A 的覆盖, 其中所述血清型 6A 和 19A 不依赖于血清组交叉保护的的限制。还描述了制备包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌血清型 3 多糖的免疫原性缀合物的方法, 该方法包括在二价阳离子的存在下用高碘酸氧化所述多糖。

1. 制备包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 3 多糖的免疫原性缀合物的方法, 所述方法包括

(a) 使纯化的血清型 3 多糖与选自乙酸、柠檬酸或碳酸的温和的酸反应, 得到水解的血清型 3 多糖;

(b) 在二价阳离子的存在下使水解的血清型 3 多糖与氧化剂反应, 得到活化的血清型 3 多糖, 其中所述的氧化剂是高碘酸且二价阳离子是  $Mg^{2+}$  或  $Ca^{2+}$ ;

(c) 使活化的血清型 3 多糖与载体蛋白混合;

(d) 使混合且活化的血清型 3 多糖和载体蛋白与还原剂反应, 得到血清型 3 多糖: 载体蛋白缀合物; 和

(e) 封闭血清型 3 多糖: 载体蛋白缀合物中未反应的醛, 得到包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌血清型 3 多糖的免疫原性缀合物;

其中所述载体蛋白选自: 白喉类毒素; 破伤风类毒素、百日咳类毒素、霍乱类毒素、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的外毒素 A; 外膜复合体 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 A 组或者 B 组链球菌的 C5a 肽酶、流感嗜血杆菌蛋白 D; 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)。

2. 权利要求 1 的方法, 还包括在与载体蛋白混合前纯化活化的血清型 3 多糖。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 还包括在与还原剂反应前, 共同冻干所述混合且活化的血清型 3 多糖和载体蛋白。

4. 权利要求 1 或 2 的方法, 还包括纯化免疫原性缀合物。

5. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述的温和的酸是乙酸。

6. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述的载体蛋白是 CRM<sub>197</sub>。

7. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述的还原剂是氰基硼氢化钠。

8. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中封闭未反应的醛包括使血清型 3 多糖: 载体蛋白缀合物与硼氢化钠反应。

9. 制备包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌血清型 3 多糖的免疫原性缀合物的方法, 所述方法包括:

(a) 使纯化的血清型 3 多糖与乙酸反应, 得到水解的血清型 3 多糖;

(b) 在  $MgCl_2$  的存在下使水解的血清型 3 多糖与高碘酸反应, 得到活化的血清型 3 多糖;

(c) 纯化活化的血清型 3 多糖;

(d) 使活化的血清型 3 多糖与载体蛋白混合;

(e) 共同冻干混合且活化的血清型 3 多糖和载体蛋白;

(f) 使共同冻干且活化的血清型 3 多糖和载体蛋白与氰基硼氢化钠反应, 得到血清型 3 多糖: 载体蛋白缀合物; 和

(g) 用硼氢化钠封闭血清型 3 多糖: 载体蛋白缀合物中未反应的醛, 得到包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌血清型 3 多糖的免疫原性缀合物;

其中所述载体蛋白选自: 白喉类毒素; 破伤风类毒素、百日咳类毒素、霍乱类毒素、大

肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的外毒素 A ;外膜复合体 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 A 组或者 B 组链球菌的 C5a 肽酶、流感嗜血杆菌蛋白 D ;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)。

10. 权利要求 9 的方法,还包括纯化所述免疫原性缀合物。

11. 权利要求 9 或 10 的方法,其中所述的载体蛋白是 CRM<sub>197</sub>。

12. 制备活化的肺炎链球菌血清型 3 多糖的方法,所述方法包括:

(a) 使纯化的血清型 3 多糖与选自乙酸、柠檬酸或碳酸的温和的酸反应,得到水解的血清型 3 多糖 ;和

(b) 在二价阳离子的存在下使水解的血清型 3 多糖与氧化剂反应,得到活化的血清型 3 多糖,其中所述的氧化剂是高碘酸且二价阳离子是 Mg<sup>2+</sup> 或 Ca<sup>2+</sup>。

13. 权利要求 12 的方法,还包括在氧化后纯化活化的血清型 3 多糖。

14. 权利要求 12 或 13 的方法,其中所述的温和的酸是乙酸。

## 多价肺炎球菌多糖-蛋白质缀合物组合物

### 发明领域

[0001] 本发明总体上涉及医药领域,并具体地涉及微生物学、免疫学、疫苗和通过免疫预防细菌病原体感染。

### [0002] 发明背景

[0003] 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是世界上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价肺炎球菌缀合物疫苗(7vPnC, **Prevnar®**)是第一种表明对婴儿和幼儿中侵入性疾病和中耳炎具有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 的荚膜多糖,每种多糖缀合到称作 CRM<sub>197</sub> 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%侵入性肺炎球菌疾病(IPD) [1,2]。Prenvar 的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,在美国婴儿中侵入性肺炎球菌疾病减少(图1) [3,4]。

[0004] 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] 导致的。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和19A(图1) [3]。此外,这两种血清型造成比血清型1、3、5和7F总和还要多的侵入性疾病病例(100,000个2岁以下儿童中8.2对3.3例)。此外,血清型6A和19A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,可能血清组交叉保护将导致血清型6A和19A疾病的下降,但是有证据表明该下降将很有限,并且由于这些血清型引起的疾病的很大负担将保持(见下文)。

[0005] 考虑到由于血清型1、3、5、6A、7F和19A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Prenvar的覆盖度,并且提供对6A和19A的覆盖,其不依赖于血清组交叉保护的限制。

### [0006] 发明概述

[0007] 因此,本发明总体上提供了包含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,如基于铝的佐剂。更具体地,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)加上6种附加的血清型(1、3、5、6A、7F和19A)。

[0008] 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并且载体蛋白是CRM<sub>197</sub>。

[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,载体蛋白是CRM<sub>197</sub>,并且佐剂是基于铝的佐剂,诸如磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。在本发明的一个具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0010] 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,并且所述荚膜多糖制备自血清型 3 和至少一种额外的血清型。

[0011] 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。在另一实施方案中,载体蛋白是 CRM<sub>197</sub>。在再一个实施方案中,组合物包含佐剂,诸如选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的基于铝的佐剂。在一个具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0012] 本发明还提供了多价免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物和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,并且该荚膜多糖制备自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F、23F 和至少一种额外的血清型。

[0013] 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。在另一实施方案中,载体蛋白是 CRM<sub>197</sub>。在再一个实施方案中,组合物包含佐剂,诸如选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的基于铝的佐剂。在一个具体实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0014] 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前述任一种免疫原性组合物。

[0015] 本发明还提供了施用的任一种免疫原性组合物是单个的 0.5mL 剂量,其经配制成含有:除了 4 μg 6B 外,2 μg 每种糖;约 29 μg CRM<sub>197</sub> 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。

[0016] 还提供了制备包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌血清型 3(Pn 3)多糖的免疫原性缀合物的方法。在一个实施方案中,该方法包括(i)使纯化的 Pn 3 多糖与温和的酸反应,得到水解的 Pn 3 多糖;(ii)在二价阳离子的存在下使水解的 Pn 3 多糖与氧化剂反应,得到活化的 Pn 3 多糖;(iii)使活化的 Pn 3 多糖与载体蛋白混合;(iv)使混合且活化的 Pn 3 多糖和载体蛋白与还原剂反应,得到 Pn 3 多糖:载体蛋白缀合物;和(v)封闭 Pn 3 多糖:载体蛋白缀合物中未反应的醛,得到包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌 Pn 3 多糖的免疫原性缀合物。

[0017] 在一个其它实施方案中,该方法包括:(i)使纯化的 Pn 3 多糖与乙酸反应,得到水解的 Pn 3 多糖;(ii)在 MgCl<sub>2</sub> 的存在下使水解的 Pn 3 多糖与高碘酸反应,得到活化的 Pn 3 多糖;(iii)纯化活化的 Pn 3 多糖;(iv)使活化的 Pn 3 多糖与载体蛋白混合;(v)共同冻干混合且活化的 Pn 3 多糖和载体蛋白;(vi)使共同冻干且活化的 Pn 3 多糖和载体蛋白与氰基硼氢化钠反应,得到 Pn 3 多糖:载体蛋白缀合物;和(vii)用硼氢化钠封闭 Pn 3 多糖:载体蛋白缀合物中未反应的醛,得到包含与载体蛋白共价连接的肺炎链球菌 Pn 3 多糖的免疫原性缀合物。

[0018] 还提供了制备活化的肺炎链球菌 Pn 3 多糖的方法。该方法包括:(i)使纯化的 Pn 3 多糖与温和的酸反应,得到水解的 Pn 3 多糖;和(ii)在二价阳离子的存在下使水解的 Pn 3 多糖与氧化剂反应,得到活化的 Pn 3 多糖。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 描绘了在美国年龄 < 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 < 5 岁的儿童中具有青霉素 (PCN) 抗性的肺炎球菌分离株的分布 (1998)。

[0022] 图 3 描绘了来自 D118-P16 Prevnar 试验的第三次剂量后 OPA 的倒数累积分布曲线 (reverse cumulative distribution; RCDC)。

[0023] 发明详述

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

[0025] 来自 1995-1998 年间 IPD 监视的数据估计 Prevnar 中的 7 种血清型造成 < 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, Prevnar 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 Prevnar 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物疫苗除去任一种 Prevnar 血清型, 而是加入血清型以得到更宽的覆盖范围。

[0026] 血清型 1、3、5 和 7F 的包括

[0027] 在美国, 5 岁以下儿童中血清型 1 引起的 IPD 率 < 2%, 对于血清型 3 和 7F 的每一种大概相同 [1, 6]。血清型 1 和 5 占具有侵入性肺炎球菌疾病的高危美国人口中 IPD 的较高发病率。具体地, 血清型 1 引起阿拉斯加 < 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 和血清型 5 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 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, 在欧洲由血清型 1 引起的 IPD 的百分比不成比例地高于美国 (分别为 6-7% 对 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  $\geq 39^{\circ}\text{C}$  并且具有升高的白细胞数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 引起的疾病的较低百分比可能被引起较轻的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 被不成比例地表示 [16, 17, 18]。这提示血清型 1 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 将在世界上的多数地区对 IPD 的覆盖率增加约 3% -7%, 在亚洲增加约 9%。从而, 11 价疫苗将覆盖亚洲中的约 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 是第 8 位最普遍的总体中耳液分离物 [20]。血清型 3 占与中耳炎相关的肺炎球菌血清型的高达 8.7%。因而, 在中耳炎以及 IPD 中血清型 3 和 7F 的重要性保证它们包括在肺炎球菌缀合物疫苗中。

[0030] 然而, 产生显示出就血清型 3 多糖而言的显著免疫原性的多价肺炎球菌缀合物疫苗的尝试没有成功。例如, 在 11 价肺炎球菌蛋白 D 缀合物疫苗 (11-Pn-PD) 的免疫原性和安全性研究中, 在接受三剂该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血清型 3 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) 没有显示出在与其他测试的血清型相当的水平上对血清型 3 的抗体应答 (Gatchalian 等人, 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster No. 4, P1A Poster

Session 1, Istanbul Turkey, 2001 年 3 月 27 日)。在再一个研究中,评估了 11-Pn-PD 在预防急性中耳炎中的功效,疫苗没有提供对血清型 3 引起的发作的保护 (Prymula 等人 (2006) Lancet, 367 :740-748)。因此,包含来自血清型 3 的荚膜多糖和能够引起对血清型 3 多糖的免疫原性应答的肺炎球菌缀合物疫苗提供了在本领域现状上的显著进步。

[0031] 血清型 6A 和 19A 的包括

[0032] a. 血清型 6A 和 19A 的流行病学

[0033] 文献中的监视数据提示血清型 6A 和 19A 与血清型 1、3、5、和 7F 组合相比,造成美国 < 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 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 组分的原理。

[0034] b. 6B 和 19F 多糖诱导的对 6A 和 19A 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 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 荚膜的抗体。使用游离多糖和使用肺炎球菌缀合物疫苗在多种群体中评估 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 生物体的 OPA 活性与使用 6B 生物体的不同 [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 (其中存在高度相似性) 相反,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 20% 的受试者具有对 19A 的应答 [26]。用 19F 多糖免疫后对血清型 19A 的低水平的交叉反应性 IgG 和 OPA 应答也已经在使用缀合物疫苗的试验中记载 [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,尽管在较低水平,和用 19F 免疫后对 19A 的极低的功能抗体。

[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) 缀合物疫苗 (含有 6B、14、19F、23F 糖) 或安慰剂免疫灰鼠 [27]。在该试验中,显示对 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 中耳炎仅有 17% 的保护。

[0040] Saeland 等人在肺感染模型中,在用 6A 生物进行鼻内攻击之前,使用来自用 8 价肺炎球菌破伤风缀合物疫苗 (含有 6B 和 19F) 免疫的婴儿血清被动免疫小鼠 [28]。在 59 个血清样品中,53% 的样品保护小鼠抵抗具有 6B 的菌血症,37% 的样品保护抵抗 6A。在相同模型中用来自 4 剂 11 价肺炎球菌缀合物疫苗 (含有缀合到破伤风类毒素的 19F) 免疫的婴儿的血清被动免疫的小鼠被给予 19A 生物体的鼻内攻击 [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,尽管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] 在功效/有效性试验中 6B 和 19F 多糖缀合物免疫对 6A 和 19A 疾病的影响

[0042] 表 1 中指出了在 7vPnC 和 9vPnC(7vPnC 加血清型 1 和 5) 功效试验中由于 6B、6A、19F 和 19A 血清型导致的疾病病例数 [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 得出任何结论。然而,Finnish 中耳炎试验产生了大量肺炎球菌分离菌 [32]。在根据方案分析(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)。相反,对由于 19F 或者 19A 引起的中耳炎没有显示使用 7vPnC 的血清型特异的功效。

[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 引起的肺炎球菌疾病的病例

[0044]

|                                           | 6B        |           | 6A         |           | 19F       |           | 19A       |           |
|-------------------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                           | PnC       | 对照        | PnC        | 对照        | PnC       | 对照        | PnC       | 对照        |
| <b>Kaiser 功效试验<br/>-7vPnC(ITT)</b>        | <b>1</b>  | <b>7</b>  | <b>0</b>   | <b>1</b>  | <b>2*</b> | <b>13</b> | <b>0</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Navajo 功效试验<br/>-7vPnC(ITT)</b>        | <b>0</b>  | <b>5</b>  | <b>1</b>   | <b>0</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>0</b>  |
| <b>南非人功效试验<br/>-9vPnC<br/>HIV(-)(ITT)</b> | <b>1</b>  | <b>2</b>  | <b>1</b>   | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>1</b>  | <b>3</b>  | <b>1</b>  |
| <b>南非人功效试验<br/>-9vPnC<br/>HIV(+)(ITT)</b> | <b>1</b>  | <b>7</b>  | <b>3</b>   | <b>10</b> | <b>2</b>  | <b>3</b>  | <b>2</b>  | <b>3</b>  |
| <b>芬兰人中耳炎试<br/>验-7vPnC(PP)</b>            | <b>9*</b> | <b>56</b> | <b>19*</b> | <b>45</b> | <b>43</b> | <b>58</b> | <b>17</b> | <b>26</b> |

[0045] \*显示的统计学显著功效

[0046] 来自参考文献 30、10 和 33,和个人交流

[0047] Contr = 对照

[0048] ITT = 打算治疗分析



[0049] PP = 根据方案分析

[0050] 还可以从疾病控制中心 (Centers for Disease Control) 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 个月大的儿童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,尽管其水平比血清型 6B 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。

[0051] 表 2. CDC 进行的病例对照试验的初步结果 (在 2003 年 ICAAC 上给出)

[0052]

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

[0053] \*比较接种的 ( $\geq 1$  剂) 对比未接种的疫苗有效性,并对基础条件调节参照 40 和个人 / 机密交流

[0054] 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 6A 和 19A 引起的 IPD 中,血清型 6B 和 19F 赋予适度减少 ([3] 中的表 1)。在未免疫的成年人中由血清型 6A、9A、9L、9N、18A、18B、18F、19A、19B、19C、23A 和 23B (“都是疫苗相关的血清型”) 引起疾病发生率有一定的降低 ([3] 中的表 2)。这些数据确定在 2 岁以下儿童中使用 Prevnar 的群体免疫力对于血清型 6A 和 19A 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 的基础。

[0055] 加入 6A 和 19A 的结论

[0056] 在图 1 和表 2 中使用 7vPnC 疫苗的上市后监视数据和病例 - 对照研究表明,与上述关于动物中免疫应答和性能的其他信息相一致,可能存在对 6A 疾病的一定的交叉保护,但是比对 6B 疾病的交叉保护程度较低。此外,似乎对 19A 的保护是有限的。因此,含有血清型 6A 和 19A 的 13vPnC 疫苗提供了覆盖,其不依赖于血清型 6B 和 19F 对血清组交叉保护的限制。

[0057] 因此,本发明提供了包含 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 制备荚膜多糖,以及生理学上可接受的载体。一种此类载体蛋白是称作 CRM<sub>197</sub> 的白喉类毒素。免疫原性组合物可以还包含佐剂,如基于铝的佐剂,诸如磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

[0058] 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 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

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。

[0059] 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。

[0060] 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]。

[0061] 载体蛋白优选是无毒并且非反应原性并且可以以足够的量和纯度得到的蛋白质。载体蛋白应该服从标准的缀合步骤。在本发明的一个具体实施方案中,将 CRM<sub>197</sub> 用作载体蛋白。

[0062] CRM<sub>197</sub> (Wyeth, Sanford, NC) 是从在基于酪蛋白氨基酸和酵母提取物的培养基中生长的白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*) 菌株 C7 (β 197) 的培养物分离的白喉毒素的非毒性变体 (即,类毒素)。通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换层析纯化 CRM<sub>197</sub>。备选地,根据美国专利号 5,614,382 重组制备 CRM<sub>197</sub>,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。

[0063] 其他合适的载体蛋白包括灭活的细菌毒素,诸如破伤风类毒素、百日咳类毒素、霍乱类毒素 (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 A。也可以使用细菌外膜蛋白,诸如外膜复合体 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 A 组或者 B 组链球菌的 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。

[0064] 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 (就多糖-蛋白质缀合物的量而言富集)。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。

[0065] 纯化各糖缀合物后,将它们混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) 和右旋糖 (dextrose) 溶液。

[0066] 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”是用于增强本发明的免疫原性组合物的免疫原性的物质。因此,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:

[0067] (1) 铝盐 (alum),诸如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝,等等;

[0068] (2) 水包油乳液制剂 (有或者没有其他特定免疫刺激剂,诸如胞壁酰基肽 (下文定义) 或者细菌细胞壁组分),如,

[0069] (a) MF59 (PCT 公布号 WO 90/14837),含有 5% 鲨烯,0.5% 吐温 80,和 0.5% 司盘 85 (任选含有不同量的 MTP-PE (见下文,尽管不是所需的),使用微流化床装置诸如 110Y 型微流化床装置 (Microfluidics, Newton, MA) 配制成亚微米颗粒,

[0070] (b)SAF, 含有 10 % 鲨烯, 0.4 % 吐温 80, 5 % Pluronic 嵌段聚合物 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

[0071] (c)Ribi™ 佐剂系统 (RAS), (Corixa, Hamilton, MT), 含有 2 % 鲨烯, 0.2 % 吐温 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 (MPL™) 的一种或多种细菌细胞壁组分 (Corixa), 海藻糖二霉菌酸酯 (TDM), 和细胞壁骨架 (CWS), 优选 MPL+CWS (Detox™);

[0072] (3) 皂苷佐剂, 可以使用如 Quil A 或 STIMULON™ 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);

[0073] (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- 磷酸基 -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, 诸如含有 CpG 基序的寡核苷酸 (美国专利号 6, 207, 646);

[0074] (5) 细胞因子, 诸如白介素 (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,  $\gamma$  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;

[0075] (6) 细菌 ADP- 核糖基化毒素的脱毒突变体, 诸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 的谷氨酸被另一氨基酸, 优选被组氨酸替换 (根据公布的国际专利申请号 WO 00/18434 (也见 W002/098368 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

[0076] (7) 作为免疫刺激剂以增强组合物的有效性的其他物质。

[0077] 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- 羟基磷酸基氧基) - 乙胺 (MTP-PE) 等等。

[0078] 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易感的人, 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)。

[0079] 选择每个疫苗剂量中缀合物的量作为诱导免疫保护而无明显的不利作用的量。此类量可以取决于肺炎球菌血清型而变化。通常, 每剂将包含 0.1 到 100  $\mu$ g 多糖, 尤其 0.1 到 10  $\mu$ g, 更尤其 1 到 5  $\mu$ g。

[0080] 通过包括观察受试者中合适的免疫应答的标准研究确定具体疫苗的组分的最优量。最初接种后, 受试者可以接受足够间隔的一次或几次加强免疫。

[0081] 在本发明的一个具体实施方案中, 13vPnC 疫苗是各自缀合到 CRM<sub>197</sub> 的血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 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  $\mu$ g 6B 之外, 2  $\mu$ g 每种糖; 约 29  $\mu$ g CRM<sub>197</sub> 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,疫苗是可用于肌肉施用的均匀、白色混悬液。

[0082] 13vPnC 疫苗的剂量水平的选择类似于上市的 7vPnC 疫苗 (Prevnam)。为所有血清型选择 2  $\mu$ g 糖剂量水平,只是对于 6B 为每剂 4  $\mu$ g。7vPnC 疫苗对于血清型 4、9V、14、18C、19F 和 23F 在 2  $\mu$ g 糖剂量水平和对于 6B 在 4  $\mu$ g 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。

[0083] 免疫方案可以按照为 7vPnC 疫苗指定的方案。例如,针对肺炎链球菌由于 13vPnC 疫苗中包括的血清型引起的侵入性疾病,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。

[0084] 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*)、粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) (以前称作粘膜炎布兰汉球菌 (*Branhamella catarrhalis*)) 和 *Alloiococcus otitidis*。

[0085] 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)。

[0086] 适于包括的粘膜炎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)。

[0087] 适于包括的 *Alloiococcus otitidis* 抗原的实例包括国际专利申请 W003/048304 中鉴定的那些。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 用于缀合的肺炎球菌血清型 3 多糖的活化

[0091] 已有效地应用多糖中碳水化合物的部分氧化来产生醛基,然后使所述醛基与载体蛋白的赖氨酸残基偶联以产生免疫原性缀合物 (即,用于在脊椎动物中刺激或诱发特异免疫反应的组合物,诸如疫苗)。在许多应用中,通用氧化剂高碘酸钠提供了在与载体蛋白偶联之前的多糖中碳水化合物的有效氧化。然而,用高碘酸钠直接氧化 Pn3 多糖可产生几乎不存在残余醛的降解的多糖。备选的氧化方案在二价阳离子 (例如,  $Mg^{2+}$  或  $Ca^{2+}$ ) 的存在下混合高碘酸,并且提供了 Pn3 多糖的有效氧化。

[0092] 表 3:应用高碘酸 /  $MgCl_2$  的 Pn3 的氧化数据

[0093]

| 样品 ID   | 高碘酸量(meq)** | 氧化<br>(小时) | 温 度<br>(°C) | DO#*** | Kd #<br>(CL4B) |
|---------|-------------|------------|-------------|--------|----------------|
| PP3* 天然 | 0           | --         | 4           | 0.0    | 0.048          |
| PP3 氧化的 | 0.2         | 16         | 25          | 5.8    | 0.24           |
| PP3 氧化的 | 0.2         | 72         | 4           | 9.0    | 0.1            |
| PP3 氧化的 | 1           | 16         | 4           | 13.2   | 0.24           |
| PP3 氧化的 | 1           | 16         | 25          | 4.1    | 0.24           |
| PP3 氧化的 | 1           | 72         | 4           | 7.9    | 0.29           |

[0094] \* PP3 :天然的肺炎球菌多糖 3 型

[0095] \*\* Meq :摩尔当量

[0096] \*\*\* DO :氧化程度

[0097] 为了降低粘稠度和相关过滤问题,首先应用温和的酸使 Pn 3 多糖进行水解 / 解聚,所述酸诸如是乙酸、柠檬酸或碳酸。在水解 / 解聚后,应用控制量的氧化剂进行部分氧化以产生“活化的”Pn3 多糖。可以使用将末端羟基氧化为醛的任何选择性氧化剂,包括特异糖氧化酶(例如,高碘酸钠或钾,或高碘酸)。如上面所讨论的那样,优选的氧化剂是在二价阳离子存在下的高碘酸。然后任选地纯化活化的 Pn 3 多糖(例如通过相对缓冲盐水的渗滤)。

[0098] 活化的 Pn 3 多糖可与载体蛋白混合。可以选择载体蛋白以增加结合的 Pn3 多糖的免疫原性和 / 或以诱发针对载体蛋白的抗体,其是诊断、分析和 / 或治疗有益的。将抗原分子(例如,多糖)与载体共价连接赋予增强的免疫原性和 T- 细胞依赖性(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)。如本文讨论的那样,有用的载体蛋白包括灭活的细菌毒素,诸如破伤风类毒素、百日咳类毒素、霍乱类毒素(例如,如国际专利申请 W02004/083251 中所述)、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、和来自铜绿假单胞菌(Pseudomonasaeruginosa)的外毒素 A。也可以使用细菌外膜蛋白,诸如外膜复合体 c、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、肺炎球菌黏附素蛋白、来自 A 组或者 B 组链球菌的 C5a 肽酶、或者流感嗜血杆菌蛋白 D。其他蛋白质,诸如卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或者结核菌素的纯化的蛋白质衍生物也可以用作载体蛋白。优选的载体蛋白是突变的白喉毒素 CRM<sub>197</sub>。在与载体蛋白混合后,任选地冷冻(例如,滚动冷冻(shell frozen))和共冻干活化的 Pn 3 多糖 / 载体蛋白混合物。

[0099] 通过使活化的 Pn 3 多糖 / 载体蛋白混合物与还原剂如氰基硼氢化钠反应来进行缀合。然后通过硼氢化钠还原来封闭未反应的醛。纯化缀合物(例如,通过相对磷酸缓冲液渗滤,随后相对缓冲盐水渗滤),得到在缓冲盐水中的终批次浓度的糖缀合物。

[0100] 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。这些实施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

### [0101] 实施例 1

#### [0102] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 1

#### [0103] 制备主细胞库和工作细胞库

[0104] 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。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、F3 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 ( $< -70^{\circ}\text{C}$ ) 种子瓶,用合成的甘油作为冷藏剂。除了冷冻瓶外,为 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培养所有培养物。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诸如合成甘油的冷藏剂的新鲜培养基中。

#### [0105] 发酵和收获

[0106] 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  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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 pH6.6。通过连续流动离心接着深层过滤和  $0.45\ \mu\text{m}$  微量过滤澄清裂解物。

[0107] 在一个备选方法中,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% 脱氧胆酸钠在培养液中得到 0.12% 的浓度,以裂解细菌细胞和释放细胞相关的多糖。裂解后,在  $7^{\circ}\text{C}$  到  $13^{\circ}\text{C}$  的温度搅拌下,对发酵罐内容物保持 8 到 24 小时之间的时间间隔,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  $15^{\circ}\text{C}$  到  $25^{\circ}\text{C}$  的温度下保持 12 到 24 小时之间的时间间隔后,显著部分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,其保持在溶液中。然后通过连续流动离心,接着通过深层过滤和  $0.45\ \mu\text{m}$  微量过滤澄清具有沉淀物的溶液。

#### [0108] 纯化

[0109] 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。

[0110] 将来自肺炎链球菌血清型 1 的发酵罐培养物的澄清的培养液浓缩并用 100kDa MWC0 (千道尔顿分子量截止) 滤器渗滤。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,诸如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0111] 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通过含有沉淀物的深层滤器再循环氯化钠溶液进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液漂洗滤器。

[0112] 向多糖溶液中加入来自 NaI 贮存液的碘化钠 (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 溶液漂洗沉淀容器和滤器并将漂洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤多糖。

[0113] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤器上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0114] 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,用氯化钠溶液漂洗碳滤器。将漂洗液与多糖溶液合并,然后将其通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。

[0115] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤器上浓缩并用 1M 磷酸钠缓冲液调节以达到 0.025M 终浓度的磷酸钠。检查 pH 并调节到  $7.0 \pm 0.2$ 。

[0116] 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 ( $< 15 \mu$ 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穿过液回收多糖。多糖溶液通过位于柱子之前和之后的 0.2  $\mu$ m 线内滤器过滤。

[0117] 使用 30kDa MWC0 滤器浓缩多糖溶液。然后用注射用水 (WFI) 渗滤浓缩液。

[0118] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2  $\mu$ m 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。

[0119] 描述特征

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 连接折射率和多角度激光散射 (MALLS) 检测器的高效凝胶过滤层析与样品浓度结合使用以计算分子量。

[0123] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘多糖的相对分子大小分布。

[0124] 实施例 2

[0125] 制备血清型 1 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物

[0126] 活化和缀合

[0127] 将纯化的多糖的容器解冻并在反应容器中合并。向容器中加入 pH9.0 的 0.2M 碳酸钠用于在 50 $^{\circ}\text{C}$  部分脱乙酰化 (水解) 3 小时。将反应物冷却到 20 $^{\circ}\text{C}$  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。

[0128] 浓缩活化反应混合物并使用 30K MWC0 膜用 0.9% NaCl 渗滤 10 次。将存留物用 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。将活化的糖装入 100mL 玻璃冻干瓶中并在 -75 $^{\circ}\text{C}$  滚动冷冻并冻干。

[0129] “滚动冷冻”(Shell-freezing) 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浴中通过电机驱动的滚筒自动滚动烧瓶。在瓶的内部“壳”周围均匀冷冻产物的薄涂层,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。这些自动化的冷冻的单位一次提供了简单和有效的预先冷冻许多烧瓶的方法,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。

[0130] 将冻干物质的瓶子恢复到室温并以 2 : 1 的糖 / 蛋白质比重悬浮于 CRM<sub>197</sub> 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 离子强度和 7.5 的 pH,然后加入氰基硼氢化钠。反应物在 23 $^{\circ}\text{C}$  温育 18 小时,接着在 37 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  温育 3-6 小时淬灭未反应的醛。

[0131] 将反应混合物用盐水稀释 2 倍并通过 0.45–5  $\mu\text{m}$  预过滤器转移到存留物容器中。用 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH6) 渗滤反应混合物 30 次,用盐水渗滤 20 次。通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤器过滤存留物。

[0132] 将缀合物溶液用 0.9% 盐水稀释到 0.5mg/mL 的目标,然后在 Class 100 通风厨中无菌过滤到最终体相浓缩物 (FBC) 容器中。缀合物在 2–8°C 保存。

[0133] 描述特征

[0134] 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。

[0135] 使用特异抗血清通过狭线印迹测定法证实缀合物的身份。

[0136] 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体中糖对蛋白质的比率:

[0137]

$\mu\text{g/mL}$  糖

比率 = -----

$\mu\text{g/mL}$  蛋白质

[0138] 通过 Hestrin 方法 (Hestrin 等人, J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249) 测量 O-乙酰基含量。O-乙酰基浓度与总的糖浓度的比率得到微摩尔 O-乙酰基 /mg 糖。

[0139] 实施例 3

[0140] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 3

[0141] 制备主细胞库和工作细胞库

[0142] 肺炎链球菌血清型 3 从 Robert Austrian 博士 (University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania) 得到。细胞库系统的制备见实施例 1。

[0143] 发酵和收获

[0144] 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  $\pm$  2°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  $\mu\text{m}$  微量过滤澄清裂解物。

[0145] 纯化

[0146] 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。

[0147] 将来自肺炎链球菌血清型 3 的发酵罐培养物的澄清的培养液浓缩并用 100kDa MWCO 滤器渗滤。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,诸如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0148] 加入十六烷基三甲基溴化铵 (HB) 前,向浓缩并渗滤的多糖溶液中加入计算体积的 NaCl 贮存液以得到 0.25M NaCl 的终浓度。然后通过加入来自贮存液的 HB 得到 1% HB (w/



v) 的终浓度来沉淀多糖。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含有沉淀物的 深层滤器再循环氯化钠溶液进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液漂洗滤器。

[0149] 向多糖溶液中加入来自 NaI 贮存液的碘化钠 (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 溶液漂洗沉淀容器和滤器并将漂洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤多糖。

[0150] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤器上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0151] 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,用氯化钠溶液漂洗碳滤器。将漂洗液与多糖溶液合并,然后将其通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。

[0152] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 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  $7.0 \pm 0.2$ 。

[0153] 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  $\mu$ 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穿过液回收多糖。用缓冲液穿过柱子冲洗多糖并通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。

[0154] 使用 30kDa MWC0 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液。

[0155] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2  $\mu$ 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。

[0156] 描述特征

[0157] 通过指定给多糖分子的质子的信号的分配,  $^1\text{H-NMR}$  数据与化学结构相一致。

[0158] 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。

[0159] 连接折射率和多角度激光散射 (MALLS) 检测器的高效凝胶过滤层析与样品浓度结合使用以计算分子量。

[0160] 用大小排阻层析介质 (CL-4B) 描绘多糖的相对分子大小分布。

[0161] 实施例 4

[0162] 血清型 3 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物的制备

[0163] 活化和缀合

[0164] 将纯化的血清型 3 糖的容器解冻并在反应容器中合并。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  $85^{\circ}\text{C}$  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 0.1M。通过在  $23^{\circ}\text{C}$  温育 16-24 小时,在高碘酸钠存在下进行氧化。

[0165] 浓缩活化反应混合物,并使用 100K MWC0 膜,用 WFI 渗滤 10 次。通过 0.2- $\mu$ m 滤器过滤存留物。

[0166] 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 CRM<sub>197</sub> 载体蛋白与糖溶液混合至 2g 糖 /1g CRM<sub>197</sub> 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  $-75^{\circ}\text{C}$  滚动冷冻,并冻干。

[0167] 使共同冻干的糖 / 蛋白质物质瓶恢复室温,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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $23^{\circ}\text{C}$  温育 3-6 小时淬灭未反应的醛。通

过 0.45–5  $\mu\text{m}$  预过滤器转移反应混合物到存留物容器中。

[0168] 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– $\mu\text{m}$  过滤器过滤存留物。

[0169] 将缀合物溶液稀释到 0.5mg/mL 的糖靶标, 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。

[0170] 描述特征

[0171] 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。

[0172] 使用特异抗血清通过狭线印迹测定法证实缀合物的身份。

[0173] 分别通过蒽酮测定法和 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体中糖对蛋白质的比率:

[0174]

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

[0175] 实施例 5

[0176] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 5

[0177] 肺炎链球菌血清型 5 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。

[0178] 备选的发酵方法

[0179] 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  $\text{NaHCO}_3$  溶液的种子瓶。将瓶子在 36°C  $\pm$  2°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  $\text{NaHCO}_3$  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 10mM  $\text{NaHCO}_3$  浓度的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时停止发酵。向培养物中加入合适量的无菌 12% 脱氧胆酸钠得到培养液中 0.12% 的浓度, 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 的温度之间保持发酵罐内容物 8 到 24 小时之间的时间间隔, 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, 其保持在溶液中。然后通过连续流动离心, 接着通过深层过滤和 0.45  $\mu\text{m}$  微量过滤澄清具有沉淀物的溶液。

[0180] 实施例 6

[0181] 制备血清型 5 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物

[0182] 活化和缀合

[0183] 将血清型 5 糖的容器解冻并在反应容器中合并。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℃温育 16-22 小时进行氧化。

[0184] 浓缩活化反应混合物,并使用 100K MWC0 膜,用 WFI 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0185] 将血清型 5 活化的糖与 CRM<sub>197</sub> 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℃滚动冷冻,并共同冻干。

[0186] 让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℃温育 72 小时,接着再次加入氰基硼氢化物并在 30℃温育 20-28 小时。

[0187] 氰基硼氢化钠温育后,用盐水稀释反应混合物 2 倍并通过 0.45-5 μm 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 μm 滤器过滤存留物。

[0188] 将缀合物溶液稀释到 0.5mg/mL 的糖靶标,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。

[0189] 缀合物的表征见实施例 2。

[0190] 实施例 7

[0191] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 6A

[0192] 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到肺炎链球菌血清型 6A。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,在层析步骤前的 30kDa MWC0 浓缩步骤被省略。

[0193] 实施例 8

[0194] 制备血清型 6A 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物

[0195] 活化和缀合

[0196] 血清型 6A 多糖是高分子量聚合物,其必须在氧化前减小大小。解冻血清型 6A 糖的容器并在反应容器中合并。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 1MNaOH 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。

[0197] 浓缩活化反应混合物并使用 100K MWC0 膜用 WFI 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0198] 将血清型 6A 与蔗糖混合并填充到 100mL 玻璃冻干瓶 (50mL 目标填充) 并在 -75℃滚动冷冻并冻干。

[0199] 将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。氰基硼氢化物温育后,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。

[0200] 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。

[0201] 将缀合物溶液稀释到 0.5mg/mL 的糖目标,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。

[0202] 缀合物的表征见实施例 2。

[0203] 实施例 9

[0204] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 7F

[0205] 肺炎链球菌血清型 7F 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到。细胞库系统的制备和发酵和多糖的收获见实施例 3。关于备选的发酵和收获方法, 见实施例 1 中描述的备选方法。

[0206] 纯化

[0207] 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。

[0208] 将来自肺炎链球菌血清型 7F 的发酵罐培养物的澄清的培养液浓缩并用 100kDa MWC0 滤器渗滤。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, 诸如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0209] 血清型 7F 不与 HB 形成沉淀。而是, 通过加入来自贮存液的 HB 至 1% HB 的终浓度从浓缩并渗滤的溶液沉淀杂质。在深层滤器上捕获沉淀物并丢弃滤器。多糖包含在滤液中。

[0210] 向多糖溶液中加入来自 NaI 贮存液的碘化钠 (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 溶液漂洗沉淀容器和滤器并将漂洗液与部分纯化的多糖溶液合并。丢弃滤器。然后通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤多糖。

[0211] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤器上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0212] 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, 用氯化钠溶液漂洗碳滤器。将漂洗液与多糖溶液合并, 然后将其通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。

[0213] 将多糖溶液在 30kDa MWC0 超滤器上浓缩并用 1M 磷酸钠缓冲液调节以达到 0.025M 终浓度的磷酸钠。检查 pH 并调节到  $7.0 \pm 0.2$ 。

[0214] 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  $\mu$ 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穿过液回收多糖。用缓冲液穿过柱子冲洗多糖并通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤。

[0215] 使用 30kDa MWC0 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液。

[0216] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2  $\mu$ 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 2° -8°C 冷冻保藏。

[0217] 多糖的表征见实施例 3。

[0218] 实施例 10

[0219] 制备血清型 7F 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物

[0220] 活化和缀合

[0221] 通过在 23°C 温育 16-24 小时, 在高碘酸钠存在下进行氧化。

[0222] 浓缩活化反应混合物并使用 100K MWC0 膜, 用 10mM NaOAc (pH4.5) 渗滤 10 次。通过 0.2  $\mu$ m 滤器过滤存留物。

[0223] 将血清型 7F 填充到 100mL 玻璃冻干瓶 (50ml 目标填充), 在 -75°C 滚动冷冻并冻干。

[0224] 将冻干的血清型 7F 和 CRM<sub>197</sub> 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℃温育 16 小时淬灭未反应的醛。

[0225] 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 次并用琥珀酸缓冲的盐水渗滤 30 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0226] 将缀合物溶液用 0.9% 盐水稀释到 0.5mg/mL 的糖目标,然后在 Class100 通风厨中无菌过滤到 FBC 容器中。在 2-8℃保存缀合物。

[0227] 缀合物的表征见实施例 4。

[0228] 实施例 11

[0229] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 19A

[0230] 从 Gerald Schiffman 博士 (State University of New York, Brooklyn, New York) 得到肺炎链球菌血清型 19A。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。

[0231] 实施例 12

[0232] 血清型 19A 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物的制备

[0233] 活化和缀合

[0234] 将血清型 19A 糖的容器解冻并在反应容器中合并。加入乙酸钠至 10mM (pH5.0) 并在高碘酸钠存在下通过在 23℃温育 16-24 小时进行氧化。

[0235] 浓缩活化反应混合物并使用 100K MWC0 膜,用 10mM 乙酸盐 (pH5.0) 渗滤 10 次。通过 0.2 μm 滤器过滤存留物。

[0236] 用蔗糖混合活化的糖接着加入 CRM<sub>197</sub>。将血清型 19A 活化的糖和 CRM<sub>197</sub> 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℃滚动冷冻并冻干。

[0237] 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℃温育 15 小时。氰基硼氢化物温育后,通过加入硼氢化钠,在 23℃温育 3-20 小时淬灭未反应的醛。

[0238] 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。

[0239] 用 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水将缀合物溶液稀释到 0.5mg/mL 的靶标,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。

[0240] 缀合物的表征见实施例 4。

[0241] 实施例 13

[0242] 制备肺炎链球菌荚膜多糖血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F

[0243] 制备肺炎链球菌种子培养物

[0244] 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。肺炎链球菌血清型 14 从 ATCC 菌株 6314 得到。

[0245] 单独地将一瓶每种希望的血清型的肺炎链球菌用于开始发酵批次。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% 右旋糖 / 1% 硫酸镁溶液。将两个瓶子接种不同量的种子。瓶子在 36℃ ± 2℃培育

直到培养基变成黄色。培育后,从每个瓶子移出样品,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。

[0246] 将基于大豆的培养基转移到种子发酵罐并消毒。然后向发酵罐中加入一体积的50%右旋糖/1%硫酸镁溶液。监视并控制种子发酵罐的pH(pH6.7到7.4)和搅拌。温度保持在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。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pH控制下并定期取出样品并测试OD和pH。当在600nm达到所需的OD0.5时,用来自种子发酵罐的发酵液接种中间发酵罐。

[0247] 将基于大豆的培养基转移到中间发酵罐并消毒。然后向发酵罐加入一体积的50%右旋糖/1%硫酸镁溶液。监视并控制中间发酵罐的pH(pH6.7到7.4)和搅拌。温度保持在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。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pH控制下并定期取出样品并测试OD和pH。当在600nm达到所需的OD0.5时,用来自中间发酵罐的发酵液接种生产发酵罐。

[0248] 将基于大豆的培养基转移到生产发酵罐并消毒。然后向发酵罐加入一体积的50%右旋糖/1%硫酸镁溶液。监视并控制生产发酵罐的pH(pH6.7到7.4)和搅拌。温度保持在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。保持发酵罐处于pH控制下并定期取出样品并测试OD和pH,直到发酵完成。

[0249] 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分钟并将温度设置点降低至 $10^{\circ}\text{C}$ 。过夜温育培养物并且证实失活后,根据需要,用50%乙酸调节培养物的pH到6.4至6.8。升高发酵罐的温度至 $20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 并将内含物转移到澄清保持槽中。

[0250] 通过以每小时25到600升的流速离心处理澄清保持槽的内含物(包括细胞残渣)(血清型4除外,其中丢弃细胞残渣并将流速固定到25到250升/小时)。取出上清液的样品并测试OD。在离心期间期望的OD为 $\leq 0.15$ 。

[0251] 最初,通过深层滤器装置再循环上清液,直到达到 $0.05 \pm 0.03$ 的OD。然后,上清液穿过深层滤器装置并且通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜以过滤滤液保持槽。

[0252] 随后,产物通过闭管转移到纯化区用于处理。

[0253] 所有上面的操作(离心、过滤和转移)都在 $10^{\circ}\text{C}$ 到 $30^{\circ}\text{C}$ 之间进行。

[0254] 关于血清型4和6B的备选发酵和收获方法,见实施例1中描述的备选方法。

[0255] 纯化

[0256] 每种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。

[0257] 将来自所希望的肺炎链球菌血清型的发酵罐培养物的澄清的培养液浓缩并用100kDa MWCO滤器渗滤。使用磷酸钠缓冲液在 $\text{pH} < 9.0$ 下完成渗滤。渗滤从较高分子量的生物聚合物,诸如核酸、蛋白质和多糖除去了低分子量的培养基组分。

[0258] 通过加入来自贮存液的HB得到1% HB(w/v)的终浓度(血清型23F除外,其具有2.5%的终浓度),以从浓缩并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不沉淀;因此保留滤液)。再溶解多糖沉淀物并通过含有沉淀物的深层滤器再循环氯化钠溶液进行洗脱。然后用额外的氯化钠溶液漂洗滤器。

[0259] 向多糖溶液中加入来自NaI贮存液的碘化钠(NaI)至终浓度0.5%以沉淀HB(血清型6B除外,其具有0.25%的终浓度)。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。

[0260] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液渗滤。

[0261] 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,用氯化钠溶液漂洗碳滤器。将漂洗液与多糖溶液合并,然后将其通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤器过滤。

[0262] 将多糖溶液在 30kDa MWCO 超滤膜上浓缩并用氯化钠溶液漂洗滤器。检查 pH 并调节到  $7.0 \pm 0.3$ 。

[0263] 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  $7.0 \pm 0.3$  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穿过液回收多糖。多糖溶液通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤器过滤。

[0264] 使用 30kDa MWCO 滤器浓缩多糖溶液。然后用 WFI 渗滤浓缩液直到电导率  $< 15 \mu\text{S}$ 。

[0265] 将渗滤的多糖溶液通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤到主体容器 (bulk container) 中并在  $2-8^\circ\text{C}$  保存。

[0266] 实施例 14

[0267] 制备用于血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 的肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物

[0268] 活化方法

[0269] 不同的血清型糖按照不同的途径用于活化 (活化前水解或者不水解) 和缀合 (水性或者 DMSO 反应),如该实施例所述。

[0270] 将多糖从主体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。

[0271] 步骤 1

[0272] 对于血清型 6B、9V、14、19F 和 23F,调节 pH 至  $\text{pH}6.0 \pm 0.3$ 。

[0273] 对于血清型 4,加入盐酸 (0.01M 最终酸浓度) 并在  $45^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  下温育 25-35 分钟。通过冷却到  $21-25^\circ\text{C}$  并加入 1M 磷酸钠至目标  $\text{pH}6.7 \pm 0.2$  终止水解。进行过程中测试以证实合适水平的脱丙酮酸化 (depyruvylation)。

[0274] 对于血清型 18C,加入冰乙酸 (0.2M 最终酸浓度) 并在  $94^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  下温育溶液 205-215 分钟。然后降低温度至  $21-25^\circ\text{C}$  并加入 1-2M 磷酸钠至目标  $\text{pH}6.8 \pm 0.2$ 。

[0275] 步骤 2 :高碘酸盐反应

[0276] 使用总的糖含量 (除了血清型 4 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,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 的所有血清型,让氧化反应在  $21-25^\circ\text{C}$  下进行 16 到 20 小时,对于 19F 的氧化反应温度  $\leq 15^\circ\text{C}$ 。

[0277] 步骤 3 :超滤

[0278] 浓缩氧化的糖并在 100kDa MWCO 超滤器 (对于 18C 使用 5kDa 超滤器) 上用 WFI (对于血清型 19F 使用 0.01M 磷酸钠缓冲液  $\text{pH}6.0$ ) 渗滤。丢弃渗透液并通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤存留物。

[0279] 步骤 4 :冻干

[0280] 对于血清型 4、9V 和 14,将浓缩的糖与 CRM<sub>197</sub> 载体蛋白混合,装入玻璃瓶中,滚动冷冻并在  $\leq -65^\circ\text{C}$  保存。冻干冷冻浓缩的糖 -CRM<sub>197</sub> 并在  $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$  保存。

[0281] 对于血清型 6B、19F 和 23F,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% ±3% 的蔗糖浓度。血清型 18C 不需要添加蔗糖。然后将浓缩的糖装入玻璃瓶中,滚动冷冻并在 ≤ -65℃ 保存。冻干冷冻浓缩的糖并在 -25° ±5℃ 保存。

[0282] 缀合方法

[0283] 使用两种缀合方法:水性缀合用于血清型 4、9V、14 和 18C, DMSO 缀合用于血清型 6B、19F 和 23F。

[0284] 水性缀合

[0285] 步骤 1:溶解

[0286] 对于血清型 4、9V 和 14,解冻冻干的活化的糖 -CRM<sub>197</sub> 混合物并在室温平衡。然后以特定比例用 0.1M 磷酸钠缓冲液重构冻干的活化的糖 -CRM<sub>197</sub>:

[0287] • 对于血清型 4 和 9V,每 16-24g 糖 1L 缓冲液

[0288] • 对于血清型 14,每 6-10g 糖 1L 缓冲液

[0289] 对于血清型 9V,在 37° ±2℃ 温育反应混合物直到完全溶解,对于血清型 4 和 14,在 23° ±2℃ 温育反应混合物直到完全溶解。

[0290] 对于血清型 18C,在 CRM<sub>197</sub> 于 1M 磷酸氢二钠的溶液中以每 1LCRM<sub>197</sub> 溶液 0.11L 磷酸钠的典型比例重构冻干的糖。在 23° ±2℃ 温育反应混合物 (8-12g/L 糖浓度) 直到完全溶解。

[0291] 在该阶段检测 pH 作为过程中控制。

[0292] 步骤 2:缀合反应

[0293] 对于血清型 4 和 9V,通过加入氰基硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以达到每摩尔糖 1.0-1.4 摩尔氰基硼氢化钠,启动缀合反应。在 37° ±2℃ 温育反应混合物 44-52 小时。然后降低温度至 23° ±2℃ 并向反应器中加入 0.9% 氯化钠。加入硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以达到每摩尔糖 1.8-2.2 摩尔当量的硼氢化钠。在 23° ±2℃ 温育混合物 3-6 小时。用 0.9% 氯化钠稀释混合物并漂洗反应器。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。

[0294] 对于血清型 14 和 18C,通过加入氰基硼氢化物溶液 (100mg/mL) 以达到每摩尔糖 1.0-1.4 摩尔氰基硼氢化钠,启动缀合反应。在 23° ±2℃ 温育反应混合物 12-24 小时。然后升高温度至 37° ±2℃ 并将反应物温育 72-96 小时。然后降低温度至 23° ±2℃ 并向反应器中加入 0.9% 氯化钠。加入硼氢化钠溶液 (100mg/mL) 以达到每摩尔糖 1.8-2.2 摩尔当量的硼氢化钠。在 23° ±2℃ 温育混合物 3-6 小时。用 0.9% 氯化钠稀释混合物并漂洗反应器。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。

[0295] 步骤 3:超滤 100kDa

[0296] 浓缩稀释的缀合混合物并使用最小 15 体积 (血清型 4) 或者 40 体积 (血清型 9V、14 和 18C) 的 0.9% 氯化钠在 100kDa MWCO 超滤器上渗滤。

[0297] 丢弃渗透液。

[0298] 对于血清型 4,通过 0.45 μm 滤器过滤存留物。

[0299] 在该步骤进行过程中控制 (糖含量)。

[0300] 步骤 4:HA 柱纯化

[0301] 该步骤仅对于血清型 4 缀合物进行。

[0302] 首先用 0.5M 磷酸钠缓冲液中和 HA 柱 (pH7.0 ±0.3),然后用 0.9% 氯化钠平衡。将



过滤的存留物（血清型 4）以 1.0L/ 分钟的流速加到柱上。用 0.9%氯化钠以 $\leq 2.0\text{L/ 分钟}$ 流速洗涤柱子。然后用 0.5M 磷酸钠缓冲液以 $\leq 2.0\text{L/ 分钟}$ 流速洗脱产物。

[0303] 然后浓缩 HA 级分并用最小 20 体积的 0.9%氯化钠在 100kDa MWC0 膜上渗滤。丢弃渗滤液。

[0304] 步骤 5 :过滤除菌

[0305] 100kDa MWC0 渗滤后的存留物通过  $0.22\mu\text{m}$  滤器过滤。对过滤的产物进行过程中控制（糖含量,游离蛋白质,游离糖和氰化物）。对过滤的存留物进行过程中控制以确定是否需要额外的浓缩、渗滤和 / 或稀释以满足 FBC 靶标。用 FBC 样品重复这些和额外的测试。

[0306] 如需要,用 0.9%氯化钠稀释过滤的缀合物以便达到小于  $0.55\text{g/L}$  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。

[0307] 最后,过滤缀合物 ( $0.22\mu\text{m}$ ) 并以  $2.64\text{g/ 罐}$  的典型量装入 10L 不锈钢罐中。在该阶段,进行产率、糖含量、蛋白质含量、pH、糖 :蛋白质比例和赖氨酸含量作为过程中控制。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、糖鉴定、CRM<sub>197</sub> 鉴定）。

[0308] DMSO 缀合

[0309] 步骤 I :溶解

[0310] 将冻干活化的糖血清型 6B、19F、23F 和冻干的 CRM<sub>197</sub> 载体蛋白在室温平衡并在 DMSO 中重构。稀释浓度通常为 2-3g 糖 (2-2.5g 蛋白质) / 升 DMSO。

[0311] 步骤 II :缀合反应

[0312] 将活化的糖和 CRM<sub>197</sub> 载体蛋白在  $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  以  $0.6\text{g}-1.0\text{g 糖 / gCRM}_{197}$  (对于血清型 6B 和 19F) 或者 1.2 到  $1.8\text{g 糖 / gCRM}_{197}$  (对于血清型 23F) 的比例范围混合 60-75 分钟。

[0313] 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 ( $100\text{mg/ml}$ ) 启动缀合反应。向反应混合物加入 WIF 至 1% (v/v) 的目标并在  $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  温育混合物 40 小时以上。

[0314] 向反应物中加入硼氢化钠溶液  $100\text{mg/mL}$  (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  $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  温育混合物 3-6 小时。该步骤还原糖上存在的任何未反应的醛。然后在  $< 15^{\circ}\text{C}$  将反应混合物转移到含有 0.9%氯化钠的稀释罐中。

[0315] 步骤 III :100kDa 超滤

[0316] 将稀释的缀合物混合物通过  $1.2\mu\text{m}$  滤器过滤并浓缩,并在 100kDaMWC0 膜上用最少 15 体积的 0.9%氯化钠渗滤 ( $0.01\text{M}$  磷酸钠 /  $0.05\text{M}$  NaCl 缓冲液用于血清型 23F)。丢弃渗透液。通过  $0.45\mu\text{m}$  滤器过滤存留物。在该阶段取过程中糖含量样品。

[0317] 步骤 IV :DEAE 柱纯化

[0318] 该步骤仅对血清型 23F 进行。

[0319] 用  $0.01\text{M}$  磷酸钠 /  $0.05\text{M}$  氯化钠缓冲液平衡 DEAE 柱。将过滤的存留物（血清型 23F）装载到柱上并用  $0.01\text{M}$  磷酸钠 /  $0.05\text{M}$  氯化钠缓冲液洗涤。用  $0.01\text{M}$  磷酸钠 / 0.9% NaCl 缓冲液洗涤柱子。然后用  $0.01\text{M}$  磷酸钠 /  $0.5\text{M}$  氯化钠缓冲液洗脱产物。

[0320] 步骤 V :100kDa 超滤

[0321] 浓缩来自 6B 和 19F 的存留物并用至少 30 体积的 0.9%氯化钠渗滤。丢弃渗透液。

[0322] 浓缩来自血清型 23F 的洗脱物并用最少 20 体积的 0.9%氯化钠渗滤。丢弃渗透

液。

[0323] 步骤 VI :过滤除菌

[0324] 100kDa MWC0 渗滤后的存留物通过 0.22  $\mu$ m 滤器过滤。对过滤的产物进行过程中控制（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过程中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。

[0325] 如需要,用 0.9%氯化钠稀释过滤的缀合物以便达到小于 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。

[0326] 最后,过滤缀合物 (0.22  $\mu$ m) 并以 2.64g/ 罐的量装入 10L 不锈钢罐中。在该阶段,进行产率、糖含量、蛋白质含量、pH、糖 :蛋白质比例和赖氨酸含量作为过程中控制。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、残留 DMSO、糖鉴定、和 CRM<sub>197</sub> 鉴定）。

[0327] 实施例 15

[0328] 多价肺炎球菌缀合物疫苗的配制

[0329] 13 种缀合物的最终本体 (bulk) 浓缩物含有 0.85%氯化钠。3、6A、7F 和 19A 型本体浓缩物也含有 5mM pH5.8 的琥珀酸钠缓冲剂。基于批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 膜滤器单元,将制备物通过 0.22  $\mu$ m 膜无菌过滤到第二个容器中。用剩余的 20%的 0.85%氯化钠洗涤第一个容器并将容器穿过相同的滤器并收集到所述第二个容器中。在加入本体磷酸铝期间和之后,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。

[0330] 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。

[0331] 实施例 16

[0332] 13 价缀合物疫苗的免疫原性

[0333] 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 CRM<sub>197</sub> 的化学缀合和磷酸铝 (AlPO<sub>4</sub>) 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。

[0334] 研究 #HT01-0021

[0335] 研究 #HT01-0021 检查具有 AlPO<sub>4</sub> 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 周用计划的人临床剂量的用或不用 AlPO<sub>4</sub> (100  $\mu$ g/ 剂) 配制的每种多糖 (2  $\mu$ g 每种 PS, 只是 4  $\mu$ g 6B) 肌内免疫新西兰白兔 (New Zealand White rabbits)。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。

[0336] 表 4 显示了在两剂 13vPnC 疫苗后,在合并的血清样品中达到的几何平均效价 (GMT)。用 IgG GMT 的比率比较来自第 4 周到第 0 周的应答。这些数据表明在 13vPnC 制剂中包括 AlPO<sub>4</sub> 与没有佐剂的相同疫苗相比引起了更高水平的 IgG 抗体。尽管当在制剂中包

括  $\text{AlPO}_4$  时抗体应答更大,但是这些增加不是统计学上显著的。

[0337] 用这两种 13vPnC 制剂免疫后,还在兔中评估了功能抗体应答(表 5)。当比较有或者没有佐剂的疫苗制剂时,在 13vPnC+ $\text{AlPO}_4$  疫苗处理组中观察到更高的 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到 OPA 效价。对于多数血清型,在第 4 周测量的 OPA 效价比第 0 周的 OPA 效价(基线)高至少 4 倍。

[0338] 从来自两个处理组的合并血清评估了对每种 13vPnC 疫苗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 效价,然后比较。除了血清型 1 之外,在接受加佐剂的疫苗的动物中的抗体应答好于接受无佐剂的疫苗并且在免疫方案的第二周达到峰值(数据未显示)。

[0339] 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+ $\text{AlPO}_4$  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。

[0340] 表 4. 用两剂 13 价肺炎球菌糖缀合物免疫后的兔 IgG 免疫应答 (GMT)

[0341]

| 血清型 | 具有 $\text{ALPO}_4^a$ 的稀释剂 |       |               | 13vPnC <sup>a</sup> |                             |               | 13vPnC + $\text{ALPO}_4^a$ |                                        |               |
|-----|---------------------------|-------|---------------|---------------------|-----------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------------------|---------------|
|     | 第 0 周                     | 第 4 周 | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周               | 第 4 周<br>(95% CI)           | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周                      | 第 4 周<br>(95% CI)                      | 比率<br>Wk4:Wk0 |
| 1   | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 5,926<br>(2,758-12,733)     | 119           | 50                         | 11,091<br>(5,327-23,093)               | 222           |
| 3   | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 6,647<br>(2,773-15,932)     | 133           | 58                         | 16,443<br>(7,096-38,106)               | 284           |
| 4   | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 13,554<br>(8,031-22,875)    | 271           | 50                         | 29,183<br>(15,342-55,508)              | 584           |
| 5   | 134                       | <100  | 0.4           | 50                  | 5,859<br>(2,450-14,009)     | 117           | 50                         | 16,714<br>(6,959-40,140)               | 334           |
| 6A  | 141                       | <100  | 0.4           | 74                  | 22,415<br>(11,987-41,914)   | 303           | 83                         | 63,734<br>(21,141-192,146)             | 768           |
| 6B  | <100                      | <100  | 1.0           | 57                  | 8,108<br>(3,564-18,444)     | 142           | 54                         | 23,505<br>(11,286-48,955)              | 435           |
| 7F  | 3,859                     | 579   | 0.2           | 171                 | 43,591<br>(26,931-70,557)   | 444           | 143                        | 84,888<br>(46,445-155,151)             | 496           |
| 9V  | 289                       | 995   | 3.4           | 205                 | 15,780<br>(7,193-34,616)    | 125           | 208                        | 43,331 <sup>b</sup><br>(23,256-71,510) | 217           |
| 14  | 437                       | 177   | 0.4           | 61                  | 6,906<br>(3,416-13,962)     | 113           | 70                         | 16,076<br>(9,649-26,785)               | 322           |
| 18C | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 21,263<br>(15,770-28,725)   | 426           | 50                         | 35,040<br>(24,708-49,692)              | 701           |
| 19A | <100                      | <100  | 1.0           | 121                 | 113,599<br>(54,518-236,707) | 939           | 144                        | 280,976<br>(119,587-660,167)           | 1,951         |
| 19F | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 14,365<br>(7,346-28,090)    | 287           | 50                         | 24,912<br>(9,243-67,141)               | 498           |
| 23F | <100                      | <100  | 1.0           | 50                  | 5,323<br>(1,894-14,962)     | 106           | 50                         | 15,041<br>(4,711-48,018)               | 301           |

[0342] a:来自组内每只兔的等体积的血清组成的合并血清的 GMT

[0343] b:与没有  $\text{AlPO}_4$  的处理组统计学上不同 ( $p = 0.022$ )

[0344] 表 5. 用 2 剂 13 价肺炎球菌糖缀合物免疫后 NZW 兔合并血清的肺炎链球菌 OPA GMT

[0345]

| 血清型 | 13vPnC <sup>a</sup> |       |               | 13vPnC + ALPO <sub>4</sub> <sup>a</sup> |       |               |
|-----|---------------------|-------|---------------|-----------------------------------------|-------|---------------|
|     | 第 0 周               | 第 4 周 | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周                                   | 第 4 周 | 比率<br>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            |

[0346] a :由处理组 (n = 12) 内各只兔的等体积的血清组成的合并物

[0347] 研究 #HT01-0036

[0348] 研究 #HT01-0036 比较用缀合或不缀合 CRM<sub>197</sub> 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 周和第 2 周时,用一剂 2.2 μg 每种 PS (除 6B 是 4.4 μg 外) 肌内免疫新西兰白兔。动物接受三种疫苗制剂之一:(a) 13vPnC(PS 直接缀合到 CRM<sub>197</sub>), (b) 13vPnPS (游离 PS) 或者 (c) 13vPnPS+CRM<sub>197</sub> (游离 PS 与 CRM<sub>197</sub> 混合)。所有疫苗制剂都含有作为佐剂的 125 μg/剂量的 AlPO<sub>4</sub>。

[0349] 在 IgG ELISA 和用补体介导的 OPA 测量功能性抗体中评估对所有疫苗制剂的血清型特异性免疫应答。比较处理组之间的免疫应答。

[0350] 表 6 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+CRM<sub>197</sub> 疫苗引起了更高的血清 IgG 效价。除了 14 型肺炎链球菌之外,13vPnC 疫苗能够在 OPA 中诱导针对肺炎链球菌的代表性菌株的功能性抗体 (表 7)。用 13vPnPS 或 13vPnPS+CRM<sub>197</sub> 疫苗免疫两次后,两种疫苗都不能对于所测量的 13 种血清型中的 10 种在第 4 周时相对于第 0 周诱导 ≥ 8 倍的 OPA 效价 (表 7)。

[0351] 总之,这些结果表明 13 价肺炎球菌疫苗多糖的缀合比仅仅使用游离多糖或者与未缀合的 CRM<sub>197</sub> 混合的多糖所看到的产生更高的血清 IgG 效价和总的更大的功能性抗体活性。

[0352] 表 6. 用 2 剂 13 价肺炎球菌糖缀合物免疫后,通过 ELISA 测量的对 PnPS 的兔 IgG 应答 (GMT)

[0353]

| 血清型 | 13vPnPS (游离 PS) |                      |               | 13vPnPS + CRM <sub>197</sub><br>(与 CRM <sub>197</sub> 混合的 PS) |                      |               | 13vPnC |                              |               |
|-----|-----------------|----------------------|---------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|---------------|--------|------------------------------|---------------|
|     | 第 0 周           | 第 4 周<br>(95% CI)    | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周                                                         | 第 4 周<br>(95% CI)    | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周  | 第 4 周<br>(95% CI)            | 比率<br>Wk4:Wk0 |
| 1   | 378             | 2,290<br>(843-5,790) | 5.8           | 395                                                           | 1,959<br>(809-4,739) | 5.0           | 472    | 35,970<br>(29,130-44,417)    | 76.2          |
| 3   | 57              | 240<br>(64-908)      | 4.2           | 89                                                            | 163<br>(74-358)      | 1.8           | 50     | 10,414<br>(10,414-16,676)    | 208.3         |
| 4   | 50              | 379<br>(150-959)     | 7.6           | 50                                                            | 607<br>(313-1,178)   | 12.1          | 50     | 12,890<br>(9,117-18,224)     | 257.8         |
| 5   | 343             | 226<br>(113-450)     | 4.5           | 50                                                            | 321<br>(147-701)     | 6.4           | 50     | 35,264<br>(24,467-50,824)    | 705.3         |
| 6A  | 154             | 466<br>(316-688)     | 3.0           | 98                                                            | 210<br>(95-464)      | 2.1           | 163    | 234,245<br>(167,152-328,283) | 1,437.1       |
| 6B  | 63              | 727<br>(384-1,375)   | 11.6          | 62                                                            | 745<br>(384-1,440)   | 12.0          | 131    | 33,599<br>(22,934-49,222)    | 256.5         |
| 7F  | 50              | 61<br>(39-95)        | 1.2           | 50                                                            | 72<br>(47-111)       | 1.4           | 50     | 35,702<br>(24,350-52,347)    | 714.0         |
| 9V  | 50              | 104<br>(48-195)      | 2.1           | 55                                                            | 169<br>(74-390)      | 3.0           | 50     | 50,033<br>(34,765-72,007)    | 1,000.7       |
| 14  | 66              | 298<br>(117-757)     | 4.5           | 50                                                            | 195<br>(71-535)      | 3.9           | 50     | 20,121<br>(12,087-32,138)    | 402.4         |
| 18C | 89              | 1,555<br>(655-3,688) | 17.5          | 66                                                            | 761<br>(300-1,935)   | 11.5          | 101    | 71,451<br>(32,745-124,641)   | 707.4         |
| 19A | 50              | 89<br>(44-179)       | 1.8           | 50                                                            | 80<br>(39-163)       | 1.6           | 50     | 23,485<br>(12,857-42,723)    | 469.7         |
| 19F | 61              | 1,362<br>(559-3,317) | 22.3          | 61                                                            | 991<br>(370-2,654)   | 16.3          | 67     | 19,358<br>(12,553-33,173)    | 288.9         |
| 23F | 73              | 1,085<br>(487-2,420) | 14.9          | 121                                                           | 638<br>(311-1,311)   | 5.3           | 68     | 45,972<br>(25,134-84,089)    | 676.1         |

[0354] 表 7. 用 2 剂 13 价肺炎球菌疫苗免疫后,兔血清合并物的肺炎链球菌 OPA 效价  
[0355]

| 血清型 | OPA 效价             |       |               |                 |       |               |                                                                     |               |
|-----|--------------------|-------|---------------|-----------------|-------|---------------|---------------------------------------------------------------------|---------------|
|     | 无处理                |       |               | 13vPnPS (游离 PS) |       |               | 13vPnPS + CRM <sub>197</sub><br>(与 CRM <sub>197</sub> 混合的<br>游离 PS) |               |
|     | 第 0 周 <sup>a</sup> | 第 4 周 | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 0 周           | 第 4 周 | 比率<br>Wk4:Wk0 | 第 4 周                                                               | 比率<br>Wk4:Wk0 |
| 1   | 4                  | 16    | 4             | 16              | 4     | 4             | 8                                                                   | 32            |
| 3   | 4                  | 4     | 1             | 4               | 1     | 1             | 4                                                                   | 8             |
| 4   | 4                  | 4     | 1             | 4               | 1     | 1             | 4                                                                   | 64            |
| 5   | 4                  | 32    | 8             | 16              | 4     | 4             | 16                                                                  | 64            |
| 6A  | 8                  | 64    | 8             | 32              | 4     | 4             | 32                                                                  | 664           |
| 6B  | 8                  | 64    | 8             | 32              | 4     | 4             | 32                                                                  | 32            |
| 7F  | 16                 | 32    | 2             | 16              | 1     | 1             | 16                                                                  | 16            |
| 9V  | 16                 | 16    | 1             | 32              | 2     | 2             | 32                                                                  | 8             |
| 14  | 16                 | 16    | 1             | 16              | 1     | 1             | 16                                                                  | 2             |
| 18C | 4                  | 16    | 4             | 16              | 4     | 4             | 8                                                                   | 64            |
| 19A | 8                  | 8     | 1             | 8               | 1     | 1             | 16                                                                  | 64            |
| 19F | 4                  | 4     | 1             | 4               | 1     | 1             | 8                                                                   | 64            |
| 23F | 16                 | 32    | 2             | 16              | 1     | 1             | 32                                                                  | 32            |

[0356] a:用作所有组的第 0 周值

[0357] 实施例 17

[0358] 用于血清型 3 肺炎球菌糖 -CRM<sub>197</sub> 缀合物的备选方法

[0359] 解冻纯化的多糖的容器并在反应容器中合并,并加热至 85°C 的温度。当在温度上升期间混合物的温度达到约 35°C 时,加入 2M 乙酸以达到 0.1M 乙酸浓度。当混合物温度达到 85°C 时,在这一温度维持 1 小时以完成水解/解聚。将经水解/解聚的多糖冷却至 23°C 并加入 1M MgCl<sub>2</sub> 以达到 0.1MMgCl<sub>2</sub> 的浓度。应用 1-1.25 摩尔当量的高碘酸(作为在 WFI 中 50mg/mL 的溶液添加)进行氧化。将混合物在 23°C 温育 16-24 小时。

[0360] 通过应用 100K MWCO 聚醚砜(PES)膜针对 10 倍体积的 WFI 渗滤纯化反应混合物。应用 0.2M 磷酸盐缓冲液(pH7.0)将经纯化的活化的多糖调节至 6.0 的 pH,以 2:1 的多糖/蛋白质比率与 CRM<sub>197</sub> 混合,在 -75°C 滚动冷冻,并共同冻干 71 小时。共同冻干后,将多糖/

CRM<sub>197</sub> 混合物储存于 -25℃ ± 5℃, 直到缀合。为了缀合, 将共同冻干的多糖 / CRM<sub>197</sub> 混合物以 20mg/mL 多糖的浓度溶解于 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 并用 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH 4.6) 和 1M NaOH 的组合将 pH 调节至 6.2, 随后作为在 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中的 100mg/mL 溶液添加 0.5 摩尔当量的氰基硼氢化钠。搅拌反应混合物并在 37℃ 温育 44 小时。在氰基硼氢化钠温育后, 用冷 (2-8 °C) 0.9% 盐水稀释反应混合物 1 倍, 随后作为在 WFI 中的 100mg/mL 溶液加入 1 摩尔当量的硼氢化钠, 以在 23℃ 封闭未反应的醛 3-6 小时。

[0361] 将反应混合物通过 0.45-5 μm 预过滤器转移到存留物容器中, 并然后通过应用 100K MWC0 再生纤维素膜渗滤而纯化。然后针对 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 9.0) 渗滤 30 次, 并针对 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 渗滤 20 次。最后针对 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水 (pH 6.0) 渗滤 20 次。通过 0.2 μm 过滤器过滤经渗滤的缀合物并测定糖含量。基于糖分析, 用 5mM 琥珀酸盐 / 0.9% 盐水 (pH 6.0) 将缀合物溶液稀释至 0.5mg/mL 的目标, 并再次无菌过滤 (0.2 μm) 以得到终批浓度的缀合物。将缀合物储存在 2-8℃。

[0362] 对于缀合物的表征, 见实施例 4。

[0363] 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, 可以做出多种修改和等同方案而不背离本发明的精神和范围。

[0364] 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。

[0365] 参考文献:

[0366] 1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. 哪些肺炎球菌血清型引起大多数的侵入性疾病: 缀合物疫苗制剂和使用的建议, 第 I 部分 (Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I.), Clin Infect Dis 2000 ;30 :100-21.

[0367] 2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR, 特定的肺炎球菌血清型对不同疾病现象的贡献: 缀合物疫苗制剂和使用的建议, 第 I 部分 (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.

[0368] 3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J 等, 导入蛋白质-多糖缀合物疫苗后侵入性肺炎球菌疾病的下降 (Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine), New Engl J Med 2003 ;348(18) :1737-46.

[0369] 4. Black S, Shinefield H, Hansen J 等, 批准后评估七价肺炎球菌缀合物疫苗的有效性 (Postlicensure evaluation of the effectiveness of sevenvalent pneumococcal conjugate vaccine), Pediatr Infect Dis J 2001 ;20 :1105-7.

[0370] 5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G 等, 1995-1998 年侵入性肺炎链球菌感染在美国的流行病学: 缀合物疫苗时期预防的机会 (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.

[0371] 6. Butler J, Breiman R, Lipman H 等, 1978-1994 年美国学前儿童中肺炎链球菌感染的血清型分布 (Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994), *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.

[0372] 7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J 等, 在美国多药抗性肺炎链球菌的流行增加 (Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States), *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.

[0373] 8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM 等, 在亚特兰大多药抗性肺炎链球菌的流行增加 (The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta), *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.

[0374] 9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR, 肺炎链球菌分离株的肺炎球菌缀合物疫苗血清型和此类分离株在患中耳炎的儿童中的抗微生物易感性 (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.

[0375] 10. Black S, Shinefield H, Fireman B 等, 七价肺炎球菌缀合物疫苗在儿童中的有效性、安全性和免疫原性 (Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children), *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.

[0376] 11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC., 阿拉斯加 1991-1998 年肺炎链球菌的侵入性分离株的血清型分布和抗微生物抗性模式 (Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998), *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.

[0377] 12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H 等, 预防儿童肺炎的潜在干扰: 来自儿童的消毒部位肺炎球菌分离株的血清型和血清组分布的地理和时间差异: 疫苗策略的建议 (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.

[0378] 13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM., 在远北昆士兰侵入性肺炎球菌疾病在儿童中的流行病学 (The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland), *J. Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.

[0379] 14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC 等, 在拉丁美洲儿童中侵入性肺炎链球菌的感染: 来自泛美健康组织监视研究 (Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study), *Clin Infect Dis* 1998; 26:1355-61.

[0380] 15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. 侵入性肺炎球菌疾病比率和血清型频率

在幼儿中的地理差异 (Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children), Lancet 2001 ;357 :950-52.

[0381] 16. Buckingham SC, King MD, Miller ML., 1996 至 2001 年在儿童中复杂的肺炎旁胸腔积液的影响范围和病因学 (Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001), Pediatr Infect Dis J 2003 ; 22 :499-504.

[0382] 17. Byington C, Spencer L, Johnson T 等, 持续的高比例小儿科肺炎旁胸腔脓液的流行病学研究 : 危险因素和微生物的关联 (An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations), Clin Infect Dis 2002 ;34 :434-40.

[0383] 18. Tan T, Mason E, Wald E 等, 由肺炎链球菌引起的复杂肺炎的临床特征 (Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae), Pediatrics 2002 ;110 :1-6.

[0384] 19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ 等, 来自边远的肯塔基州的急性中耳炎的肺炎球菌血清型 (Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky), Pediatr Infect Dis J 2002 ;21 :859-65.

[0385] 20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R 等, 在儿童中引起急性中耳炎的肺炎球菌血清型的多国研究 (Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children), Pediatr Infect Dis J 2002 ;21 :1008-16.

[0386] 21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ 等, 考虑制剂第二代肺炎球菌荚膜多糖疫苗的重点是组内的交叉反应型 (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.

[0387] 22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M., 鉴定对肺炎链球菌具有低调理吞噬活性的交叉反应性抗体 (Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for Streptococcus pneumoniae), J Infect Dis 1997 ;176 : 698-703.

[0388] 23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH., 在婴儿中由肺炎球菌缀合物疫苗诱导的对交叉反应血清型的免疫 (Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants), J Infect Dis 1999 ;180 : 1569-76.

[0389] 24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H., 在婴儿中由肺炎球菌缀合物疫苗引起的对肺炎链球菌 6B 型和 6A 型多糖的抗体的交叉反应性 (Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of Streptococcus pneumoniae, evoked by pneumococcal conjugate vaccines), J Infect Dis 2001 ;184 :789-93.

[0390] 25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty H., 在 FinOM 疫苗试验中对交叉反应的肺炎球菌血清型 6A/6B 和 19A/19F 的免疫应答 (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, 2003 年 11 月 19-23 日.

[0391] 26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB., 单个施用和组合施用肺炎球菌多糖型 19F 和 19A 在成人志愿者中的抗体应答 (Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination), *Infect Immun* 1982 ;36 :1261-2.

[0392] 27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebeler CL, Le CT., 在南美栗鼠中耳炎模型中肺炎链球菌多糖 - 蛋白质缀合物疫苗抗同源和异源血清型的免疫原性和有效性 (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.

[0393] 28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfssdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I., 来自用肺炎球菌缀合物疫苗 PncT 接种的婴儿的血清样本保护小鼠免于由肺炎链球菌血清型 6A 和 6B 引起的侵入性感染 (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.

[0394] 29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I., 在鼠肺炎球菌肺炎模型中肺炎球菌血清型 19F 缀合物疫苗诱导对血清型 19A 的交叉保护性免疫 (Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model), *Infect Immun* 2003 ;71 :2956-9.

[0395] 30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N., 在 HIV 感染和未感染的儿童中 9 价肺炎球菌缀合物疫苗的试验 (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.

[0396] 31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R 等, 在美国印第安人儿童中七价缀合物肺炎球菌疫苗的功效和安全性: 组随机试验 (Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial), *Lancet* 2003 ;362 :355-61.

[0397] 32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A 等, 肺炎球菌缀合物疫苗抗急性中耳炎的功效 (Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media), *N Engl J Med* 2001 ;344 :403-9.

[0398] 33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A 等, 在儿童中七价肺炎球菌缀合物疫苗的有效性 (Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children), *Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.*

[0399] 34. 美国专利号 4,673,574.

[0400] 35. 美国专利号 4,902,506.

在美国年龄<2岁的儿童从基线(1998/1999年)到2001年  
按照血清型的IPD比率的变化(ABCs 监视)

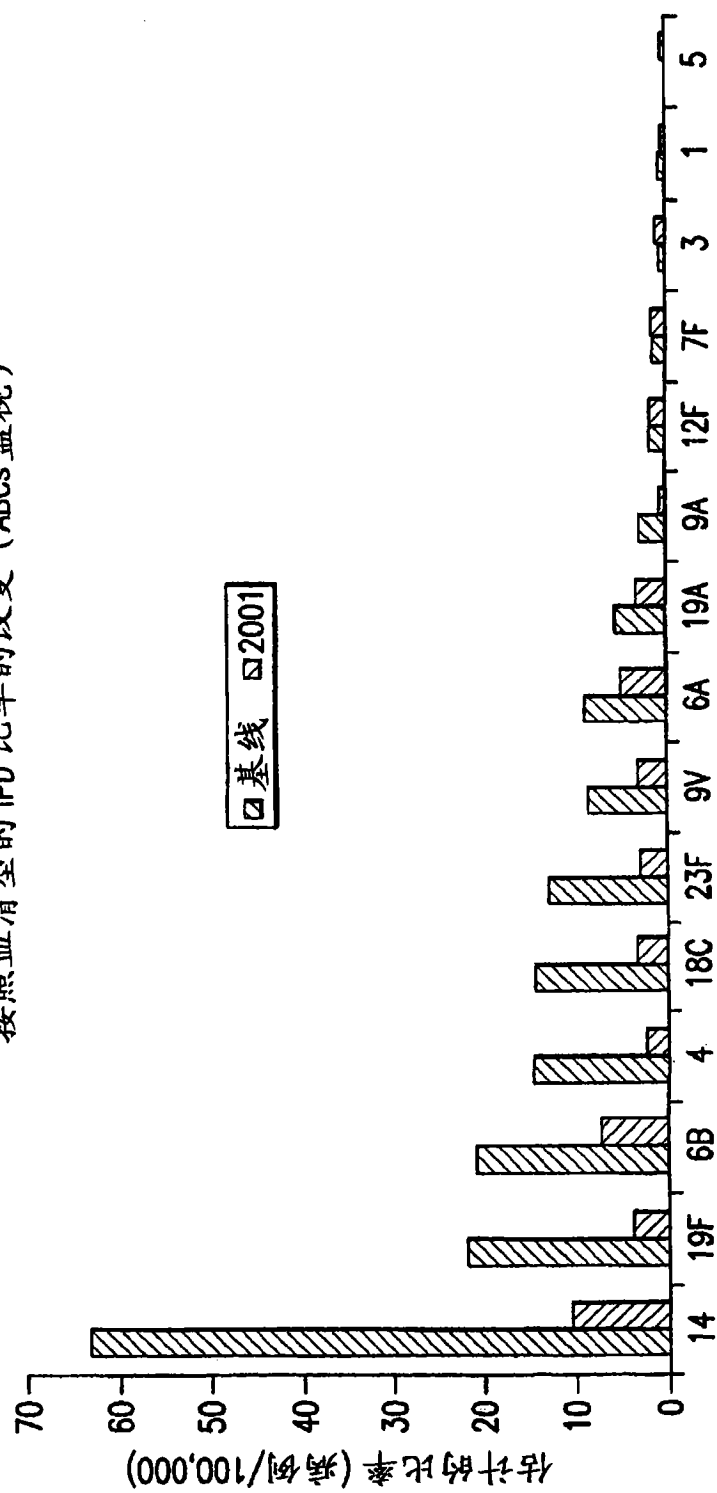


图 1

在&lt;5岁的儿童中具有PCN抗性的肺炎球菌分离株的分布(1998)

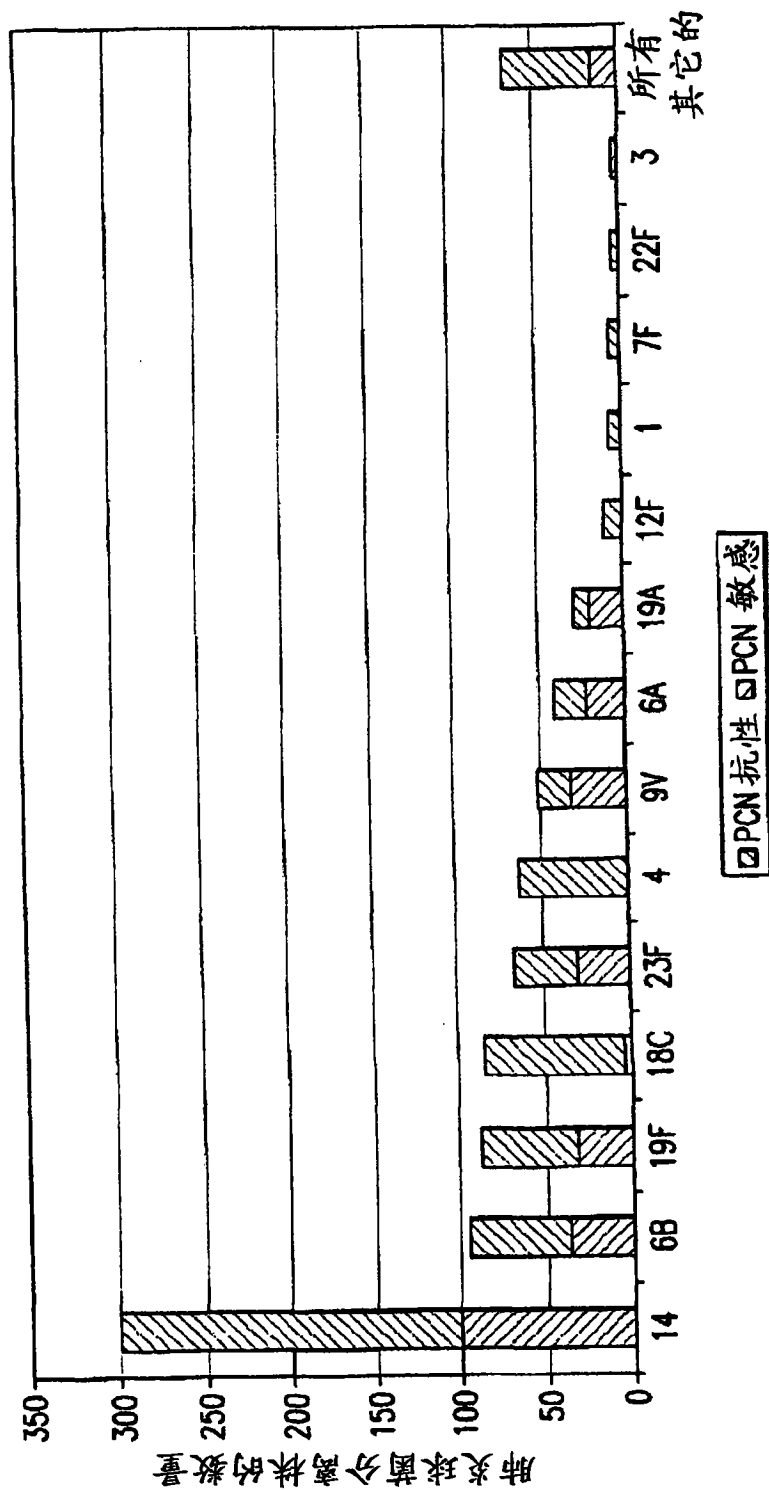


图 2

来自 D118-P16 Prev(e)nar 试验的第三次剂量后 OPA 的 RCDC  
接受生产规模批次的 Prev(e)nar® 的同龄组 (n=98)

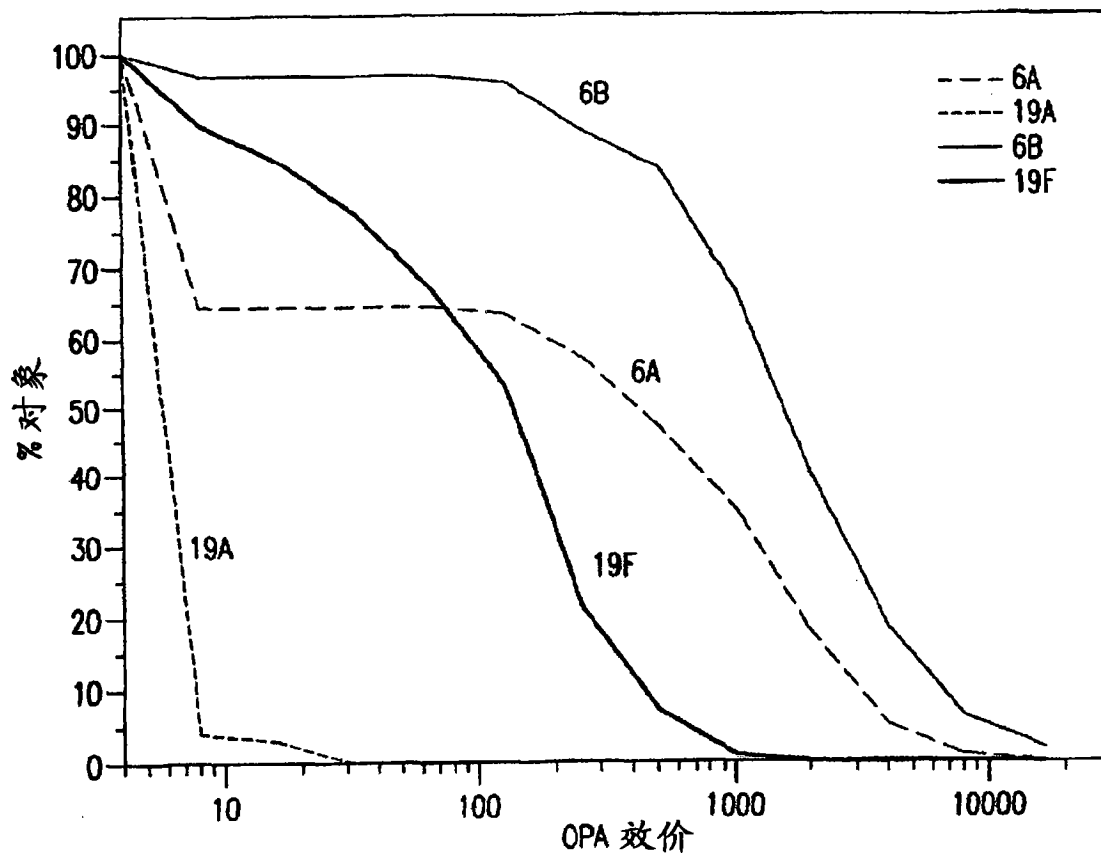


图 3