



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113164581 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980076246.8

N·D·曼特纳 M·达特拉

(22) 申请日 2019.09.23

V·桑加雷迪

(30) 优先权数据

201841031653 2018.09.23 IN

201841031654 2018.09.23 IN

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 黄琳娟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.19

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/058036 2019.09.23

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/058963 EN 2020.03.26

(71) 申请人 生物E有限公司

地址 印度海得拉巴

(72) 发明人 R·布尔基 V·B·坎迪马拉

R·斯利拉曼 R·V·马图尔

权利要求书3页 说明书19页 附图9页

(54) 发明名称

纯化的肺炎链球菌荚膜多糖

(57) 摘要

本发明涉及肺炎链球菌荚膜多糖。更具体地,本发明涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖及其制备方法。

1. 一种纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B的荚膜多糖,其平均分子量(Mw)在50和1000kDa之间。

2. 根据权利要求1所述的纯化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B的荚膜多糖,其平均分子量(Mw)在50kDa和750kDa之间;在50kDa和500kDa之间;在100kDa和1000kDa之间;在100kDa和750kDa之间;在100kDa和500kDa之间。

3. 根据权利要求1所述的纯化的肺炎链球菌血清型15A或15C的荚膜多糖,其甘油含量在5-18%范围内。

4. 根据权利要求3所述的纯化的肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,其甘油含量为5%至10%。

5. 根据权利要求3所述的纯化的肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,其甘油含量为5%至10%。

6. 根据权利要求1所述的纯化的肺炎链球菌血清型35B的荚膜多糖,其醋酸盐含量在2-10%范围内,优选地在2-8%范围内。

7. 一种用于制备纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型的荚膜多糖的方法,包括以下步骤:

a. 在合适的培养基中培养肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B;

b. 将肺炎链球菌培养液灭活;

c. 将肺炎链球菌培养液离心;

d. 从培养液中纯化肺炎链球菌的荚膜多糖;和

e. 将纯化的肺炎链球菌的荚膜多糖进行高压均质以得到平均分子量(Mw)在50和1000kDa之间的尺寸化的荚膜多糖。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中在500至2000bar的压力下进行均质。

9. 一种纯化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B的荚膜多糖,其平均分子量(Mw)在50和1000kDa之间,其通过根据权利要求7所述的方法得到。

10. 一种肺炎球菌结合疫苗,其包括至少一种源自肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B的纯化的和尺寸化的荚膜多糖,所述荚膜多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,所述荚膜多糖与载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS)。

11. 根据权利要求10所述的结合疫苗,其中所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)或其组合。

12. 根据权利要求10所述的肺炎球菌结合疫苗,其包括源自血清型2的多糖,所述多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,所述多糖与PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,所述比例为0.7至1.2。

13. 根据权利要求10所述的肺炎球菌结合疫苗,其包括源自血清型15A的多糖,所述多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,所述多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,所述比例为0.7至1.2。

14. 根据权利要求10所述的肺炎球菌结合疫苗,其包括源自血清型15C的多糖,所述多

糖的平均分子量在50和1000kDa之间,所述多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,所述比例为0.7至1.2。

15. 根据权利要求10所述的肺炎球菌结合疫苗,其包括源自血清型35B的多糖,所述多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,所述多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,所述比例为0.7至1.2。

16. 根据权利要求10至15所述的肺炎球菌结合疫苗,其中所述结合物的平均分子量在500kDa至5000kDa之间;在1000kDa至10000kDa之间;在1500kDa至15000kDa之间;在2000kDa至20000kDa之间;在2500kDa至25000kDa之间;或在3000kDa至30000kDa之间。

17. 一种免疫原性组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型2、15A、15C或35B中的至少一种糖结合物,其中所述糖结合物中的多糖是根据权利要求1所述的纯化的荚膜多糖。

18. 根据权利要求17所述的免疫原性组合物,所述免疫原性组合物进一步包含源自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、14、15B、16F、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、31、33F的糖结合物,其与选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)的载体蛋白或载体蛋白组合结合。

19. 根据权利要求17或18所述的组合物,其中所述组合物为多价免疫原性组合物,为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、25或更多价的肺炎球菌结合物组合物。

20. 根据权利要求19所述的免疫原性组合物,其中所述组合物为24价肺炎球菌结合物组合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少3种肺炎球菌血清型的多糖以及包括1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、14、18C、19A、19F、20A、20B、22F、23F、24F、33F的附加血清型的多糖,其中所述血清型均与载体蛋白结合,其中所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)。

21. 根据权利要求19所述的免疫原性组合物,其中所述组合物为24价肺炎球菌结合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少2种肺炎球菌血清型的多糖以及包括1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F的附加血清型的多糖,其中所述血清型均与选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合。

22. 根据权利要求19所述的免疫原性组合物,其中所述组合物为多价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少2种肺炎球菌血清型的多糖以及选自1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、20A、20B、22F、23A、23B、23F、24F、33F中的一种或多种附加血清型的多糖,其中所述血清型均与选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合。

23. 根据权利要求19所述的免疫原性组合物,其中所述组合物为17价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自与载体蛋白结合的肺炎链球菌血清型的多糖,其中所述血清型包括2、15A、15C和35B以及附加血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F,其中所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)。

24. 根据权利要求1所述的纯化的荚膜多糖,其中所述多糖用于制备疫苗或免疫原性组合物。

25. 根据权利要求10至16中任一项所述的疫苗或根据权利要求17至23中任一项所述的

免疫原性组合物,其中所述疫苗或免疫原性组合物用于预防肺炎链球菌感染。

## 纯化的肺炎链球菌荚膜多糖

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年9月23日提交的申请号为201841031653和201841031654的印度专利申请的优先权的权益,其通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及纯化的肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的荚膜多糖。更具体地,本发明涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖及其制备方法。

### 背景技术

[0004] 肺炎链球菌是一种革兰氏阳性菌,是动物和人类侵袭性感染的主要病原体,会导致例如败血症、脑膜炎、中耳炎和大叶性肺炎。作为感染过程的一部分,肺炎球菌(*pneumococci*)通过凝集素样方式与真核生物碳水化合物结合,从而很容易地与人类上下呼吸道的非炎症上皮细胞结合。

[0005] 肺炎双球菌(*pneumococcus*)被化学连接的多糖包裹,这种多糖具有血清型特异性。已知的肺炎球菌血清型有90多种,而荚膜是肺炎球菌的主要毒力决定因素,因为荚膜不仅保护细菌内表面免受补体,而且其本身免疫原性很低。抗多糖抗体水平被认为是预防侵袭性肺炎球菌疾病的预测指标。作为疫苗,肺炎球菌多糖外壳能够使免疫系统发达或未受损的个体对肺炎链球菌产生合理程度的免疫力,但是与合适载体蛋白结合的荚膜多糖则可以使最有可能感染肺炎球菌的婴儿和老年人也产生免疫反应。

[0006] 肺炎球菌疫苗包括肺炎球菌多糖疫苗和肺炎球菌结合疫苗。人们普遍认为,商业化肺炎球菌多糖疫苗的保护效果或多或少与疫苗接种时诱导的抗体浓度有关。目前的疫苗包括多价肺炎球菌多糖疫苗(包括来自两种或多种血清型的肺炎球菌多糖)和肺炎球菌结合疫苗。

[0007] 23价肺炎球菌疫苗(**Pneumovax<sup>®</sup>23**)是多价肺炎球菌多糖疫苗,包含23种肺炎球菌血清型的未结合荚膜多糖,包括血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19F、19A、20、22F、23F和33F。**Pneumovax<sup>®</sup>23**,其已经获批并且证明在预防成年人肺炎球菌疾病方面是有价值的,特别是对于老年人和高危人群。然而,婴儿和幼龄儿童对这些未结合的肺炎球菌多糖疫苗反应欠佳。

[0008] 7价肺炎球菌联合疫苗(**Prevnar<sup>®</sup>-7**)是肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗,包含七种最常见的分离多糖血清型(例如,与CRM<sub>197</sub>结合的4、6B、9V、14、18C、19F和23F)。自2000年**Prevnar<sup>®</sup>-7**在美国开始使用以来,儿童患侵袭性肺炎球菌病(IPD)的发病率显著降低。由于在世界上的某些地区,**Prevnar<sup>®</sup>-7**的血清型覆盖率的局限性,所以开发了13价结合疫苗**Prevnar-13<sup>®</sup>**并得到批准,其包含与CRM<sub>197</sub>结合的13种血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F。

[0009] Synflorix<sup>®</sup>是肺炎球菌结合疫苗,其包含10种与蛋白D(PD)结合的多糖血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、23F、结合破伤风类毒素(TT)的血清型18C和结合白喉类毒素(DT)的血清型19F。每种血清型多糖在控制pH条件下利用1-氰基-4-二甲氨基-吡啶四氟硼酸盐(CDAP)进行偶联。

[0010] 美国专利号9,492,559B2公开了一种免疫原性组合物,其包括至少一种糖结合物,该糖结合物选自源自肺炎链球菌血清型15B的糖结合物、源自肺炎链球菌血清型22F的糖结合物、源自肺炎链球菌血清型33F的糖结合物、源自肺炎链球菌血清型12F的糖结合物、源自肺炎链球菌血清型10A的糖结合物、源自肺炎链球菌血清型11A的糖结合物和源自肺炎链球菌血清型8的糖结合物组成的组。WO 2019/050813A1公开了一种纯化的源自肺炎链球菌血清型16F的荚膜多糖及其多糖蛋白质结合物。

[0011] WO 2019/050814A1公开了一种纯化的源自肺炎链球菌血清型23A和23B的荚膜多糖及其多糖蛋白质结合物。

[0012] WO 2019/050815A1公开了一种纯化的源自肺炎链球菌血清型24F的荚膜多糖及其多糖蛋白质结合物。

[0013] WO 2019/050816A1公开了一种纯化的源自肺炎链球菌血清型31的荚膜多糖及其多糖蛋白质结合物。

[0014] 尽管存在这些疫苗,但仍然需要开发额外的多价肺炎球菌多糖结合疫苗,其中多糖以简单且有效的方式纯化和尺寸化。因此,本发明的发明人以简单且有效的方式将肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖进行纯化和尺寸化。

## 发明内容

[0015] 本发明涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2的荚膜多糖,其平均分子量在约50和1000kDa之间。

[0016] 本发明还涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,其平均分子量在约50和1000kDa之间。

[0017] 本发明还涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,其平均分子量在约50和1000kDa之间。

[0018] 本发明还涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型35B的荚膜多糖,其平均分子量在约50和1000kDa之间。

## 附图说明

[0019] 图1A:在50°C的D<sub>2</sub>O中,血清型2荚膜多糖的400MHz一维(1D) <sup>1</sup>H NMR谱。

[0020] 图1B:用于鉴定血清型2的一维(1D) <sup>1</sup>H NMR识别区。

[0021] 图2A:在50°C的D<sub>2</sub>O中,血清型15A荚膜多糖的400MHz一维(1D) <sup>1</sup>H NMR谱。

[0022] 图2B:用于鉴定血清型15A的一维(1D) <sup>1</sup>H NMR识别区。

[0023] 图3A:在50°C的D<sub>2</sub>O中,血清型15C荚膜多糖的400MHz一维(1D) <sup>1</sup>H NMR谱。

[0024] 图3B:用于鉴定血清型15C的一维(1D) <sup>1</sup>H NMR识别区。

[0025] 图4A:在50°C的D<sub>2</sub>O中,血清型35B荚膜多糖的400MHz一维(1D) <sup>1</sup>H NMR谱。

[0026] 图4B:用于鉴定血清型35B的一维(1D) <sup>1</sup>H NMR识别区。

[0027] 图5A:SEC-HPLC色谱图示出了血清型2-CRM<sub>197</sub>的结合反应动力学。

[0028] 图5B:SEC-HPLC色谱图示出了血清型2-PsaA的结合反应动力学。

[0029] 图6A:SEC-HPLC色谱图示出了(A)血清型15A-CRM<sub>197</sub>的结合反应动力学。

[0030] 图6B:SEC-HPLC色谱图示出了血清型15A-PsaA的结合反应动力学。

[0031] 图7A:SEC-HPLC色谱图示出了(A)血清型15C-CRM<sub>197</sub>的结合反应动力学。

[0032] 图7B:SEC-HPLC色谱图示出了血清型15C-PsaA的结合反应动力学。

[0033] 图8A:SEC-HPLC色谱图示出了(A)血清型35B-CRM<sub>197</sub>的结合反应动力学。

[0034] 图8B:SEC-HPLC色谱图示出了血清型35B-PsaA的结合反应动力学。

[0035] 图9:用PCV制剂免疫的兔子的血清抗体滴度。

[0036] 定义

[0037] 在整个本发明中,除非上下文另有明确指示,否则单数术语“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数指代。同样,除非词语“或”明确限定为仅指两个或多个项目的列表中的单个项目而排除其他项目,否则在此类列表中使用“或”应解释为包括(a)列表中的任何单个项目,(b)列表中的所有项目,或(c)列表中项目的任何组合。另外,在整个本发明中使用的术语“包括”等表示包括至少所述特征,使得不排除任何更多数量的相同特征和/或一个或多个附加类型的特征。此外,在一个或多个实施方案中,可以以任何合适的方式组合各种特定特征、方法或特性。

[0038] 本发明并不旨在穷尽说明或将本技术限制于本文公开的精确形式。尽管本文出于举例说明的目的公开了特定实施例,但是如相关领域的普通技术人员将认识到的,在不偏离本技术的情况下,各种等效修改是可能的。在一些情况下,未详细示出和/或描述众所周知的结构和功能,以避免不必要地模糊了本技术实施例的描述。尽管方法的步骤可在本文中以特定顺序呈现,但在替代实施例中,这些步骤可具有另一种适当的顺序。类似地,在特定实施方案的上下文中,公开的本技术的某些实施方案可以在其他实施方案中进行组合或消除。此外,虽然与某些实施方案相关联的优点可以在这些实施方案的上下文中公开,但是其他实施方案也可以展现出这些优点,并且并非所有实施方案都需要展现本文公开的这些优点或其他优点以落入本技术的范围内。因此,本公开和相关技术可以包括本文未明确示出和/或描述的其他实施方案。

[0039] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与该方法所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0040] 在给定值的范围的情况下,应当理解,该范围的上限和下限之间的每个中间值以及该所述范围内的任何其他所述值或中间值都包含在该方法和组合物内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围中,并且也包含在该方法和组合物内,受制于所述范围中的任何具体排除的限制。如果所述范围包括一个或两个限值,则不包括其中一个或两个限值的范围也包括在该方法、组合物和组合中。

[0041] 如本文所用,术语“荚膜多糖”是指在肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的细胞壁外部但与细胞壁相邻的一层多糖。

[0042] 如本文所用,术语“载体蛋白”是指通常为了增强或促进免疫系统对抗原的检测而将多糖偶联、附着或结合至其的任何蛋白质。载体蛋白的实例包括但不限于CRM<sub>197</sub>、PsaA和破伤风类毒素。

[0043] 本文所用术语“结合 (conjugate)”或“结合的 (conjugated)”用于表示肺炎链球菌荚膜多糖与载体蛋白共价结合。

[0044] 本说明书中使用的术语“多糖”是指由以糖苷键连接在一起的糖链组成的复杂碳水化合物。多糖可包含至少10、20、30、40或50或更多种糖。

[0045] 本文所用的术语“尺寸化的 (sized)”或“尺寸化 (sizing)”是指通过各种方法减小天然多糖的尺寸。这些方法可以包括机械方法,例如均质化。减小天然多糖的尺寸或“尺寸化”提供各种优点,包括:(1) 相比于天然多糖,赋予了更多同质性;(2) 可控制结合物中多糖与蛋白质的比例;(3) 经尺寸化的多糖可提供给组合物更高的稳定性。为了本发明的目的,将肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的天然荚膜多糖尺寸化为平均分子量 (Mw) 在50和1000kDa之间。

[0046] 如本文中所示,多糖的术语“分子量”或“分子尺寸”或“平均分子尺寸”或“平均分子量”是指通过MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering, 多角度激光光散射) 测量的多糖的重均分子量 (Mw)。

### 具体实施方式

[0047] 本发明涉及纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖及其制备方法。

[0048] 根据本发明的多糖通过如下制备:在发酵罐内以优化营养物培养肺炎链球菌,和在发酵结束时通过添加脱氧胆酸钠 (DOC) 或任何常规裂解剂裂解细胞。将收获的裂解液经过下游纯化,以去除蛋白质、核酸、细胞壁成分等杂质。

[0049] 发酵后,利用分批或连续离心机离心DOC细胞裂解物,去除细胞碎片。将无细胞液的pH值调节至酸性条件,提高温度,然后离心。离心后,将上清液通过深度过滤器,浓缩并使用超滤 (UF) 膜进行渗滤 (diafilter)。添加洗涤剂,从多糖制剂 (保留物) 中去除额外的杂质,随后进行离心。随后,将洗涤剂处理的上清液通过木炭过滤器或活性炭柱,然后将过滤的多糖暴露于SiO<sub>2</sub>颗粒,离心。将上清液通过深度过滤器,将深度滤液通过碳过滤器,然后通过0.22至0.6μm过滤器。将滤液浓缩并用超滤膜渗滤,再用0.5-2% NaCl溶液或者在水中或缓冲液中渗滤,得到基本上纯净形式的多糖。

[0050] 纯化的多糖可以在高pH值下通过化学方法尺寸化或使用高压均质器机械地尺寸化。在超滤膜上将尺寸化的多糖制剂浓缩至5-25mg/mL。将保留物通过0.22μm过滤器并在-20°C以下冷冻。

[0051] 在一个实施方案中,本发明提供纯化的和尺寸化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖,其平均分子量 (Mw) 在50和1000kDa之间。优选地,在100-1000kDa、200-800kDa、250-600kDa或300-400kDa、70-150kDa或75-125kDa之间。

[0052] 在一些实施方案中,在结合前,纯化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖的平均分子量在50kDa和1000kDa之间。在其他此类实施方案中,多糖的平均分子量在50kDa和750kDa之间;在50kDa和500kDa之间;在100kDa和1000kDa之间;在100kDa和750kDa之间;在100kDa和500kDa之间。

[0053] 在纯化程序后,使用各种尺寸化技术将本发明的荚膜多糖的尺寸减小至所需的尺寸。发明人已发现根据本发明制备的与载体蛋白结合的纯化的血清型2、15A、15C和35B的荚

膜多糖具有高免疫原性。

[0054] 在实施方案中,本发明的荚膜多糖包含源自血清型2的肺炎链球菌多糖,其平均分子量为约80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa、700kDa或1000kDa。

[0055] 在实施方案中,本发明的荚膜多糖包含源自血清型15A的肺炎链球菌多糖,其平均分子量为约80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa、700kDa或1000kDa。

[0056] 在实施方案中,本发明的荚膜多糖包含源自血清型15C的肺炎链球菌多糖,其平均分子量为约80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa、700kDa或1000kDa。

[0057] 在实施方案中,本发明荚膜多糖包含源自血清型35B的肺炎链球菌多糖,其平均分子量为约80kDa、100kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa、700kDa或1000kDa。

[0058] 在另一方面,本发明提供尺寸化的肺炎链球菌血清型15A荚膜多糖,其包括含量在5-18%范围内的甘油,优选地在5-10%内。

[0059] 在另一方面,本发明提供尺寸化的肺炎链球菌血清型15C荚膜多糖,其包括含量在5-18%范围内的甘油,优选地在5-10%内。

[0060] 在另一方面,本发明提供尺寸化的肺炎链球菌血清型35B荚膜多糖,其包括含量在2-10%范围内的醋酸盐,优选地在2-8%内。

[0061] 在另一方面,本发明提供尺寸化的肺炎链球菌血清型15A,其平均分子量在50至1000kDa之间,甘油含量在5-18%范围内。

[0062] 在另一方面,本发明提供尺寸化的肺炎链球菌血清型15C,其平均分子量在50至1000kDa之间,甘油含量在5-18%范围内。

[0063] 在另一方面,本发明提供一种分离的肺炎链球菌血清型35B,其平均分子量在50至1000kDa之间,醋酸盐含量在2-10%范围内。

[0064] 甘油磷酸侧链的存在可通过如下确定:用氢氟酸(HF)处理多糖释放甘油后,用高效阴离子交换色谱脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)进行测定甘油。

[0065] 在实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗,其中源自肺炎链球菌血清型2纯化的多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,该多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2。

[0066] 在实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗,其中源自肺炎链球菌血清型15A纯化的多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,该多糖与选自PsaA、CRM<sub>197</sub>、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2。

[0067] 在实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗,其中源自肺炎链球菌血清型15C纯化的多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,该多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2。

[0068] 在实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗,其中源自肺炎链球菌血清型35B纯化的多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,该多糖与选自PsaA、CRM197、PspA或破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2。

[0069] 在实施方案中,本发明提供免疫原性组合物,其包括至少一种源自肺炎链球菌血清型2的糖结合物、至少一种源自肺炎链球菌血清型15A的糖结合物、至少一种源自肺炎链球菌血清型15C的糖结合物和至少一种源自35B的糖结合物。

[0070] 在一个方面,本发明的免疫原性组合物进一步包括源自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、14、15B、16F、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、31、33F的糖结合物,其与载体蛋白结合,所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)或者CRM197与PsaA的组合或CRM197与破伤风类毒素的组合或PsaA与破伤风类毒素的组合或CRM197、PsaA与破伤风类毒素的组合。

[0071] 在另一方面,免疫原性组合物为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、25或更多价的肺炎球菌结合物组合物。

[0072] 在另一方面,免疫原性组合物为多价,并且包括八种肺炎球菌多糖结合物(八价)、九种肺炎球菌多糖结合物(九价)、十种肺炎球菌多糖结合物(10价)、十一种肺炎球菌多糖结合物(11价)、十二种肺炎球菌多糖结合物(12价)、十三种肺炎球菌多糖结合物(13价)、十四种肺炎球菌多糖结合物(14价)、十五种肺炎球菌多糖结合物(15价)、十六种肺炎球菌多糖结合物(16价)、十七种肺炎球菌多糖结合物(17价)、十八种肺炎球菌多糖结合物(18价)、十九种肺炎球菌多糖结合物(19价)、二十种肺炎球菌多糖结合物(20价)、二十一种肺炎球菌多糖结合物(21价)、二十二种肺炎球菌多糖结合物(22价)、二十三种肺炎球菌多糖结合物(23价)、二十四种肺炎球菌多糖结合物(24价)、二十五种肺炎球菌多糖结合物(25价)、二十六种肺炎球菌多糖结合物(26价)。

[0073] 在又一实施方案中,本发明提供免疫原性组合物,其包括纯化的肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的荚膜多糖,其平均分子量在约50和1000kDa之间,该荚膜多糖与载体蛋白结合。

[0074] 在本发明的一个方面中,所述免疫原性组合物包括肺炎链球菌多糖,其中将所述多糖血清型按高达x2、x3、x4、x5、x6、x7、x8、x9或x10的因子进行尺寸化。术语“按高达x2的因子进行尺寸化”意指糖类经受旨在减小糖类的尺寸但保留大于天然多糖的一半尺寸的处理。

[0075] 未受经尺寸化技术处理的多糖称为天然多糖。在正常纯化过程中或在结合过程中发生降解,多糖的尺寸可能会稍微减小,这仍然可以称为天然多糖。

[0076] 荚膜多糖可以通过本领域已知的各种机械方法来减小尺寸,例如高压技术,例如微流态化法、Emulsiflex™、高压均质、超声波或高林(Gaulin)均质。

[0077] 通过将处理物料流泵送通过尺寸足够小的流道,高压均质实现了高剪切率。通过使用更大的应用的均质化压力可增加剪切率,通过将进料流再循环通过均质器可以增加暴露时间。

[0078] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型2的荚膜多糖,该荚膜多糖与载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa和约10000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0079] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,该荚膜多糖与载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合

物的平均分子量在500kDa至约10000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0080] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,该荚膜多糖与载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约10000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0081] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型35B的荚膜多糖,该荚膜多糖与载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约10000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0082] 本发明的多糖蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约5000kDa之间;在1000kDa至约10000kDa之间;在约1500kDa至约15000kDa之间;在约2000kDa至约20000kDa之间;在约2500kDa至约25000kDa之间;或在约3000kDa至约30000kDa之间。

[0083] 在另一实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括纯化的肺炎球菌多糖和载体蛋白质,蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0084] 在优选的实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的纯化的多糖,该多糖的平均分子量在50和1000kDa之间,该多糖与载体蛋白结合,所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT),或CRM197与PsaA的组合或CRM197与破伤风类毒素的组合或PsaA与破伤风类毒素的组合或CRM197、PsaA与破伤风类毒素的组合,其中所述组合物包括百分比比例为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2。

[0085] 在另一实施方案中,本发明提供肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括一种或多种纯化的肺炎球菌血清型荚膜多糖,每种荚膜多糖分别与载体蛋白结合,其中每种多糖-蛋白结合物的平均分子量为约1500kDa至约15000kDa。

[0086] 在其他实施方案中,纯化的肺炎球菌多糖可在结合到一种或多种载体蛋白质之前进行活化(例如,通过化学方式)。每种活化的肺炎球菌多糖可分别与载体蛋白结合,形成多糖-蛋白质结合物(例如,糖结合物)。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的纯化的肺炎球菌多糖可经化学活化,随后根据已知技术与载体蛋白质结合,例如美国专利号4,365,170、4,673,574和4,902,506中所述的技术。例如,肺炎球菌多糖可通过使用氧化剂,例如高碘酸盐(如高碘酸钠、高碘酸钾或高碘酸)将末端羟基氧化成醛,通过随机氧化分解碳水化合物化合物的一个或多个邻位羟基并形成一个或多个反应性羟基,来活化。

[0088] 本发明的纯化肺炎球菌多糖也可通过CDAP(1-氰基-4-二甲氨基-吡啶四氟硼酸盐)来活化,并且随后与一种或多种载体蛋白(例如PsaA、CRM197、PspA或其组合)结合。在其他实施方案中,经CDAP活化以形成氰酸酯的肺炎球菌多糖可直接与一种或多种载体蛋白质结合,或者使用间隔基团(spacer)(例如,接头)进行结合。间隔基团可与载体蛋白上的氨基偶联。在一些实施方案中,间隔基团可以是脘胺或半脘胺,其产生巯基化多糖,所述巯基化多糖可通过硫醚键与载体蛋白连接,得到马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如,使用GMBS)或

卤代乙酰化载体蛋白(例如,使用碘代乙酰亚胺、乙基碘代乙酰亚胺HC1、SIAB、SIA、SBAP和/或溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯。在其他实施方案中,使用己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联氰酸酯,并且使用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学物质经蛋白质载体上的羧基将氨基衍生糖结合到载体蛋白。此类结合物在PCT公布号W0 93/15760、PCT公布号W0 95/08348、PCT公布号W0 96/29094以及Chu et al.,1983,Infect.Immunity 40:245-256中有描述。

[0089] 可与本发明的多糖-蛋白质结合物和疫苗组合物一起使用的其他合适的活化和/或偶联技术包括使用碳二亚胺、酰肼、活性酯、降冰片烷(norborane)、对硝基苯甲酸、N-羧基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU和PCT公布号W0 98/42721中描述的其他方法。例如,结合可涉及羧基接头,其可由糖的游离羟基与CDI反应形成(参见Bethell et al.,1979,J.Biol.Chem.254:2572-4;Hearn et al.,1981,J.Chromatogr.218:509-18),然后与蛋白质偶联形成氨基甲酸酯键。在一些实施方案中,将异头端还原为初级羟基,初级羟基的可选的保护/脱保护,初级羟基与CDI的反应以形成CDI氨基甲酸酯中间体,将CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白质上的氨基偶联。

[0090] 例如,可与本发明的多糖-蛋白质结合物和疫苗组合物一起使用的另一合适的活化和/或偶联技术包括以下方法:尺寸化的肺炎球菌多糖(例如,约6mL浓度为约10mg/mL的尺寸化的多糖)和CDAP(例如,浓度为约100mg/mL溶于乙腈(w/v))可在玻璃瓶中以约1比约1的比例混合(例如,通过搅拌约1分钟)。可根据需要调节多糖溶液的pH值(例如,使用约0.2M三乙胺并在室温下搅拌3分钟将pH值调节至约9.25)。此外,可将PsaA(例如,约4mL浓度为约15mg/mL的溶液)缓慢添加至活化的肺炎球菌多糖(例如,以约1比约1(Ps:载体蛋白)的比例)。可调节反应的pH值(例如,使用0.2M三甲胺调节至约9.05),并继续反应(例如,在室温下搅拌5小时)。可以淬灭反应混合物(例如,通过添加过量浓度的甘氨酸)。

[0091] 在一些实施方案中,可使用膜(例如,100K MWCO膜)对反应混合物进行渗滤,并且可通过尺寸排阻色谱法进行纯化。经渗滤和纯化的级分可使用SEC-MALLS和葱酞法进行分析。可以汇集并过滤所分析的含有结合物的级分(例如,使用0.2 $\mu$ m过滤器)。

[0092] 将肺炎球菌多糖与一种或多种载体蛋白结合后,可通过多种技术纯化多糖-蛋白质结合物(例如,针对多糖-蛋白质结合物的量进行富集)。这些技术包括但不限于浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱、柱层析和深度过滤。例如,在纯化结合物后,可将结合物进行复合以形成本发明的肺炎球菌多糖-蛋白质结合物组合物,其可用作疫苗。

[0093] 在一个实施方案中,本发明提供17价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自与载体蛋白结合的肺炎链球菌血清型的多糖,其中所述血清型包括2、15A、15C和35B以及附加血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F。

[0094] 在一个实施方案中,本发明提供17价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自与载体蛋白结合的肺炎链球菌血清型的多糖,其中所述血清型包括2、15A、15C和35B以及附加血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F,其中所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)。

[0095] 在一个实施方案中,本发明提供24价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少3种肺炎球菌血清型的多糖和包括1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、14、18C、19A、19F、20A、20B、22F、23F、24F、33F的附加血清型的多糖,其中24种血清型均与载体蛋白结合,其中载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)或CRM197与

PsaA的组合或CRM197与破伤风类毒素的组合或PsaA与破伤风类毒素的组合或CRM197、PsaA与破伤风类毒素的组合。

[0096] 在一个实施方案中,本发明提供24价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少2种肺炎球菌血清型的多糖和包括1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F的附加血清型的多糖,其中24种血清型均与载体蛋白结合,所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)或CRM197与PsaA的组合或CRM197与破伤风类毒素的组合或PsaA与破伤风类毒素的组合或CRM197、PsaA与破伤风类毒素的组合。

[0097] 在一个实施方案中,本发明提供多价肺炎球菌结合疫苗组合物,其包括源自选自2、15A、15C和35B中的至少2种肺炎球菌血清型的多糖和选自1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、20A、20B、22F、23A、23B、23F、24F、33F中的一种或多种附加血清型的多糖,其中血清型与载体蛋白结合,所述载体蛋白选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)或CRM197与PsaA的组合或CRM197与破伤风类毒素的组合或PsaA与破伤风类毒素的组合或CRM197、PsaA与破伤风类毒素的组合。

[0098] 在一些实施方案中,本发明提供用于制备本文所述的肺炎球菌疫苗组合物的多糖-蛋白质结合物的方法,其中所述方法进一步包括将所述多糖-蛋白质结合物配制成包括佐剂、赋形剂和缓冲剂的肺炎球菌疫苗组合物。

[0099] 在一些实施方案中,本发明提供用于制备本文所述的肺炎球菌疫苗组合物的多糖-蛋白质结合物的方法,其中佐剂为磷酸铝。

[0100] 在另一实施方案中,本发明的疫苗或免疫原性组合物用于预防由肺炎链球菌菌株引起的感染。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供治疗有此需要的受试者的方法,包括向有此需要的受试者施用本文所述的肺炎球菌疫苗组合物。

[0102] 在一些实施方案中,受试者患有由肺炎链球菌介导的疾病,例如侵袭性肺炎球菌病(IPD)。在一个实施方案中,受试者是人类,例如婴儿(小于约1岁)、幼儿(约12个月至约24个月)、幼龄儿童(约2岁至约5岁)、较大儿童(约5岁至约13岁)、青少年(约13岁至约18岁)、成年人(约18岁至65岁)或老年人(约65岁以上)。

[0103] 在一些实施方案中,本发明提供诱导对肺炎链球菌荚膜多糖结合物的免疫反应的方法,包括向受试者施用免疫有效量的本文所述的肺炎球菌结合疫苗组合物。

[0104] 在一个实施方案中,诱导对肺炎链球菌荚膜多糖结合物的免疫反应的方法,包括向受试者经全身、经皮下和/或经粘膜施用本文所述的肺炎球菌结合疫苗组合物。

[0105] 在一些实施方案中,一剂量的本发明的疫苗组合物中的每种结合物的量是足以诱导免疫保护反应的量,例如诱导免疫保护反应而无显著不良反应。尽管每种结合物的量可根据肺炎球菌血清型而变化,但每剂量疫苗组合物可包含约0.1 $\mu$ g至约50 $\mu$ g的每种肺炎球菌多糖、约0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g,或约1 $\mu$ g至约5 $\mu$ g的与包含约1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g载体蛋白的每种载体蛋白结合的每种肺炎球菌多糖。

[0106] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型2的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约1500kDa之间,并且蛋白质与多

糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0107] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa到约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0108] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa到约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0109] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.1 $\mu$ g至约10 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型35B的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa到约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0110] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型2的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ gCRM<sub>197</sub>载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0111] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ gCRM<sub>197</sub>载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa到约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0112] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ gCRM<sub>197</sub>载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0113] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型2的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g PsaA载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0114] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15A的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g PsaA载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0115] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型15C的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g PsaA载体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0116] 在其他实施方案中,本发明提供肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物,其包括0.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g源自肺炎链球菌血清型35B的荚膜多糖,该荚膜多糖与1.5 $\mu$ g至约5 $\mu$ g PsaA载

体蛋白结合,其中多糖-蛋白质结合物的平均分子量在500kDa至约15000kDa之间,并且蛋白质与多糖(蛋白质/PS)的百分比比例(w/w)为约0.5至约2.0,优选地该比例为0.7至1.2。

[0117] 在优选的实施方案中,本发明提供多价结合疫苗组合物,其包括源自肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B中的至少两种的多糖,该多糖的平均分子量在50至1000kDa之间,该多糖与选自PsaA、CRM<sub>197</sub>、PspA、破伤风类毒素(TT)的载体蛋白结合,其中所述组合物包括百分比比例为约0.5至约2.0的蛋白质与多糖(蛋白质/PS),优选地,该比例为0.7至1.2,和肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、14、16F、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、31、33F的附加多糖-蛋白质结合物,其与选自PsaA、CRM197、PspA、破伤风类毒素(TT)的载体蛋白或载体蛋白的组合结合。

[0118] 本发明的肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗组合物可使用已知方法制造。例如,肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物可以用药理学上可接受的稀释剂或载体(例如水或盐溶液)配制。此外,肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物可进一步包括以下的一种或多种:缓冲剂、防腐剂或稳定剂、聚山梨醇酯、佐剂(例如铝化合物,如氢氧化铝、磷酸铝或羟基磷酸铝)和/或冻干赋形剂。本发明的肺炎球菌多糖-蛋白质结合疫苗组合物中所包含的上述化合物中的任何一种可依据有此需要的受试者的施用方式和途径的功能进行选择,并且可进一步基于标准药理学实践进行选择。

[0119] 当将本发明的肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗组合物施用于受试者时,诱导形成能够结合肺炎链球菌血清型2、15A、15C和35B的抗体,这可通过标准ELISA试验测定得到。ELISA按WHO建议的方案进行。简单来说,Maxisorp<sup>TM</sup>ELISA平板涂有给定血清型的PnCPS(使用PBS按1 $\mu$ g/50 $\mu$ L加入每孔;无菌无内毒素,含0.02%叠氮化钠)。将平板放入有湿润纸巾的箱子中加湿,并在37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下孵育5小时,然后将平板在5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C下储存待用。

[0120] 实施例

[0121] 提供以下实施例以举例说明本发明,并且仅用于说明目的,而不应理解为限制本发明的范围。

[0122] 实施例1:

[0123] a、肺炎球菌荚膜多糖血清型2、15A、15C和35B的制备。

[0124] 肺炎链球菌株(血清型2、15A、15C和35B)细胞库获取自美国疾病预防控制中心。

[0125] 种子预处理:

[0126] 将0.4 $\mu$ L培养物(肺炎链球菌血清型2)分离物接种到60mL完全水解酪蛋白(Mueller-Hinton, MH)培养基中。将接种的烧瓶在35 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 5 $\pm$ 0.5%CO<sub>2</sub>下培养2至8小时。收集样品并在600nm下检查光密度(OD)。当所需OD达到0.8 $\pm$ 0.2时,收集样品,检查pH值,进行革兰氏染色。

[0127] 种子制备:

[0128] 用显微镜(革兰氏染色)确定种子预培养物的纯度后,将40mL种子预培养物接种到含有760mL MH培养基的1升烧瓶中。将接种种子在35 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 5 $\pm$ 0.5%CO<sub>2</sub>下培养3至11小时。收集样品并在600nm下检查光密度(OD)。当所需OD达到4 $\pm$ 2时,收集样品进行革兰氏染色,测pH。涂布在血琼脂平板上确定纯度。

[0129] 发酵/培养:

[0130] 将750mL种子接种到15升MH培养基中,并以每分钟3至5mL的速率补充30至50%的

葡萄糖,在温度为 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,100至140转每分钟(RPM),pH为 $7.1 \pm 0.3$ 的条件下进行培养,直到600nm处OD达到 $6 \pm 2$ 。

[0131] 灭活:

[0132] 将13%脱氧胆酸钠(DOC)储液加入发酵液中,使培养液失活,培养 $10 \pm 2$ 小时。

[0133] 离心:

[0134] 收取经DOC处理的培养物,在 $20^\circ\text{C}$ 下以14000相对离心力(RCF)离心。离心后,收集上清液并进行纯化步骤处理。

[0135] b、肺炎球菌血清型2荚膜多糖的纯化

[0136] 在分批离心机上离心肺炎链球菌血清型2的DOC细胞裂解物,去除细胞碎片。将无细胞液的pH调至5.0,培养4小时,在14000g下离心45min。离心后,将上清液通过深度过滤器。然后,将滤液浓缩4.2倍,使用30-300kDa超滤膜进行渗滤(4-15Dia体积)。添加洗涤剂(CTAB 1%),从多糖制剂(保留物)中去除额外的杂质,在 $6^\circ\text{C}$ 下培养30-90分钟,然后在9000-14500g下离心15-60分钟。随后,将CTAB处理的上清液通过活性炭柱(30-300g/L聚合制剂(poly preparation))。将经碳过滤的多糖制剂暴露于 $\text{SiO}_2$ (二氧化硅)颗粒(3-10%,含盐)中,在 $2-40^\circ\text{C}$ 下培养15-120分钟,然后在9000-14500g下离心15-60分钟。将上清液通过2-50 $\mu\text{m}$ 深度过滤器,将深度滤液通过碳过滤器,然后通过0.22至0.6 $\mu\text{m}$ 过滤器。然后,将滤液(0.22至0.6 $\mu\text{m}$ )浓缩并用30-300kDa超滤膜渗滤,再用0.5-2%NaCl溶液或者在水或缓冲液中不加盐渗滤,得到基本上纯净形式的血清型2荚膜多糖。

[0137] 肺炎球菌血清型15A和15C荚膜多糖的纯化,采用类似上述血清型2的程序进行制备。

[0138] c、肺炎球菌血清型35B荚膜多糖的纯化

[0139] 在分批离心机上离心肺炎链球菌血清型35B的DOC细胞裂解物,去除细胞碎片。将无细胞培养液的pH调至5.0,培养4小时,在14000g下离心45min。离心后,将上清液通过深度过滤器。然后,将滤液浓缩7.5倍,使用30-300kDa超滤膜进行渗滤(4-15Dia体积)。添加洗涤剂(CTAB 1%),从多糖制剂(保留物)中去除额外的杂质,在 $6^\circ\text{C}$ 下培养30-90分钟,然后在9000-14500g下离心15-60分钟。随后,将CTAB处理的上清液通过活性炭柱(30-300g/L聚合制剂)。将经碳过滤的多糖制剂暴露于 $\text{SiO}_2$ (二氧化硅)颗粒(3-10%,含盐)中,在 $2-40^\circ\text{C}$ 下培养15-120分钟,然后在9000-14500g下离心15-60分钟。将上清液通过2-50 $\mu\text{m}$ 深度过滤器,将深度滤液通过碳过滤器,然后通过0.22至0.6 $\mu\text{m}$ 过滤器。然后,将滤液(0.22至0.6 $\mu\text{m}$ )浓缩并用30-300kDa超滤膜渗滤,再用0.5-2%NaCl溶液或者在水或缓冲液中不加盐渗滤,得到基本上纯净形式的血清型35B荚膜多糖。

[0140] d、纯化的肺炎球菌血清型2荚膜多糖的尺寸化

[0141] 使用高压均质器在1000bar下对上述得到的纯化的肺炎球菌血清型2荚膜多糖进行机械尺寸化,循环1-20次。在30kDa超滤(UF)膜上将尺寸化的多糖制剂再次浓缩至15mg/mL。将保留物通过0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器,并在 $-20^\circ\text{C}$ 以下冷冻。

[0142] 肺炎球菌血清型35B荚膜多糖的尺寸化,采用类似上述血清型2的程序进行。

[0143] e、纯化的肺炎球菌血清型15A荚膜多糖的尺寸化。

[0144] 使用高压均质器在1500bar下对纯化的肺炎球菌血清型15A荚膜多糖进行机械尺寸化,循环1-20次。在30kDa超滤(UF)膜上将尺寸化的肺炎球菌血清型15A多糖制剂再次浓

缩至15mg/mL。将保留物通过0.22 $\mu$ m过滤器,并在-20 $^{\circ}$ C以下冷冻。

[0145] f、纯化的肺炎球菌血清型15C荚膜多糖的尺寸化。

[0146] 使用高压均质器在1200bar下对纯化的肺炎球菌血清型15C荚膜多糖进行机械尺寸化,循环1-20次。在30kDa超滤(UF)膜上将尺寸化的肺炎球菌血清型15A多糖制剂再次浓缩至15mg/mL。将保留物通过0.22 $\mu$ m过滤器,并在-20 $^{\circ}$ C以下冷冻。

[0147] 肺炎球菌血清型2、15A和15C荚膜多糖的NMR结构分析。

[0148] 通过NMR分析确认血清型2、15A和15C的多糖特性(identity)。根据Abeygunawardana et.al.,Development and Validation of an NMR based Identity Assay for polysaccharides,Analytical Biochemistry,279,226-240(2000)中发表的方法进行分析。根据图1-3中的NMR数据,NMR谱的异头区证实了多糖特性,并识别到分别含有血清型2、15A和15C多糖的糖类的峰。

[0149] 肺炎球菌血清型35B荚膜多糖的NMR结构分析。

[0150] 通过NMR分析确认血清型35B的多糖特性。根据Abeygunawardana et.al.,Development and Validation of an NMR based Identity Assay for polysaccharides,Analytical Biochemistry,279,226-240(2000)中发表的方法进行分析。根据图4中的NMR数据。根据L.M.Beynon.,J.C.Richards.,M.B.Perry.,P.J.Kniskern,Characterization of the capsular antigen of Streptococcus pneumoniae serotype 35B,Canadian Journal of Chemistry,73(1):41-48(1995)中发表的数据,对血清型35B的 $^1\text{H}$  NMR谱进行峰分配。

[0151] 如上文所述制备的纯化的和尺寸化的肺炎球菌血清型2、15A、15C和35B多糖的显著特征如下表1所示。

[0152] 表1

血清型	尺寸化前	尺寸化后						
	平均分子量(kDa)	平均分子量(kDa)	蛋白质杂质%	核酸杂质%	CWPS%	O-乙酰基(%)	己糖胺(%)	甘油含量(%)
[0153] 2	545	261	<1	0.1	0.82	NA	NA	NA
15A	813	187	<1	0.09	1.88	<0.5	22.15	7.53
15C	649	202	<1	0.01	0.38	<0.5	13	8.12
35B	343	229	<1	0.12	0.71	5.47	13	N.A.

[0154] 实施例2:载体蛋白的制备

[0155] a、CRM<sub>197</sub>的制备

[0156] 可根据美国专利号5,614,382中所述的方法通过重组方法制备CRM<sub>197</sub>。或者,根据文献中已知的方法或根据PCT公布WO 2016/079755、WO 2017/081700和WO 2018/193475中公开的方法重组制备CRM<sub>197</sub>。可以通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换色谱法纯化CRM<sub>197</sub>,这些方法为本领域所公知。

[0157] b、PsaA的制备

[0158] PsaA基因从肺炎链球菌血清型4中PCR扩增得到,不含其疏水前导肽序列。该基因序列已被证实,并利用构建的内部(in-house)载体(pBE66)克隆到大肠杆菌中进行更高效

表达。

[0159] 用含有1mL甘油原液的20mLLB培养基在150mL锥形瓶中复苏编码PsaA基因的甘油原液培养物。在37℃、200rpm下培养培养物约6小时至最终OD<sub>600nm</sub>为3.50D。将复苏的培养物转移至5L锥形瓶中的1L种子培养物中。培养物在37℃、200rpm下生长约10小时至最终OD<sub>600nm</sub>为3。将种子培养物无菌转移至20L发酵罐中,该发酵罐中含有以下培养基成分:HyPeptone6g/L、酵母提取物12g/L、磷酸氢二钾13.5g/L、磷酸氢二铵4g/L、柠檬酸1.7g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O1.2g/L、葡萄糖4g/L、盐酸硫胺10mg/L以及1mL/L微量元素(例如,对于100mL组合物具有以下微量元素FeCl<sub>3</sub> 2.7g,ZnCl<sub>2</sub> 0.2g,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2g,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2g,CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.1g,硼酸0.05g,CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1g,浓HCL 10mL)。初始发酵以OD<sub>600nm</sub>为0.20D开始。在整个发酵过程中,用20%正磷酸和12.5%氢氧化铵使pH值维持在7±0.2。当葡萄糖水平降至0.5g/L以下时,以3-4g/L/h的稳定速率开始分批补料,在整个富氧发酵过程中保持D0%>20%。在发酵罐中培养细胞,通过离心获得细胞颗粒。用细胞破碎解装置(Panda)裂解细胞。在10000g下离心裂解液,将澄清的上清液进行纯化。

[0160] PsaA纯化与Larentis et.al,2011中描述的程序类似(Protein expression and Purification 78(2011)38)。在DEAE后,使用混合模式色谱(陶瓷羟基磷灰石II型)进一步优化纯化,以获得更高纯度的PsaA。

[0161] 阴离子交换色谱:将30mL DEAE-琼脂糖凝胶(GE)树脂装填至XK16/20柱。用5倍柱体积的无菌蒸馏水清洗树脂,然后用10倍柱体积的20mM Tris,1mM EDTA,pH 8.0(平衡缓冲液)清洗树脂。用平衡缓冲液将30mL上清液稀释至100mL,并将其装载到柱上,收集流出液。用5倍体积的平衡缓冲液清洗柱。用12倍体积的(0-100%B)线性梯度洗脱PsaA。(缓冲液A含有20mM Tris,1mM EDTA,pH 8.0;缓冲液B含有20mM Tris,1mM EDTA,250mM NaCl,pH 8.0)。然后用20mM Tris,1mM EDTA,1M NaClpH 8.0清洗柱。

[0162] 混合模式色谱:将25mL陶瓷羟基磷灰石II型(CHT-II)装填至柱中。用多体积的无菌蒸馏水清洗树脂,然后用10倍体积的20mM Tris pH 6.8清洗树脂。将在SDSPAGE上显示出约37KD清晰可见带的PsaA浓度良好的DEAE树脂的洗脱级分汇集并装载到CHT-II树脂上。收集流出液,用5倍柱体积的平衡缓冲液清洗柱。用5倍柱体积梯度洗脱(15%B、20%B、50%B和100%B)蛋白质。缓冲液A含有20mM Tris pH 6.8,而缓冲液B含有250mM磷酸盐缓冲液pH 6.8。

[0163] 将所有显示出PsaA预期大小的清晰条带的洗脱级分汇集,用10kDa MWC0盒浓缩,并对20mM pH 7.5磷酸盐缓冲液进行渗滤。将纯化的蛋白质加载至SDS-PAGE凝胶上以评价纯度。

[0164] 实施例3:肺炎球菌血清型2、15A、15C和35B荚膜多糖的结合。

[0165] a、肺炎球菌血清型2荚膜多糖与CRM<sub>197</sub>的结合

[0166] 将1000mg(200.0mL浓度为5.0mg/mL)经机械减小尺寸的血清型2多糖和5.0mL CDAP(100mg/mL乙腈溶液(w/v))按1.0:0.5(PS:CDAP)的比例在玻璃瓶中混合并搅拌1min。用12.0mL 0.2M三乙胺将多糖溶液的pH调节至9.0,在室温(RT)下搅拌1min。将1000mg CRM(66.7mL浓度为15.0mg/mL)按1.0:1.0(PnPs:CRM)的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0167] 用2.8mL0.2M三乙胺将反应的pH调节到9.0,在室温下搅拌反应3-5小时,然后加入过量浓度的甘氨酸(100mM)猝灭反应。在反应每过一小时,使用SEC-HPLC监测反应的结合动

力学(图5A)。

[0168] 用100kDa MWC0 TFF膜,将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用SEC-MALLS法、蒽酮法对各级分进行分析,将含有结合物的级分汇集,用0.2 $\mu$ m过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为8168kDa。

[0169] b、肺炎球菌血清型2荚膜多糖与PsaA的结合

[0170] 将1000mg (200.0mL浓度为5.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型2多糖和5.0mL CDAP (100mg/mL乙腈溶液(w/v)) 按1.0:0.5 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌1min。用16.0mL 0.2M三乙胺将多糖溶液的pH调节至9.0,在室温(RT)下搅拌1min。将800mg PsaA (53.33mL浓度为15.0mg/mL) 按1.0:0.8 (PnPs:PsaA) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0171] 用3.5mL 0.2M三乙胺将反应的pH调节到9.0,在室温下搅拌反应3-5小时,然后加入过量浓度的甘氨酸(100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时,使用SEC-HPLC监测反应的结合动力学(图5B)。

[0172] 用100kDa MWC0 TFF膜,将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用SEC-MALLS法、蒽酮法对各级分进行分析,将含有结合物的级分汇集,用0.2 $\mu$ m过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为6295kDa。

[0173] c、肺炎球菌血清型15A荚膜多糖与CRM<sub>197</sub>的结合

[0174] 将1000mg (66.7mL浓度为15.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型15A多糖和10.0mL CDAP (100mg/mL乙腈溶液(w/v)) 按1.0:1.0 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌1min。用18.0mL 0.2M三乙胺将多糖溶液的pH调节至9.0,在室温(RT)下搅拌1min。将1000mg CRM<sub>197</sub> (53.33mL浓度为15.0mg/mL) 按1.0:0.8 (PnPs:CRM) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0175] 用1.0mL 0.2M三乙胺将反应的pH调节到9.0,在室温下搅拌反应3-5小时,然后加入过量浓度的甘氨酸(100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时,使用SEC-HPLC监测反应的结合动力学(图6A)。

[0176] 用100kDa MWC0 TFF膜,将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用SEC-MALLS法、蒽酮法对各级分进行分析,将含有结合物的级分汇集,用0.2 $\mu$ m过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为4272kDa。

[0177] d、肺炎球菌血清型15A荚膜多糖与PsaA的结合

[0178] 将1000mg (71.4mL浓度为14.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型15A多糖和10.0mL CDAP (100mg/mL乙腈溶液(w/v)) 按1.0:1.0 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌1min。用20.5mL 0.2M三乙胺将多糖溶液的pH调节至9.0,在室温(RT)下搅拌1min。将1000mg PsaA (66.6mL浓度为15.0mg/mL) 按1.0:1.0 (PnPs:PsaA) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0179] 用0.9mL 0.2M三乙胺将反应的pH调节到9.0,在室温下搅拌反应3-5小时,然后加入过量浓度的甘氨酸(100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时,使用SEC-HPLC监测反应的结合动力学(图6B)。

[0180] 用100kDa MWC0 TFF膜,将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用SEC-MALLS法、蒽酮法对各级分进行分析,将含有结合物的级分汇集,用0.2 $\mu$ m过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为9776kDa。

[0181] e、肺炎球菌血清型15C荚膜多糖与CRM<sub>197</sub>的结合

[0182] 将1000mg (10.0mL浓度为100.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型15C多糖和15.0mL

CDAP (100mg/mL 乙腈溶液 (w/v)) 按 1.0:1.5 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌 1min。用 24.0mL 0.2M 三乙胺将多糖溶液的 pH 调节至 9.0, 在室温 (RT) 下搅拌 1min。将 1000mg CRM<sub>197</sub> (66.6mL 浓度为 15.0mg/mL) 按 1.0:1.0 (PnPs:CRM) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0183] 用 2.8mL 0.2M 三乙胺将反应的 pH 调节到 9.0, 在室温下搅拌反应 3-5 小时, 然后加入过量浓度的甘氨酸 (100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时, 使用 SEC-HPLC 监测反应的结合动力学 (图 7A)。

[0184] 用 100kDa MWC0 TFF 膜, 将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用 SEC-MALLS 法、葱酮法对各级分进行分析, 将含有结合物的级分汇集, 用 0.2 $\mu$ m 过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为 10490kDa。

[0185] f、肺炎球菌血清型 15C 荚膜多糖与 PsaA 的结合

[0186] 将 1000mg (100.0mL 浓度为 10.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型 15C 多糖和 15.0mL CDAP (100mg/mL 乙腈溶液 (w/v)) 按 1.0:1.5 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌 1min。用 24.0mL 0.2M 三乙胺将多糖溶液的 pH 调节至 9.0, 在室温 (RT) 下搅拌 1min。将 1000mg PsaA (66.6mL 浓度为 15.0mg/mL) 按 1.0:1.0 (PnPs:PsaA) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0187] 用 2.8mL 0.2M 三乙胺将反应的 pH 调节到 9.0, 在室温下搅拌反应 3-5 小时, 然后加入过量浓度的甘氨酸 (100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时, 使用 SEC-HPLC 监测反应的结合动力学 (图 7B)。

[0188] 用 100kDa MWC0 TFF 膜, 将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用 SEC-MALLS 法、葱酮法对各级分进行分析, 将含有结合物的级分汇集, 用 0.2 $\mu$ m 过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为 8719kDa。

[0189] g、肺炎球菌血清型 35B 荚膜多糖与 CRM<sub>197</sub> 的结合

[0190] 将 1000mg (100.0mL 浓度为 10.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型 35B 多糖和 5.0mL CDAP (100mg/mL 乙腈溶液 (w/v)) 按 1.0:0.5 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌 1min。用 5.0mL 0.2M 三乙胺将多糖溶液的 pH 调节至 9.0, 在室温 (RT) 下搅拌 1min。将 1000mg CRM<sub>197</sub> (66.7mL 浓度为 15.0mg/mL) 按 1.0:1.0 (PnPs:CRM) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0191] 用 1.6mL 0.2M 三乙胺将反应的 pH 调节到 9.0, 在室温下搅拌反应 3-5 小时, 然后加入过量浓度的甘氨酸 (100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时, 使用 SEC-HPLC 监测反应的结合动力学 (图 8A)。

[0192] 用 100kDa MWC0 TFF 膜, 将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用 SEC-MALLS 法、葱酮法对各级分进行分析, 将含有结合物的级分汇集, 用 0.2 $\mu$ m 过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为 8572kDa。

[0193] h、肺炎球菌血清型 35B 荚膜多糖与 PsaA 的结合

[0194] 将 1000mg (142.8mL 浓度为 7.0mg/mL) 经机械减小尺寸的血清型 35B 多糖和 6.0mL CDAP (100mg/mL 乙腈溶液 (w/v)) 按 1.0:0.6 (PS:CDAP) 的比例在玻璃瓶中混合并搅拌 1min。用 7.0mL 0.2M 三乙胺将多糖溶液的 pH 调节至 9.0, 在室温 (RT) 下搅拌 1min。将 1000mg PsaA (66.6mL 浓度为 15.0mg/mL) 按 1.0:1.0 (PnPs:PsaA) 的比例缓慢加入活化的多糖中。

[0195] 用 2.2mL 0.2M 三乙胺将反应体系的 pH 调节到 9.0, 在室温下搅拌反应 3-5 小时, 然后加入过量浓度的甘氨酸 (100mM) 猝灭反应。在反应每过一小时, 使用 SEC-HPLC 监测反应的结合动力学 (图 8B)。

[0196] 用100kDa MWC0 TFF膜,将反应混合物进行渗滤和浓缩。浓缩物用尺寸排阻色谱进行纯化。采用SEC-MALLS法、葱酮法对各级分进行分析,将含有结合物的级分汇集,用0.2 $\mu$ m过滤器进行无菌过滤。所得结合物的平均分子量为6944kDa。

[0197] 实施例4:肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质结合疫苗的配制

[0198] 将多价结合疫苗配制为0.5mL剂量,其中包括肺炎球菌血清型2、15A、15C和35B多糖各2.2 $\mu$ g,所述多糖与~8-10 $\mu$ g实施例3中制备的CRM<sub>197</sub>蛋白质结合。按相当于每0.5mL剂量0.5mg Al<sup>3+</sup>的量,将所有结合物吸附到磷酸铝凝胶上。将0.9%W/V盐溶液用作制剂的稀释剂和载体,用1N盐酸将最终制剂pH调节至pH 6。为了调节pH后能够有效吸附,在恒定搅拌下将制剂混合2小时。混合2小时后,将配制的混合物按每瓶0.58mL的填充体积无菌填充至3mL无菌非硅化小瓶中,用无菌13mm橡胶塞封闭,并用13mm无菌粉色翻盖铝密封盖密封,然后对填充小瓶进行光学检查和标记。从批次中随机抽取一些小瓶,对其外观、pH、渗透压、总多糖(total poly)和蛋白质含量( $\mu$ g/SHD)、吸附率%、铝含量(mg/SHD)进行分析。

[0199] 实施例5:肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质结合疫苗的配制

[0200] 将多价结合疫苗配制为0.5mL剂量,其中包括肺炎球菌血清型2、15A、15C和35B多糖各2.2 $\mu$ g,所述多糖与~8-10 $\mu$ g实施例3中制备的PsaA载体蛋白结合。将所有结合物吸附到铝上。按相当于每0.5mL剂量0.5mg Al<sup>3+</sup>的量,将所有结合物吸附到磷酸铝凝胶上。将0.9%W/V盐溶液用作制剂的稀释剂和载体,用1N盐酸将最终制剂pH调节至pH 6。为了调节pH后能够有效吸附,在恒定搅拌下将制剂混合2小时。混合2小时后,将配制的混合物按每瓶0.58mL的填充体积无菌填充至3mL无菌非硅化小瓶中,用无菌13mm橡胶塞封闭,并用13mm无菌粉色翻盖铝密封盖密封,然后对填充小瓶进行光学检查和标记。从批次中随机抽取一些小瓶,对其外观、pH、渗透压、总多糖和蛋白质含量( $\mu$ g/SHD)、吸附率%、铝含量(mg/SHD)进行分析。

[0201] 实施例5:肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质结合疫苗的配制

[0202] 将24价结合疫苗配制为0.5mL剂量,其中包括与25至40 $\mu$ g CRM<sub>197</sub>结合的肺炎球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23F和33F多糖各2.2 $\mu$ g,但6B 4.4 $\mu$ g,和与25至40 $\mu$ g PsaA结合的肺炎球菌血清型3、6A、8、10A、11A、12F、15A、23A、23B、24F和35B多糖各2.2 $\mu$ g。按相当于每0.5mL剂量0.5mg Al<sup>3+</sup>的量,将所有结合物吸附到磷酸铝凝胶上。将0.9%W/V盐溶液用作制剂的稀释剂和载体,用1N盐酸将最终制剂pH调节至pH 6。为了调节pH后能够有效吸附,在恒定搅拌下将制剂混合2小时。混合2小时后,将配制的混合物按每瓶0.58mL的填充体积无菌填充至3mL无菌非硅化小瓶中,用无菌13mm橡胶塞封闭,并用13mm无菌粉色翻盖铝密封盖密封,然后对填充小瓶进行光学检查和标记。从批次中随机抽取一些小瓶,对其外观、pH、渗透压、总多糖和蛋白质含量( $\mu$ g/SHD)、吸附率%、铝含量(mg/SHD)进行分析。

[0203] 实施例6:用0.5mL剂量免疫兔子

[0204] A) 免疫与ELISA

[0205] 在封闭的设施中培育和饲养1.5至2kg的健康兔子。用实施例4和实施例5所述的多价PCV以0.5mL单剂量免疫兔子。每组由7只兔子组成,在第1、15、29天接用制剂免疫。在第0天(免疫前)、第15天(试验抽血)和第36天(最终抽血)采集血样。采用ELISA法对第0天(PD1)、第40天(PD3)采集的兔子血清进行分析,分析其血清型特异性免疫反应。ELISA按WHO建议的方案进行。ELISA按WHO建议的方案进行。简单来说,Maxisorp™ ELISA平板涂有给定

血清型的PnCPS。ELISA按WHO建议的方案进行。简单来说,Maxisorp™ ELISA平板涂有给定血清型的PnCPS (使用PBS按1 $\mu$ g/50 $\mu$ L加入每孔;无菌无内毒素,含0.02%叠氮化钠)。将平板放入有湿润纸巾的箱子中加湿,并在37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下培养5小时,然后将平板在5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C下储存待用。

[0206] 将试验血清预先吸附到CWPS-Multi™上,以消除细胞壁多糖引起的背景反应。为此,用998 $\mu$ L预吸附溶液(1mL-在999 $\mu$ L 10% SuperBlock™的PBST溶液中加入1 $\mu$ L CWPS Multi™)稀释2 $\mu$ L试验血清和阳性对照血清,得到1:500的最终稀释度。将稀释样品在室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)下连续振荡培养1小时。通过轻弹平板去除未结合的PnCPS,并通过加入200 $\mu$ L阻断剂(20% SuperBlock™的PBS溶液)阻断孔中的游离位点。将平板在室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)下不振荡下培养1小时。

[0207] B) 添加试验样品和对照品

[0208] 将50 $\mu$ L稀释剂(10% SuperBlock™的PBST溶液)加至除A1至A12以外的所有孔中。然后按100 $\mu$ L/孔将预吸附试验血清样品加至A1至A10中,将对照血清样品加至A11和A12中。通过从第1孔转移50 $\mu$ L到第2孔,依此类推,即从A1-A10转移到H1-H10,从而对试验样品进行两倍连续稀释。类似地,将对照样品(007SP)从A11和12向E11和E12作连续稀释。F11和F12至H11和H12不作稀释设置为空白。将平板在室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)下不振荡下培养2小时。培养步骤后,丢弃内容物,用PBST(约250 $\mu$ L/孔)手动或用洗板机洗涤平板三次。

[0209] C) 添加第一抗体

[0210] 按50 $\mu$ L/孔将重组蛋白A/G过氧化物酶(使用10% SuperBlock™ PBST溶液稀释1:20000)加至所有孔中,将平板在室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)下振荡下培养1小时。然后,用PBST(250 $\mu$ L/孔)手动或用洗板机洗涤平板三次。

[0211] D) 显色与读数

[0212] 按50 $\mu$ L/孔加入TMB底物,在室温(25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)下不振荡下培养15分钟,产生显色反应。按50 $\mu$ L/孔加入1.25M硫酸终止反应。测定450nm处的OD值。

[0213] E) 滴度估计

[0214] 将免疫动物的抗体滴度作为稀释因数的倒数。所显示OD<sub>450nm</sub>是免疫前滴度(约0.2)的两倍的最高稀释度报告为滴度。将血清抗体对每种血清型的滴度作图,并与不同处理组进行比较。

[0215] F) 兔子的免疫反应

[0216] 用实施例5中所述的制剂免疫兔子。研究设计由两组组成,每组7只兔子。用三剂量配制疫苗对动物进行免疫。

[0217] 每隔一定时间采集免疫兔子的血清。用ELISA估计血清型特异性IgG滴度水平,其改编自WHO建议的用于评估人血清中血清抗体滴度的ELISA。抗体滴度估计为所产生OD<sub>450nm</sub>值高于临界值的血清最大稀释度。用免疫前动物的IgG滴度值计算血清IgG滴度的几何平均增长倍数(GMFR)。在施用上述24价PCV制剂后,发现动物具有抗疫苗中结合物的每种血清型多糖的抗体,因此这些疫苗具有免疫原性。

[0218] 如(图9)所示,滴度估计为所产生ELISA OD<sub>450nm</sub>值高于临界值(在免疫前血清中观察到的2 $\times$ OD<sub>450nm</sub>;OD值约为0.1)的最大血清稀释度。将每种血清型的几何平均增长倍数(GMFR)作图。将3剂量免疫后(3剂后,Post dose 3)获得的血清用于评估免疫原性。实心黑

色条表示与CRM197结合的肺炎球菌多糖,而开放白色条表示与PsaA结合的肺炎球菌多糖。

[0219] 通过前文,应当理解,出于举例说明的目的,本文描述了本发明的具体实施例,但是在不偏离本发明范围的情况下可以进行各种修改。

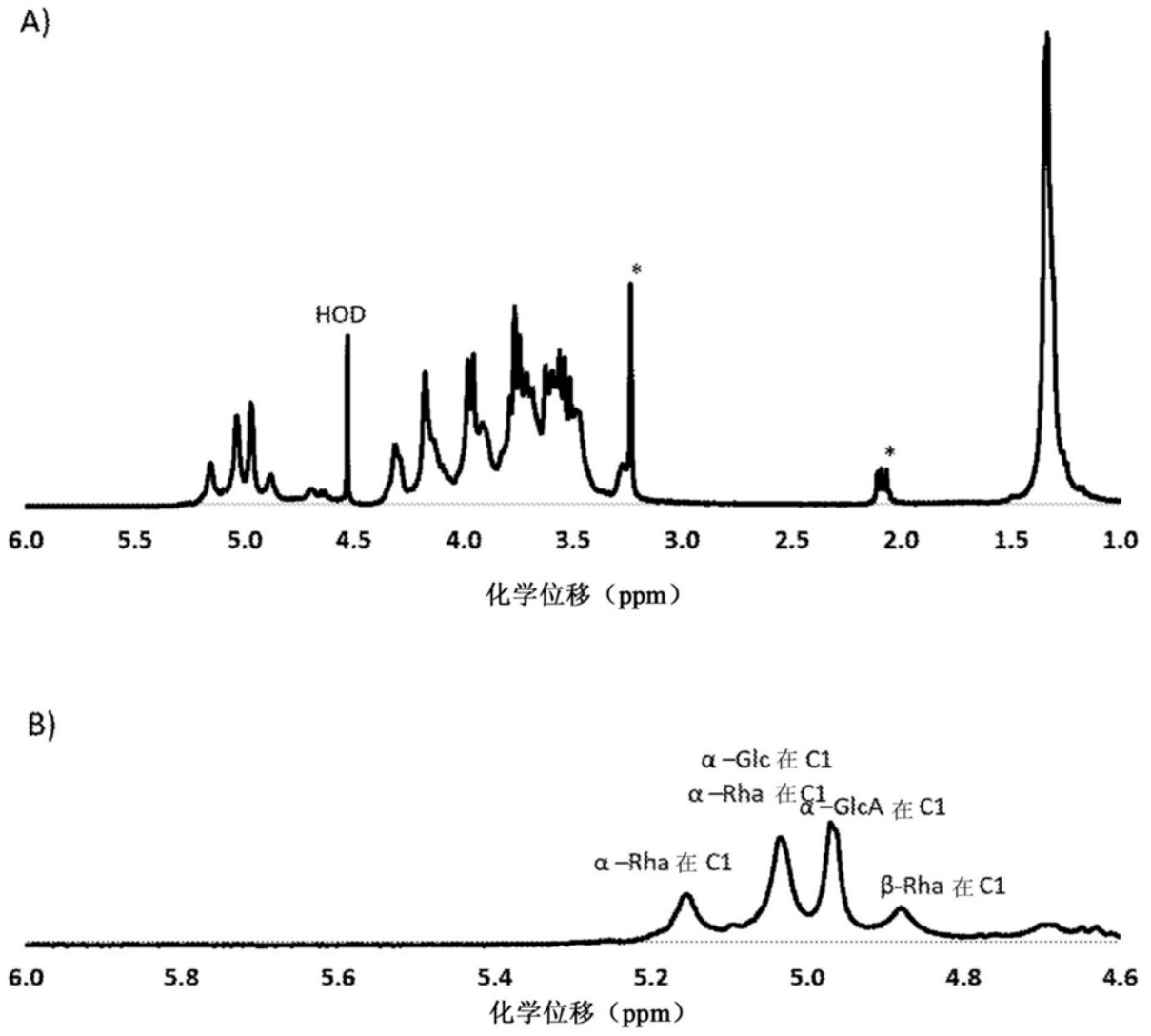


图1

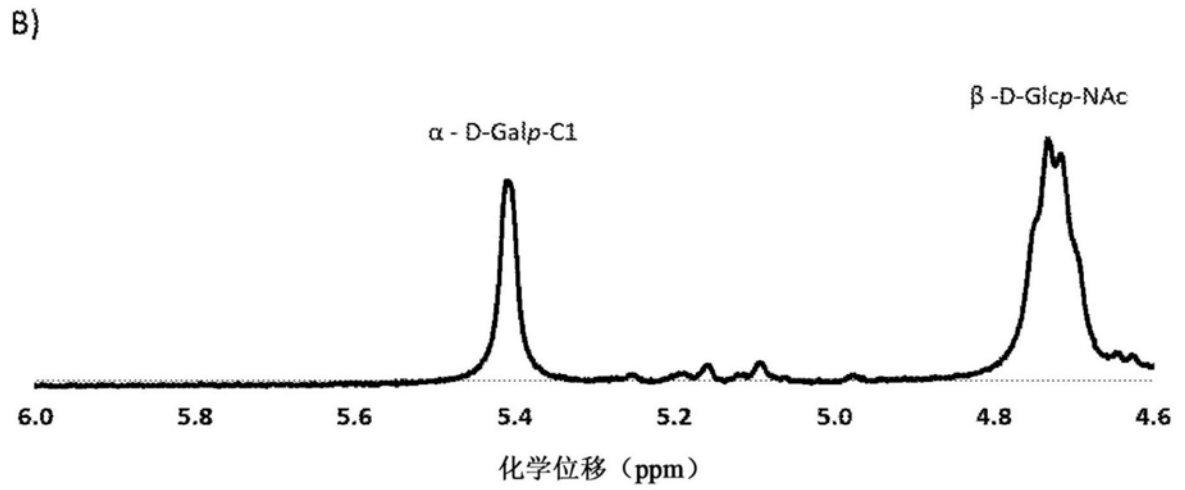
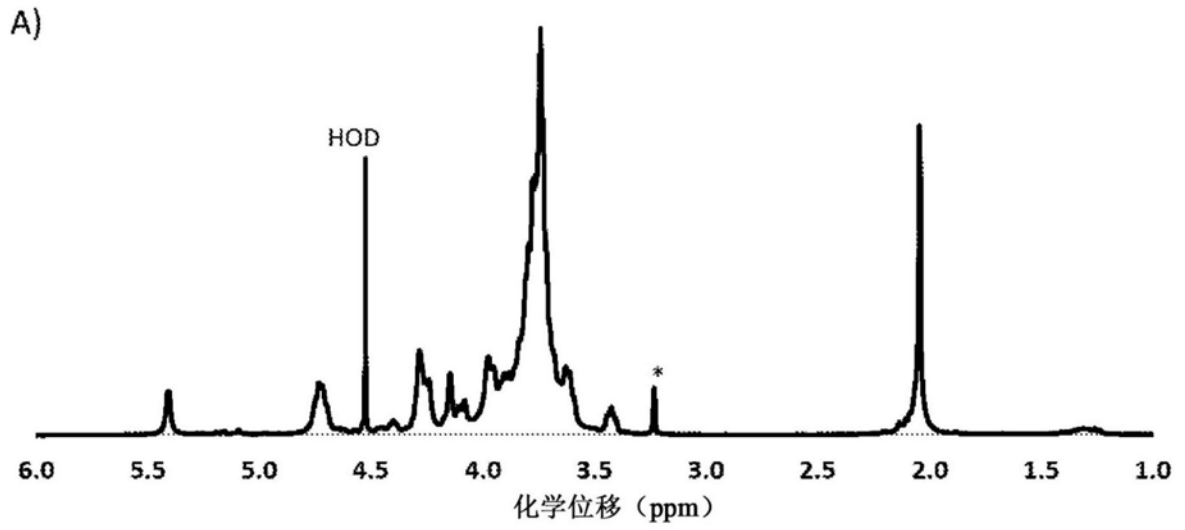


图2

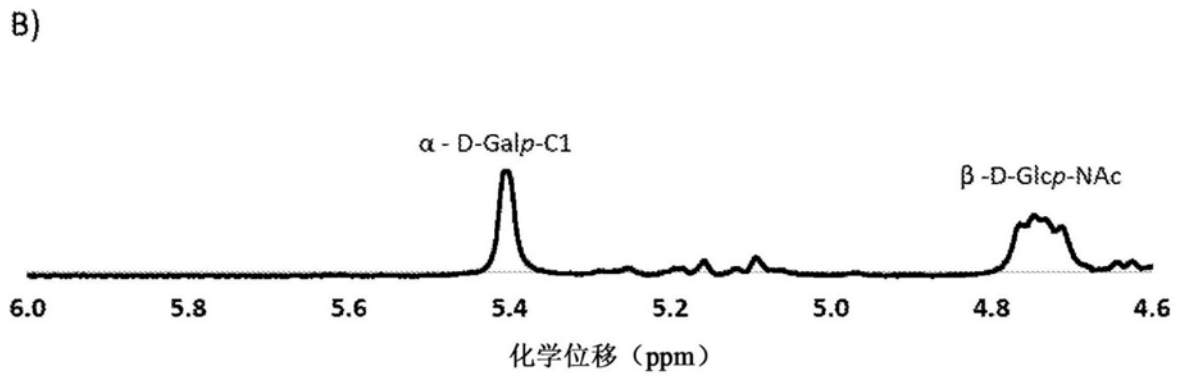
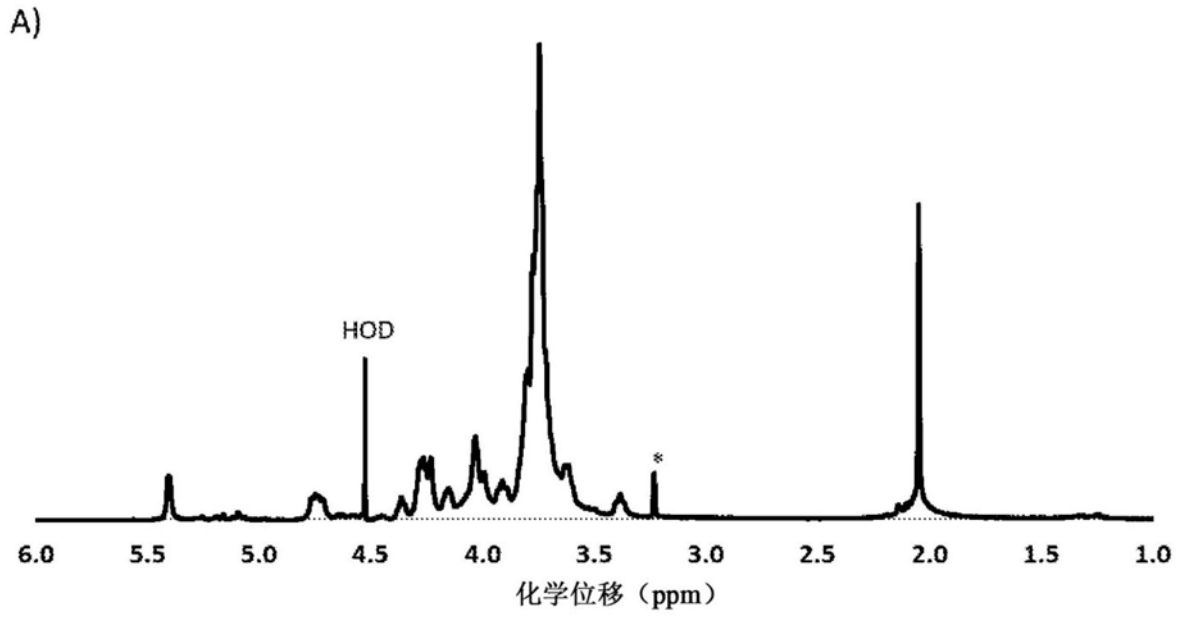
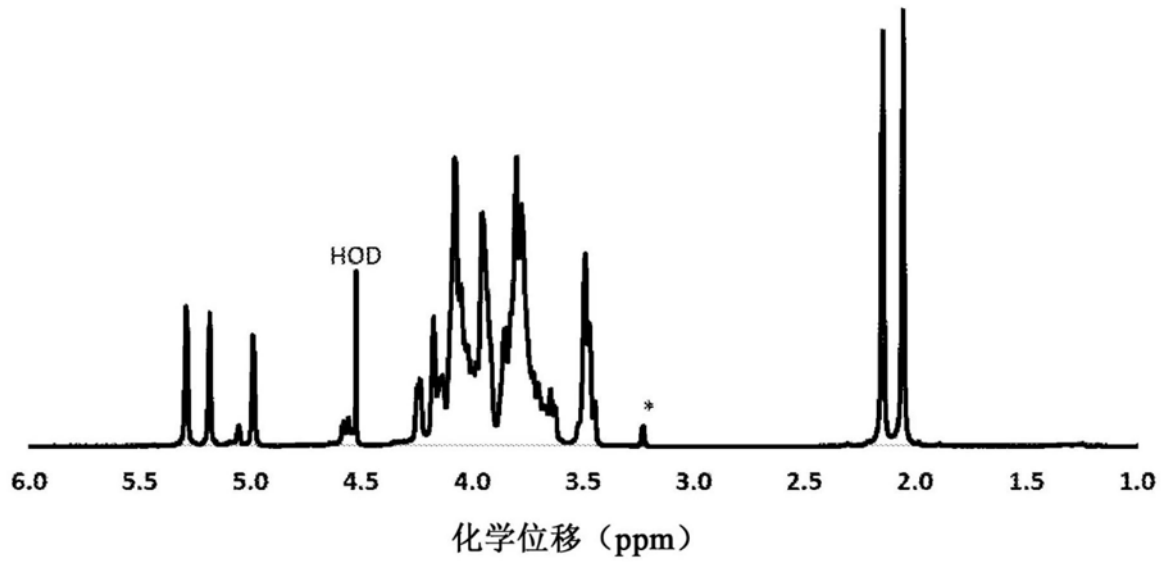


图3

A)



B)

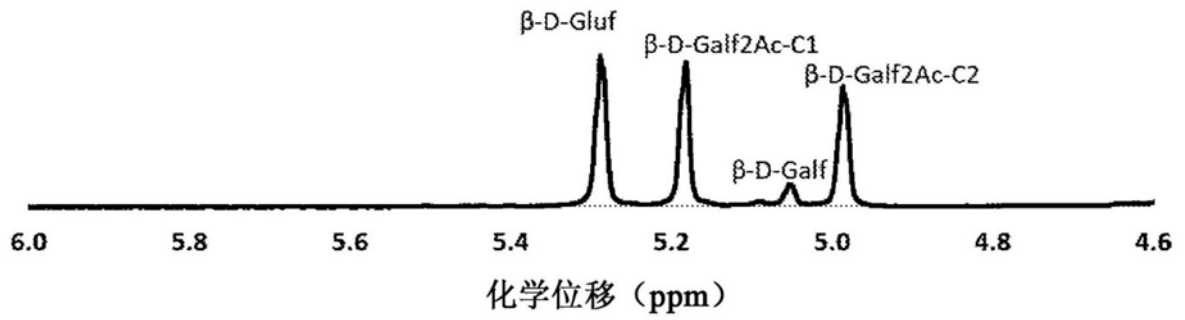
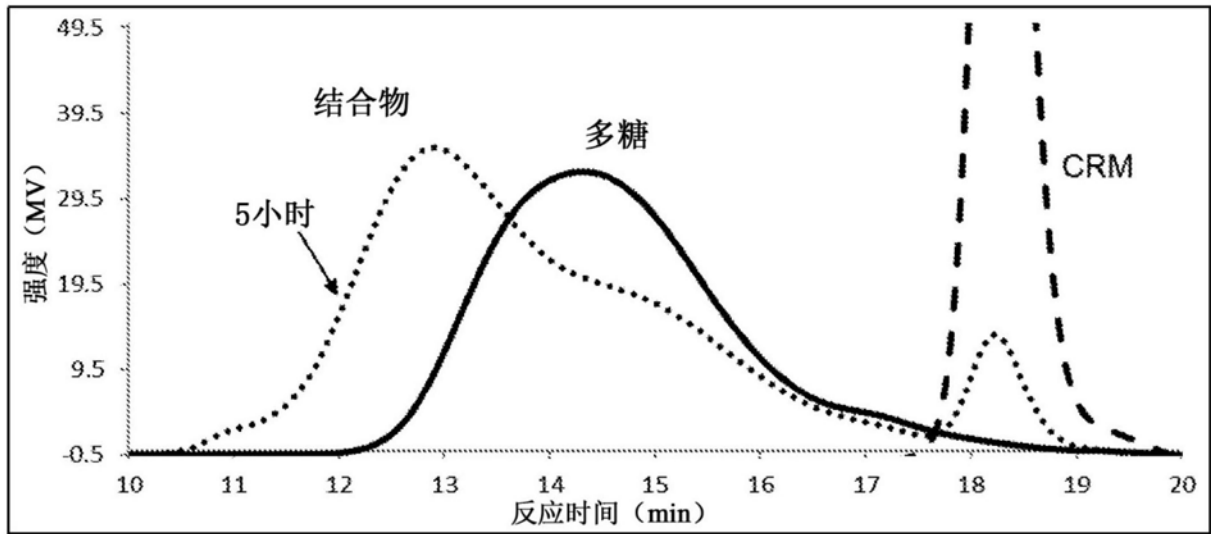


图4

(A)



(B)

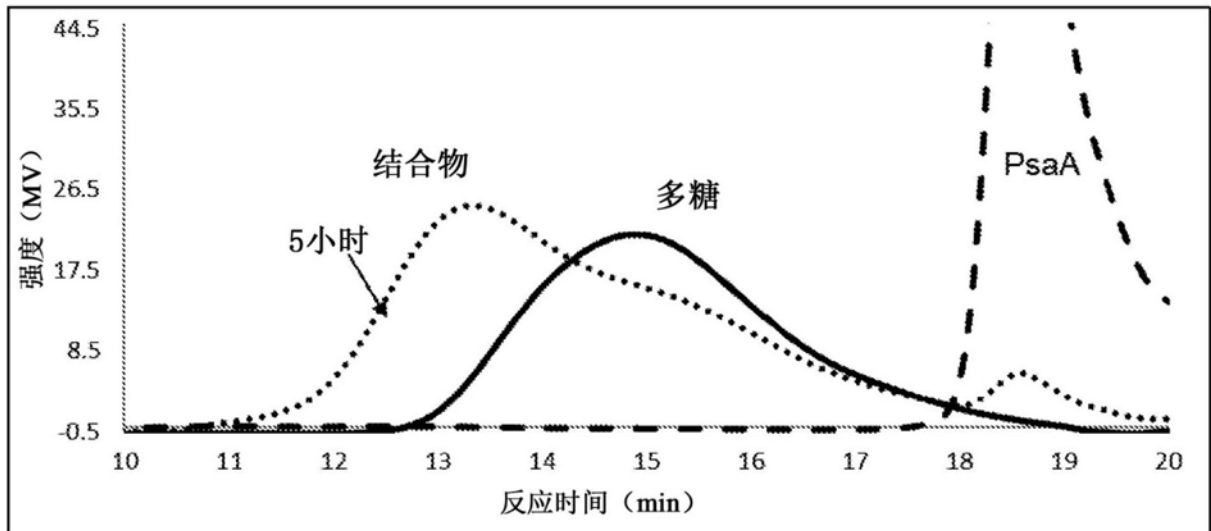


图5

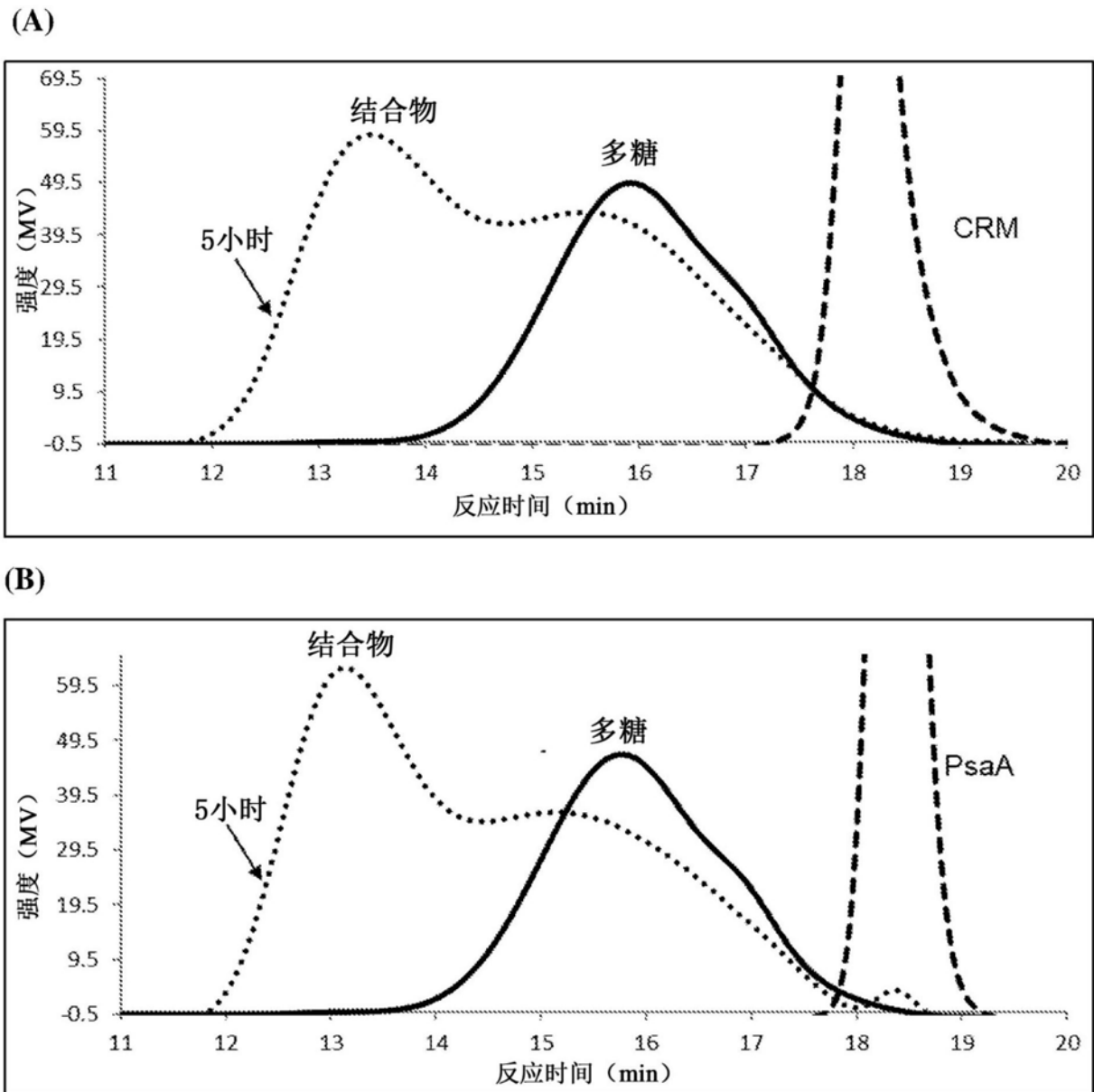
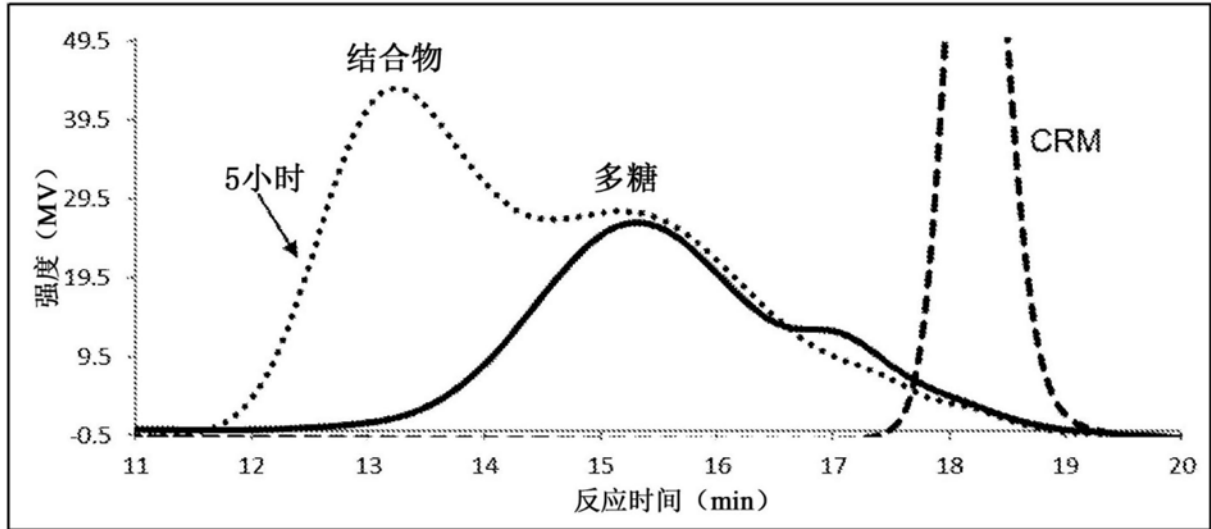


图6

(A)



(B)

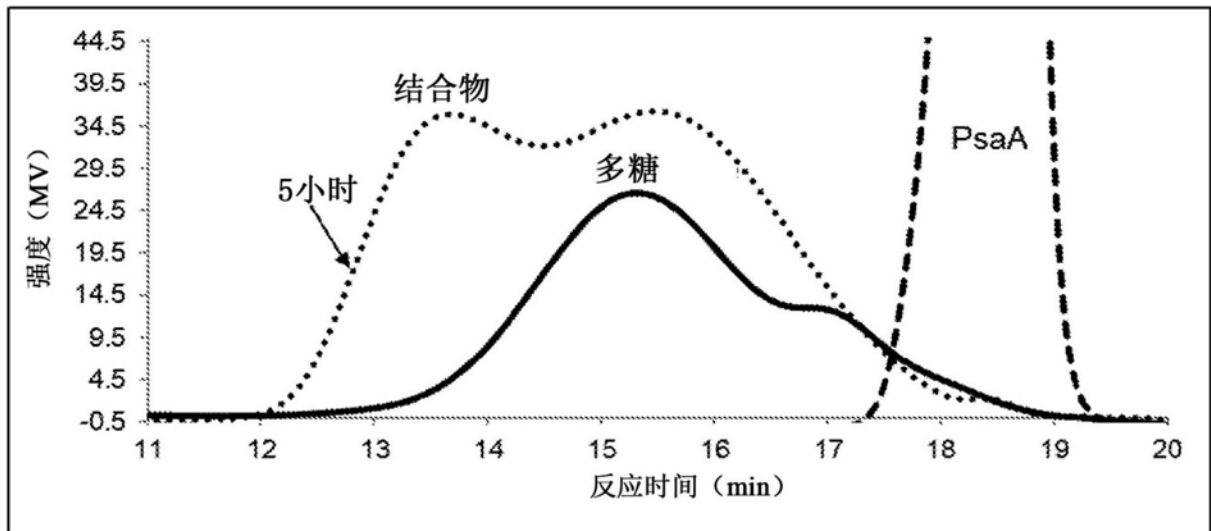
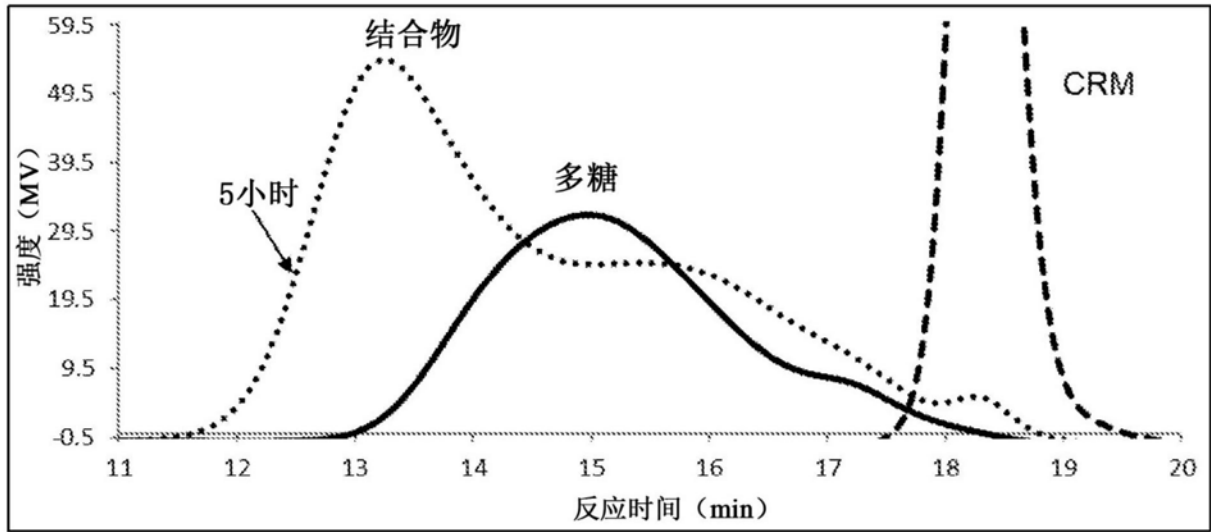


图7

(A)



(B)

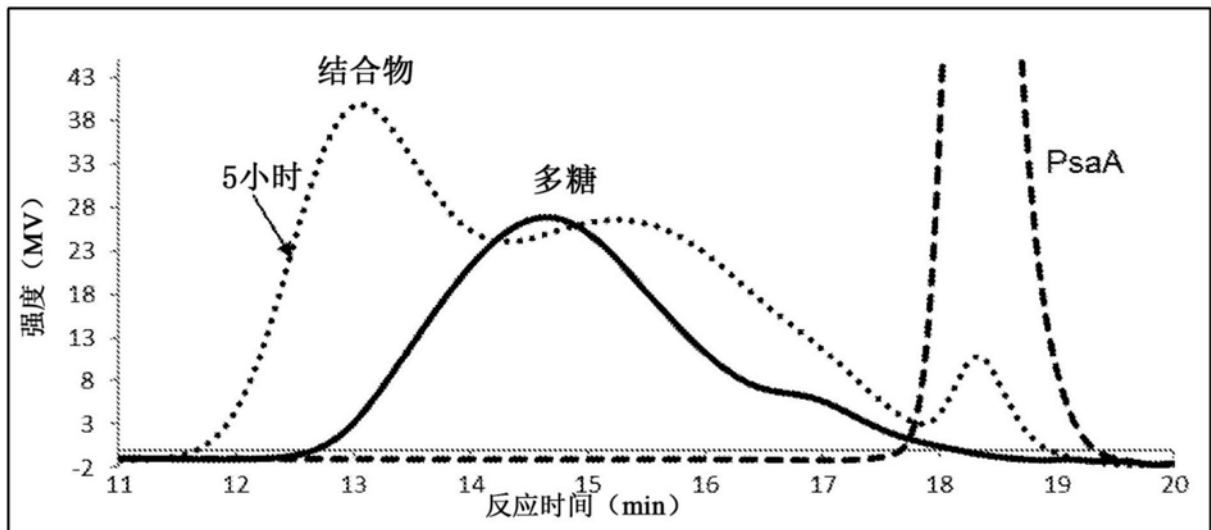


图8

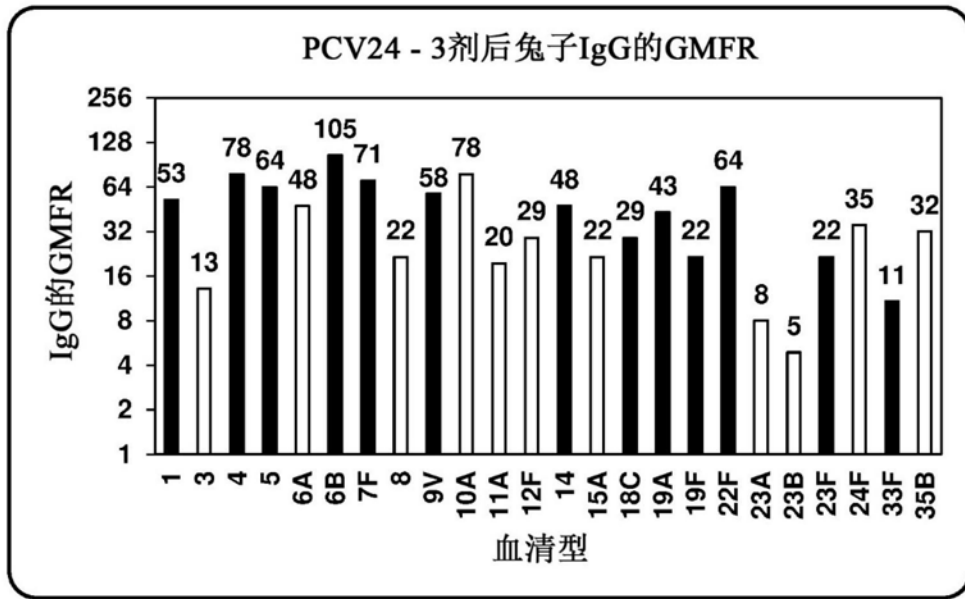


图9