(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112384240 B
(45)授权公告日 2024.10.29

(21)申请号 201980029219.5
(22)申请日 2019.05.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112384240 A
(43)申请公布日 2021.02.19
(30)优先权数据
1807303.1 2018.05.03 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/061266 2019.05.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/211386 EN 2019.11.07
(73)专利权人 伦敦卫生及热带医学学院
地址 英国伦敦吉宝街
专利权人 UCL 商业有限公司
(72)发明人 B·雷恩 J·布朗 J·卡库一
(74)专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204
专利代理师 郁旦蓉
(51)Int.Cl.
A61K 39/09(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
C07K 14/315(2006.01)
C08B 37/00(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017216286 A1,2017.12.21
Jeremy S. Brown等.Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic Streptococcus pneumoniae infection.Infect Immun.2001,第69卷(第11期),摘要,第6704页右栏第2段.
审查员 鲁众阳

权利要求书1页 说明书22页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

糖缀合物疫苗

(57)摘要

本发明涉及肺炎链球菌蛋白抗原NanA、PiuA以及Sp0148作为免疫原性肺炎链球菌荚膜多糖的载体的用途。例如,本发明对糖缀合物疫苗产生针对多种荚膜血清型的保护性免疫应答能够提供帮助。本发明提供了糖缀合物、疫苗组合物以及其制造和使用方法。

CN 112384240 B

1.一种糖缀合物,其特征在于,包括:

被肺炎链球菌荚膜多糖糖基化的肺炎链球菌蛋白质抗原,

其中,所述蛋白质抗原为PiuA,

PiuA蛋白质抗原包含与SEQ ID NO:3的100%的序列相同的氨基酸序列,

所述荚膜多糖是血清型4荚膜多糖。

2.根据权利要求1所述的糖缀合物,其特征在于:

其中,所述蛋白质抗原包含异源糖基化序列。

3.根据权利要求2所述的糖缀合物,其特征在于:

其中,所述异源糖基化序列包含序列D / E-Y-N-X-S / T,

Y和X是除P外的任何氨基酸。

4.根据权利要求2或3所述的糖缀合物,其特征在于:

其中,所述蛋白质抗原包括两个或两个以上的所述异源糖基化序列。

5.根据权利要求2或3所述的糖缀合物,其特征在于:

其中,所述蛋白质抗原包含与SEQ ID NO:2的序列相同的氨基酸序列。

6. 一种疫苗组合物,其特征在于,包括:

权利要求1-5任一项所述的一种或多种的糖缀合物;以及

可药用的赋形剂。

7.根据权利要求6所述的疫苗组合物,其特征在于,还包括:

佐剂。

8.一种制造疫苗组合物的方法,其特征在于,包括:

将根据权利要求1-5中任一项的一种或多种糖缀合物与可药用的赋形剂以及任选的佐剂相混合。

9.一种根据权利要求1-5任一项所述的糖缀合物或根据权利要求6或7所述的疫苗组合物在制备用于治疗有需要的个体的肺炎链球菌感染的药物中的用途。

糖缀合物疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种糖缀合物疫苗及其制造方法。

背景技术

[0002] 肺炎链球菌(肺炎球菌)是一种专性的人类病原体,是肺炎、败血病以及脑膜炎最常见的病因之一,因此肺炎链球菌(肺炎球菌)在全球范围内造成了相当大的发病率以及死亡率。肺炎链球菌脑膜炎由于其特别在儿童和老年人中的高致死率以及所导致的神经系统后遗症带来的生活质量下降而受到了特别的关注。

[0003] 肺炎球菌结合疫苗(PCV)的引入对减少肺炎链球菌感染(包括由疫苗血清型引起的脑膜炎)非常有效(1-8)。例如,儿童接种了PCV疫苗,而没有接种的成年人群体可以因为群体免疫,使疫苗血清型导致的肺炎链球菌感染大大地减少了(1、2、4、13)。但是,现有技术的PCV具有三个主要的缺点。首先,主要引起疾病的血清型(STs)在地理上以及年龄上都有所不同,但现有的PCV的配方是固定且不容易被改变的。因此,现有的PCV对不同群体/或不同疾病中的肺炎链球菌的发病率会有不同的影响(9)。例如,肺炎链球菌脑膜炎持续在全世界范围内导致大量的发病以及死亡,特别是在撒哈拉以南的非洲,那里的肺炎链球菌脑膜炎每年可影响每10万名儿童中的98名儿童(38)。其次,由于存在超过90种肺炎链球菌荚膜血清型,而PCV仅通过其中的13种阻止鼻咽菌落定殖(细菌通常的生态位),因此PCV的引入与非疫苗血清型的大范围扩张有关,包括在脑膜炎病例中(5、7、8)。细菌的自然繁殖能力预示了肺炎链球菌荚膜血清型的数量可能会进一步增加,而随着非疫苗血清型的增加,疾病的发病率也会随之增加(10-13)。第三,PCV疫苗的价格昂贵,限制了其在疾病负担最重的中低收入国家(LMIC)中的使用,并阻碍了该疫苗在成人中的成本效益(14、15)。因此需要一种可以预防儿童和成人的疾病,且能够灵活地适应肺炎链球菌生态学的变化并提供一些形式的交叉血清型保护的低成本肺炎链球菌疫苗,这仍然是全球范围内待解决的当务之急。

[0004] 当前PCV的制造不仅价格昂贵且耗时,需要进行单个荚膜多糖的纯化以及化学偶联至蛋白载体的多步过程。Wren小组率先提出了另一种方法,称为蛋白质糖蛋白偶联技术(PGCT),它使用弯曲杆菌寡糖基转移酶CjPglB,在大肠杆菌中产生重组蛋白/聚糖结构(16、17)。PGCT需要在大肠杆菌中共表达目标聚糖基因,编码带有附加“糖标签”序列以确保蛋白质/聚糖缀合的载体蛋白抗原的基因以及偶联酶CjPglB(18)。疫苗产品是通过一步法Ni^{2+}亲和色谱法从大肠杆菌分批培养物中生产的,这种方法可以很容易地扩大生产规模。此外,PGCT可以使PCV中包含的血清型更为灵活,从而可以针对不同目标人群和地理位置的优势血清型量身定制疫苗,并根据肺炎链球菌生态学的变化快速重新配制。

[0005] PGCT的另一个优点是,不同的蛋白质抗原可以很容易地与荚膜抗原结合。自从1990年将用于b型流感嗜血杆菌的化学缀合疫苗首次商业化以来,化学缀合疫苗的基础科学几乎没有得到任何发展。到目前为止,糖缀合物疫苗配方中仅有四种主要的载体蛋白得到了许可:破伤风梭状芽胞杆菌的失活毒素、白喉棒状杆菌(CRM197)、流感嗜血杆菌的表面表达蛋白(蛋白D)以及脑膜炎奈瑟球菌血清群B(19,20)。多种蛋白质的免疫潜能都尚未被

测试,抗体对糖缀合物的聚糖成分的反应效率在不同的肽链之间还有所不同(21、22)。鉴别其他蛋白质能否与聚糖抗原融合时能刺激良好抗体反应有助于糖缀合物疫苗的开发。使用肺炎链球菌蛋白抗体作为载体蛋白可以提供另一个优点,就是可以诱发该蛋白的适应性反映。上文已描述了多种肺炎链球菌蛋白抗原,这些抗原作为疫苗时,可以通过可通过抗体介导的调理吞噬作用(23)、抑制细菌蛋白功能(24,25)以及刺激Th17细胞应答(26-28)在动物模型中产生保护性免疫,这其中的一些抗原已经进行了人体的一期试验。保护性肺炎链球菌蛋白抗原可用作PGCT方法的载体蛋白,以制备PCV,该PCV可以引发由对蛋白成分的适应性免疫介导的血清型独立免疫。这种疫苗在预防脑膜炎方面也可能具有理论上的优势,因为针对所选表面蛋白抗原的抗体可以阻止血脑屏障的渗透(29-31)。

[0006] PCGT已被用来生产针对土拉弗朗西斯菌的有效原型疫苗(32),而痢疾杆菌PGCT疫苗最近已完成一期试验(33)。最近,PGCT已被证实可用于制备具有四种包括血清型4在内的不同类型的肺炎链球菌荚膜血清型的糖缀合物(17)。然而,现在仍没有确定使用PGCT制造的PCV是否可以诱导保护性抗荚膜反应,并且也不确定是否具有与现有商用PCV相似的功效。此外,没有关于肺炎链球菌蛋白抗原是否可以作为荚膜抗原的有效载体蛋白并且还能够刺激保护性反应的数据。

[0007] 总结

[0008] 发明人认识到,肺炎链球菌蛋白抗原可以用作糖缀合物疫苗中的免疫原性肺炎链球菌荚膜多糖的载体,其能够产生针对多种荚膜血清型的保护性免疫应答,本发明采用了如下技术方案:

[0009] 本发明第一层面提供了一种糖蛋白,其包含被肺炎链球菌荚膜多糖糖基化的肺炎链球菌蛋白抗原。

[0010] 优选的肺炎链球菌蛋白抗原包括NanA,PiuA和Sp0148,最优选为PiuA。

[0011] 本发明第二层面提供了包含一种或多种上述第一层面的糖蛋白的疫苗组合物。

[0012] 本发明第三层面提供了一种治疗肺炎链球菌感染的方法,包括:向有需要的个体施用第一层面的糖蛋白或第二层面的疫苗组合物。

[0013] 本发明的第四层面提供了用于治疗个体的肺炎链球菌感染的方法中的第一层面的糖蛋白或第二层面的疫苗组合物。

[0014] 根据第三层面和第四层面的肺炎链球菌感染的治疗可以包括预防性或保护性治疗。

[0015] 以下详细描述本发明的其他层面和实施例。

[0016] 附图简要说明

[0017] 图1显示了用重组糖蛋白接种疫苗可以产生针对肺炎球菌荚膜和载体蛋白的抗体,通过ELISA测量从接种重组糖蛋白(实心圆)或同源未糖基化抗原(空心方块)的小鼠(n=8)中获得的抗血清中的抗体水平。图1A-E显示了使用包被有纯化的4型荚膜多糖的板测量的抗荚膜多糖抗体,图中分别是来自Prevnar-13(实心圆)以及假疫苗接种(空心正方形)动物的抗血清的对照。图1F-H显示了使用单克隆抗His捕获抗体和重组的未糖基化的载体蛋白,通过夹心ELISA测量从接种了联合疫苗(Combo)(Sp4)(实心圆)或联合疫苗(空心正方形)的小鼠中抗载体蛋白的抗体。数据显示为重复试验的平均±SEM值。

[0018] 图2显示了用重组糖蛋白进行疫苗接种可产生识别同源和异源肺炎球菌分离株的

抗体。使用来自糖基化和未糖基化疫苗组的混合抗血清,通过全细胞ELISA测量抗ST4(图2A)和抗ST2(图2B)抗体。数据为来自三种不同培养物的平均值±SEM。*P<0.05vs PBS,#P<0.05用单向方差分析法以及Bonferroni后测试法进行蛋白质以及糖蛋白的检测。图2C显示了使用来自糖基化和未糖基化疫苗组的混合抗血清,对来自ST4和ST2过夜培养物的浓缩裂解物进行免疫印迹分析。分子量标记以千道尔顿给出。

[0019] 图3显示了在链球菌种上抗体沉积的流式细胞仪分析。图3A显示了这些抗体沉积在糖化(红色阴影)和非糖化(灰色阴影)疫苗组的10%抗血清中的表达肺炎链球菌血清型4荚膜的,被称为葡萄球菌(Sp4)的链球菌菌株上的流式细胞仪直方图示例,以假接种的血清(虚线)作为对照。图3B显示了使用流式细胞术分析在来自糖基化(实心圆)和未糖基化(空心圆)疫苗组的10%鼠抗血清(n=8)中的肺炎链球菌(Sp4)上测量的抗体沉积。红点表示高滴度样品中抗血清浓度降低(5%相对于10%)的反应。*p<0.05使用Kruskal-Wallis以及Dunn后期测试法进行检验(vs PBS)。图3C显示了抗体沉积在糖基化疫苗组的2%(红色阴影),0.2%(灰色阴影)和0.02%(虚线)抗血清中的TIGR4肺炎链球菌菌株上的流式细胞仪直方图的示例。图3D显示了在用糖基化或非糖基化疫苗接种的小鼠的合并抗血清中抗体在TIGR4上的沉积。使用与递减浓度的Prevnar-13抗血清孵育以产生标准曲线的细菌确定沉积滴定度。结果显示为重复试验的平均±SEM值。

[0020] 图4显示了抗体在非血清型4肺炎球菌上的沉积。图4A-D显示了在接种了糖基化NanA(灰色阴影)、Sp0148(红色阴影)或PiuA(蓝色阴影)的小鼠或正常小鼠血清(虚线)的小鼠中,在1%混合抗血清中的同源和异源肺炎球菌分离株上的代表性直方图和抗体沉积。黑色柱代表PE+细菌的百分比,灰色柱代表阳性群体的gMFI。设置门(gates)以使NMS反应中5-10%的事件(events)为PE+,以解释自发荧光中菌株的特异性差异。数据显示为技术重复样本的平均值±SEM。图4E显示了使用来自用组合疫苗(绿色通道)和肺炎球菌全能血清(红色通道)接种的小鼠的抗血清对同源和异源肺炎球菌分离株的免疫荧光染色。

[0021] 图5显示了抗血清样品对肺炎链球菌与人体中性粒细胞相互作用的影响。图5A显示了用糖基化(红色阴影)或未糖基化(灰色阴影)疫苗组和5%小兔补体在20%抗血清中调理后,与FAM-SE标记的TIGR4孵育的新鲜人体中性粒细胞的流式细胞术直方图示例。假接种的血清(虚线)作为对照。图5B显示了当来自糖基化(实心圆)或未糖基化(空心)疫苗组的20%抗血清(n=8)和5%小兔补体中调理时,新鲜人体中性粒细胞与TIGR4的缔合百分比。来自接种了Prevnar-13(实心圆)以及假接种疫苗(空心方块)的动物的抗血清作为对照。*p<0.05使用Kruskal-Wallis以及Dunn后期测试法进行检验(vs PBS)。图5E显示了在来自糖基化(实心圆)或未糖基化(空心正方形)疫苗组的20%抗血清(n=6)和5%小兔补体中调理后,新鲜人中性粒细胞与非4型肺炎球菌的缔合百分比。来自接种了Prevnar-13(实心圆)以及假接种疫苗(空心方块)的动物的抗血清作为对照。

[0022] 图6显示用重组糖缀合物接种可提供针对肺炎球菌肺炎的同源但非异源保护。给小鼠接种糖基化和非糖基化的联合疫苗,并用1×10^{7}CFU TIGR4进行鼻内攻击48小时(7A-B)或用血清型4(7C-E)进行鼻内攻击。通过连续稀释和铺板确定细菌负担。*p<0.05使用Kruskal-Wallis以及Dunn后期测试法进行检验(vs PBS)。

[0023] 具体描述

[0024] 本发明涉及用于疫苗组合物中的重组糖蛋白,特别是包含被肺炎链球菌荚膜多糖

糖基化的肺炎链球菌蛋白抗原的糖蛋白。这些糖蛋白产生针对多种肺炎链球菌血清型的保护性免疫应答,并且可用于预防或治疗肺炎链球菌感染,例如脑膜炎。

[0025] 本文所述的糖蛋白可包含肺炎链球菌蛋白抗原以及一种或多种N-连接肺炎链球菌荚膜多糖,即所述荚膜多糖可与所述蛋白抗原的天冬酰胺残基共价连接(N-糖基化)。荚膜多糖和肺炎链球菌蛋白抗原可以是异源的,即肺炎链球菌蛋白抗原在自然体系中可能不会被荚膜多糖糖基化。

[0026] 细菌病原体细胞,例如肺炎链球菌,通常被荚膜多糖包裹且该荚膜多糖在细胞周围形成保护性外层。荚膜多糖可与宿主B细胞直接相互作用,并在不存在T细胞的情况下诱导抗体合成。一个肺炎链球菌荚膜多糖可包含一个或多个B细胞表位。荚膜中的多糖是通过糖苷键连接的单糖亚基的均聚物或杂聚物。细菌病原体不同血清型的细胞的荚膜多糖中单糖亚基的构型互相之间各不相同。例如,迄今为止已识别出超过90种不同的肺炎链球菌荚膜血清型。

[0027] 本文所描述的糖蛋白的肺炎链球菌荚膜多糖可包括常见的肺炎链球菌血清型,例如1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F。来自肺炎链球菌血清型的荚膜多糖的结构在本领域中是众所周知的(Bentley and Spratt PLoS Genet。2006Mar;2(3):e31。Epub 2006Mar 10)。

[0028] 在一些优选的实施方案中,荚膜多糖可以是血清型4的荚膜多糖。

[0029] 本文所述的糖蛋白可包含一个或多个荚膜多糖部分,例如两个,三个,四个,五个或多个荚膜多糖部分。在一些实施方案中,糖蛋白可包含两个荚膜多糖部分。例如,荚膜多糖部分可以连接至糖蛋白内的糖基化序列,比如在蛋白抗原的N和C末端。

[0030] 连接至糖蛋白的多个荚膜多糖部分可以是相同的多糖或不同的多糖。

[0031] 肺炎链球菌蛋白抗原可以是在任何能够引起免疫应答的肺炎链球菌上表达的蛋白质,优选为T细胞应答。例如,肺炎链球菌蛋白可包含一个或多个T细胞表位。优选的肺炎链球菌蛋白抗原可诱导针对多种肺炎链球菌菌株的交叉保护免疫,并支持对与其连接的荚膜多糖的强烈抗体应答。

[0032] 合适的肺炎链球菌蛋白是本领域已知的,包括神经氨酸酶A(NanA;spr1536;EC3.2.1.18)、肺炎链球菌血红素转运系统脂蛋白PiuA(Sp1872)以及Sp0148。最优选为PiuA(Sp1872)。

[0033] 合适的PiuA蛋白抗原可包含数据库登录号KGI34864.1、AOG58833.1、ANO37655.1、KGI33012.1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或这些中任一个的片段或变体。

[0034] 合适的NanA蛋白抗原可包含数据库登录号NP_359129.1或SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或这些中任何一个的片段或变体。例如,蛋白质抗原可以包含NanA的N末端凝集素样结构域。

[0035] 合适的Sp0148蛋白抗原可包含数据库登录号ABJ55394.1或WP_000724951.1或SEQ ID NO:9的氨基酸序列或这些中任一项的片段或变体。

[0036] 参考多肽序列的变体,例如SEQ ID NO:3、6或9之一,可以包含至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列与参考多肽序列相一致的氨基酸序列。

[0037] 通常参照算法GAP(GCG Wisconsin Package™,Accelrys,San Diego CA)来定义核

苷酸和氨基酸序列的同一性。GAP使用Needleman&Wunsch算法对两个完整的序列进行比对，以使匹配数最大化并使间隔最小。通常，使用默认参数，间隔产生罚分＝12以及间隔延伸罚分＝4。GAP的使用可能是优选的，但是也可以使用其他算法，例如BLAST，BLASTP或BLASTN(使用Altschul等人的方法，FASTA(使用Pearson和Lipman的方法，或使用Smith-Waterman算法的PSI-Search)，且通常使用默认参数[54-56,75]。

[0038] 例如，蛋白质抗原可以包含通过插入添加，取代或删除1个、2个、3个、4个、5-10个、10-20个、20-30个、30-40个或者更多的氨基酸而不同于参考多肽序列的氨基酸序列，例如SEQ ID NO:3、6或9之一。

[0039] 蛋白质抗原可以是参考多肽序列的片段，例如SEQ ID NO:3、6或9之一，或者是参考多肽序列的变体。片段是截短的多肽，其由比全长序列更少的氨基酸组成，片段包含了全长序列的至少一个免疫原性决定簇并保持免疫原性。合适的片段可包含全长序列的至少100，至少150，至少200，至少250或至少300个氨基酸。

[0040] 全长蛋白抗原的片段能够增强识别全长抗原以及肺炎链球菌血清型或该蛋白抗原来源的菌株的免疫应答(如果需要可以适当加入佐剂)。例如，可以通过对潜在的免疫原性位点进行计算机模拟来鉴定合适的片段，然后生成片段组，并在哺乳动物保护模型中进行体内测试。

[0041] 用于疫苗组合物中的合适的蛋白质抗原可能缺乏信号肽序列。

[0042] 肺炎链球菌蛋白抗原可包含糖基化序列。糖基化序列是形成多糖部分的附着位点的蛋白质内的连续氨基酸短序列。荚膜多糖可以与蛋白质抗原的糖基化序列内的天冬酰胺残基共价连接。

[0043] 糖基化序列的选择可能取决于用于产生糖蛋白的寡糖基转移酶。空肠弯曲杆菌PglB识别的合适的糖基化序列可以包含序列D/E-Y-N-X-S/T，其中Y和X是除P之外的任何氨基酸。例如，糖基化序列可以包含序列DQNAT。其他与寡糖基转移酶一起使用的其他糖基化序列可以容易地被确定。

[0044] 糖基化序列可以是异源的，即该序列可以不是天然存在于蛋白质抗原的序列中并且可以通过重组技术掺入其中。将糖基化序列掺入到蛋白质抗原序列中的合适方法是本领域众所周知的。在一些实施方案中，异源糖基化序列可以位于接头残基的两侧，例如一个或多个G残基，比如G或GG。

[0045] 蛋白质抗原可包含一个糖基化序列或多个糖基化序列。例如，蛋白质抗原可包含两个糖基化序列。较为合宜地，糖基化序列可以位于蛋白质抗原的N末端(或紧邻N末端前导序列)或蛋白质抗原的C末端(或紧邻C末端纯化标签)。

[0046] 在一些实施方案中，蛋白抗原可以与前导肽偶联以指导糖蛋白作为前体从细胞分泌到培养基中。一系列合适的前导肽是本领域已知的，并且包括DsbA前导序列MKKIWLALAGLVLAFSASAAQ或其变体。前导肽可以与蛋白抗原异源，即它可以是不与蛋白抗原天然结合的前导序列。前导肽可以位于前体糖蛋白的N末端。在前体表达以产生糖蛋白后，通过翻译后加工除去前导肽。

[0047] 糖蛋白可进一步包含纯化标签。纯化标签是形成特异性结合对的其中一个异源氨基酸序列。可以通过特异性结合对的另一个异源氨基酸序列与多肽结合，用来检测、分离和/或纯化含有纯化标签的多肽。例如，纯化标签可以形成被抗体分子结合的表位。

[0048] 各种合适的纯化标签是本领域已知的,包括例如MRGS(H)$_6$、DYKDDDDK(FLAG™)、T7-、S-(KETAAAKFERQHMDS)、poly-Arg(R_{5-6})、poly-His(H_{6-10})、poly-Cys(C_4)、poly-Phe(F_{11})、poly-Asp(D_{5-16})、Strept-tag II(WSHPQFEK)、c-myc(EQKLISEEDL)、HA流感标签[66]、Glu-Glu-Phe标签[67]、Tag.100(Qiagen;源自哺乳动物MAP激酶2的12aa标签)、Cruz标签09™(MKAEFRRQESDR、圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology Inc.))以及Cruz标签22™(MRDALDRLDRLA,圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology Inc.))。

[0049] 在一些优选的实施方案中,可以使用聚His纯化标签,例如C末端(His)10序列。表达后,可以使用含有结合的二价镍或钴离子的亲和树脂通过亲和色谱法分离包含聚His纯化标签的糖蛋白。使用亲和树脂纯化多组氨酸标签的糖蛋白是本领域众所周知的。看需要可以在纯化后通过蛋白酶切去除poly-His标签以产生蛋白质抗原。

[0050] 包含糖基化序列、His标签和前导肽的合适的肺炎链球菌蛋白抗原可包含SEQ NO:2、5或7中任一个的氨基酸序列,或这些中任一个的片段或变体。本文还公开了没有前导肽和任选His标签的SEQ NO:2、5或7。

[0051] 上述糖蛋白可以通过任何合适的方法制得。优选地,糖蛋白通过蛋白糖偶联技术(PGCT)制得(参见例16-18、41、42)。例如,本文所述的产生糖蛋白的方法可以包括:

[0052] 在微生物细胞中表达;

[0053] (i)寡糖基转移酶;

[0054] (ii)肺炎链球菌荚膜多糖;以及

[0055] (iii)肺炎链球菌蛋白抗原;

[0056] 寡糖基转移酶将病原体蛋白抗原与病原体荚膜多糖糖基化以产生糖蛋白。

[0057] 微生物细胞可以是原核细胞,优选为大肠杆菌细胞。

[0058] 用于产生糖蛋白的微生物细胞可包含(i)编码寡糖基转移酶的异源核酸,(ii)异源荚膜多糖生物合成基因座,和(iii)编码病原体蛋白抗原的异源核酸。异源核酸和基因座可以存在于微生物细胞中的染色体外质粒上,或者整合到微生物细胞的基因组中。

[0059] 生成微生物细胞的方法包括用以下几种物质转化微生物细胞:

[0060] (i)编码寡糖基转移酶的异源核酸;

[0061] (ii)异源肺炎链球菌荚膜多糖生物合成位点;以及

[0062] (iii)编码肺炎链球菌蛋白抗原的异源核酸。

[0063] 转化微生物细胞的合适的方法是本领域众所周知的。异源核酸和基因座可以包含在一种或多种载体例如质粒中。在一些实施方案中,异源核酸和基因座可全部包含在不同的载体中。在其他实施方案中,两个或更多个异源核酸和异源基因座也可以包含在同一载体中。

[0064] 为了表达寡糖基转移酶、蛋白质抗以及荚膜多糖,可以在标准条件下在细胞培养容器如生物反应器或发酵罐中培养微生物细胞。

[0065] 寡糖基转移酶(EC 2.4.1.119)催化蛋白质抗原的糖基化序列的天冬酰胺残基与荚膜多糖的糖基化。可以使用标准技术简单地鉴别出合适的用于附着任何特定荚膜多糖底物的寡糖基转移酶。在一些优选的实施方案中,寡糖基转移酶可以是PglB,优选为细菌PglB,例如鸡白痢幽门螺杆菌PglB,脱硫弧菌PglB,拉里弯曲杆菌PglB和空肠弯曲杆菌PglB。优选的PglB可以是包含数据库登录号ASI87642.1或YP_002344519.1或SEQ ID NO:10

的氨基酸序列或其变体以及片段。

[0066] 上文详细地描述了肺炎链球菌蛋白抗原和肺炎链球菌荚膜多糖。用于通过PGCT连接的肺炎链球菌荚膜多糖可被连接至十一碳烯酚焦磷酸脂锚。在一些实施方案中,例如,当寡糖基转移酶是空肠弯曲杆菌PglB时,荚膜多糖可包含在C2位置含有乙酰氨基的还原端糖中。

[0067] 肺炎链球菌荚膜多糖可以在从异源荚膜多糖生物合成基因座或操纵子的微生物细胞中产生。多糖生物合成基因座是肺炎链球菌基因组的一个区域,这个区域包含了产生微生物细胞中的荚膜多糖所需的基因。多糖的生物合成基因座位于肺炎链球菌基因组中的AliA和DexB基因之间,且在其N末端有四个保守基因。在本领域中已经报道了用于不同肺炎链球菌血清型的多糖生物合成基因座(参见例子:Bentley and Spratt PLoS Genet.2006Mar,2(3):e31.Epub 2006Mar 10),并且可以使用标准基因分析技术在任何肺炎链球菌基因组中进行鉴别。

[0068] 肺炎链球菌荚膜多糖的生物合成基因座可以从肺炎链球菌血清型的细胞获得,并克隆到微生物细胞中表达的载体上以产生荚膜多糖。在细胞中从异源生物合成基因座产生荚膜多糖的技术在本领域中已得到确立(16-18、41、42)。

[0069] 糖蛋白在在微生物细胞中产生后,可以被分离和/或纯化,这可以使用本领域已知的任何便利的方法来实现。纯化重组糖蛋白的技术是本领域众所周知的,包括例如HPLC,FPLC或亲和层析。在一些实施方案中,如上所述,可以使用糖蛋白上的亲和标签进行纯化。

[0070] 糖蛋白可与本文所述的药学上可接受的赋形剂和任选的佐剂和/或一种或多种不同的糖蛋白一起配制,例如以产生用于治疗用途的免疫原性制剂或疫苗组合物。疫苗组合物在上文中有详细的描述。

[0071] 荚膜多糖和蛋白质抗原都是免疫原性的,并且在向其施用糖蛋白的个体中可以引发针对荚膜多糖和蛋白质抗原的适应性免疫应答。免疫应答可以包括T细胞依赖性免疫应答和T细胞非依赖性免疫应答,例如抗体的产生。在一些优选的实施方案中,糖蛋白可以同时引发T细胞依赖性免疫应答和T细胞非依赖性免疫应答。

[0072] 糖蛋白可以提供针对肺炎链球菌的保护性免疫应答。例如,当糖蛋白个体暴露于肺炎链球菌时,糖蛋白可能会刺激、促进或者增强保护性免疫应答。糖蛋白可以刺激针对荚膜多糖和/或蛋白抗原来源的肺炎链球菌血清型或者肺炎链球菌血清型的保护性免疫应答,而不是仅仅针对荚膜多糖和/或蛋白抗原来源的肺炎链球菌血清型。例如,糖蛋白可以刺激针对多种肺炎链球菌血清型的保护性免疫应答。在一些实施方案中,一种保护性免疫应答可以对应单独的血清型。

[0073] 可以用如上所述的一种或多种糖蛋白配制成疫苗组合物。

[0074] 疫苗组合物是包含一种或多种免疫原性组分的免疫原性制剂,其能够在个体中产生对一种或多种免疫原性组分的保护性免疫应答。本文描述的疫苗组合物的免疫原性组分可以包含在一种或多种糖蛋白的肺炎链球菌蛋白抗原和肺炎链球菌荚膜多糖中。

[0075] 本文所述的疫苗组合物包含来自肺炎链球菌的蛋白质和多糖抗原,其能够在个体中引发针对肺炎链球菌的免疫应答。例如,蛋白质和多糖抗原可以对暴露于肺炎链球菌的血清具有免疫反应性,比如说对暴露在肺炎链球菌下的人体血清。

[0076] 疫苗组合物可包含如上所述的一种糖蛋白或多种糖蛋白,优选为多种糖蛋白,例

如2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同的糖蛋白。组合物中的多种糖蛋白可包含多种不同的蛋白质抗原和/或多种不同的荚膜多糖。例如,疫苗组合物可以包含具有多种不同的肺炎链球菌荚膜多糖和相同的肺炎链球菌蛋白抗原的糖蛋白;多种不同的肺炎链球菌蛋白抗原和相同的肺炎链球菌荚膜多糖;或多种不同的肺炎链球菌蛋白抗原和多种不同的肺炎链球菌荚膜多糖。

[0077] 疫苗组合物可以进一步包含佐剂。佐剂是增加或增强个体中对抗原的免疫应答的非免疫原性剂(回顾见例子以及Vaccine Adjuvants:adjuvants:preparation methods and research protocols Ed O'Hagan(2000)Springer)。

[0078] 合适的佐剂包括铝和铝盐,例如氢氧化铝和/或磷酸铝;油乳液组合物(或水包油组合物),包括角鲨烯水乳液,例如emulsigen™(MVP Technologies Inc),Addavax™和MF59™(参见,例如WO 90/14837);皂苷制剂,例如QS21和免疫刺激复合物(ISCOMS)(参见例如U.S.Pat No.5,057,540;WO 90/03184,WO 96/11711,WO 2004/004762,WO 2005/002620);Toll样受体(TLR)激动剂,例如TLR7激动剂(参见例如WO 2012/117377),任选地与铝盐组合;细菌或微生物衍生物,例如单磷酰脂质A(MPL)、3-O-去酰化MPL(3dMPL)、鞭毛蛋白、含CpG-基序的寡核苷酸、鼠李二肽(MDP)和/或海藻糖dycorynemycolate(TDM)ADP-核糖基化细菌毒素,例如大肠杆菌热不稳定肠毒素LT和霍乱毒素CT及其非酶结合亚基,聚I:C阴离子聚合物,包括丙烯酸聚合物(例如聚甲基丙烯酸甲酯),与烯丙基蔗糖交联的丙烯酸(例如CarbopolTM,路博润和聚乙烯亚胺(PEI)),细胞因子选自:GMCSF、干扰素γ、干扰素α、干扰素β、白介素12、白介素23、白介素17、白介素2、白介素1、TGF、TNFα以及TNFβ。

[0079] 制备疫苗组合物的方法可以包括:

[0080] 将如上所述的一种或多种糖蛋白与药学上或兽医学上可接受的赋形剂和任选的佐剂混合。

[0081] 本文所用的术语"药学上可接受的"或"兽医学上可接受的"是指在健全的兽医或医学判断的范围内,,适用于与动物的组织(例如人类或其他哺乳动物)相接触而不会产生过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,且具有合理的效益/风险比的化合物、材料、组合物和/或剂型。在与制剂的其他成分相容的意义上,每种载体,赋形剂等也必须是"可接受的"。

[0082] 合适的赋形剂和载体包括但不限于水、盐水、缓冲盐水、磷酸盐缓冲液、醇/水溶液、乳液或悬浮液、可以根据常规技术添加其他常规使用的稀释剂、助剂以及赋形剂。这样的载体可以包括乙醇、多元醇及其合适的混合物、植物油以及可注射的有机酯,也可以使用缓冲剂和pH调节剂,其包括但不限于由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括但不限于有机酸盐,例如柠檬酸的盐(例如柠檬酸盐)、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸、邻苯二甲酸、Tris、三甲胺盐酸盐或磷酸盐缓冲液。注射用药物的载体可以包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖、海藻糖、蔗糖、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉注射的载体可包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏葡萄糖那些等等。还可以在药物载体中提供防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂(例如,EGTA、EDTA),惰性气体等。本文所述的疫苗组合物不受载体选择的限制。在本领域技术范围内,上述的这些药学上可接受的组分具有适当的pH值、等渗性、稳定性以及其他常规特性。

[0083] 合适的载体,赋形剂等可在标准药学教科书中找到,例如,Remington's

Pharmaceutical Sciences[71]and The Handbook of Pharmaceutical Excipients,4th edit.,eds.R.C.Rowe et al,APhA Publications,2003。

[0084] 疫苗组合物可以方便地以单位剂型的形式存在,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。这样的方法包括使一种或多种分离的免疫原性多肽与可以构成一种或多种辅助成分的上述的载体或赋形剂相缔合的步骤。通常,通过将活性化合物与液体载体、细碎的固体载体或两者一起均匀且紧密地结合在一起来制备制剂。

[0085] 根据给药途径,本文所述的疫苗组合物可以以各种形式产生。例如,疫苗组合物可以以无菌水溶液或分散液的形式制成,适合于注射使用,或者使用冷冻干燥技术以冻干的形式制成。冻干的疫苗组合物通常保持在约4℃,并且可以在有或没有佐剂的情况下在稳定溶液例如盐水或HEPES中重构。疫苗组合物也可以为悬浮液或乳剂的形式。

[0086] 这些疫苗组合物可包含适合通过任何常规给药途径给药的添加剂。疫苗组合物可以制备成以例如液体、散剂、气雾剂、片剂、胶囊剂、肠溶片剂或胶囊剂或栓剂的形式施用于受试者。因此,疫苗组合物也可以是但不限于悬浮液、溶液、在油性或水性运载体中的乳剂,糊剂和可植入的持续释放或可生物降解的制剂的形式。用于持续释放或植入的组合物可以包含药学上可接受的聚合物或疏水材料,例如乳液,离子交换树脂,微溶聚合物或微溶盐。

[0087] 适用于肠胃外给药的制剂(例如通过注射,包括肌内注射)包括水性和非水性等渗的、无热原的、无菌的注射溶液,其中可能含有抗氧化剂,缓冲剂,防腐剂,稳定剂,抑菌剂以及与用预期接受者的血液形成制剂等渗的溶质;水性和非水性无菌悬浮液,可包括悬浮剂和增稠剂。适用于此类制剂的等渗赋形剂的例子包括氯化钠注射液,林格氏溶液或乳酸林格氏注射液。通常,溶液中活性化合物的浓度为约1μg/ml至约100mg/ml,例如约10μg/ml至约50mg/ml。在用于肠胃外给药的一些制剂中,可以以干燥(即粉末或颗粒)形式提供活性成分,以便在肠胃外给药重构组合物之前用合适的媒介物(例如无菌无热原的水)进行重构。其他有用的肠胃外给药制剂包括那些包含微晶形式的活性成分,脂质体制剂或作为可生物降解的聚合物体系的组分的制剂。

[0088] 疫苗组合物可以存在于单位剂量或多剂量密封容器中,例如安瓿瓶和小瓶中,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,并且仅需添加无菌液体载体,例如在使用前立即注射水即可。

[0089] 疫苗组合物可以通过任何方便的给药途径给予受试者。在一些实施方案中,通过肠胃外途径,例如肌肉内、鼻内、经皮或皮下途径进行施用。例如,疫苗组合物可以通过注射,优选肌肉内注射施用。

[0090] 疫苗组合物的适当剂量根据实际情况在个体与个体之间或群体与群体之间有所不同。确定最佳剂量通常将涉及针对任何给药的风险或有害副作用之间的平衡的治疗收益水平。所选剂量水平取决于多种因素,包括但不限于给药途径、给药时间以及疫苗组合物、其他药物,化合物和/或组合使用的材料的分泌速率,以及个体的物种、类型、成熟度、性别、体重、状况和一般健康状况。疫苗组合物的量和给药途径最终将由兽医或医生决定,尽管通常剂量应达到足以产生有益作用而又不会引起实质性有害或有毒副作用的疫苗组合物的血清浓度。

[0091] 治疗可以包括向个体施用治疗有效量的疫苗组合物。“治疗有效量”是指产生一定期望治疗效果的疫苗组合物的量,与合理的获益/风险比相对应。例如,用于个体给药的疫

苗组合物的合适量可以是产生针对组合物的个体中存在的每种多糖或蛋白质抗原的保护性免疫应答的量。

[0092] 当本文所述的疫苗组合物施用的个体暴露于肺炎链球菌时,疫苗组合物施用的个体可能表现出针对肺炎链球菌的获得性和/或适应性免疫应答。这些反应可以针对由肺炎链球菌感染引起的发病或死亡提供保护作用。例如,疫苗组合物可以降低感染肺炎链球菌的可能性、降低个体感染临床症状的严重性或持续时间、预防或延迟感染临床症状的发作、预防或降低在感染肺炎链球菌后的个体的死亡风险。

[0093] 可以连续或间歇地进行一剂的体内给药(例如,以适当的间隔分批给药)。在一些实施方案中,疫苗组合物可以以足够的时间间隔多次施用给同一个体以获得加强效果,例如在两次施用之间间隔至少1周、2周、3周或4周,优选为2周。可以最初向个体施用一定剂量后再加强剂量,例如,给药时,可以在1-4周的时候给初始剂量,而在3-6周大的时候给一次加强剂量。确定最有效的给药方式和剂量的方法是本领域技术人员众所周知的,并且将随制剂和所治疗的受试者不同而变化。例如,在一些实施方案中,当在一段时间后(例如2-4周后)加强剂量时,若母体中母体来源的抗体的水平降低,则两周后可以施用疫苗组合物的初始剂量。可以通过兽医或医生选择剂量水平和方式进行单次或多次给药。

[0094] 本文所述的糖蛋白或疫苗组合物可用于治疗动物或人体的方法。本发明提供了本文所述的糖蛋白或疫苗组合物,其用于治疗个体或个体所在的群体中的肺炎链球菌感染;本发明提供了本文所述的糖蛋白或疫苗组合物在制备用于治疗个体或个体肺炎链球菌感染的药物中的用途;以及提供了治疗肺炎链球菌感染的方法,其包括将本文所述的糖蛋白或疫苗组合物施用于需要其的个体或个体所在的群体中。

[0095] 肺炎链球菌感染包括感染任何血清型或菌株的肺炎链球菌,例如肺炎链球菌血清型4,以及肺炎链球菌感染的临床体征,以及与肺炎链球菌感染有关的疾病,包括细菌性脑膜炎、败血病、肺炎、中耳炎、心脏感染、心包炎、化脓性关节炎以及自发性腹膜炎。

[0096] 肺炎链球菌感染可使用标准诊断标准进行鉴定或诊断。

[0097] 本文所述的治疗可在暴露于肺炎链球菌时引发个体或人群的免疫系统产生免疫反应。这可以实现期望的治疗效果,例如,增强针对肺炎链球菌感染引起的发病率或死亡率的保护或抵抗。

[0098] 更优选地,本文所述的治疗可以是预防性或预防性治疗,即个体或人群在治疗时可能未患有肺炎链球菌感染和/或未显示出肺炎链球菌感染的临床体征。在一些实施方案中,个体或人群可能易感肺炎链球菌或有感染肺炎链球菌的风险。

[0099] 例如,糖蛋白或疫苗组合物可用于针对肺炎链球菌的个体或人群的疫苗接种或免疫作用。本文所述的肺炎链球菌感染的治疗可以预防个体或人群中以后的肺炎链球菌感染或减轻其影响。预防或预防性治疗可能会降低个人或人群对肺炎链球菌感染的易感性、预防或抑制肺炎链球菌在鼻咽部定植、降低感染肺炎链球菌的风险或可能性、延缓或减少病变的严重性或持续时间或肺炎链球菌感染的其他临床症状,或预防或延迟个体或人群中肺炎链球菌临床症状的发作,和/或减少或预防由肺炎链球菌感染引起的发病率或死亡率。

[0100] 适用于用本文描述的糖蛋白或疫苗组合物治疗的个体或群体可以是人类或非人类的哺乳动物,例如易受肺炎链球菌感染的非人类哺乳动物,包括马类哺乳动物,例如马。

[0101] 相对于未免疫人群,本文所述的糖蛋白或疫苗组合物可以降低人群中与肺炎链球

菌相关的发病或死亡的发生率。例如,与未免疫人群相关的接种人群可以在暴露于肺炎链球菌后减少肺炎链球菌感染的损伤或其他临床症状的发生率。在一些实施方案中,用本文所述的疫苗组合物对人群进行接种,与未经治疗的人群相比可将表现出肺炎链球菌感染的临床症状的人群中的个体数目减少至少50%,更优选至少60%、至少65%、至少70%,或至少75%,最优选至少80%。

[0102] 本发明的其他方面和实施方式提供了上述方面和实施方式,其中用术语“包括”代替了术语“包含”,并且在上述方面和实施方式中用术语“基本上由……组成”代替了术语“包含”。

[0103] 应当理解,除非上下文另外要求,否则本申请公开了上述方面和实施例中的任何一个相互之间的所有组合。类似地,除非上下文另外要求,否则本申请公开了单独或与任何其他方面相结合的优选和/或可选特征的所有组合。

[0104] 通过阅读本公开文本,以上实施例的修改,其他实施例及其修改对于本领域技术人员将是显而易见的,并且这些均在本发明的范围内。

[0105] 本说明书中提及的所有文件和序列数据库条目出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0106] 在本文中使用的“和/或”应被视为两个指定的特征或部件中的每个具有或不具有另一个的特定公开。例如,“A和/或B”将被视为(i)A,(ii)B和(iii)A和B中的每一个的具体公开,就像每个在本文中分别列出一样。

[0107] 实验

[0108] 以下实验使用PGC将脑内皮细胞浸润素NanA(29)、Th17刺激抗原Sp0148(24)以及ABC转运蛋白PiuA(34)的N端片段与包囊4型血清抗原进行偶联,并使用接种疫苗的以及感染肺炎链球菌的小鼠模型进行这些糖缀合物功效的测试。

[0109] 1.材料与方法

[0110] 1.1细菌菌株和生长条件

[0111] 表1列出了该研究中使用的细菌菌株。将大肠杆菌分离株常规在改良的超适培养液(SSOB)或琼脂中并在28℃的条件下培养。在适当的情况下,向培养物中补充100μg/ml氨苄青霉素,20μg/ml四环素和/或80μg/ml大观霉素。肺炎链球菌在37℃+5%CO_2的哥伦比亚马血琼脂平板(E&O实验室)或在脑心浸液(BHI)的液体培养基中培养。在适当的情况下,在培养物中补充5μg/ml庆大霉素或75μg/ml链霉素。在补充有0.5%酵母提取物的Todd-Hewitt液体培养基中于37℃+5%CO_2培养出缓症链球菌。将肺炎链球菌和缓症链球菌培养至约0.4-08的OD_{600},并在-80℃的条件下,在20%甘油中一次性使用1ml等分试样进行保存。通过连续稀释和铺板确定放养密度。

[0112] 1.2载体蛋白基因的合成与基因修饰

[0113] DNA序列、在大肠杆菌中优化表达的密码子、编码神经氨酸酶A(NanA,Spd1504)以及ABC转运蛋白PiuA(Sp1872)和Sp0148已在pUC57中进行了商业合成,并被亚克隆到pEXT21中。由于在早期实验中难以以高产量进行重组生产的全长NanA的大小,这使得对蛋白质功能至关重要的蛋白质N末端凝集素样结构域需要从pEXT21(nanA)中亚克隆来得到,正如上文的补充方法所述(29)。为了促进PglB糖基化,用序列子DQNAT修饰了合成的载体蛋白序列,该序列两端有两个间隔区甘氨酸残基且位于成熟蛋白的N和C末端。通过将天然信号肽

交换为DsbA前导序列MKKIWLALAGLVLAFSASAAQ,可以促进周质靶向。C-末端十-His序列可以用于促进Ni-NTA的纯化。在NanA中,内部EcoRI和XbaI位点被同义突变取代。根据制造商的说明,将商业质粒构建体克隆到高效的文库DH5α细胞(Life Technologies)中,并在-80℃下于20%甘油中存储。使用限制酶EcoRI和XbaI(New England Biolabs)将合成的载体蛋白序列亚克隆到表达载体pEXT21中。

[0114] 1.3表达菌株的制备

[0115] 在过夜的条件下,以1:100接种大肠杆菌W3110和W311B pB4-4细胞培养物,并使其OD_{600}为0.3-0.6。将培养物在冰上冷却,以4000×g沉淀10分钟,并依次用0.5体积然后用0.25体积的冰冷的10%甘油洗涤。将感受态细胞重悬于1/250体积的冰冷的10%甘油中,并在2.5kV、200Ω和25μF的条件下,用pEXT21(nanA)、pEXT21(piuA)或pEXT21(sp0148)将50μl等分试样在0.2cm试管中进行转化。为了研究脂质连接的Sp4在抗胶囊免疫中的作用,用pEXT21(piuA)转化了W3110 pB4-4细胞。确认表达的分离株在-80℃下储存在20%甘油中。

[0116] 1.4重组蛋白制备

[0117] 将W3110 pEXT21(NanA/PiuA/Sp0148)和W311B pB4-4 pEXT20 pEXT21(NanA/PiuA/Sp0148)分离株在28℃下培养过夜,然后按1:100的比例亚培养到SSOB中。将细菌培养2-3h,然后在28℃下用1mM IPTG和4mM $MnCl_2$诱导过夜。将细胞以14,000×g沉淀,并使用压力细胞匀浆器(Stanstead)裂解。裂解液在室温下用25U/ml Benzonase核酸酶(Sigma-Aldrich)处理20分钟,并使用Millex-GP注射器过滤器(Millipore)进行0.2μm的过滤。在最初的研究中,重组(糖)蛋白是根据制造商的说明使用Ni-NTA纯化系统(Thermo Fisher Scientific)进行纯化的。为了进行疫苗接种研究,使用GE Healthcare的His-trap FF色谱柱和线性咪唑梯度为25至250mM的AKTA纯化器分离了重组(糖)蛋白。通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色鉴定仅包含重组(糖)蛋白的级分,合并,并使用Vivaspin 20离心浓缩器(10000MWCO)将缓冲液交换到PBS中。使用Pierce Coomassie Plus(Bradford)分析试剂盒(Thermo Fisher)测定蛋白质浓度。将重组(糖)蛋白过滤除菌,在PBS中标准化至200μg/ml,并在-80℃下保存。通过SDS-PAGE确认样品纯度。

[0118] 1.5SDS-PAGE和免疫印迹

[0119] 将重组蛋白(10μl)与4μl 4x LDS样品缓冲液(thermos fisher)和2μl 0.5M二硫苏糖醇(Sigma-Aldrich)混合,并在70℃下加热10分钟。在MOPS缓冲液中的NuPAGE 12% bis-tris蛋白凝胶上分离样品,并根据制造商的说明使用iblot2转移系统将其转移至硝酸纤维素膜上。用补充有2.5%脱脂奶粉(Marvel)以及0.1%正常山羊血清(Thermo Fisher)的PBST封闭膜。使用血清型4兔抗胶囊抗体(Statens Serum Institut,丹麦)和单克隆小鼠抗His IgG(Abcam)作为第一抗体,分别以1:1000和1:5000的稀释度稀释。孵育1小时后,将膜用PBST洗涤3次,并以1:10000的稀释度与次级山羊抗兔IgG(IRDye800)和山羊抗小鼠IgG(IRDye680)共轭抗体孵育45分钟。将膜在PBST中再洗涤3次后,用LI-COR奥德赛荧光成像系统(LI-COR Biosciences UK Ltd)进行检测。

[0120] TIGR4和D39裂解物是通过过夜培养物的压力裂解制备的。0.2μm过滤裂解液,并使用Vivaspin 20离心浓缩器(10000MWCO)浓缩10倍。如上所述,通过免疫印迹使用鼠抗血清的1:1000稀释液和山羊抗小鼠IgG(IRDye800)的1:10000稀释液,通过免疫印迹分析10μl浓缩裂解液的等分试样。使用LI-COR奥德赛荧光成像系统进行光密度测定。

[0121] 1.6疫苗接种研究

[0122] 从Charles River购买5-6周大的雌性CD1小鼠,将其关在4个笼子中。为进行抗血清生成和肺炎攻毒研究,第0天在小鼠腹膜内接种10μg在Sigma佐剂(Sigma-Aldrich)中以1:1乳化的重组(糖)蛋白。在第21天和第35天皮下注射加强免疫。对阳性对照组进行疫苗接种,并用20μl稀释的1:5PBS Prevnar-13(Wyeth)进行加强免疫。阴性对照组仅用PBS和Sigma佐剂进行假疫苗接种。使用上述腹膜内接种的小鼠进行定植研究,并在光异氟烷麻醉下用2μg重组蛋白(无佐剂)或20μl稀释的Prevnar-13或PBS在鼻内加强免疫。对于肺炎研究,在异氟烷麻醉下,在50μl PBS中用1×10^{7}CFU TIGR4感染小鼠。感染后24小时将小鼠扑杀,并评估肺和血液中的细菌负担。

[0123] 1.7抗胶囊和抗蛋白ELISA

[0124] 为了测量抗胶囊反应,将Nunc Maxisorp 96孔板用0.5μg/孔纯化的4型肺炎球菌多糖(Statens Serum Institut,丹麦)在PBS中于4℃的条件下包被过夜。在28℃,下用补充有2.5%脱脂奶粉和0.1%正常山羊血清的PBST封闭孔与补充有0.1%BSA和0.01%叠氮化钠的鼠抗血清的10倍稀释液在PBS中孵育1小时。用PBST洗涤孔3次,并在28℃下与1:20000稀释的HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(Abcam)稀释1小时。再洗涤三遍后,用50μl四甲基联苯胺检测结合的抗体。使用50μl 1M的H_2SO_4终止反应,并使用EL800微孔板读取器(BioTek Instruments)和参考波长A630测量OD_{450}。适当的抗胶囊抗体滴度为通过与使用任意滴定度为1:10000的Prevnar抗血清产生的标准曲线相比较获得的。

[0125] 抗蛋白反应是通过三明治ELISA法进行的,在4℃下用涂有PBS的0.1μg单克隆兔抗组氨酸IgG(Abcam)包被的板过夜。用PBST洗涤孔3次,并与1μg/孔的PBS中的重组蛋白一起在28℃温育2小时。再洗涤三遍后,将板封闭,并与10倍稀释的鼠抗血清和HRP偶联的山羊抗小鼠IgG一起如上所述进行孵育。

[0126] 对于全细胞ELISA,将TIGR4和D39培养物生长至大约0.4-08的OD_{600},洗涤并重悬至10%甘油中的0.4的OD_{600}。将板与100μl/孔的标准化细菌在室温孵育2小时,并将细菌用4%甲醛凝固20分钟。经过洗涤的板在28℃下用1:1000稀释的鼠抗血清和如上所述的HRP缀合的山羊抗小鼠IgG孵育2小时。

[0127] 1.8抗体沉积测定

[0128] 如先前所述,使用肺炎链球菌和微生物链球菌的冷冻原液进行抗体沉积测定。简而言之,将2×10^{6}CFU/孔细菌与稀释的鼠抗血清以50μl的最终体积在37℃下以225rpm的速度搅拌孵育30分钟。细菌以3000rpm的速度沉淀,用PBS洗涤两次,再与1:100稀释的PE偶联山羊抗小鼠IgG(25μl/孔)一起孵育30分钟。再洗涤两次后,将细菌用200μl/孔的4%多聚甲醛进行凝固,并使用FACSVerse系统通过流式细胞仪测量细菌群体的荧光强度。通过与在任意滴度为1:10000下使用抗Prevnar抗血清产生的的标准曲线相比较,确定TIGR4的滴度。

[0129] 1.9吞噬细胞摄取测定

[0130] 根据制造商的说明书,使用MACSexpress磁性纯化系统,使用从健康人类供体中纯化的中性白细胞,进行吞噬细胞摄取测定。将肺炎链球菌的冷冻原种重悬于1ml的0.1M碳酸氢钠中,并与FAM-SE在37℃下孵育30分钟。将细菌用PBS洗涤3次,然后将2×10^{6}CFU/孔的细菌与稀释的鼠抗血清以50μl的最终体积在37℃下以225rpm的速度搅拌孵育30分钟。将每孔2×10^{4}个中性白细胞加入50μl PBS中,并将反应再温育30分钟。用100μl/孔的4%多聚甲醛

凝固反应,并使用FACSVerse系统通过流式细胞仪测量中性粒细胞的荧光强度。

[0131] 1.10统计分析

[0132] 使用GraphPad Prism进行拥有适合的组规模和比较次数的统计分析。使用FlowJo软件进行流动式细胞数据分析。

[0133] 1.11重组蛋白生产

[0134] 使用表S2中列出的引物,从pEXT21(nanA)中亚克隆NanA的N端凝集素样结构域。使用Q5高保真2X预混液(New England Biolabs)和引物对pEXT-F/nanA-R和pEXT-R/nanA-F在98℃10s、60℃30s、72℃30s并持续30个循环的条件下从pEXT21(nanA)扩增出商业合成NanA构建体的两个片段。片段经PCR纯化(QIAquick PCR纯化试剂盒,Qiagen)并用AvrII(New England Biolabs)吸收。对吸收的片段进行PCR纯化,并使用T3 DNA连接酶(New England Biolabs)进行连接。使用如上所述的pEXT-F/pEXT-R引物对,将重新连接的反应混合物用作NanA(N末端)扩增的模板。将得到的插入片段进行PCR纯化,并使用限制酶EcoRI和XbaI克隆到pEXT21中。将含有NanA的凝集素样结构域和PglB糖基化和Ni-NTA纯化所需的遗传成分的质粒pEXT21(NanA)转化为DH5α细胞,并在-80℃下于20%甘油中保存。

[0135] 2.结果

[0136] 2.1用重组糖缀合物接种可产生针对荚膜和载体蛋白的抗体

[0137] 如上所述,从分离物中制备NanA(Sp4),PiuA(Sp4)和Sp0148(Sp4),分别对8只雌性CD1小鼠的组进行单种疫苗接种(10μg/小鼠/注射)或进行组合接种(每种蛋白4μg/小鼠/疫苗接种)。包括同源的非糖基化抗原、Prevnar-13以及单PBS(Sham)疫苗组作为抗蛋白和抗荚膜反应的对照。从距离前一次接种疫苗后7天的小鼠回收的血清中,循环的抗荚膜抗体在所有糖基化抗原组中均超过检测极限,而在仅接种蛋白质的组中未检测到反应性(图1A-E)。各组之间的抗荚膜抗体水平差异显着,但似乎与不同制剂中糖蛋白的相对含量不相关。尽管NanA样品中糖基化程度最高,但PiuA糖缀合物刺激了最强大的抗荚膜免疫反应(图1A)。所有三种糖结合物的联合疫苗接种均产生了强烈的抗荚膜反应,类似于Prevnar-13产生的反应。通过夹心ELISA法评估抗载体蛋白反应并确认所有疫苗组均已血清转化为选定的载体蛋白(图1F-H)。不管它们是否携带血清型4聚糖,都会对蛋白抗原产生强烈的体液免疫反应,这表明糖基化对蛋白抗原性没有明显影响。

[0138] 2.2接种重组糖缀合物的小鼠血清中肺炎链球菌的抗体识别

[0139] 使用全细胞ELISA和涂有同源4型肺炎链球菌TIGR4以及2型异源血清D39菌株的板评估接种疫苗小鼠血清中肺炎链球菌的抗体识别(图2A-B)。与接种Prevnar 13的小鼠血清相比,接种Sp0148组的糖缀合物的小鼠血清对TIGR4的识别有着相似的ELISA滴度,接种PiuA或者三种蛋白糖缀合物组合的小鼠血清则有着更高的滴度(图2A),接种NanA糖缀合物的小鼠产生的抗TIGR4滴度无明显增加。在用未糖基化的PiuA和所有三种蛋白质的组合接种的小鼠中,血清中也产生了针对TIGR4的显著的抗体滴度。正如预期的那样,从接种糖缀合物或相应蛋白的小鼠中回收的血清的D39全细胞ELISA的滴度没有差异,而接种Sp0148或所有这三种蛋白的疫苗的小鼠的抗体滴度则显著增加(图2B)。天然肺炎球菌抗原的识别是通过用接种了不同PGCT糖缀合物及其同源蛋白的小鼠血清免疫印迹肺炎链球菌裂解物而证实的(图2C)。在TIGR4裂解物中确认了对所选择的用于研究的三种蛋白质识别,以及确认了用糖缀合物抗血清探测的样品中4型肺炎球菌荚膜的识别。与抗荚膜ELISA的结果一致

(图2A),不同的蛋白聚糖偶联物与4型血清荚膜具有不同水平的反应性,其中最强的信号来自接种PiuA(Sp4)和糖缀合物联合疫苗(Combo)(Sp4)。的小鼠的血清与全细胞酶联免疫吸附测定的结果一致,当用接种疫苗的小鼠血清探测D39裂解物时,尽管PiuA信号接近检测极限,也同时鉴别出了脂蛋白Sp0148以及PiuA。这些数据综合起来表明,用糖缀合物分子进行疫苗接种产生的抗体可同时识别抗荚膜和抗蛋白抗原,因此可识别出同源和异源的肺炎链球菌分离株。

[0140] 2.3用重组糖缀合物接种疫苗可刺激具有能够促进活体肺炎链球菌的调理作用的抗体的产生

[0141] 使用流式细胞术测定来评估用PGCT糖缀合物接种疫苗是否可以导致整个活体肺炎链球菌的抗体识别。为了专门研究抗荚膜识别,来自接种组的血清用于评估IgG与表达链球菌4型肺炎链球菌(S.mitis(SpT4))的链球菌突变体的结合(36)。虽然没有检测到野生型链球菌的识别,但是来自所有用于研究的组的个体血清均识别出链球菌(SpT4)(图3A-B)。不同疫苗组之间的IgG结合程度各不相同,只有在Sp0148和NanA(Sp4)疫苗接种组的分别为四只和六只小鼠的血清中识别出肺炎链球菌(SpT4),而从全部八只接种了PiuA糖缀合物或全部三种蛋白质糖缀合物疫苗的小鼠中获得的血清引起与链球菌(SpT4)的显著的免疫球蛋白结合(图3B)。这两组的抗体结合水平与Prevnar-13疫苗接种组所达到的水平相当。在接种了任意未糖基化蛋白抗原的小鼠的血清中,未观察到在链球菌(SpT4)菌株上的抗体沉积,证实了肺炎球菌载体蛋白与肺炎链球菌细胞表面之间没有交叉反应性。这些数据支持了ELISA结果,即虽然选择用于研究的每种新型糖缀合物都可以刺激抗Sp4荚膜免疫反应,但PiuA糖缀合物比NanA和Sp0148糖缀合物刺激的反应鲁棒性更高。

[0142] 使用TIGR4菌株重复流式细胞术IgG结合测定。TIGR4与糖化缀合物疫苗接种的小鼠组的合并鼠抗血清的递减稀释液一起孵育,显示了剂量依赖性的IgG结合(图3C)。将gMFI读数与使用Prevnar-13疫苗接种的小鼠的抗血清产生的标准曲线进行比较发现,与接种了四种糖缀合物的小鼠血清孵育的反应中具有较高的表面抗体滴度(图3D)。另外,在用未糖基化的Sp0148或所有三种蛋白质的组合接种的小鼠血清中,可检测到的表面IgG结合水平(图3D)。IgG的表面沉积与从NanA或PiuA的未糖基化抗原所获得的血清中的阴性对照没有区别。为了评估不依赖荚膜抗体识别的单个蛋白质抗原的识别,使用固定浓度的混合有,使用从接种每种糖缀合物的小鼠的固定浓度的混合抗血清,评估与其他荚膜血清型的肺炎链球菌相结合的IgG。接种疫苗的小鼠血清中非血清型4菌株的IgG识别通常比TIGR4菌株弱,并且在菌株与菌株之间有所不同(图4A-D),尽管与血清型23F菌的IgG结合水平高,且与血清型2F菌株的结合水平合理,但与6B菌株的结合却很少。菌株之间不同抗原促进IgG结合的能力各不相同,例如NanA诱导的血清型23F菌株反应最弱,而Sp0148诱导的TIGR4菌株反应最弱,这可能反映了各个蛋白抗原的表达水平和表面可及性之间的差异。

[0143] 2.4PGCT糖缀合物疫苗接种小鼠血清中结合肺炎链球菌的抗体的可视化

[0144] 通过使用荧光显微镜研究联合疫苗组的抗血清以及荧光标记的抗小鼠第二抗体,进一步研究了同源和异源肺炎球菌分离株的识别(图4E)。用所有三种PGCT糖缀合物接种的小鼠的血清中TIGR4菌株的孵育在细菌细胞上产生了明亮,均匀的表面染色,类似于从Prevnar-13接种的小鼠的血清中观察到的结果,证实了IgG与同源血清型具有高水平的结合。相反,按照流式细胞仪数据,PGCT糖缀合疫苗的小鼠血清中非血清型毒株的荧光染色较

弱且分布不均匀,并且株与株之间的差异更大。但是,当小鼠接种了糖基化或未糖基化的三种蛋白质抗原混合物时,在所有血清型(包括不能被Prevnar-13接种的小鼠的血清识别的血清型2株)中均可见染色的球菌。ELISA,流式细胞术以及免疫荧光数据一起证明了PGCT糖缀合物可以诱导抗荚膜IgG应答,该应答的载体蛋白强度不同,但(例如PiuA糖缀合物)与Prevnar-13疫苗接种后的强度相似。另外,PGCT糖缀合物刺激对蛋白抗原的显著抗体反应,该蛋白抗原可以调理异源肺炎链球菌血清型,并且可以针对多种肺炎链球菌菌株潜在地提供保护作用。

[0145] 2.5用PGCT产生的重组糖缀合物接种小鼠的保护功效

[0146] 为了确定抗体在TIGR4上的沉积密度是否足以促进调理吞噬作用,使用新鲜分离的人中性粒细胞进行了中性粒细胞摄取测定(37)。在PiuA(Sp4)糖缀合物或三种蛋白质的糖缀合物组合疫苗接种的小鼠血清中的温育均促进了TIGR4肺炎链球菌菌株的中性粒细胞摄取,表明产生了功能性抗荚膜体液免疫应答来响应使用PGCT制备的重组4型荚膜抗原(图5A)。但是,在此测定中,来自接种了Sp0148(Sp4),NanA(Sp4)或未糖基化蛋白(单独或组合)的小鼠的血清未能促进中性粒细胞的吞噬作用(图5B)。组合的缀合物也未能促进测定的非血清型4菌株的中性粒细胞吞噬作用(图5C-E)。

[0147] 使用感染的小鼠模型评估使用PGCT制备的糖缀合物的保护功效。用Prevnar或所有三种PGCT糖缀合物组合或未糖基化蛋白的组合给小鼠接种疫苗,然后通过鼻内接种TIGR4菌株(脓毒症模型的肺炎)或已知会引起脑膜炎的4型血清型对小鼠进行攻击。48小时后,挑拣出小鼠通过靶器官CFU评估其感染水平。在TIGR4攻击模型中,进行三种PGCT糖缀合物的联合接种几乎可以完全预防败血病,并使得肺CFU降低约$\log_{10}$,这与Prevnar-13疫苗提供的保护水平非常相似(图6A-B)。尽管没有统计学显着性,但是在单独用未糖基化蛋白的组合进行疫苗接种的小鼠中,从血液中回收的中位CFU/ml也有所降低。在脑膜炎模型中,接种三种PGCT糖缀合物可以完全预防败血病和脑膜炎,并导致肺CFU降低约3$\log_{10}$(图6C-E),同样,这与Prevnar-13疫苗接种提供的保护水平非常相似。对于仅接种了未糖基化蛋白组合的疫苗的小鼠,其血液平均数、肺和脑CFU均低于阴性对照的结果,尽管只有血液数据具有统计学意义。这些小鼠模型的数据表明,使用肺炎链球菌荚膜以及PGCT制作的蛋白质抗原可以高度保护其免受同源的肺炎链球菌血清型感染,且提供与现有市售PCV制剂疫苗一样好的保护水平。此外,蛋白质成分还产生了不依赖于荚膜抗原的保护性应答,表明PGCT疫苗将能够提供交叉血清型保护。

[0148] 在上述实验中,蛋白聚糖偶联技术用于生产低成本的多组分糖缀合物疫苗,该疫苗包含三个被重组血清型4荚膜糖基化的表面抗原。研究结果包括:(a)使用PGCT制备的肺炎链球菌糖缀合物具有与商用PCV一样的免疫原性,并在肺炎和脑膜炎的小鼠模型中提供相似的保护水平;(b)肺炎链球菌蛋白抗原可以不用作已建立的结合疫苗载体蛋白之一,而是作为PCV疫苗的载体蛋白;(c)使用PGCT制备的糖缀合物根据载体蛋白的不同,其抗荚膜免疫原性也有着显著的不同;(d)载体蛋白是免疫原性的,可以刺激抗体应答,该应答能够提供一定程度的针对脑膜炎和败血症且不依赖于荚膜抗体的保护作用。数据表明,PGCT可以提供一种制造PCV的替代方法,该方法所需成本比现有的化学缀合方法更少,并且可以产生相似水平的血清型特异性保护,可在发展中国家中用于预防包括脑膜炎在内的严重肺炎链球菌感染。此外,PGCT可以制成包含一系列肺炎链球菌蛋白载体蛋白的PCV,从而提供至

少某种程度的血清型非依赖性免疫。

[0149] 从我们的数据重得出并对疫苗开发具有广泛意义的重大发现是可以鉴别其他能促进抗体对荚膜抗原反应的载体蛋白。目前,只有四种蛋白质已用于制备糖缀合物,但我们的数据表明PiuA将是另一种选择。用于产生糖缀合物的其他两种蛋白质Sp_0148以及NanA在产生抗聚糖反应方面的效力与PiuA相比明显较低。实际上,可以想象的是大多数组合疫苗产生的抗荚膜反应是由于糖基化PiuA的存在所致。不同的载体蛋白在促进抗荚膜抗体的功效方面存在如此显著的差异的原因还尚不明确。免疫印迹表明,这不仅仅是由于PiuA糖缀合物的量更大,因为实际上NanA糖缀合物的量似乎是最大的。载体蛋白和糖基化位点的选择对于产生强大的抗荚膜IgG反应非常重要,最近的数据表明,糖缀合物通过与MHCII结合的糖基化抗原表位直接呈递给T细胞受体,从而产生的对聚糖的抗体反应(21,22)。这种机制将解释我们的数据,因为抗荚膜抗体应答的强度将受到载体蛋白的选择以及受荚膜抗原共价连接的位点的影响。这些数据表明,筛选其他肺炎链球菌蛋白应该要鉴定糖缀合物疫苗的其他载体蛋白,从而能够对荚膜或其他聚糖抗原产生强烈的抗体反应。

[0150] 使用肺炎链球菌蛋白抗原作为使用PGCT制备PCV的载体蛋白的主要优点是,这些蛋白可以诱导可以起到保护作用的额外免疫反应。对蛋白质抗原的免疫应答也可以包括T细胞介导的免疫,包括与纯抗体应答相比理论上可以增强粘膜免疫的TH17应答(24、40)。我们调查了使用PGCT产生的,与3个保守肺炎链球菌蛋白抗原共轭的4型肺炎球菌荚膜相结合的组合糖缀合物、内皮细胞浸润蛋白NanA(29)、Th17刺激抗原Sp0148(24)以及ABC转运蛋白PiuA(34)是否可以刺激针对肺炎链球菌的同源和异源免疫。我们的数据证实,用载体蛋白进行疫苗接种能够产生良好的抗体反应,从而可以识别出不同的活体肺炎链球菌菌株。单独接种这些蛋白质后,可以使感染肺炎链球菌后得血液和脑膜中的细菌CFU减少这证实了抗体对载体蛋白成分的保护潜力。然而,尽管选择了已知的Th17诱导抗原(SP_0148)疫苗,但仅用蛋白质进行疫苗接种仍无法预防肺部感染,并且针对全身感染的保护水平比抗荚膜反应所提供的保护水平弱。此外,对这三种蛋白质的抗体应答在识别不同肺炎链球菌菌株方面的能力也有所不同。

[0151] 综上所述,此处提供的数据证明PGCT可以制备具有与现有商业PCV一样功效的肺炎链球菌糖缀合物,以预防血清型特异性感染,而除此之外它还能刺激针对异源血清型的保护性免疫。

[0152]

种类	菌株	描述
大肠杆菌	W3110	K12 衍生物
大肠杆菌	W311B	W3110 衍生物，含有染色体插入的寡糖基转移酶 PglB
大肠杆菌	W3110 pB4-4	含有 Spn 4 型荚膜操纵子的 W3110
大肠杆菌	W311B pB4-4	含有 Spn 4 型荚膜操纵子的 W311B
大肠杆菌	W3110 pEXT21(NanA)*	重组 NanA 的制备
大肠杆菌	W3110 pEXT21(PiuA)*	重组 PiuA 的制备
大肠杆菌	W3110 pEXT21(Sp0148)*	重组 Sp0148 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(NanA)	糖基化 NanA 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(PiuA)	糖基化 PiuA 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(Sp0148)	糖基化 Sp0148 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT20	Sp4 糖基化增强
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(NanA) pEXT20	糖基化 NanA 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(PiuA) pEXT20	糖基化 PiuA 的制备
大肠杆菌	W311B pB4-4 pEXT21(Sp0148) pEXT20	糖基化 Sp0148 的制备
大肠杆菌	W3110 pB4-4 pEXT21(PiuA) pEXT20	重组 PiuA / LLO 的制备
肺炎链球菌	TIGR4	血清型 4
肺炎链球菌	D39	血清型 2
肺炎链球菌	EF3030	血清型 19F
肺炎链球菌	6B	血清型 6B
肺炎链球菌	23F	血清型 23F
葡萄球菌		葡萄球菌表达 WT 荚膜
葡萄球菌		葡萄球菌表达 Spn 4 型荚膜

[0153] *用于疫苗制作

[0154] 表1

[0155] 参考文献

[0156] 1.Jacobs DM Yung F,Hart E,Nguyen MNH,Shaver A.Trends in pneumococcal meningitis hospitalizations following the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the United States.Vaccine.2017;35(45):6160-5.

[0157] 2.Polkowska A,et al BMJ Open.2017;7(5):e015080.

[0158] 3.Hsu HE,Shutt KA,Moore MR,Beall BW,Bennett NM,Craig AS,et al.Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis.N Engl J Med.2009;360(3):244-56.

[0159] 4.Bijlsma MW,Brouwer MC,Kasanmoentalib ES,Kloek AT,Lucas MJ,Tanck MW,

et al.Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14:a prospective cohort study.Lancet Infect Dis.2016;16(3):339-47.

[0160] 5.Alari A,Chaussade H,Domenech De Celles M,Le Fouler L,Varon E, Opatowski L,et al.Impact of pneumococcal conjugate vaccines on pneumococcal meningitis cases in France between 2001and 2014:a time series analysis.BMC medicine.2016;14(1):211.

[0161] 6.Pirez MC,Mota MI,Giachetto G,Sanchez Varela M,Galazka J,Gutierrez S,et al.Pneumococcal Meningitis Before and After Universal Vaccination With Pneumococcal Conjugate Vaccines 7/13,Impact on Pediatric Hospitalization in Public and Nonpublic Institutions,in Uruguay.Pediatr Infect Dis J.2017;36 (10):1000-1.

[0162] 7.Nhantumbo AA,Weldegebriel G,Katsande R,de Gouveia L,Come CE,Cuco AZ,et al.Surveillance of impact of PCV-10vaccine on pneumococcal meningitis in Mozambique,2013-2015.PLoS One.2017;12(6):e0177746.

[0163] 8.Azevedo J,Dos Anjos ES,Cordeiro SM,Dos Santos MS,Escobar EC,Lobo PR,et al.Genetic profiles and antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae non-PCV10 serotype isolates recovered from meningitis cases in Salvador,Brazil.J Med Microbiol.2016;65(10):1164-70.

[0164] 9.Hausdorff WP,Bryant J,Paradiso PR,Siber GR.Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease:implications for conjugate vaccine formulation and use,part I.Clin Infect Dis.2000;30(1):100-21.

[0165] 10.Geno KA,Gilbert GL,Song JY,Skovsted IC,Klugman KP,Jones C,et al.Pneumococcal Capsules and Their Types:Past,Present,and Future.Clin Microbiol Rev.2015;28(3):871-99.

[0166] 11.Skov Sorensen UB,Yao K,Yang Y,Tettelin H,Kilian M.Capsular Polysaccharide Expression in Commensal Streptococcus Species:Genetic and Antigenic Similarities to Streptococcus pneumoniae.MBio.2016;7(6).

[0167] 12.Miller E,Andrews NJ,Waight PA,Slack MP,George RC.Herd immunity and serotype replacement 4years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales:an observational cohort study.Lancet Infect Dis.2011;11(10):760-8.

[0168] 13.Waight PA,Andrews NJ,Ladhani SN,Sheppard CL,Slack MP,Miller E.Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4years after its introduction:an observational cohort study.Lancet Infect Dis.2015;15(5):535-43.

[0169] 14.Bonten MJ,Huijts SM,Bolkenbaas M,Webber C,Patterson S,Gault S,et al.Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults.N Engl J Med.2015;372(12):1114-25.

[0170] 15.van Hoek AJ,Miller E.Cost-Effectiveness of Vaccinating

Immunocompetent>/＝65Year Olds with the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England.PLoS One.2016;11(2):e0149540.

[0171] 16.Wacker M,Linton D,Hitchen PG,Nita-Lazar M,Haslam SM,North SJ,et al.N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E.coli.Science.2002;298(5599):1790-3.

[0172] 17.Kay EJ,Yates LE,Terra VS,Cuccui J,Wren BW.Recombinant expression of Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides in Escherichia coli.Open Biol.2016;6(4):150243.

[0173] 18.Linton D,Dorrell N,Hitchen PG,Amber S,Karlyshev AV,Morris HR,et al.Functional analysis of the Campylobacter jejuni N-linked protein glycosylation pathway.Mol Microbiol.2005;55(6):1695-703.

[0174] 19.Donnelly JJ,Deck RR,Liu MA.Immunogenicity of a Haemophilus influenzae polysaccharide-Neisseria meningitidis outer membrane protein complex conjugate vaccine.J Immunol.1990;145(9):3071-9.

[0175] 20.Forsgren A,Riesbeck K,Janson H.Protein D of Haemophilus influenzae:a protective nontypeable H.influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines.Clin Infect Dis.2008;46(5):726-31.

[0176] 21.Avci FY,Li X,Tsuji M,Kasper DL.A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design.Nat Med.2011;17(12):1602-9.

[0177] 22.Stefanetti G,Hu QY,Usera A,Robinson Z,Allan M,Singh A,et al.Sugar-Protein Connectivity Impacts on the Immunogenicity of Site-Selective Salmonella O-Antigen Glycoconjugate Vaccines.Angew Chem Int Ed Engl.2015;54(45):13198-203.

[0178] 23.Genschmer KR,Accavitti-Loper MA,Briles DE.A modified surface killing assay(MSKA)as a functional in vitro assay for identifying protective antibodies against pneumococcal surface protein A(PspA).Vaccine.2013;32(1):39-47.

[0179] 24.Moffitt KL,Gierahn TM,Lu YJ,Gouveia P,Alderson M,Flechtner JB,et al.T(H)17-based vaccine design for prevention of Streptococcus pneumoniae colonization.Cell Host Microbe.2011;9(2):158-65.

[0180] 25.Malley R,Trzcinski K,Srivastava A,Thompson CM,Anderson PW,Lipsitch M.CD4+T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization.Proc Natl Acad Sci U S A.2005;102(13):4848-53.

[0181] 26.Tu AH,Fulgham RL,McCrory MA,Briles DE,Szalai AJ.Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by Streptococcus pneumoniae.Infect Immun.1999;67(9):4720-4.

[0182] 27.Cheng Q,Finkel D,Hostetter MK.Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from Streptococcus

pneumoniae.Biochemistry.2000;39(18):5450-7.

[0183] 28.Janulczyk R,Iannelli F,Sjoholm AG,Pozzi G,Bjorck L.Hic,a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function.J Biol Chem.2000;275(47):37257-63.

[0184] 29.Uchiyama S,Carlin AF,Khosravi A,Weiman S,Banerjee A,Quach D,et al.The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion.J Exp Med.2009;206(9):1845-52.

[0185] 30.Yamaguchi M,Nakata M,Sumioka R,Hirose Y,Wada S,Akeda Y,et al.Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems.Virulence.2017:1-9.

[0186] 31.Mahdi LK,Wang H,Van der Hoek MB,Paton JC,Ogunniyi AD.Identification of a novel pneumococcal vaccine antigen preferentially expressed during meningitis in mice.J Clin Invest.2012;122(6):2208-20.

[0187] 32.Cuccui J,Thomas RM,Moule MG,D'Elia RV,Laws TR,Mills DC,et al.Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against Francisella tularensis.Open Biol.2013;3(5):130002.

[0188] 33.Riddle MS,Kaminski RW,Di Paolo C,Porter CK,Gutierrez RL,Clarkson KA,et al.Safety and Immunogenicity of a Candidate Bioconjugate Vaccine against Shigella flexneri 2a Administered to Healthy Adults:a Single-Blind,Randomized Phase I Study.Clin Vaccine Immunol.2016;23(12):908-17.

[0189] 34.Brown JS,Ogunniyi AD,Woodrow MC,Holden DW,Paton JC.Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic Streptococcus pneumoniae infection.Infect Immun.2001;69(11):6702-6.

[0190] 35.Bernatchez S,Szymanski CM,Ishiyama N,Li J,Jarrell HC,Lau PC,et al.A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of three cell surface glycoconjugates in Campylobacter jejuni.J Biol Chem.2005;280(6):4792-802.

[0191] 36.Wilson R,Cohen JM,Reglinski M,Jose RJ,Chan WY,Marshall H,et al.Naturally Acquired Human Immunity to Pneumococcus Is Dependent on Antibody to Protein Antigens.PLoS Pathog.2017;13(1):e1006137.

[0192] 37.Reglinski M,Gierula M,Lynskey NN,Edwards RJ,Sriskandan S.Identification of the Streptococcus pyogenes surface antigens recognised by pooled human immunoglobulin.Sci Rep.2015;5:15825.

[0193] 38.Gessner BD,Mueller JE,Yaro S.African meningitis belt pneumococcal disease epidemiology indicates a need for an effective serotype 1 containing vaccine,including for older children and adults.BMC Infect Dis.2010;10:22.

[0194] 39.Wacker M,Feldman MF,Callewaert N,Kowarik M,Clarke BR,Pohl NL,et al.Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a

common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems.Proc Natl Acad Sci U S A.2006;103(18):7088-93.

[0195] 40.Zhang Z,Clarke TB,Weiser JN.Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice.J Clin Invest.2009;119(7):1899-909.

[0196] 41.Terra et al(2012)J.Med.Microbiol.61 919-926.

[0197] 42.WO2009/104074

[0198] 43.WO2014/114926

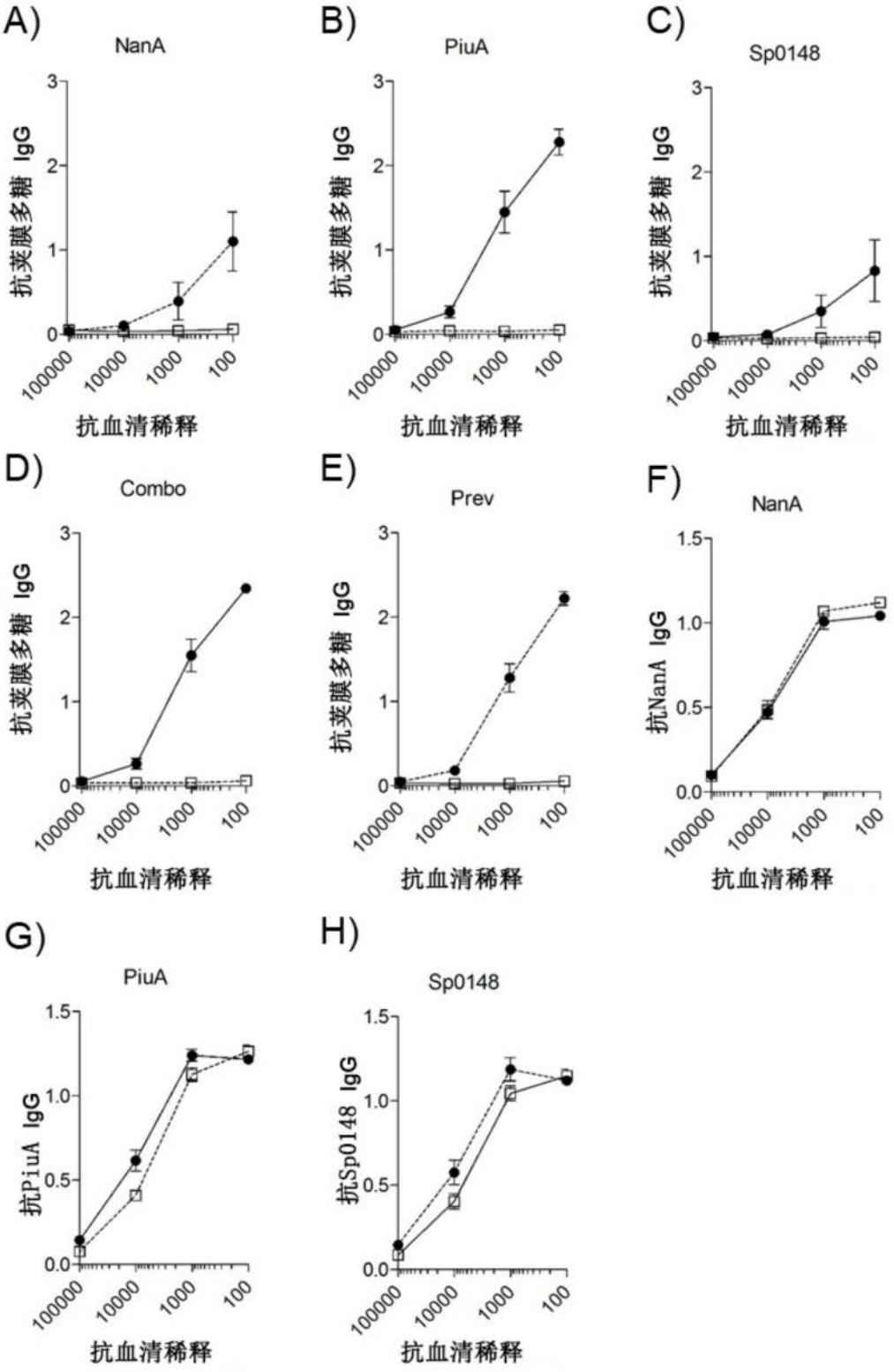

A)
NanA
抗荚膜多糖 IgG
抗血清稀释
B)
PiuA
抗荚膜多糖 IgG
抗血清稀释
C)
Sp0148
抗荚膜多糖 IgG
抗血清稀释
D)
Combo
抗荚膜多糖 IgG
抗血清稀释
E)
Prev
抗荚膜多糖 IgG
抗血清稀释
F)
NanA
抗NanA IgG
抗血清稀释
G)
PiuA
抗PiuA IgG
抗血清稀释
H)
Sp0148
抗Sp0148 IgG
抗血清稀释
100000
10000
1000
100

图1

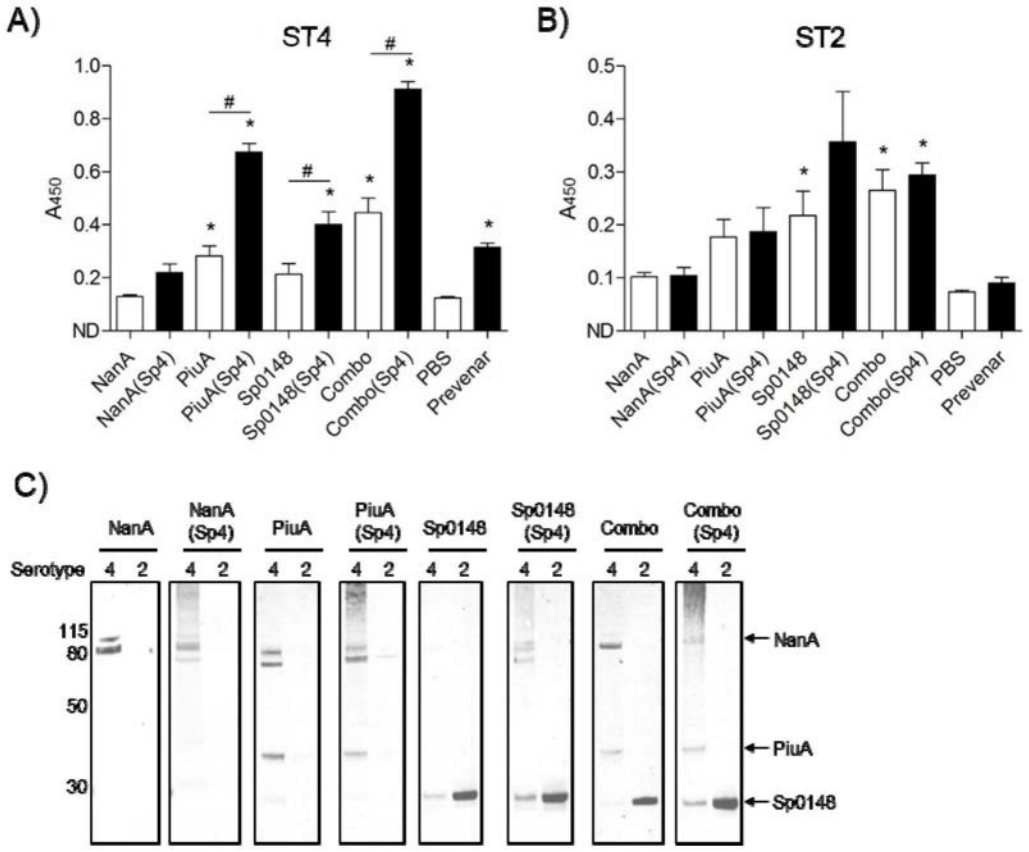

A)
ST4
A450
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
ND
NanA
NanA(Sp4)
PiuA
PiuA(Sp4)
Sp0148
Sp0148(Sp4)
Combo
Combo(Sp4)
PBS
Prevenar
B)
ST2
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
C)
NanA
NanA (Sp4)
PiuA
PiuA (Sp4)
Sp0148
Sp0148 (Sp4)
Combo
Combo (Sp4)
Serotype 4 2
115
80
50
30
NanA
PiuA
Sp0148

图2

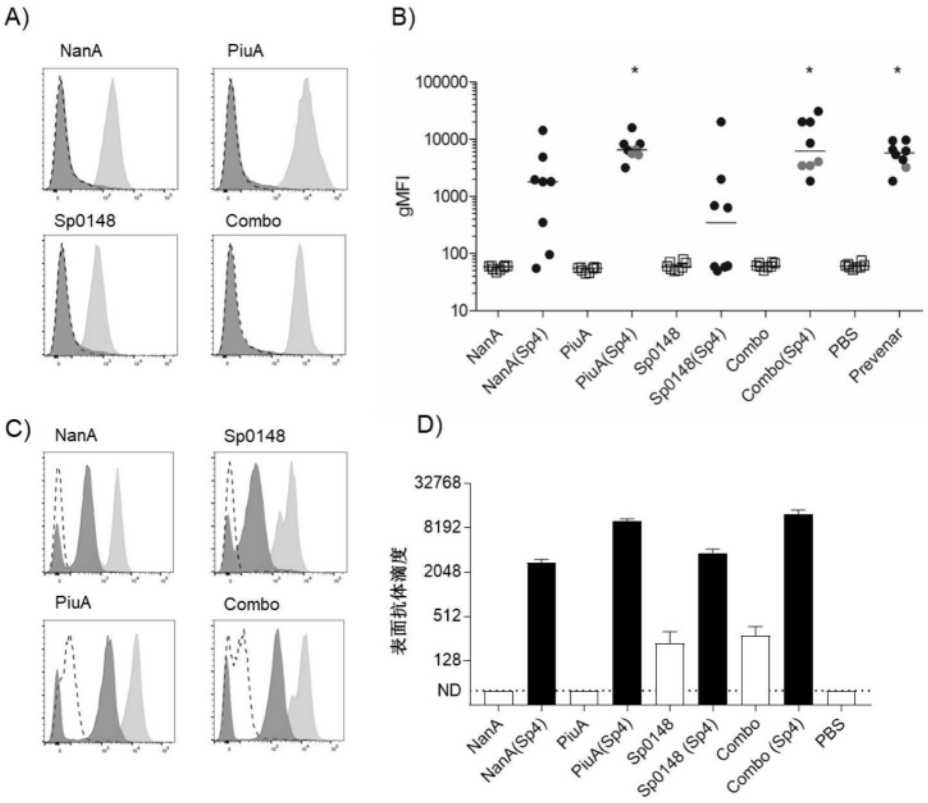

A)
NanA
PiuA
Sp0148
Combo
B)
gMFI
100000
10000
1000
100
10
NanA
NanA(Sp4)
PiuA
PiuA(Sp4)
Sp0148
Sp0148(Sp4)
Combo
Combo(Sp4)
PBS
Prevenar
C)
NanA
Sp0148
PiuA
Combo
D)
表面抗体滴度
32768
8192
2048
512
128
ND
NanA
NanA(Sp4)
PiuA
PiuA(Sp4)
Sp0148
Sp0148 (Sp4)
Combo
Combo (Sp4)
PBS

图3

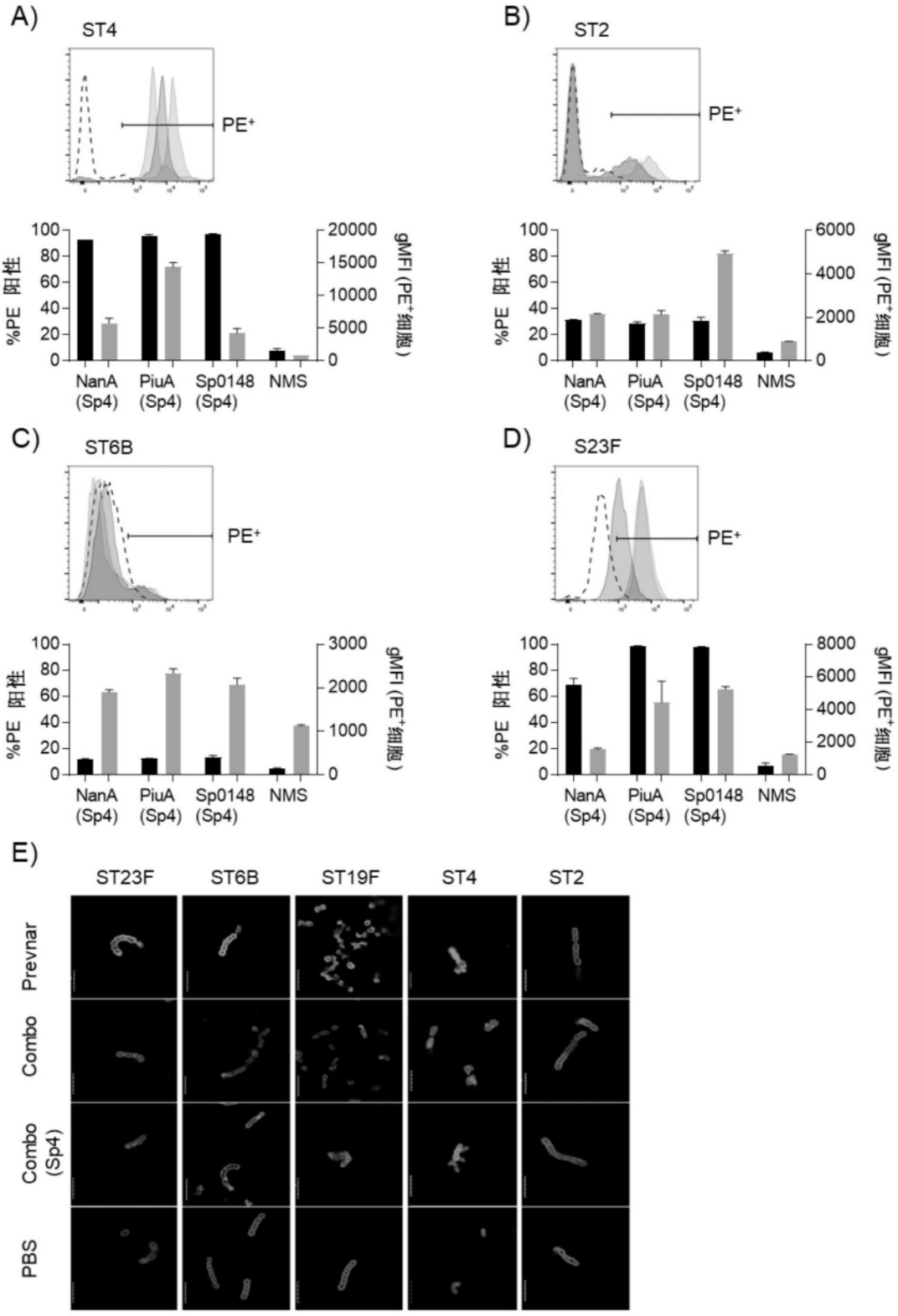

A)
ST4
PE+
%PE 阳性
gMFI (PE+细胞)
NanA (Sp4)
PiuA (Sp4)
Sp0148 (Sp4)
NMS
B)
ST2
C)
ST6B
D)
S23F
E)
ST23F
ST6B
ST19F
ST4
ST2
Prevnar
Combo
Combo (Sp4)
PBS

图4

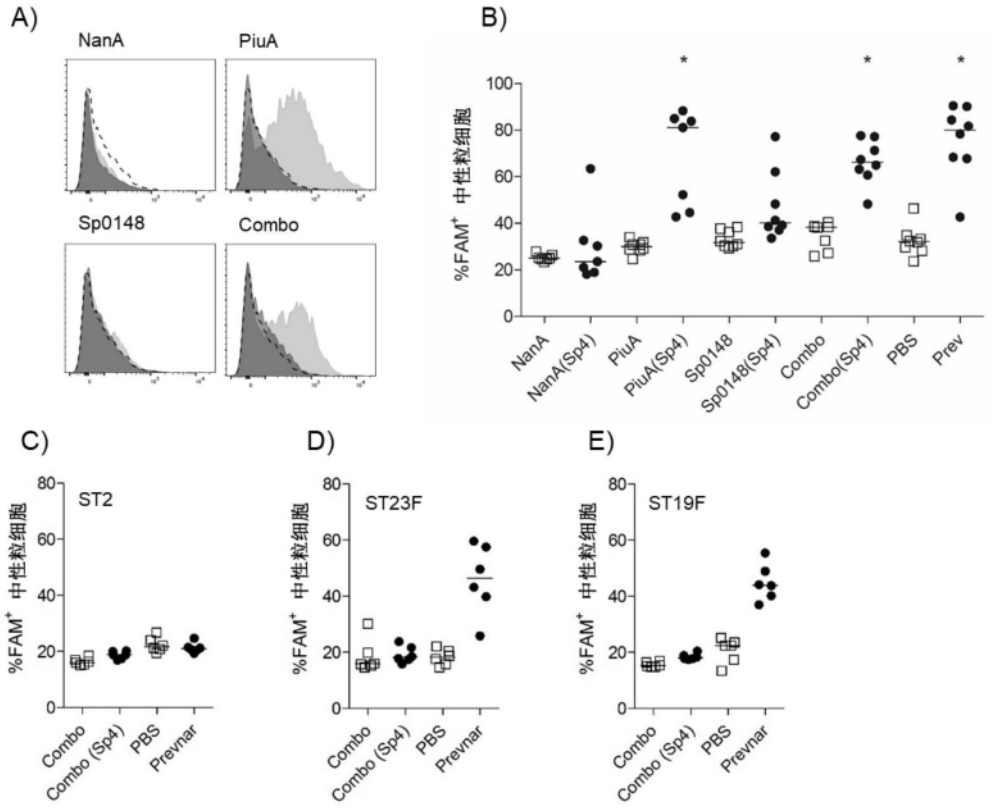

A)
NanA
PiuA
Sp0148
Combo
B)
%FAM+ 中性粒细胞
NanA
NanA(Sp4)
PiuA
PiuA(Sp4)
Sp0148
Sp0148(Sp4)
Combo
Combo(Sp4)
PBS
Prev
C)
ST2
D)
ST23F
E)
ST19F
Combo
Combo (Sp4)
PBS
Prevnar

图5

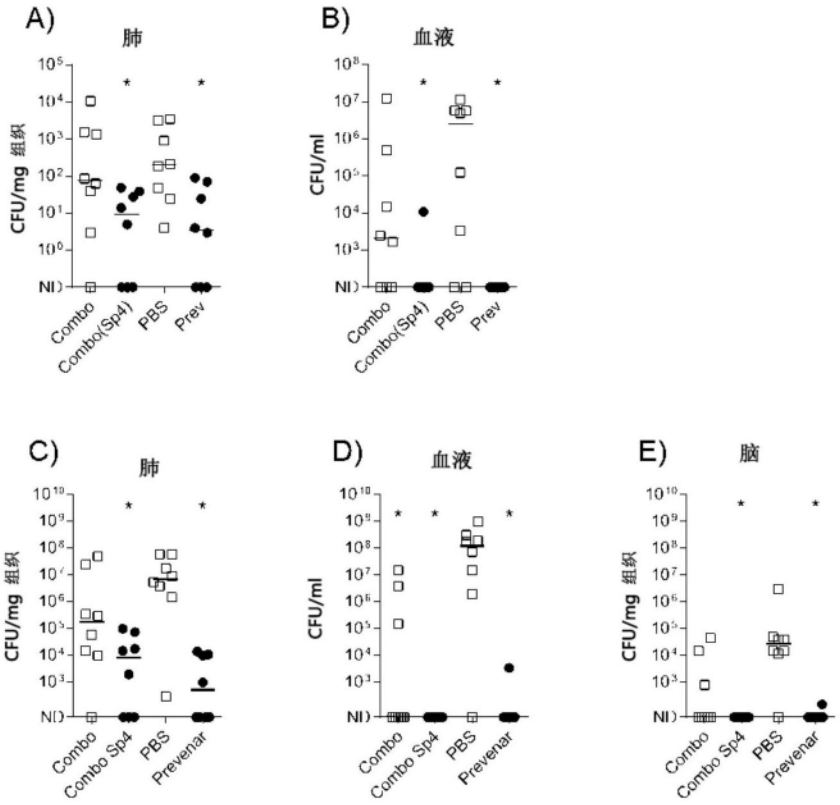

A)
肺
CFU/mg 组织
ND
Combo
Combo(Sp4)
PBS
Prev
B)
血液
CFU/ml
ND
Combo
Combo(Sp4)
PBS
Prev
C)
肺
CFU/mg 组织
ND
Combo
Combo Sp4
PBS
Prevenar
D)
血液
CFU/ml
ND
Combo
Combo Sp4
PBS
Prevenar
E)
脑
CFU/mg 组织
ND
Combo
Combo Sp4
PBS
Prevenar

图6