



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112336854 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202011016155.6

A61K 39/385 (2006.01)

(22) 申请日 2015.01.15

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112336854 A

(43) 申请公布日 2021.02.09

(30) 优先权数据

61/929,561 2014.01.21 US

(62) 分案原申请数据

201580005248.X 2015.01.15

(73) 专利权人 辉瑞大药厂

地址 美国纽约州

(72) 发明人 M·韩 A·K·普雷萨德 D·库泊

W·J·沃特森

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 张小勇

(56) 对比文件

CN 101600459 A, 2009.12.09

CN 102883745 A, 2013.01.16

Pinayur S. Venkateswaran等.Type

Variation of Strains of Streptococcus pneumoniae in Capsular Serogroup 15.The Journal of Infectious Diseases.1983,第147卷(第6期),第1042页右栏最后一段至第1043页右栏第4段,第1046页左栏第2段,第1050页左栏最后一段,表3.

慕艳红等.离子色谱在多糖疫苗及多糖蛋白结合疫苗质量控制中的应用.微生物学免疫学进展.2012,第40卷(第6期),第81页左栏第2段,第81页左栏最后一段至右栏第1段.

审查员 闫华玉

(51) Int.Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

权利要求书1页 说明书29页

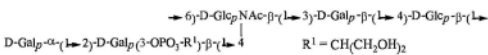
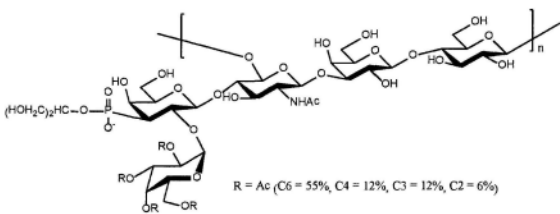
序列表9页 附图1页

(54) 发明名称

肺炎链球菌荚膜多糖及其缀合物

(57) 摘要

本发明涉及分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖和它们的制备方法。本发明还涉及包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物,它们的制备方法和包含它们的免疫原性组合物。



C₃₇H₆₁NNaO₃₁P, MW=1069.8

Ac= 乙酰基

1. 免疫原性组合物在制备用于预防人类受试者感染血清型15C肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)的疫苗中的用途,所述免疫原性组合物包含免疫原性缀合物,所述免疫原性缀合物包含共价连接到载体蛋白的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖,其中所述免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸盐,其中当施用于人类受试者时,所述免疫原性组合物诱导能够在调理吞噬作用测定法(OPA)中杀死血清型15B和15C肺炎链球菌的抗体的形成。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐与分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐的比例为至少0.65。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐与分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐的比例为至少0.7。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐与分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的mM乙酸盐的比例为至少0.8。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的用途,其中所述免疫原性缀合物由以下之一表征:

其中所述免疫原性缀合物包含相比血清型15B荚膜多糖的总量小于40%的游离血清型15B荚膜多糖;

其中所述免疫原性缀合物具有3000-20000kDa的分子量;

其中缀合物中血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的比例是0.4-2;

和

其中缀合度是2-15。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述免疫原性组合物进一步包含至少一种额外的抗原。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中所述免疫原性组合物进一步包含佐剂。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述免疫原性组合物进一步包含佐剂。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述佐剂是磷酸铝。

11. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中用于预防人类受试者感染血清型15C肺炎链球菌的疫苗是用于预防在人类受试者中与血清型15B和15C肺炎链球菌相关的肺炎链球菌感染的疫苗。

肺炎链球菌荚膜多糖及其缀合物

[0001] 本申请是CN201580005248.X的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及分离的肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型15B荚膜多糖和它们的制备方法。本发明还涉及包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物,它们的制备方法和包含它们的免疫原性组合物和疫苗。

背景技术

[0003] 肺炎链球菌是革兰氏阳性、柳叶刀形球菌,其通常成对出现(双球菌),也可以短链或作为单细胞出现。它们很容易生长在血琼脂平板上,具有发光的菌落并显示 α 溶血,除非厌氧培养,它们表现出 β 溶血。大多数肺炎球菌血清型的细胞具有荚膜,其是每个细胞周围的多糖包衣。此荚膜是在人类中毒力的决定因素,因为其通过阻止抗体附着到细菌细胞而干扰吞噬作用。目前鉴定了超过90种已知的肺炎球菌荚膜血清型,其中23种最常见的血清型占全球侵袭性疾病的大约90%。作为疫苗,肺炎球菌多糖包衣在具有发达的或未受损害的免疫系统的个体中可赋予合理程度的对肺炎链球菌的免疫性,而缀合到合适的载体蛋白的荚膜多糖允许在婴儿和也对于肺炎球菌感染风险最大的老年人中的免疫应答。

[0004] 自从2000年推出第一款7价肺炎球菌缀合疫苗(PCV7或Pneumovax)以来,来自那七个血清型(4、6B、9V、14、18C、19F、和23F)的侵袭性疾病已几乎消失。在Pneumovax 13中加入血清型1、3、5、6A、7F和19A进一步降低了侵袭性肺炎球菌疾病的数目。

[0005] 然而,由非疫苗血清型(诸如肺炎链球菌血清型15A、15B和15C)导致的侵袭性肺炎球菌疾病的发病率最近已增加(参见例如Beall B.等, *Journal of Clinical Microbiology*.44(3):999-1017, 2006,或Jacobs 等, *Clin Infect Dis.* (2008) 47(11): 1388-1395)。目前市售的肺炎球菌疫苗无一提供在人以及特别是在小于2岁的儿童中针对血清型15B肺炎链球菌的适当的保护。因此,存在对可用于诱导针对血清型15B肺炎链球菌的免疫反应的免疫原性组合物的需要。如果这样的免疫原性组合物可用于保护受试者免受血清型15C和/或15A肺炎链球菌的侵害,也将是额外的益处。

发明概述

[0006] 在一方面,本公开内容提供了一种具有5kDa-500kDa的分子量的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖。

[0007] 在进一步的方面,本公开内容提供了分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖,每mM所述肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8mM,优选至少0.6mM乙酸盐。

[0008] 在进一步的方面,本公开内容提供了分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖,每mM所述肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8mM,优选至少0.6mM甘油。

[0009] 在进一步的方面,本公开内容提供一种包含共价连接到载体蛋白的本文所公开的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物。在一方面,所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0010] 在进一步的方面,本公开内容提供了包含本文所公开的免疫原性缀合物和生理上可接受的媒介物的免疫原性组合物。在一方面,所述免疫原性组合物还包含至少一种额外的抗原。在一方面,所述免疫原性组合物还包含佐剂。

[0011] 在进一步的方面,本公开内容提供了包含如本文所公开的免疫原性组合物的疫苗。

[0012] 在进一步的方面,本公开内容提供了用于生产如本文所公开的分离的血清型15B多糖的方法,该方法包括以下步骤:

[0013] (a) 制备肺炎链球菌血清型15B细菌细胞的发酵培养物;

[0014] (b) 裂解所述发酵培养物中的细菌细胞;

[0015] (c) 从发酵培养物纯化肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖;和,

[0016] (d) 通过高压均质裁剪(sizing)纯化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖。

[0017] 在进一步的方面,本公开内容提供一种用于生产活化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的方法,所述方法包括使如本文所公开的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖与氧化剂反应的步骤。在一方面,本公开内容提供了通过上述方法获得或可获得的活化的血清型15B荚膜多糖。

[0018] 在进一步的方面,本公开内容提供了包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] (a) 混合如本文公开的活化的多糖与载体蛋白;

[0020] (b) 使所述混合的活化的多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物。在一方面,本公开内容提供了通过上述方法获得或可获得的免疫原性结合物。

[0021] 在进一步的方面,本公开内容提供了保护受试者免于血清型15B肺炎链球菌感染的方法,所述方法包括给受试者施用免疫原性量的本文所公开的免疫原性组合物或疫苗。

[0022] 在进一步的方面,本公开内容提供了治疗或预防在受试者中与血清型15A、15B和/或15C肺炎链球菌相关的肺炎链球菌感染、疾病或病况的方法,所述方法包括施用治疗或预防有效量的本文中公开的免疫原性组合物或疫苗的步骤。

附图简述

[0023] 图1—肺炎球菌荚膜多糖血清型15B重复单元的结构。

发明详述

[0024] 本发明可以通过参考以下本发明优选实施方案和本文包括的实施例的详细描述而更容易地理解。除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与此发明所属领域技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些类似或等效的方法和材料可以用于实践或测试本发明,本文仍然描述了某些优选的方法和材料。在描述实施方案和主张本发明中,可以根据下列定义使用某些术语。

[0025] 定义

[0026] 如本文所用,多糖或多肽-载体蛋白缀合物的“分子量”指通过尺寸排阻色谱法(SEC)结合多角度激光散射检测器(MALLS)计算得到的分子量。

[0027] 如本文所用,术语“游离多糖”指没有共价缀合到载体蛋白但是在血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物组合中存在的血清型15B荚膜多糖。游离多糖可以非共价连接(即,非共价结合、吸附、或被捕获于其中或用其捕获)多糖载体蛋白缀合物。

[0028] 游离多糖的百分比在血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物的最终纯化后测量。优选地,其在最终纯化后4周内测量。其表示为样品中总的多糖的百分比。

[0029] 如本文所用,术语“血清型15B多糖”或“血清型15B荚膜多糖”指肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖。

[0030] 如本文所用,术语“血清型15B糖缀合物”或“血清型15B缀合物”指共价缀合到载体蛋白的分离的血清型15B多糖。

[0031] 如本文所用,术语“氧化度”(DO)指当分离的多糖用氧化剂活化时每个生成的醛基的糖重复单元数目。多糖的氧化度可以使用本领域技术人员已知的常规方法确定。

[0032] 如本文所用,术语“受试者”指哺乳动物,包括人,或指鸟、鱼、爬行动物、两栖动物或任何其它动物。术语“受试者”还包括家庭宠物或研究动物。家庭宠物和研究动物的非限制性实例包括:狗、猫、猪、兔、大鼠、小鼠、沙土鼠、仓鼠、豚鼠、雪貂、猴、鸟、蛇、蜥蜴、鱼、龟和蛙。术语“受试者”还包括家畜动物。家畜动物的非限制性实例包括:羊驼、野牛、骆驼、牛、鹿、猪、马、美洲驼、骡、驴、绵羊、山羊、兔、驯鹿、牦牛、鸡、鹅和火鸡。

[0033] 分离的血清型15B荚膜多糖

[0034] 如在图1中所示,血清型15B的多糖重复单元由分支的三糖主链(一个N-乙酰葡萄糖胺(Glc_pNAc)、一个吡喃半乳糖(Gal_p)和一个吡喃葡萄糖(Glc_p))与连接于 Glc_pNAc 的C4羟基的 αGal_p - βGal_p 二糖分支组成。磷酸甘油连接到二糖分支中 βGal_p 残基的C3羟基。血清型15B荚膜多糖是O-乙酰化的并且O-乙酰化总量是每个多糖重复单元约为0.8至0.9个O-乙酰基(参见例如C. Jones 等, *Carbohydrate Research*, 340 (2005) 403-409)。来自血清型15C血清型的荚膜多糖具有与血清型15B相同的主链结构但是缺少O-乙酰化。

[0035] 本发明的分离的血清型15B多糖可以通过包含下列步骤的方法获得:

[0036] (a) 制备血清型15B肺炎链球菌细菌细胞的发酵培养物;

[0037] (b) 裂解所述发酵培养物中的细菌细胞;

[0038] (c) 从发酵培养物纯化血清型15B多糖;和,

[0039] (d) 通过高压均质裁剪纯化的血清型15B多糖。

[0040] 血清型15B多糖可以使用本领域技术人员已知的分离方法直接从细菌获得(参见,例如美国专利申请公开号20060228380、20060228381、20070184071、20070184072、20070231340和20080102498或W02008118752公开的方法)。此外,它们可以使用合成方案生产。

[0041] 血清型15B肺炎链球菌菌株可以获自建立的培养物集合(诸如例如ATCC保藏菌株 No ATCC10354或可获自疾病控制和预防中心的链球菌参考实验室,亚特兰大,佐治亚州(Streptococcal Reference Laboratory of the Center for disease control and prevention, Atlanta, GA)的菌株)或临床样本。

[0042] 细菌细胞优选在基于大豆的培养基中生长。生产肺炎链球菌血清型15B的细菌细胞发酵后,裂解细菌细胞以产生细胞裂解物。细菌细胞可以使用任意裂解剂进行裂解。“裂解剂”是帮助细胞壁破裂和导致细胞裂解的自溶素释放的试剂,包括例如,去垢剂。如本文所用,术语“去垢剂”指能够诱导细菌细胞裂解的任何阴离子或阳离子去垢剂。用于在本发明的方法中使用的此类去垢剂的代表性实例包括脱氧胆酸钠(DOC)、N-月桂酰肌氨酸、鹅脱氧胆酸钠和皂苷。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,用于裂解细菌细胞的裂解剂是DOC。DOC是胆汁酸脱氧胆酸的钠盐,其通常来源于生物来源,诸如母牛或公牛。DOC活化LytA蛋白,其是参与肺炎链球菌细胞壁生长和分裂的自溶素。LytA蛋白在其C-末端部分具有胆碱结合域,并且已知lytA基因的突变产生对DOC裂解有抗性的LytA突变体。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,用于溶解细菌细胞的裂解剂是非动物来源的裂解剂。用于在本发明的方法中使用的非动物来源的裂解剂包括来自非动物来源的与DOC具有类似作用模式的试剂(即,所述作用模式是影响LytA功能并导致肺炎链球菌细胞裂解)。此类非动物来源的裂解剂包括但不限于DOC的类似物、表面活性剂、去垢剂和胆碱结构类似物。在一个实施方案中,非动物来源的裂解剂选自癸磺酸、叔辛基苯氧基聚(氧乙烯)乙醇(例如Igepal®CA-630,CAS#:9002-93-1,可购自Sigma Aldrich, St. Louis, MO),辛基酚环氧乙烷缩合物(例如Triton X-100,可购自Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、N-月桂酰肌氨酸、N-月桂酰肌氨酸钠、月桂基亚氨基二丙酸、十二烷基硫酸钠、鹅脱氧胆酸盐、猪脱氧胆酸盐、甘氨酸脱氧胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐、牛磺鹅脱氧胆酸盐和胆酸盐。在另一个实施方案中,非动物来源的裂解剂是N-月桂酰肌氨酸。在另一个实施方案中,所述裂解剂是N-月桂酰肌氨酸钠。

[0045] 血清型15B多糖然后可以使用本领域中已知的纯化技术(包括使用离心、深度过滤、沉淀、超滤、活性炭处理、渗滤和/或柱色谱法)从细胞裂解物中分离(参见,例如美国专利申请公开号20060228380、20060228381、20070184071、20070184072、20070231340和20080102498或W02008118752)。可以然后使用纯化的血清型15B荚膜多糖用于免疫原性缀合物的制备。

[0046] 优选地,为了生成具有有利的滤过性特征和/或收率的缀合物,在缀合到载体蛋白之前进行多糖的裁剪成低分子量(MW)范围。有利地,纯化的血清型15B多糖的大小减小同时保留多糖结构的关键特征,诸如例如存在O-乙酰基。优选地,纯化的血清型15B多糖的大小通过机械均质来减小。

[0047] 在优选的实施方案中,纯化的血清型15B多糖的大小通过高压均质来减小。高压均质通过将工艺流泵送通过具有足够小尺寸的流路实现高剪切率。通过使用更大的施加的均质压力增加剪切率并且暴露时间可以通过将进料流再循环通过均质机而增加。

[0048] 高压均质方法特别适用于减小纯化的血清型15B多糖的大小,同时保留多糖的结构特征,诸如O-乙酰基的存在。

[0049] 通过从肺炎链球菌裂解物纯化血清型15B多糖和任选地纯化的多糖的裁剪所获得的分离的血清型15B荚膜多糖可以通过不同的参数来表征,包括例如分子量、每mM所述血清型15B荚膜多糖的甘油的mM、每mM所述血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM。

[0050] 多糖的O-乙酰化程度可通过本领域中已知的任何方法确定,例如通过质子NMR(参

见例如Lemercinier和Jones(1996) Carbohydrate Research 296; 83-96、Jones 和 Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247、W005/033148或W000/56357)。另一种常用方法描述于Hestrin(1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261中。优选地,0-乙酰基的存在通过离子HPLC分析确定。

[0051] 在纯化的、分离的或活化的血清型15B荚膜多糖中或在血清型15B多糖-载体蛋白缀合物中0-乙酰基的存在表示为每mM所述多糖的乙酸盐的mM数或作为每个多糖重复单元0-乙酰基的数目。

[0052] 甘油磷酸侧链的存在可以在通过用氢氟酸(HF)处理多使其释放后,通过使用具有脉冲安培检测法的高效阴离子交换色谱法(HPAEC-PAD)测量甘油来确定。在纯化的分离的或活化的血清型15B荚膜多糖中或在血清型15B多糖-载体蛋白缀合物中甘油的存在表示为每mM血清型15B多糖的甘油的mM数。

[0053] 分离的血清型15B荚膜多糖也可以使用本领域技术人员已知的方法合成产生。

[0054] 在优选的实施方案中,分离的血清型15B荚膜多糖具有5-500kDa、50-500 kDa、50-450kDa、100-400kDa、100-350kDa的分子量。在优选的实施方案中,分离的血清型15B荚膜多糖具有100-350kDa的分子量。在优选的实施方案中,分离的血清型15B荚膜多糖具有100-300kDa的分子量。在优选的实施方案中,分离的血清型15B荚膜多糖具有150-300kDa的分子量。

[0055] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6、或0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,0-乙酰基的存在通过离子-HPLC分析确定。

[0056] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6、或0.7 mM甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM甘油。

[0057] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100-350kDa、优选150-350kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐。

[0058] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100-350kDa、优选150-350kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0059] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐和每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0060] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100-350kDa、优选150-350kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐和每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0061] 血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物

[0062] 分离的血清型15B荚膜多糖可以缀合到载体蛋白以获得免疫原性缀合物。分离的多糖可以通过本领域技术人员已知的方法缀合到载体蛋白(参见例如美国专利申请公开号20060228380、20070184071、20070184072、20070231340或W02011/100151)。

[0063] 在一个实施方案中,可以用1-氰基-4-二甲基氨基-吡啶鎓四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯。活化的多糖可以与载体蛋白上的氨基直接偶联或通过间隔子(接头)基团偶联。例如,间隔可为脒胺或半脒胺以提供硫醇化多糖,其可通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如,使用GMBS)或卤乙酰化的载体蛋白(例如使用碘乙酰亚胺或溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯或SIAB,或SIA,或SBAP)反应后获得的硫醚键与载体偶联。优选地,氰酸酯(任选地通过CDAP化学反应制得)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联,并且氨基衍生化的糖采用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学反应通过蛋白载体上的羧基与载体蛋白偶联。此类缀合物描述于例如W093/15760、W0 95/08348和W0 96129094。

[0064] 其他合适的技术使用碳二亚胺、酰肼、活性酯、降冰片烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。很多描述于国际专利申请公开号W098/42721中。偶联可以涉及羰基接头,其可以通过使糖的游离羟基与CDI反应形成(参见Bethell 等, 1979, 1. Biol. Chern. 254:2572-4; Hearn 等, 1981, J. Chromatogr. 218:509-18),之后与蛋白反应以形成氨基甲酸酯键。这可涉及到异头末端还原到伯羟基,任选地,伯羟基基团的保护/脱保护,伯羟基基团与CDI反应形成CDI氨基甲酸酯中间体,以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白质氨基的偶联。

[0065] 在优选的实施方案中,分离的血清型15B荚膜多糖通过还原性胺化缀合到载体蛋白。还原性胺化涉及通过氧化活化的多糖和活化的多糖通过还原与蛋白载体缀合。

[0066] 血清型15B荚膜多糖的活化

[0067] 活化的血清型15B荚膜多糖通过使分离的血清型15B荚膜多糖与氧化剂反应获得。例如,所述活化的血清型15B荚膜多糖可以通过包括以下步骤的方法获得:

[0068] (a) 制备血清型15B肺炎链球菌细菌细胞的发酵培养物;

[0069] (b) 裂解所述发酵培养物中的细菌细胞;

[0070] (c) 从发酵培养物纯化血清型15B多糖;

[0071] (d) 通过高压均质裁剪纯化的血清型15B多糖。

[0072] (e) 使经裁剪的血清型15B多糖与氧化剂反应。

[0073] 在优选的实施方案中,与氧化剂反应的分离的血清型15B荚膜多糖的浓度为0.1-10mg/mL、0.5-5mg/mL、1-3mg/mL,或约2 mg/mL。

[0074] 在优选的实施方案中,所述氧化剂是高碘酸盐。高碘酸盐氧化邻位羟基以形成羰基或醛基并导致切割C-C键。术语‘高碘酸盐’既包括高碘酸盐也包括高碘酸。该术语还既包括偏高碘酸盐(IO_4^-)也包括正高碘酸盐(IO_6^{5-})。术语‘高碘酸盐’还包括高碘酸盐的各种盐,包括高碘酸钠和高碘酸钾。在优选的实施方案中,所述氧化剂是高碘酸钠。在优选的实施方案中,用于氧化血清型15B荚膜多糖的高碘酸盐是偏高碘酸盐。在优选的实施方案中,用于氧化血清型15B荚膜多糖的高碘酸盐是偏高碘酸钠。

[0075] 在优选的实施方案中,多糖与0.01-10、0.05-5、0.1-1、0.5-1、0.7-0.8、0.05-0.5、0.1-0.3摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、

0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.15摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.25摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.5摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.6摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中,多糖与约0.7摩尔当量的氧化剂反应。

[0076] 在优选的实施方案中,反应的持续时间是1-50、10-30、15-20、15-17小时或约16小时。

[0077] 在优选的实施方案中,反应的温度维持在15-45℃、15-30℃、20-25℃。在优选的实施方案中,反应的温度维持在约23℃。

[0078] 在优选的实施方案中,氧化反应在选自磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)或Bis-Tris的缓冲液中进行。在优选的实施方案中,缓冲液是磷酸钾。

[0079] 在优选的实施方案中,缓冲液具有1-500mM、1-300mM、50-200mM的浓度。在优选的实施方案中,缓冲液具有约100mM的浓度。在优选的实施方案中,氧化反应在4-8、5-7、5.5和6.5的pH下进行。在优选的实施方案中,pH是约6。

[0080] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖通过使0.5-5mg/mL分离的血清型15B荚膜多糖与0.2-0.3摩尔当量的高碘酸盐在20-25℃的温度下反应获得。

[0081] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖是纯化的。活化的血清型15B荚膜多糖根据本领域技术人员已知的方法纯化,诸如凝胶渗透色谱法(GPC)、透析或超滤/渗滤。例如,活化的荚膜多糖通过使用超滤装置浓缩和渗滤。

[0082] 在优选的实施方案中,本发明涉及通过上述公开的方法获得或可获得的活化的血清型15B荚膜多糖。

[0083] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖的氧化度是2-20、2-15、2-10、2-5、5-20、5-15、5-10、10-20、10-15、15-20。在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖的氧化度是2-10、4-8、4-6、6-8、6-12、8-12、9-11、10-16、12-16、14-18、16-20、16-18或18-20。

[0084] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖具有5-500kDa、50-500 kDa、50-450kDa、100-400kDa、100-350kDa的分子量。在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖具有100-350kDa的分子量。在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖具有100-300kDa的分子量。在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖具有150-300kDa的分子量。在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖具有100-250kDa的分子量。

[0085] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,0-乙酰基的存在通过离子-HPLC分析确定。

[0086] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM甘油。在优选的实施方案中,所述活化

的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7 mM甘油。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM甘油。

[0087] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100-250kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐。

[0088] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100-250kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0089] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐和每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0090] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100-250kDa的分子量,并且每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐和每mM所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。

[0091] 在实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖是冻干的,任选地在冷冻保护剂/冻干保护剂的存在下冻干。在实施方案中,所述冷冻保护剂/冻干保护剂是糖。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇及帕拉金糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。冻干的活化的荚膜多糖可以然后与包含载体蛋白的溶液混合。

[0092] 在另一个实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白混合并冻干,任选地在冷冻保护剂/冻干保护剂的存在下冻干。在实施方案中,所述冷冻保护剂/冻干保护剂是糖。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇及帕拉金糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。共冻干的多糖和载体蛋白可以然后重悬在溶液中并与还原剂反应。

[0093] 在实施方案中,本发明涉及冻干的活化的血清型15B荚膜多糖。

[0094] 在实施方案中,本发明涉及共冻干的活化的血清型15B荚膜多糖和蛋白载体。在优选的实施方案中,所述蛋白载体是CRM₁₉₇。

[0095] 活化的血清型15B荚膜多糖和载体蛋白的缀合

[0096] 活化的血清型15B荚膜多糖可以通过包含下列步骤的方法缀合到载体蛋白:

[0097] (a) 混合活化的血清型15B荚膜多糖和载体蛋白,和,

[0098] (b) 使所述混合的活化的血清型15B荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物。

[0099] 与例如在水溶液中的还原胺化(其中多糖的O-乙酰化水平显著降低)相比,通过在二甲亚砜(DMSO)中还原胺化活化的血清型15B荚膜多糖和蛋白载体的缀合适合于保持多糖的O-乙酰基含量。在优选的实施方案中,步骤(a)和步骤(b)在DMSO中进行。

[0100] 在优选的实施方案中,步骤(a)包括在包含载体蛋白和DMSO的溶液中溶解冻干的血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中,步骤(a)包括在DMSO中溶解共冻干的血清型15B荚膜多糖和载体蛋白。

[0101] 当步骤(a)和(b)在水溶液中进行时,步骤(a)和(b)在缓冲液中进行在6.0-8.5、7-8或7-7.5的pH下进行,所述缓冲液优选选自PBS、MES、HEPES、Bis-Tris、ADA、PIPES、MOPSO、BES、

MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Bicine或HEPB。在优选的实施方案中,所述缓冲液是PBS。在优选的实施方案中,pH是约7.3。

[0102] 在优选的实施方案中,步骤(b)中活化的血清型15B荚膜多糖的浓度为0.1-10mg/mL、0.5-5mg/mL、0.5-2mg/mL。在优选的实施方案中,步骤(b)中活化的血清型15B荚膜多糖的浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3 mg/mL。

[0103] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的初始输入比例(重量比)是5:1-0.1:1、2:1-0.1:1、2:1-1:1、1.5:1-1:1、0.1:1-1:1、0.3:1-1:1、0.6:1-1:1。

[0104] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的初始输入比例约0.6:1-1.5:1,优选0.6:1-1:1。这样的初始输入比例特别适合在免疫原性缀合物中获得低水平的游离多糖。

[0105] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的初始输入比例是0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1或2:1。

[0106] 在实施方案中,还原剂是氰基硼氢化钠,三乙酰氧基硼氢化钠,布朗斯台德或路易斯酸存在下的硼氢化钠或硼氢化锌,胺合硼烷(诸如吡啶硼烷、2-甲基吡啶硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、苄胺- BH_3 或5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)。在优选的实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。在优选的实施方案中,所述还原剂是2-甲基吡啶硼烷钠。

[0107] 在优选的实施方案中,在步骤(b)使用的还原剂的量是大约0.1-10摩尔当量、0.5-5摩尔当量,1-2摩尔当量。在优选的实施方案中,在步骤(b)使用的还原剂的量是大约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2摩尔当量。

[0108] 在优选的实施方案中,步骤(b)的持续时间是1-60小时、10-50小时、40-50小时、42-46小时。在优选的实施方案中,步骤(b)的持续时间是约44小时。

[0109] 在优选的实施方案中,步骤(b)中反应的温度维持在10-40°C、15-30°C或20-26°C。在优选的实施方案中,步骤(b)中反应的温度维持在约23°C。

[0110] 在优选的实施方案中,包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物的制备方法进一步包括通过加入 NaBH_4 对未反应的醛加帽(淬灭)的步骤(步骤(c))。

[0111] 在优选的实施方案中,在步骤(c)使用的 NaBH_4 的量是大约0.1-10摩尔当量、0.5-5摩尔当量,1-3摩尔当量。在优选的实施方案中,在步骤(c)使用的 NaBH_4 的量是大约2摩尔当量。

[0112] 在优选的实施方案中,步骤(c)的持续时间是0.1-10小时、0.5-5小时、2-4小时。在优选的实施方案中,步骤(c)的持续时间是约3小时。

[0113] 在优选的实施方案中,步骤(c)中反应的温度维持在15-45°C、15-30°C或20-26°C。在优选的实施方案中,步骤(c)中反应的温度维持在约23°C。

[0114] 在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤b)的产率是大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤b)的产率是大于60%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤b)的产率是大于70%。该产率是在缀合物中血清型15B多糖的量 $\times$

100/缀合步骤中使用的活化的多糖的量。

[0115] 在优选的实施方案中,包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物的制备方法包括以下步骤:

[0116] (a) 制备血清型15B肺炎链球菌细菌细胞的发酵培养物;

[0117] (b) 裂解所述发酵培养物中的细菌细胞;

[0118] (c) 从发酵培养物纯化血清型15B多糖;

[0119] (d) 通过高压均质裁剪纯化的血清型15B多糖;

[0120] (e) 使经裁剪的血清型15B多糖与氧化剂反应;

[0121] (f) 混合活化的血清型15B多糖和载体蛋白,和,

[0122] (g) 使所述混合的活化的血清型15B多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型15B多糖-载体蛋白缀合物;和,

[0123] (h) 通过加入 NaBH_4 使未反应的醛加帽(淬灭)。

[0124] 在优选的实施方案中,上述方法的缀合步骤(步骤g)的产率是大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在优选的实施方案中,所述缀合步骤(步骤g)的产率是大于60%。在优选的实施方案中,所述缀合步骤(步骤g)的产率是大于70%。该产率是在缀合物中血清型15B多糖的量 $\times 100$)/缀合步骤中使用的活化的多糖的量。

[0125] 血清型15B荚膜多糖缀合到载体蛋白之后,可以通过本领域技术人员已知的各种技术纯化多糖-蛋白缀合物(使多糖-蛋白缀合物的量富集)。这些技术包括透析、浓缩/渗滤操作、切向流过滤、沉淀/洗脱、柱色谱法(DEAE或疏水相互作用色谱法)和深度过滤。

[0126] 在优选的实施方案中,载体蛋白是无毒和非反应性的并可以足够的量和纯度获得的。载体蛋白应当适合标准的缀合程序。

[0127] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖缀合选自下列的载体蛋白:DT(白喉毒素);TT(破伤风类毒素)或TT的片段C;CRM₁₉₇(白喉毒素的无毒但抗原性相同的变体);其它DT点突变体诸如CRM176、CRM228、CRM45(Uchida 等 J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973), CRM 9、CRM102、CRM 103和CRM107和其它由Nicholls和Youle描述于Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992中的突变, Glu-148缺失或至Asp、Gln或Ser和/或Ala 158至Gly的突变和描述于US 4709017或US 4950740中的其它突变,至少一个或多个残基Lys 516、Lys 526、Phe 530和/或Lys 534的突变和US 5917017或US 6455673中公开的其它突变,或US 5843711中公开的片段;肺炎球菌的肺炎球菌溶血素(Kuo 等(1995) Infect Immun 63; 2706-13)包括以某种方式脱毒的ply例如dPLY-GMBS(WO 04081515, PCT/EP2005/010258)或dPLY-formol、PhtX,包括PhtA、PhtB、PhtD或PhtE(PhtA、PhtB、PhtD或PhtE的序列公开于WO 00/37105或WO 00/39299)和Pht蛋白的融合蛋白例如PhtDE融合蛋白、PhtBE融合蛋白、Pht A-E(WO 01/98334、WO 03/54007、WO2009/000826);OMPC(脑膜炎球菌外膜蛋白-通常从脑膜炎奈瑟球菌血清组B提取-EP0372501);PorB(来自脑膜炎奈瑟氏球菌);PD(流感嗜血杆菌蛋白D-参见例如,EP 0594610 B),或其免疫功能等价物;合成肽(EP0378881, EP0427347);热休克蛋白(W093/17712, WO 94/03208);百日咳蛋白(W098/58668, EP0471 177);细胞因子;淋巴因子;生长因子或激素(W010 91/01146);包含来自各种病原体来源的抗原的多种人CD4⁺ T细胞表位的人工蛋白(Falugi等(2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824),诸如N19蛋白(Baraldoi

等 (2004) Infect Immun 72; 4884-7);肺炎球菌表面蛋白PspA (WO 02/091998);铁摄取蛋白 (WO 01/72337);艰难梭菌的毒素A或B (WO 00/61761)。在实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖缀合至DT (白喉类毒素)。在另一个实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖缀合至TT (破伤风类毒素)。在另一个实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖缀合至TT的片段C。在另一个实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖缀合至PD (流感嗜血杆菌蛋白D——参见例如 EP 0 594 610 B)。

[0128] 在优选的实施方案中,本发明的活化的血清型15B荚膜多糖缀合至CRM₁₉₇蛋白。CRM₁₉₇蛋白是白喉毒素的无毒形式,但是与白喉毒素免疫原性没有区别。CRM₁₉₇由被通过产毒的 β -棒状杆菌噬菌体 (Corynebacteriophage beta) 的亚硝基胍诱变产生的不产毒的噬菌体 β 197^{tox-}感染的白喉杆菌产生 (Uchida, T. 等 1971, Nature New Biology 233:8-11)。通过超滤,硫酸铵沉淀和离子交换色谱法纯化CRM₁₉₇。CRM₁₉₇蛋白与白喉毒素具有相同的分子量但是与其区别在于结构基因中的单个碱基改变 (鸟嘌呤至腺嘌呤)。此单碱基改变导致成熟蛋白中的氨基酸取代 (甘氨酸被谷氨酸取代),并消除了白喉毒素的毒性。CRM₁₉₇蛋白是用于糖的安全和有效的T细胞依赖性载体。关于CRM₁₉₇和其生产的进一步细节可以见于例如US 5,614,382中。

[0129] 在实施方案中,本发明涉及包含共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物。在实施方案中,本发明涉及包含通过还原胺化共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物。在实施方案中,本发明涉及包含通过在DMSO中还原胺化共价连接到载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物。在优选的实施方案中,所述载体蛋白是CRM₁₉₇。在优选的实施方案中,所述多糖是如本文所定义的分离的血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中,所述多糖是如本文所定义的分离的血清型15B荚膜多糖,其已通过高压均质进行裁剪。

[0130] 在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物包含相比血清型15B荚膜多糖的总量小于约50、45、40、35、30、25、20或15%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物包含相比血清型15B荚膜多糖的总量小于约25%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物包含相比血清型15B荚膜多糖的总量小于约20%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物包含相比血清型15B荚膜多糖的总量小于约15%的游离血清型15B荚膜多糖。

[0131] 在优选的实施方案中,免疫原性缀合物具有3000-20000kDa、5000-10000kDa、5000-20000kDa、8000-20000kDa、8000-16000 KDa或10000-16000 KDa的分子量。所述免疫原性缀合物的分子量通过SEC-MALLS测量。

[0132] 在优选的实施方案中,缀合物中血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的比例 (重量比) 是0.5-3。在优选的实施方案中,缀合物中血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的比例是0.4-2、0.5-2、0.5-1.5、0.5-1、1-1.5、1-2。在优选的实施方案中,缀合物中血清型15B荚膜多糖与载体蛋白的比例是0.7-0.9。

[0133] 尺寸排阻色谱介质 (CL-4B) 可用来确定缀合物的相对分子大小分布。尺寸排阻色谱法 (SEC) 在重力给料柱中使用以分析缀合物的分子大小分布。在介质中被孔排除的大分子比小分子洗脱更加迅速。级分收集器用于收集柱洗脱液。级分通过糖类测定进行比色测试。对于Kd值的确定,校准柱子,以确立分子完全排除在外的级分 (V_0), ($K_d=0$), 并且该级

分代表最大保留 (V_i) , ($K_d=1$)。特定样品属性所达到的级分 (V_e) 通过表达式 $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ 与 K_d 相关。

[0134] 在优选的实施方案中,至少20%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少30%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少40%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少70%免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0135] 在优选的实施方案中,40%-90%的血清型15B免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,50%-90%的血清型15B免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,65%-80%的血清型15B免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0136] 在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM乙酸盐。在优选的实施方案中,0-乙酰基的存在通过离子-HPLC分析确定。

[0137] 在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.7。在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.9。在优选的实施方案中,0-乙酰基的存在通过离子-HPLC分析确定。

[0138] 在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.7。在优选的实施方案中,免疫原性缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM与在活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸盐的mM的比例是至少0.9。在优选的实施方案中,0-乙酰基的存在通过离子-HPLC分析确定。

[0139] 在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 mM甘油。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7 mM甘油。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM甘油。在优选的实施方案中,所述免疫原性缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.7 mM甘油。

[0140] 缀合度是载体蛋白中缀合到血清型15B荚膜多糖的赖氨酸残基的数目。通过使用

本领域技术人员已知的常规方法通过氨基酸分析获得由于共价连接至多糖的载体蛋白的赖氨酸修饰的证据。相比用于产生缀合材料的CRM₁₉₇蛋白原料,缀合导致回收的赖氨酸残基的数目减少。

[0141] 在优选的实施方案中,免疫原性缀合物的缀合度是2-15、2-13、2-10、2-8、2-6、2-5、2-4、3-15、3-13、3-10、3-8、3-6、3-5、3-4、5-15、5-10、8-15、8-12、10-15或10-12。在优选的实施方案中,免疫原性缀合物的缀合度是2-5。

[0142] 免疫原性组合物

[0143] 术语“免疫原性组合物”涉及含有抗原(例如微生物或其组分)的任何药物组合物,所述组合物可以用于引发受试者中的免疫应答。

[0144] 如本文中所用,“免疫原性”是指抗原(或该抗原的表位)(诸如细菌荚膜多糖)或免疫原性缀合物或免疫原性组合物在宿主(诸如哺乳动物)中引发体液免疫应答或细胞介导的免疫应答或两者的能力。

[0145] 在实施方案中,本公开内容涉及包含本文中公开的免疫原性的血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物的免疫原性组合物。

[0146] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B肺炎链球菌的抗体的形成。在实施方案中,如通过标准ELISA测定所测量的,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B肺炎链球菌的抗体的形成。

[0147] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B和15A和/或15C肺炎链球菌的抗体的形成。在实施方案中,如通过标准ELISA测定所测量的,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B和15A和/或15C肺炎链球菌的抗体的形成。

[0148] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B和15C肺炎链球菌的抗体的形成。在实施方案中,如通过标准ELISA测定所测量的,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够结合血清型15B和15C肺炎链球菌的抗体的形成。

[0149] 在ELISA(酶联免疫吸附测定)方法中,来自接种受试者的血清的抗体与已吸附到固体支持物的多糖一起孵育。结合的抗体用酶缀合的二级检测抗体进行检测。

[0150] 在实施方案中,所述ELISA测定法是标准化的(WHO)ELISA测定法,如由WHO在‘Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn PS ELISA).’中定义(可于<http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>访问;2014年3月31日访问)。

[0151] ELISA测量人血清中存在的类型特异性IgG抗-肺炎链球菌荚膜多糖(PS)抗体。当人血清的稀释液添加到类型特异性荚膜PS包被的微量滴定板上时,特异性针对该荚膜PS的抗体结合到微量滴定板上。结合到板上的抗体使用山羊抗人IgG碱性磷酸酶标记的抗体,然后用磷酸对硝基苯酯底物进行检测。有色终产物的光密度与血清中存在抗荚膜PS抗体的量成正比。

[0152] 在实施方案中,如通过ELISA测定法所确定,本发明的免疫原性组合物能够引发人中IgG抗体,其能够以下列浓度结合肺炎链球菌血清型15B多糖:至少为0.05、0.1、0.2、0.3、

0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0153] 在实施方案中,如通过ELISA测定法所确定,本发明的免疫原性组合物能够引发人中IgG抗体,其能够以下列浓度结合肺炎链球菌血清型15C多糖:至少为0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0154] 在实施方案中,如通过ELISA测定法所确定,本发明的免疫原性组合物能够引发人中IgG抗体,其能够以下列浓度结合肺炎链球菌血清型15B和15C多糖:至少为0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0155] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够在如本文所公开的调理吞噬作用测定(OPA)中杀死血清型15B肺炎链球菌的抗体的形成。在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当在如本文所公开的OPA测定中测试时,具有高于未缀合的天然肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖所获得的OPA滴度的OPA滴度。

[0156] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够在如本文所公开的调理吞噬作用测定中杀死血清型15C肺炎链球菌的抗体的形成。在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当在如本文所公开的OPA测定中测试时,具有OPA滴度高于未缀合的天然肺炎链球菌血清型15C荚膜多糖所获得的OPA滴度的OPA滴度。

[0157] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够在如本文所公开的调理吞噬作用测定中杀死血清型15B和15C和/或15A肺炎链球菌的抗体的形成。

[0158] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物,当施用于受试者时,诱导能够杀死血清型15B和15C的抗体的形成。

[0159] 肺炎球菌调理吞噬测定(OPA)(其在功能性抗体和补体的存在下测量吞噬效应细胞杀死肺炎链球菌细胞)被认为是评估肺炎球菌疫苗的有效性的重要替代物(surrogate)。

[0160] 调理吞噬测定(OPA)可通过一起孵育肺炎链球菌细胞,待测试的热灭活人血清、分化的HL-60细胞(吞噬细胞)和外源性补体来源(例如幼兔补体)的混合物来进行。调理吞噬作用在孵育期间进行,表面覆盖抗体和补体的细菌细胞在调理吞噬作用下被杀死。从调理吞噬作用逃逸的存活的细菌的集落形成单位(cfu)通过将测定混合物铺板来确定。OPA滴度定义为稀释度倒数,其导致相对无测试血清的对照孔菌数减少50%。OPA滴度是来自涵盖此50%杀死截止值的两个稀释度的插值。

[0161] 认为1:8或更高的终点滴度是这些杀死类型OPA中的阳性结果。

[0162] 在实施方案中,如通过调理吞噬作用杀伤测定(OPA)所确定的,本发明的免疫原性组合物能够在至少50%受试者中引发至少1:8的针对肺炎链球菌血清型15B的滴度。在实施方案中,如通过调理吞噬作用杀伤测定(OPA)所确定的,本发明的免疫原性组合物能够在至少60%、70%、80%、90%或至少93%受试者中引发至少1:8的针对肺炎链球菌血清型15B的滴度。

[0163] 在实施方案中,如通过调理吞噬作用杀伤测定(OPA)所确定的,本发明的免疫原性组合物能够在至少50%受试者中引发至少1:8的针对肺炎链球菌血清型15C的滴度。在实施方案中,如通过调理吞噬作用杀伤测定(OPA)所确定的,本发明的免疫原性组合物能够在至少60%、70%、80%、90%或至少95%受试者中引发至少1:8的针对肺炎链球菌血清型15C的滴度。

[0164] 本发明的免疫原性组合物的配制可以使用现有技术承认的方法实现。例如,可以使用生理上可接受的媒介物来配制本发明的免疫原性缀合物以制备组合物。这些媒介物的

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)和右旋糖溶液。

[0165] 在优选的实施方案中,所述免疫原性组合物可包含至少一种额外的抗原。在优选的实施方案中,所述免疫原性组合物可包含至少一种额外的肺炎链球菌荚膜多糖。

[0166] 在优选的实施方案中,所述免疫原性组合物可包含至少一种额外的缀合到载体蛋白的肺炎链球菌荚膜多糖。在优选的实施方案中,所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0167] 在某些实施方案中,免疫原性组合物包含一种或多种佐剂。如本文所定义的,“佐剂”是指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,经常给予佐剂以加强免疫应答,并且佐剂是本领域技术人员所熟知的。增强组合物有效性的合适的佐剂包括但不限于:

[0168] (1) 铝盐(明矾),诸如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;

[0169] (2) 水包油乳液制剂(含或不含其它具体的免疫刺激剂诸如胞壁酰肽(定义见下文)或细菌细胞壁成分),诸如,例如

[0170] (a) MF59 (PCT公开号W0 90/14837),含有5%角鲨烯、0.5%吐温80和0.5%司盘85(任选地含有不同量的MTP-PE(见下文,虽然不是必须的)),使用微流化器,诸如110Y型微流化器(Microfluidics, Newton, MA)配制成亚微米颗粒,

[0171] (b) SAF,含有10%角鲨烯、0.4%吐温80、5%普朗尼克嵌段聚合物L121和thr-MDP(见下文)微流化成亚微米乳剂或涡旋产生较大粒度的乳液,和

[0172] (c) RiBi™佐剂系统(RAS)(Corixa, Hamilton, MT)含有2%角鲨烯、0.2%吐温80和选自3-O-脱酰基单磷脂A(MPL™)(描述于美国专利号4,912,094)(Corixa)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+ CWS(Detox™)的一种或多种细菌细胞壁组分;

[0173] (3) 可使用皂苷佐剂,诸如奎尔(Quil)A或STIMULON™QS-21(Antigenics, Framingham, MA)(美国专利号5,057,540)或其生成的粒子诸如ISCOM(免疫刺激复合物);

[0174] (4) 细菌脂多糖,合成的脂质A类似物,诸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,它们可购自Corixa,并且描述于美国专利号6,113,918中;一个这样的AGP是2-[(R) -3-十四酰氧基十四酰氨基]乙基 2-脱氧-4-O-磷酸基-3-O-[(R) -3-十四酰氧基十四酰]-2-[(R) -3-十四酰氧基十四酰氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷,其也称为529(以前称为RC529),其被配制成含水形式或作为稳定的乳液,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);

[0175] (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,γ-干扰素),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),肿瘤坏死因子(TNF),共刺激分子87-1和87-2,等;

[0176] (6) 细菌ADP-核糖基化毒素的脱毒突变体,诸如野生型或突变体形式霍乱毒素(CT),所述突变形式例如其中氨基酸位置29上的谷氨酸被另一氨基酸(优选组氨酸)取代(根据公开的国际专利申请号W000/18434(也参见W002/098368和W002/098369));百日咳毒素(PT);或大肠杆菌不耐热毒素(LT),特别是LT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129(参见,例如W0 93/13302和W0 92/19265);和

[0177] (7) 充当免疫刺激剂以增强该组合物的效力的其它物质。

[0178] 胞壁酰肽包括、但不限于,N-乙酰-胞壁酰-L-苏-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰

基-去甲胞壁酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油基-3-羟基磷酸)-乙胺(MTP-PE)等。

[0179] 在本发明的实施方案中,如本文所公开免疫原性组合物包含CpG寡核苷酸作为佐剂。如本文中所使用的CpG寡核苷酸指免疫刺激性CpG寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN),因此,除非另有说明,否则这些术语可互换使用。免疫刺激性剂CpG寡脱氧核苷酸含有一个或多个免疫刺激性CpG基序,其是非甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸,任选在某些优选的碱基背景内。CpG免疫刺激性基序的甲基化状态一般是指在二核苷酸中的胞嘧啶残基。含有至少一个非甲基化的CpG二核苷酸的免疫刺激性寡核苷酸是含有通过磷酸酯键连接至3'鸟嘌呤的5'非甲基化胞嘧啶的寡核苷酸,并且其通过结合于Toll-样受体9(TLR-9)激活免疫系统。在另一个实施方案中,免疫刺激性寡核苷酸可含有一个或多个甲基化的CpG二核苷酸,其会通过TLR9激活免疫系统而不像如果CpG基序是非甲基化的那么强烈。CpG免疫刺激性寡核苷酸可包含一个或多个回文序列,其进而可包括CpG二核苷酸。CpG寡核苷酸已描述于许多授权的专利、公开的专利申请和其它出版物,包括美国专利号6,194,388、6,207,646、6,214,806、6,218,371、6,239,116和6,339,068。

[0180] 在本发明的实施方案中,如本文所公开的免疫原性组合物包括在W02010/125480的第3页第22行至第12页第36行所述任何CpG寡核苷酸。

[0181] 已鉴定了不同类的CpG免疫刺激性寡核苷酸。这些称为A、B、C和P类,并且更详细地描述于W02010/125480的第3页第22行至第12页第36行。本发明的方法涵盖这些不同类的CpG免疫刺激性寡核苷酸的用途。

[0182] 在本发明的实施方案中,如本文所公开免疫原性组合物包含A类CpG寡核苷酸。优选地,本发明的“A类”CpG寡核苷酸具有以下核酸序列:5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1)。A类寡核苷酸的一些非限制性实例包括:5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 2);其中,*是指硫代磷酸酯键并且指磷酸二酯键。

[0183] 在本发明的实施方案中,如本文所公开的免疫原性组合物包含B类CpG寡核苷酸。在一个实施方案中,用于本发明的CpG寡核苷酸是B类CpG寡核苷酸,其由至少下式表示:

[0184] 5'X₁X₂CGX₃X₄3',其中X₁、X₂、X₃和X₄是核苷酸。在一个实施方案中,X₂是腺嘌呤、鸟嘌呤或胸腺嘧啶。在另一个实施方案中,X₃是胞嘧啶、腺嘌呤或胸腺嘧啶。

[0185] 本发明的B类CpG寡核苷酸序列是广泛描述于下列专利中的那些序列:美国专利号6,194,388、6,207,646、6,214,806、6,218,371、6,239,116和6,339,068。示例性序列包括但不限于在这些后来的申请和专利中公开的那些序列。

[0186] 在实施方案中,本发明的“B类”CpG寡核苷酸具有下列核酸序列:

[0187] 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 3),或

[0188] 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 4),或

[0189] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 5),或

[0190] 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 6),或

[0191] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 7)。

[0192] 在任何这些序列中,所有的键可以都是硫代磷酸酯键。在另一个实施方案中,在任何这些序列中,一个或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间,形成半柔性的CpG寡核苷酸。在任何这些序列中,乙基-尿苷或卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包

括但不限于溴尿苷或碘尿苷取代。

[0193] B类寡核苷酸的一些非限制性实例包括：

[0194] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 8),或

[0195] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 9),或

[0196] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 10),或

[0197] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 11),或

[0198] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO: 12)。

[0199] 其中*指硫代磷酸酯键。

[0200] 在本发明的实施方案中,如本文所公开的免疫原性组合物包含C类CpG寡核苷酸。在实施方案中,本发明的“C类”CpG寡核苷酸具有下列核酸序列：

[0201] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 13),或

[0202] 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 14),或

[0203] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 15),或

[0204] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 16),或

[0205] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 17),或

[0206] 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 18),或

[0207] 5' TCGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 19),或

[0208] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 20),或

[0209] 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 21),或

[0210] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 22),或

[0211] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 23),或

[0212] 5' TCGTCGTTTTACGGCGCGCGTCCG 3' (SEQ ID NO: 24),或

[0213] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO: 25)。

[0214] 在任何这些序列中,所有的键可以都是硫代磷酸酯键。另一个实施方案中,在任何这些序列中,一个或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间,形成半柔性的CpG寡核苷酸。

[0215] C类寡核苷酸的一些非限制性实例包括：

[0216] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 26),或

[0217] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 27),或

[0218] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 28),或

[0219] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 29),或

[0220] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 30),或

[0221] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 31),或

[0222] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 32),或

[0223] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 33),或

[0224] 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 34), 或
[0225] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO: 35), 或
[0226] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO: 36), 或
[0227] 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 37), 或

[0228] 5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO: 38)

[0229] 其中*指硫代磷酸酯键并且_指磷酸二酯键。

[0230] 在任何这些序列中,乙基-尿苷或卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包括但不限于溴尿苷或碘尿苷取代。

[0231] 在本发明的实施方案中,如本文所公开的免疫原性组合物包含P类CpG寡核苷酸。在实施方案中,用于本发明的CpG寡核苷酸是P类CpG寡核苷酸,其包含5'TLR活化域和至少两个回文区域,一个回文区域是长度为至少6个核苷酸的5'回文区域并且直接或通过间隔子连接到长度至少8个核苷酸的3'回文区域,其中,所述寡核苷酸包括至少一个YpR二核苷酸。在实施方案中,所述寡核苷酸不是T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO: 27)。在一个实施方案中,所述P类CpG寡核苷酸包括至少一个非甲基化的CpG二核苷酸。在另一个实施方案中,所述TLR活化域是TCG、TTCG、TTTCG、TYpR、TTYpR、TTTYpR、UCG、UUCG、UUUCG、TTT或TTTT。在又一个实施方案中,所述TLR活化域在5'回文区域内。在另一个实施方案中,所述TLR活化域在5'紧接着5'回文区域。

[0232] 在实施方案中,本发明的“P类”CpG寡核苷酸具有以下核酸序列: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 39)。

[0233] 在所述序列中,所有的键可以都是硫代磷酸酯键。在另一个实施方案中,一个或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间,形成半柔性的CpG寡核苷酸。在任何这些序列中,乙基-尿苷或卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包括但不限于溴尿苷或碘尿苷取代。

[0234] P类寡核苷酸的非限制性实例包括:

[0235] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 40)

[0236] 其中*指硫代磷酸酯键并且_指磷酸二酯键。

[0237] 在一个实施方案中,所述寡核苷酸包括至少一个硫代磷酸酯键。在另一个实施方案中,所述寡核苷酸的所有核苷酸间连接是硫代磷酸酯键。在另一个实施方案中,所述寡核苷酸包括至少一个磷酸二酯样键。在另一个实施方案中,所述磷酸二酯样键是磷酸二酯键。在另一个实施方案中,亲脂基团缀合到寡核苷酸。在一个实施方案中,所述亲脂基团是胆固醇。

[0238] 在实施方案中,本文公开的所有CpG寡核苷酸的核苷酸间键是磷酸二酯键(“柔性”的寡核苷酸,如PCT申请W02007/026190所述)。在另一个实施方案中,本发明的CpG寡核苷酸呈现抗降解(例如,是稳定化的)。“稳定化的寡核苷酸”是指寡核苷酸对体内降解(例如,经由外切核酸酶或内切核酸酶)具有相对抗性。核酸稳定化可以通过主链修饰来实现。具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸提供最大活性并保护寡核苷酸免于细胞内外切和内切核酸酶降解。免疫刺激性寡核苷酸可以具有嵌合主链,其具有磷酸二酯键和硫代磷酸酯键的组合。对于本发明的目的,嵌合主链指的是部分稳定化的主链,其中至少一个核苷酸间键是磷酸二酯

键或磷酸二酯样键,并且其中至少一个其它核苷酸间键是稳定化的核苷酸间键,其中所述至少一个磷酸二酯键或磷酸二酯样键和所述至少一个稳定化的键是不同的。如在PCT申请W02007/026190中所描述的,当磷酸二酯键优选地位于CpG基序内时,这样的分子被称为是“半柔性”的。

[0239] 所述CpG寡核苷酸的大小(即,沿着寡核苷酸的长度的核苷酸残基的数目)也可有助于寡核苷酸的刺激活性。为了促进摄取到细胞中,本发明的CpG寡核苷酸优选具有6个核苷酸残基的最小长度。如果存在足够的免疫刺激性基序,任何尺寸大于6个核苷酸(甚至长为许多kb)的寡核苷酸都能够诱导免疫应答,因为更大的寡核苷酸在细胞内降解。在某些实施方案中,所述CpG寡核苷酸长6-100个核苷酸,优选长8-30个核苷酸。在重要的实施方案中,本发明的核酸和寡核苷酸不是质粒或表达载体。

[0240] 在实施方案中,本文公开的CpG寡核苷酸包含取代或修饰,诸如在碱基和/或糖上,如描述于W02007/026190的第134-147段。

[0241] 在实施方案中,本发明的CpG寡核苷酸是化学修饰的。化学修饰的实例是本领域技术人员已知的,并且描述于例如Uhlmann E. 等 (1990), Chem. Rev. 90:543, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke, S.T. 等 (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; and Hunziker J. 等, (1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417中。根据本发明的寡核苷酸可具有一个或多个修饰,其中每个修饰位于特定的核苷间磷酸二酯桥和/或位于特定的 β -D-核糖单元和/或位于特定的天然核苷碱基位置,相比由天然DNA或RNA构成的相同序列的寡核苷酸。

[0242] 在本发明的一些实施方案中,含有CpG的核酸可根据本领域技术人员已知的方法简单地与免疫原性载体混合(参见例如W003/024480)。

[0243] 在本发明的具体实施方案中,本文公开的任何免疫原性组合物包含2 μ g-100mg的CpG寡核苷酸,优选为0.1mg-50mg的CpG寡核苷酸,优选0.2mg-10mg的CpG寡核苷酸,优选0.3mg-5mg的CpG寡核苷酸,甚至优选0.5-2mg的CpG寡核苷酸,甚至优选0.75-1.5mg的CpG寡核苷酸。在优选的实施方案中,本文公开的免疫原性组合物包含约1mg的CpG寡核苷酸。

[0244] 在优选的实施方案中,佐剂是基于铝的佐剂,其选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。在一个实施方案中,本文所述的免疫原性组合物包含佐剂磷酸铝。

[0245] 在优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合物还包含缓冲剂、冷冻保护剂、盐、二价阳离子、非离子型去垢剂、自由基氧化抑制剂、稀释剂或载体中的至少一种。

[0246] 免疫原性组合物任选地可包含一种或多种生理学上可接受的缓冲液,所述缓冲液选自、但不限于Tris(三羟甲基氨基甲烷(trimethamine))、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸和琥珀酸盐。在某些实施方案中,所述制剂缓冲至约5.0到约7.0,优选约5.5至约6.5的pH范围内。

[0247] 免疫原性组合物任选地可以包含一种或多种非离子表面活性剂,包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯、聚山梨酯80(吐温80)、聚山梨酯60(吐温60)、聚山梨酯40(吐温40)和聚山梨酯-20(吐温20)、聚氧乙烯烷基醚,包括但不限于Brij58、Brij35,以及其它诸如曲拉通X-100、曲拉通X-114、NP40、司盘85和普朗尼克系列非离子表面活性剂(例如,普朗尼克121)。在优选的实施方案中,免疫原性组合物包含聚山梨酯80或聚山梨酯40,优选聚山梨酯80。在优选的实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约0.001%至约2% (优选至多

约0.25%)的聚山梨酯80或浓度为约0.001%至1%(优选至多约0.5%)的聚山梨酯40。

[0248] 本发明还涉及包含本发明的免疫原性组合物的疫苗。

[0249] 用于诱导免疫应答和保护免受感染的方法

[0250] 本公开内容还包括本文所述免疫原性组合物的使用方法。例如,本公开内容的一个实施方案提供了诱导针对肺炎链球菌的免疫应答的方法,其包括给受试者施用免疫原性量的任何本文所述的免疫原性组合物。

[0251] 本公开内容的一个实施方案提供了保护受试者免于感染肺炎链球菌的方法,或预防感染肺炎链球菌的方法,或降低肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟与肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状发作的方法,所述方法包括给受试者施用免疫原性量的任何本文所述的免疫原性组合物。

[0252] 本公开内容的一个实施方案提供了保护受试者免于感染血清型15B肺炎链球菌的方法,或预防感染血清型15B肺炎链球菌的方法,或降低血清型15B肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟与血清型15B肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状发作的方法,所述方法包括给受试者施用免疫原性量的任何本文所述的免疫原性组合物。

[0253] 本公开内容的一个实施方案提供了保护受试者免于感染血清型15C肺炎链球菌的方法,或预防感染血清型15C肺炎链球菌的方法,或降低血清型15C肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟与血清型15C肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状发作的方法,所述方法包括给受试者施用免疫原性量的任何本文所述的免疫原性组合物。

[0254] 本公开内容的一个实施方案提供了保护受试者免于感染血清型15A肺炎链球菌的方法,或预防感染血清型15A肺炎链球菌的方法,或降低血清型15A肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟与血清型15A肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状发作的方法,所述方法包括给受试者施用免疫原性量的任何本文所述的免疫原性组合物。

[0255] 本公开内容的一个实施方案提供了治疗或预防受试者中与血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌相关的肺炎链球菌感染、疾病或病况的方法,所述方法包括对受试者施用治疗或预防有效量的本文所述的免疫原性组合物的步骤。另一个实施方案提供了治疗或预防受试者中与血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)相关的肺炎链球菌感染、疾病或病况的方法,所述方法包括从本文所述的免疫原性组合物产生多克隆或单克隆抗体制剂,并使用所述抗体制剂对受试者赋予被动免疫。

[0256] 在一个实施方案中,本公开内容涉及本文公开的免疫原性缀合物或免疫原性组合物用于制备药物的用途,所述药物用于保护受试者免于肺炎链球菌感染,和/或预防肺炎链球菌感染,和/或降低肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的发作,和/或保护受试者免于血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌感染和/或预防血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B),和/或降低血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的发作。

[0257] 在一个实施方案中,本公开内容涉及本文公开的免疫原性缀合物或免疫原性组合物的用途,所述药物用于保护受试者免于肺炎链球菌感染,和/或预防肺炎链球菌感染,和/

或降低肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的发作,和/或保护受试者免于血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌感染和/或预防血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B),和/或降低血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌引起的感染的严重程度或延迟血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的发作。

[0258] 对免疫原性组合物的“免疫应答”是在受试者中发展体液免疫应答和/或细胞介导的免疫应答,所述应答针对存在于所关注的免疫原性组合物或疫苗组合物中的分子。对于本公开的目的,“体液免疫应答”是抗体介导的免疫应答,并涉及对在本公开内容的免疫原性组合物或疫苗中的抗原进行识别并以一些亲和力进行结合的抗体的诱导和生成,而“细胞介导的免疫应答”是一种由T细胞和/或其它白细胞介导的免疫应答。“细胞介导的免疫应答”是由与I类或II类主要组织相容性复合物分子(MHC)、CD1或其它非经典的MHC样分子结合的抗原表位的呈递引发的。这活化抗原特异性CD4⁺ T辅助细胞或CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(“CTL”)。CTL对于通过经典或非经典MHC编码并表达在细胞表面上的蛋白结合呈递的肽抗原具有特异性。CTL帮助诱导和促进细胞内微生物的细胞内破坏,或感染此类微生物的细胞的裂解。细胞免疫的另一个方面涉及由辅助T细胞的抗原特异性应答。辅助T细胞作用在于帮助刺激功能,并聚焦非特异性效应细胞的活性针对在其表面上展示与经典或非经典的MHC分子结合的肽或其它抗原的细胞。“细胞介导的免疫应答”还指产生细胞因子、趋化因子和通过活化的T细胞和/或其它白细胞(包括衍生自CD4⁺和CD8⁺ T细胞的那些)产生的其它此类分子。特定抗原或组合物刺激细胞介导的免疫应答的能力可以通过许多测定法来确定,诸如通过淋巴细胞增殖(淋巴细胞活化)测定法、CTL细胞毒性细胞测定法,通过测定特异性针对敏化受试者中抗原的T淋巴细胞,或通过测量响应抗原再刺激的T细胞产生的细胞因子。此类测定法是本领域熟知的。参见例如Erickson 等 (1993) *J. Immunol.* 151:4189-4199;和Doe 等 (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2369-2376。

[0259] 如本文所用,“治疗(treatment)”(包括其变化,例如,“治疗(treat)”或“经治疗的(treated)”)是指下列的任意一种或多种:(i)感染或再感染的预防,如在传统的疫苗中,(ii)症状的严重程度的降低,或症状的消除,和(iii)所讨论的病原体或病症的基本上或完全消除。因此,治疗可以预防性(感染前)或治疗性(感染后)实现。在本公开中,预防性治疗是优选的方式。根据本公开内容的具体实施方案,提供了治疗(包括预防性和/或治疗性免疫)宿主动物免于血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C,更优选15B)肺炎链球菌感染的组合物和方法。本公开的方法用于赋予受试者预防性和/或治疗性免疫。本公开的方法也可以在用于生物医学研究应用的受试者上实施。

[0260] “免疫原性量”和“免疫学有效的量”两者在本文中可互换使用,指的是抗原或免疫原性组合物的量,所述量足以引发如通过本领域技术人员已知的标准测定法所测量的免疫应答,即细胞(T细胞)或体液(B细胞或抗体)应答,或两者。

[0261] 在优选的实施方案中,所述受试者是人。在最优选的实施方案中,所述受试者是新生儿(即年龄三个月以下)、婴儿(年龄3个月到一岁)或幼儿(即年龄一岁到四岁)。

[0262] 在实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物用作疫苗。

[0263] 在这样的实施方案中,待接种的受试者年龄可以小于1岁。例如,待接种的受试者

可以是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月的年龄。在实施方案中,待接种的受试者是约2、4或6个月的年龄。在另一个实施方案中,待接种的受试者年龄小于2岁。例如待接种的受试者可以是约12-15个月的年龄。在一些情况下,需要小至一个剂量的根据本发明的免疫原性组合物,但是在某些情况下,可以给予第二、第三或第四的剂量(参见方案部分)。

[0264] 在本发明的实施方案中,待接种的受试者是50岁或以上的成人,更优选55岁或以上的成人。在实施方案中,待接种的受试者是65岁或以上、70岁或以上、75岁或以上或80岁或以上的成人。

[0265] 在实施方案中,待接种的受试者是免疫功能低下的个体,特别是人。免疫功能低下的个体通常定义为展示受损或降低的针对感染性试剂攻击产生正常体液或细胞防御的能力的人。

[0266] 在本发明的实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者患有破坏人体免疫系统并导致不足以防止或治疗肺炎球菌疾病的抗体反应的疾病或病况。

[0267] 在实施方案中,所述疾病为原发性免疫缺陷病症。优选地,所述原发性免疫缺陷病症选自:组合的T和B细胞免疫缺陷、抗体缺陷、明确定义的综合症、免疫失调疾病、吞噬细胞紊乱、先天性免疫缺陷、自身炎症性病症以及补体缺陷。在实施方案中,所述原发性免疫缺陷病症选自PCT申请W02010/125480的第24页第11行-第25页第19行公开的病症。

[0268] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者患有选自下列的疾病:HIV感染、获得性免疫缺陷综合症(AIDS)、癌症、慢性心脏或肺部病症、充血性心脏衰竭、糖尿病、慢性肝病、酒精中毒、肝硬化、脊髓液渗漏、心肌病、慢性支气管炎、肺气肿、慢性阻塞性肺病(COPD)、脾功能障碍(诸如镰状细胞病)、脾功能缺乏(无脾症(asplenia))、血液恶性肿瘤、白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金病、淋巴瘤、肾功能衰竭、肾病综合征和哮喘。

[0269] 在本发明的实施方案中,待接种的免疫功能低下受试者患有营养不良。

[0270] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者正在接受降低机体对感染的抵抗力的药物或治疗。在实施方案中,这样的药物选自PCT申请W02010/125480的第26页第33行-第26页第40行公开的药物。

[0271] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下受试者是吸烟者。

[0272] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者具有白细胞计数(白血球计数)低于 5×10^9 个细胞/升,或低于 4×10^9 个细胞/升,或低于 3×10^9 个细胞/升,或低于 2×10^9 个细胞/升,或低于 1×10^9 个细胞/升,或低于 0.5×10^9 个细胞/升,或低于 0.3×10^9 个细胞/升,或低于 0.1×10^9 个细胞/升。

[0273] 白细胞计数(白血球计数):在血液中白血细胞(WBC)的数量。WBC通常作为CBC(全血细胞计数)的一部分进行测量。白血细胞是在血液中的抗感染细胞,并与称为红细胞的红色(携氧)血细胞不同。有不同类型的白细胞,包括中性粒细胞(多形核白细胞;PMN)、杆状核粒细胞(band cell)(略未成熟中性粒细胞)、T型淋巴细胞(T细胞)、B型淋巴细胞(B细胞)、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。白细胞的所有类型都反映在白细胞计数上。白细胞计数的正常范围是每立方毫米的血液通常4,300-10,800个细胞。这也可以称为白血球计数,并且可以以国际单位表示为 $4.3 - 10.8 \times 10^9$ 个细胞/升。

[0274] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下受试者患有中性粒细胞减少症。在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者具有嗜中性粒细胞计数

低于 2×10^9 个细胞/升,或低于 1×10^9 个细胞/升,或低于 0.5×10^9 个细胞/升,或低于 0.1×10^9 个细胞/升,或低于 0.05×10^9 个细胞/升。

[0275] 低白细胞计数或“中性粒细胞减少症”是其特征在于在循环血液里中性粒细胞的异常低水平的状况。中性粒细胞是一种帮助防止和抵抗感染的特定的白细胞。癌症患者经历中性粒细胞减少症最常见的原因是作为化疗的副作用。化疗诱导的中性粒细胞减少症增加了患者感染的风险,并破坏癌症的治疗。

[0276] 在本发明的具体实施方案中,待接种的免疫功能低下的受试者具有CD4+细胞计数低于 $500/\text{mm}^3$,或CD4+细胞计数低于 $300/\text{mm}^3$,或CD4+细胞计数低于 $200/\text{mm}^3$, CD4+细胞计数低于 $100/\text{mm}^3$, CD4+细胞计数低于 $75/\text{mm}^3$,或CD4+细胞计数低于 $50/\text{mm}^3$ 。

[0277] CD4细胞测试通常报道为 mm^3 中的细胞数量。正常的CD4计数是500-1600,并且CD8计数是375-1100。CD4计数在带有HIV的人中急剧下降。

[0278] 在本发明的实施方案中,本文公开的任何免疫功能低下受试者是男性人类或女性人类。

[0279] 组合物中缀合物的量一般是基于对于该缀合物缀合和非缀合的总多糖进行计算。例如,具有20%游离多糖的缀合物将具有在100 μg 多糖剂量中约80 μg 缀合的多糖和约20 μg 非缀合的多糖。当计算缀合物的剂量时,通常不考虑蛋白质对缀合物的贡献。通常,每个剂量包含0.1-100 μg 的多糖,特别是0.1-10 μg ,更特别是1-10 μg ,更特别是1-5 μg 。优选每次剂量将包含约1.1、2.2、3.3、4.4 μg 多糖。

[0280] 对于特定免疫原性组合物或疫苗的组分的最优量可以通过标准研究确定,所述研究涉及受试者中适当免疫应答的观察。初始接种后,受试者可以充分的间隔接受一次或若干次加强免疫。

[0281] 抗原作为免疫原的有效性,可通过如下进行测量,通过增殖测定法,或通过细胞溶解测定法(诸如测量T细胞裂解其特异性目标细胞的能力的铬释放测定),或通过测量对血清中抗原特异性的循环抗体的水平来测量B细胞活性水平。如本文所述,免疫应答还可以通过测量施用抗原后诱导的抗原特异性抗体的血清水平进行检测,并且更具体地,通过测量如此诱导的抗体的增强特定白血细胞调理吞噬能力的能力进行检测。免疫应答的保护水平可以通过用已施用的抗原攻击免疫的宿主来测量。例如,如果期望免疫应答针对的抗原是细菌,则通过抗原的免疫原性量诱导的保护水平是通过检测用细菌细胞攻击动物后百分比存活或百分比死亡来进行测量。在一个实施方案中,保护的量可以通过测量与细菌感染相关的至少一种症状(例如与感染相关的发热)来测量。多抗原或多组分疫苗或免疫原性组合物中的每个抗原的量将就每种其它组分而变化,并且可以通过本领域技术人员已知的方法来确定。这样的方法将包括用于测量免疫原性和/或体内疗效的方法。

[0282] 本公开内容进一步提供了特异性并选择性结合本公开的荚膜多糖或免疫原性偶联物的抗体和抗体组合物。在一些实施方案中,抗体在向受试者施用本公开内容的荚膜多糖或免疫原性缀合物后产生。在一些实施方案中,本公开内容提供针对一种或多种本公开内容的荚膜多糖或免疫原性缀合物的纯化的或分离的抗体。在一些实施方案中,如通过在动物疗效模型中或经由调理吞噬杀死测定法杀死细菌所测量的,本公开内容的抗体是有功能的。在一些实施方案中,本公开内容的抗体赋予受试者被动免疫。本公开内容还提供编码本公开内容的抗体或抗体片段的多核苷酸分子,和细胞,细胞系(诸如杂交瘤细胞或用于重

组生产抗体的其它工程改造的细胞系),或使用本领域技术人员熟知的技术产生本公开内容的抗体或抗体组合物的转基因动物。

实施例

[0283] 实施例1:分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的制备

[0284] 1.1发酵和纯化

[0285] 血清型15B荚膜多糖可以使用本领域技术人员已知的分离方法直接从细菌获得(参见例如美国专利申请公开号20060228380、20060228381、20070184071、20070184072、20070231340和20080102498或W02008118752公开的方法)。血清型15B肺炎链球菌在种子瓶中生长,然后转移到种子发酵罐。一旦目标光密度达到,则将细胞转移到生产发酵罐。发酵肉汤通过加入N-月桂酰肌氨酸进行灭活并通过超滤和渗滤纯化。

[0286] 然后通过使用PANDA2K均质机®(GEA Niro Soavi)进行高压均质来裁剪纯化的肺炎链球菌血清型15B多糖,以产生分离的肺炎链球菌血清型15B多糖。

[0287] 优选地,通过上述方法得到的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM醋酸盐,并且具有的50kDa-500kDa、优选150-350kDa的分子量。

[0288] 1.2分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的氧化

[0289] 多糖氧化在100mM磷酸钾缓冲液($\text{pH}6.0 \pm 0.2$)中进行,通过依次加入计算量的500mM磷酸钾缓冲液($\text{pH}6.0$)和WFI,以得到2.0 g/L的最终多糖浓度。如果需要的话,将反应pH调节至约 $\text{pH}6.0$ 。pH调节后,将反应温度调节至 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 。通过加入约0.25摩尔当量的高碘酸钠开始氧化反应。在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下进行氧化反应过程,持续约16小时。

[0290] 活化的多糖的浓缩和渗滤使用10K MWC0超滤盒进行。相对20倍渗滤体积的WFI进行渗滤。然后将纯化的活化的多糖贮存于 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 。纯化的活化的糖尤其是通过如下进行表征:(i)通过比色测定的糖浓度;(ii)通过比色测定的醛浓度;(iii)氧化度(iv)通过SEC-MALLS的分子量和(v)O-乙酰基和甘油的存在。

[0291] SEC-MALLS用于确定多糖和多糖-蛋白缀合物的分子量。使用SEC通过流体动力学体积分离多糖。使用折射率(RI)和多角度激光光散射(MALLS)检测器确定分子量。当光与物质相互作用时,其散射并且散射光的量与物质的浓度、 dn/dc 的平方(比折射率增量)和摩尔质量相关。分子量测量基于来自MALLS检测器散射的光信号和来自RI检测器的浓度信号的读数进行计算。

[0292] 如下确定活化的多糖的氧化度($\text{DO} = \text{糖重复单元的摩尔数} / \text{醛的摩尔数}$):

[0293] 糖重复单元的摩尔数通过多种比色法确定,例如通过使用蒽酮法。通过蒽酮法,多糖首先通过硫酸和热的作用分解成单糖。蒽酮试剂与己糖反应形成黄绿有色络合物,其吸光度在625nm以分光光度法读出。在测定的范围内,吸光度与存在的己糖的量成正比。

[0294] 还同时采用MBTH比色法确定醛的摩尔数。MBTH测定涉及吡嗪化合物的形成,通过使醛基(来自给定样品)与3-甲基-2-苯并噻唑酮腈(MBTH测定试剂)反应形成。过量的3-甲基-2-苯并噻唑酮腈氧化以形成活性阳离子。活性阳离子和吡嗪反应以形成蓝色发色团。然后所形成的发色团在650nm进行光谱读取。

[0295] 优选地,通过上述方法得到的活化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖每mM血清型

15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐,并且具有的50kDa-500kDa、优选100-250kDa的分子量。

[0296] 1.3 活化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖与CRM₁₉₇的缀合

[0297] 缀合方法由下列步骤组成:

[0298] a) 与蔗糖赋形剂混合并冻干

[0299] b) 重构冻干的活化的多糖和CRM₁₉₇

[0300] c) 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇并加帽

[0301] d) 纯化缀合物

[0302] a) 与蔗糖赋形剂混合并冻干

[0303] 活化的多糖与蔗糖混合达到每克活化的多糖25克蔗糖的比例。然后混合的混合物的瓶进行冻干。冻干后,含有冻干的活化的多糖的瓶保存在-20±5℃。计算量的CRM₁₉₇蛋白分开进行壳式冷冻(shell-frozen)并冻干。冻干的CRM₁₉₇保存在-20±5℃。

[0304] b) 重构冻干的活化的多糖和CRM₁₉₇蛋白

[0305] 冻干的活化的多糖在无水二甲亚砜(DMSO)中重构。一旦多糖完全溶解,将等量的无水DMSO添加到冻干的CRM₁₉₇用于重构。

[0306] c) 缀合和加帽

[0307] 重构的活化的多糖与重构的CRM₁₉₇在反应容器(输入比0.8:1)中合并,随后彻底混合以获得清澈的溶液,然后用氰基硼氢化钠起始缀合。反应溶液中的最终多糖浓度是约1 g/L。通过向反应混合物中添加1.0 - 1.5 MEq氰基硼氢化钠起始缀合,并在23±2℃孵育40-48小时。缀合反应通过添加2MEq的硼氢化钠(NaBH₄)以加帽未反应的醛基而终止。此加帽反应继续在23±2℃持续3±1小时。

[0308] d) 纯化缀合物

[0309] 该缀合物溶液用冷却的5mM琥珀酸盐-0.9%盐水(pH6.0)1:10稀释以制备用于通过使用100-300K MWCO滤膜的切向流过滤进行纯化。将稀释的缀合物溶液通过5μm过滤器过滤,并使用5mM琥珀酸盐-0.9%盐水(pH6.0)作为介质进行渗滤。渗滤完成后,缀合物截留物通过0.22μm的过滤器转移。

[0310] 缀合物用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水(pH6)进一步稀释,以达到约0.5mg/mL的目标糖浓度。完成最终的0.22μm的过滤步骤,以获得免疫原性缀合物。

[0311] 优选地,通过上述方法得到的缀合物每mM血清型15B荚膜多糖包含至少0.6 mM乙酸盐,具有3000-20000kDa的分子量,并具有2-6的缀合度。

[0312] 实施例2:包含共价连接到CRM₁₉₇的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物的表征

[0313] 通过实施例1中公开的方法制备缀合物1。使用不同量的氧化剂通过类似方法制备缀合物2和3。缀合物4通过类似的方法制备,除了纯化的血清型15B荚膜多糖没有被裁剪并且被活化到较低的D0(更高氧化水平),并在含水介质中进行缀合。缀合物5通过类似的方法制备,除了纯化的血清型15B荚膜多糖通过化学水解进行裁剪,并且在含水介质中进行缀合。缀合物6和7通过类似的方法制备,除了纯化的血清型15B荚膜多糖没有被裁剪。所得到的缀合物进行了表征,并且结果总结在表1中。

[0314] 表1:肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0315]

缀合物	1	2	3	4	5	6	7
多糖	经裁剪的	经裁剪的	经裁剪的	天然的	水解的	天然的	天然的
O-乙酰化; 多糖(μmol 乙酸盐/ μmol 多糖)	0.69	0.69	0.69	1.01	0.66	0.76	NA
溶剂介质	DMSO	DMSO	DMSO	含水的	含水的	DMSO	DMSO
活化的多糖DO	11.4	5.8	9.7	4.8	8.8	5	12
活化的多糖MW	196KDa	218KDa	235KDa	435 KDa	270KDa	431KDa	460KDa
产率 (%)	87.2	64	63.7	96.2	78.8	24.2	26.2
糖蛋白比例	0.68	0.65	0.71	1.22	1.29	0.9	1.5
游离糖 (%)	< 5	< 5	6.1	18.1	14.2	8.8	18
缀合物 MW, SEC-MALLS	6190KDa	7090KDa	7937KDa	1766KDa	1029KDa	6293KDa	4466KDa
O-乙酰化, 缀合物 μmol 乙酸盐/ μmol 多糖)	0.68	0.7	0.68	0.61	0.44	0.85	NA
< 0.3 Kd (%), SEC	NA	73	NA	NA	62	NA	NA
缀合度 (AAA); 修饰的 Lys	3.7	3.9	4.1	NA	3.4	NA	NA
%缀合物中保留的O-乙酰化	99%	100%	99.5%	60%	67%	100%	NA

[0316] 游离多糖的百分比通过利用氢氧化铝凝胶结合蛋白和共价结合的糖以通过离心去除的方法进行测量。样品与磷酸盐缓冲的氢氧化铝凝胶混合并离心。结合的糖与凝胶一起沉淀,而游离糖保留在上清液中。得到的上清液和对照样品通过适当比色测定法来定量,以确定游离糖的比例,并证实充分除去蛋白质和糖的回收。

[0317] 对于氨基酸分析,首先使用6N盐酸(HCl)水解,在真空下加热(160°C,15分钟),将多糖-蛋白样品水解成它的个体组分,水解为游离氨基酸。水解后,将样品用氨基酸分析仪进行分析。个体氨基酸通过离子交换色谱法分离,使用柠檬酸钠缓冲液的不连续梯度,具有温度和流速的变化。分离后,各氨基酸残基的量使用柱后茚三酮耦合检测系统进行定量确定。在这个系统中,茚三酮与柱后反应器系统中柱洗脱液混合并且混合物进入光度计。茚三酮与洗脱的氨基酸的反应得到在570nm最大吸收的紫色化合物。此吸光度是存在的 α -氨基的量的线性响应(函数)并且该反应提供了用于具有 α -氨基的所有的有机化合物的定量比色测定。在与不具有游离氨基的亚氨基酸(诸如脯氨酸和羟基脯氨酸)的反应中,产生亮黄色化合物并且在440nm进行监测。使用570和440nm波长输出两者计算每种氨基酸的峰面积。

[0318] 如下计算产率:(在缀合物中多糖的量 $\times 100$)/活化的多糖的量。

[0319] 使用含水介质产生的缀合物(4和5)表现出O-乙酰基水平显著损失。在DMSO溶剂中使用天然多糖而未进行分子量裁剪产生的缀合物(6和7)并没有表现出在O-乙酰基水平的损失。然而,除了可过滤性差的特性之外,缀合物产率也非常差。使用通过高压均质裁剪的多糖在DMSO中产生的缀合物(1、2和3)具有较高的产率和更好的可过滤性特性,并显著保存O-乙酰基水平。这些缀合物还具有非常低水平的游离多糖。

[0320] 实施例3:调理吞噬活性(OPA)测定

[0321] 本发明缀合物的免疫原性可以使用下面描述的调理吞噬测定(OPA)进行评估。

[0322] 30只6-7周龄的雌性Swiss Webster小鼠的组用0.001 µg、0.01 µg或0.1 µg的测试缀合物经由皮下途径在第0周进行免疫。将小鼠用相同剂量的缀合物在第3周加强然后在第4周放血。对第4周的血清样品进行血清型特异性OPA。

[0323] OPA用于测量在特异性针对肺炎链球菌血清型15B的鼠类血清中的功能性抗体。在测定反应中设置测试血清,所述反应测量荚膜多糖特异性免疫球蛋白的下列能力:调理细菌,触发补体沉积,从而促进吞噬作用和通过吞噬细胞杀死细菌。OPA滴度定义为稀释度倒数,其导致相对无测试血清的对照孔菌数减少50%。OPA滴度是来自涵盖此50%杀死截止值的两个稀释度的插值。

[0324] OPA方法基于描述于Hu 等, Clin Diagn Lab Immunol 2005;12(February (2)): 287-95中的方法并进行了以下修改。将测试血清进行2.5倍系列稀释,并加入到微量滴定测定板。将活的血清型15B目标细菌加入到孔中并将板在37℃摇动30分钟。将分化的HL-60细胞(吞噬细胞)和仔兔血清(3-4周龄, Pel-Freez®, 6.25%的最终浓度)加入到孔中,并将板在37℃下摇动45分钟。为了终止反应,将80µL的0.9%NaCl加入到所有孔中,混合,并将10µL等分试样转移至含200µL水的MultiScreenHTS HV过滤板(Millipore®)的孔中。液体在真空下过滤通过板,并且150 µL的HySoy介质加入到每个孔中,并过滤通过。过滤板然后在37℃, 5% CO₂孵育过夜,并随后用Destain溶液(Bio-Rad)固定。板随后用考马斯蓝染色并脱色一次。集落成像并在Cellular Technology Limited (CTL) ImmunoSpot Analyzer®上计数。使用原始集落计数绘制杀死曲线,并计算OPA滴度。

[0325] 缀合物1和2的免疫原性已经根据上述测定法进行测试。一个附加的缀合物和未缀合的天然肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖(未缀合的PS)也在相同的测定法中进行测试:

[0326] 缀合物9通过在水溶液中还原胺化通过天然(即没有被裁剪的)血清型15B荚膜多糖缀合至CRM₁₉₇来制备。

[0327] 结果显示在表2中。

表2: 动物测试的OPA滴度

OPA GMT (几何平均抗体滴度) (95%CI)			
	0.001 µg	0.01 µg	0.1 µg
[0328] 缀合物1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
缀合物2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
缀合物9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
未缀合的PS	-	-	698 (466, 1045)

[0329] 如在上表中所示,缀合物1和2,当施用于小鼠时,产生能够调理血清15B肺炎链球菌,触发补体沉积,由此促进吞噬作用并通过吞噬细胞杀死细菌的抗体。此外,尽管它们的分子量更低,它们也表现出相对于没有被裁剪的缀合物9类似的免疫原性水平。

[0330] 实施例4:血清型15B及15C血清型之间的交叉功能性OPA应答

[0331] 肺炎球菌血清群15包括四个结构相关的血清型:15A、15B、15C和15F。血清型15B和15C通过基因分型技术无法进行区分并且具有相似的荚膜多糖(PS)组成,除了15B-PS是

15C-PS的O-乙酰化变体。为了解对于血清15B的抗荚膜PS抗体是否在功能上与血清型15C交叉反应,10只兔子用PCV16v和PCV20v疫苗(两者均含有如本文所公开的包含共价连接到CRM₁₉₇肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的免疫原性缀合物作为它们制剂的一部分)进行免疫。来自接种前后的血清在OPA测定中针对血清型15B和15C目标肺炎链球菌菌株进行测试。

[0332] 用血清型15B缀合物免疫后,来自各组的10只兔子中,100%具有对血清型15B的OPA应答。这些相同的样品中,100%对血清型15C也具有OPA应答(表3和表4)。在15C OPA中在接种前的血清中观察到低OPA效价。然而,相比于接种前,接种后的血清具有超过10倍GMT OPA滴度的增加,这表明本发明的免疫原性缀合物在OPA中诱导能够杀死血清型15B和15C肺炎链球菌的抗体的形成。

[0333] PCV16v是16价缀合物组合物,其包含来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F (16vPnC) 的糖缀合物(所有单独缀合至CRM₁₉₇)。

[0334] PCV20v是20价缀合物组合物,其包含来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F (20vPnC) 的糖缀合物(所有单独缀合至CRM₁₉₇)。

[0335] 表3. 在兔血清中用PCV16v接种前后针对血清型15B和15C菌株的OPA滴度

动物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
[0336] 5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

[0337] 表4. 在兔血清中用PCV20v接种前后针对血清型15B和15C菌株的OPA滴度

[0338]

动物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	3784	无法确定*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	无法确定*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	无法确定*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	无法确定*	527
10	4	616	无法确定*	545
GMT	4	1917	77	1515

[0339] *由于杀死曲线差而无法确定滴度

- [0001] 序列表
- [0002] <110> Pfizer Inc.
- [0003] <120> 肺炎链球菌荚膜多糖及其缀合物
- [0004] <130> PC72026A
- [0005] <150> US 61/929,561
- [0006] <151> 2014-01-21
- [0007] <160> 40
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 21
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> "A类" CpG寡核苷酸
- [0015] <400> 1
- [0016] ggggacgacg tcgtgggggg g 21
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 21
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> "A类" CpG寡核苷酸
- [0023] <400> 2
- [0024] ggggacgacg tcgtgggggg g 21
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <223> "B类" CpG寡核苷酸
- [0031] <400> 3
- [0032] tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 21
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> "B类" CpG寡核苷酸

[0039]	<400> 4
[0040]	tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
[0041]	<210> 5
[0042]	<211> 24
[0043]	<212> DNA
[0044]	<213> 人工序列
[0045]	<220>
[0046]	<223> "B类" CpG寡核苷酸
[0047]	<400> 5
[0048]	tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24
[0049]	<210> 6
[0050]	<211> 24
[0051]	<212> DNA
[0052]	<213> 人工序列
[0053]	<220>
[0054]	<223> "B类" CpG寡核苷酸
[0055]	<400> 6
[0056]	tcgtcgtttc gtcgttttgt cggt 24
[0057]	<210> 7
[0058]	<211> 24
[0059]	<212> DNA
[0060]	<213> 人工序列
[0061]	<220>
[0062]	<223> "B类" CpG寡核苷酸
[0063]	<400> 7
[0064]	tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24
[0065]	<210> 8
[0066]	<211> 21
[0067]	<212> DNA
[0068]	<213> 人工序列
[0069]	<220>
[0070]	<223> B-类寡核苷酸
[0071]	<400> 8
[0072]	tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
[0073]	<210> 9
[0074]	<211> 21
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> 人工序列
[0077]	<220>

[0078] <223> B-类寡核苷酸
[0079] <400> 9
[0080] tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
[0081] <210> 10
[0082] <211> 24
[0083] <212> DNA
[0084] <213> 人工序列
[0085] <220>
[0086] <223> B-类寡核苷酸
[0087] <400> 10
[0088] tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24
[0089] <210> 11
[0090] <211> 24
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列
[0093] <220>
[0094] <223> B-类寡核苷酸
[0095] <400> 11
[0096] tcgtcgtttc gtcgttttgt cggt 24
[0097] <210> 12
[0098] <211> 24
[0099] <212> DNA
[0100] <213> 人工序列
[0101] <220>
[0102] <223> B-类寡核苷酸
[0103] <400> 12
[0104] tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24
[0105] <210> 13
[0106] <211> 22
[0107] <212> DNA
[0108] <213> 人工序列
[0109] <220>
[0110] <223> C类CpG寡核苷酸
[0111] <400> 13
[0112] tcgcgtcggt cggcgcgcgc cg 22
[0113] <210> 14
[0114] <211> 23
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工序列

[0117]	<220>
[0118]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0119]	<400> 14
[0120]	tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
[0121]	<210> 15
[0122]	<211> 21
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> 人工序列
[0125]	<220>
[0126]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0127]	<400> 15
[0128]	tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21
[0129]	<210> 16
[0130]	<211> 19
[0131]	<212> DNA
[0132]	<213> 人工序列
[0133]	<220>
[0134]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0135]	<400> 16
[0136]	tcggacgttc ggcgcgccg 19
[0137]	<210> 17
[0138]	<211> 20
[0139]	<212> DNA
[0140]	<213> 人工序列
[0141]	<220>
[0142]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0143]	<400> 17
[0144]	tcgcgtcggt cggcgcgccg 20
[0145]	<210> 18
[0146]	<211> 20
[0147]	<212> DNA
[0148]	<213> 人工序列
[0149]	<220>
[0150]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0151]	<400> 18
[0152]	tcgacgttcg gcgcgcgccg 20
[0153]	<210> 19
[0154]	<211> 18
[0155]	<212> DNA

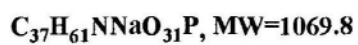
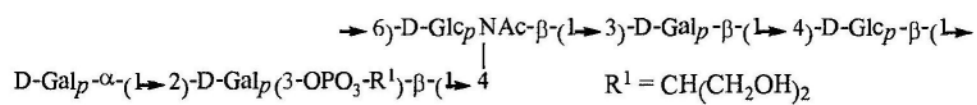
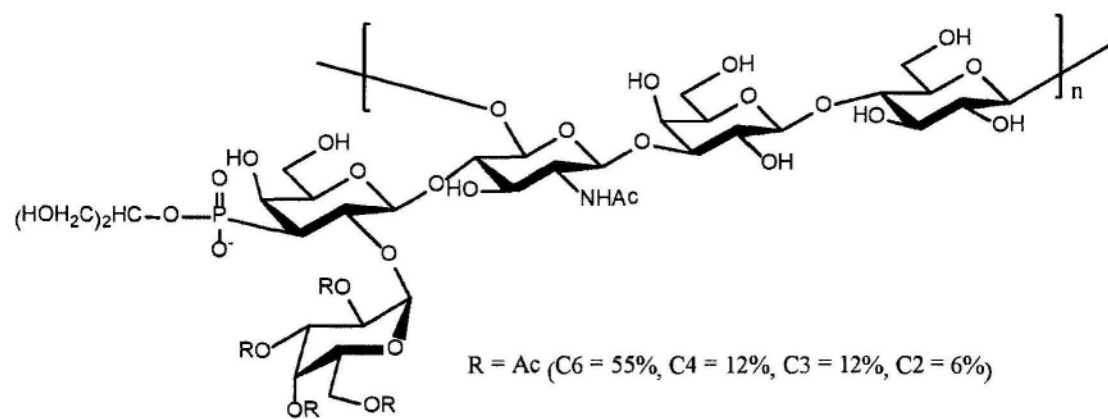
[0156] <213> 人工序列
[0157] <220>
[0158] <223> C类CpG寡核苷酸
[0159] <400> 19
[0160] tcgacgttcg gcgcgccg 18
[0161] <210> 20
[0162] <211> 18
[0163] <212> DNA
[0164] <213> 人工序列
[0165] <220>
[0166] <223> C类CpG寡核苷酸
[0167] <400> 20
[0168] tcgcgtcgtt cggcgccg 18
[0169] <210> 21
[0170] <211> 22
[0171] <212> DNA
[0172] <213> 人工序列
[0173] <220>
[0174] <223> C类CpG寡核苷酸
[0175] <400> 21
[0176] tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22
[0177] <210> 22
[0178] <211> 22
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列
[0181] <220>
[0182] <223> C类CpG寡核苷酸
[0183] <400> 22
[0184] tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
[0185] <210> 23
[0186] <211> 22
[0187] <212> DNA
[0188] <213> 人工序列
[0189] <220>
[0190] <223> C类CpG寡核苷酸
[0191] <400> 23
[0192] tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22
[0193] <210> 24
[0194] <211> 24

[0195]	<212> DNA
[0196]	<213> 人工序列
[0197]	<220>
[0198]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0199]	<400> 24
[0200]	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
[0201]	<210> 25
[0202]	<211> 23
[0203]	<212> DNA
[0204]	<213> 人工序列
[0205]	<220>
[0206]	<223> C类CpG寡核苷酸
[0207]	<400> 25
[0208]	tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23
[0209]	<210> 26
[0210]	<211> 22
[0211]	<212> DNA
[0212]	<213> 人工序列
[0213]	<220>
[0214]	<223> C类寡核苷酸
[0215]	<400> 26
[0216]	tcgcgtcggt cggcgcgcg cg 22
[0217]	<210> 27
[0218]	<211> 23
[0219]	<212> DNA
[0220]	<213> 人工序列
[0221]	<220>
[0222]	<223> C类寡核苷酸
[0223]	<400> 27
[0224]	tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
[0225]	<210> 28
[0226]	<211> 21
[0227]	<212> DNA
[0228]	<213> 人工序列
[0229]	<220>
[0230]	<223> C类寡核苷酸
[0231]	<400> 28
[0232]	tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21
[0233]	<210> 29

[0234] <211> 19
[0235] <212> DNA
[0236] <213> 人工序列
[0237] <220>
[0238] <223> C类寡核苷酸
[0239] <400> 29
[0240] tcggacgttc ggcgcgccg 19
[0241] <210> 30
[0242] <211> 20
[0243] <212> DNA
[0244] <213> 人工序列
[0245] <220>
[0246] <223> C类寡核苷酸
[0247] <400> 30
[0248] tcgcgtcggtt cggcgcgccg 20
[0249] <210> 31
[0250] <211> 20
[0251] <212> DNA
[0252] <213> 人工序列
[0253] <220>
[0254] <223> C类寡核苷酸
[0255] <400> 31
[0256] tcgacgttcg gcgcgcgccg 20
[0257] <210> 32
[0258] <211> 18
[0259] <212> DNA
[0260] <213> 人工序列
[0261] <220>
[0262] <223> C类寡核苷酸
[0263] <400> 32
[0264] tcgacgttcg gcgcgccg 18
[0265] <210> 33
[0266] <211> 18
[0267] <212> DNA
[0268] <213> 人工序列
[0269] <220>
[0270] <223> C类寡核苷酸
[0271] <400> 33
[0272] tcgcgtcggtt cggcgcgccg 18

[0273]	<210> 34
[0274]	<211> 22
[0275]	<212> DNA
[0276]	<213> 人工序列
[0277]	<220>
[0278]	<223> C类寡核苷酸
[0279]	<400> 34
[0280]	tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22
[0281]	<210> 35
[0282]	<211> 22
[0283]	<212> DNA
[0284]	<213> 人工序列
[0285]	<220>
[0286]	<223> C类寡核苷酸
[0287]	<400> 35
[0288]	tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
[0289]	<210> 36
[0290]	<211> 22
[0291]	<212> DNA
[0292]	<213> 人工序列
[0293]	<220>
[0294]	<223> C类寡核苷酸
[0295]	<400> 36
[0296]	tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22
[0297]	<210> 37
[0298]	<211> 24
[0299]	<212> DNA
[0300]	<213> 人工序列
[0301]	<220>
[0302]	<223> C类寡核苷酸
[0303]	<400> 37
[0304]	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
[0305]	<210> 38
[0306]	<211> 23
[0307]	<212> DNA
[0308]	<213> 人工序列
[0309]	<220>
[0310]	<223> C类寡核苷酸
[0311]	<400> 38

[0312]	tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23
[0313]	<210> 39
[0314]	<211> 23
[0315]	<212> DNA
[0316]	<213> 人工序列
[0317]	<220>
[0318]	<223> P类CpG寡核苷酸
[0319]	<400> 39
[0320]	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23
[0321]	<210> 40
[0322]	<211> 23
[0323]	<212> DNA
[0324]	<213> 人工序列
[0325]	<220>
[0326]	<223> P类CpG寡核苷酸
[0327]	<400> 40
[0328]	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23



Ac= 乙酰基

图1