



(10) 授权公告号 CN 111757754 B

(45) 授权公告日 2024.07.05

(21) 申请号 201980009513.X

(22) 申请日 2019.02.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111757754 A

(43) 申请公布日 2020.10.09

(30) 优先权数据
10-2018-0045246 2018.04.18 KR
62/626,482 2018.02.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/016506 2019.02.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/152921 EN 2019.08.08

(73) 专利权人 赛诺菲巴斯德有限公司
地址 美国宾夕法尼亚州斯威夫特沃特
专利权人 SK生物科技有限公司

(72) 发明人 安京军 韩东苏 金洪 金宋宪
申金焕 罗伯特·霍普弗
理查德·D·肯辛格 莫·基乌
菲利普·塔拉加

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 刘潇

(51) Int.Cl.
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/64 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2017085586 A1, 2017.05.26
田雨. 多价肺炎链球菌荚膜多糖-蛋白结合
疫苗的研究进展.《中国生物制品学杂志》. 2022,
第35卷(第10期), 第1268-1273页.

审查员 屈小又

权利要求书2页 说明书33页

(54) 发明名称

多价肺炎球菌多糖-蛋白质缀合物组合物

(57) 摘要

提供了包含21种不同肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中所述缀合物中的每一种包括与破伤风类毒素(TT)或CRM₁₉₇缀合的来自不同肺炎链球菌血清型的荚膜多糖,其中所述肺炎链球菌血清型选自1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F,其中血清型1、3和5中的两种血清型的所述荚膜多糖与TT缀合并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。还提供了产生所述混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物的方法以及在受试者中使用所述组合物预防肺炎链球菌感染或疾病的方法。

1. 一种混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其包含21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物,其中各肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物包含与来自不同肺炎链球菌血清型的荚膜多糖缀合的蛋白质载体,其中所述肺炎链球菌血清型为1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F,

其中所述蛋白质载体是CRM₁₉₇或破伤风类毒素,并且

其中所述荚膜多糖中的两种与破伤风类毒素缀合并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合,其中与破伤风类毒素缀合的所述两种荚膜多糖选自由血清型1、3和5组成的组。

2. 如权利要求1所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中来自血清型1和5的所述荚膜多糖与所述破伤风类毒素缀合,并且来自血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

3. 如权利要求1所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中来自血清型1和3的所述荚膜多糖与所述破伤风类毒素缀合,并且来自血清型4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

4. 如权利要求1所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中来自血清型3和5的所述荚膜多糖与所述破伤风类毒素缀合,并且来自血清型1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

5. 如权利要求1所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其还包含佐剂。

6. 如权利要求5所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中所述佐剂是铝基佐剂。

7. 如权利要求6所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中所述佐剂选自由磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝组成的组。

8. 如权利要求7所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中所述佐剂是磷酸铝。

9. 如权利要求1所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其中:

来自血清型9N的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合,其处于以下状态:来自血清型9N的所述荚膜多糖被活化成具有2-19或5-10的氧化程度以及200-700kDa的分子量;

来自血清型9N的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇之间形成的所述缀合物具有500-4,000kDa的分子量;

来自血清型9N的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇之间形成的所述缀合物中来自血清型9N的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇以重量计的比率为0.5-2.5;和/或

来自血清型9N的所述荚膜多糖与CRM₁₉₇之间形成的所述缀合物的15-60%在CL-4B柱中具有0.3或更低的K_d。

10. 权利要求1-9中任一项所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物在制备用于在受试者中预防肺炎链球菌感染或疾病的药物中的用途。

11. 一种疫苗,其包含如权利要求1-9中任一项所述的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物以及药学上可接受的赋形剂。

12. 如权利要求11所述的疫苗,其中来自血清型1和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

13. 如权利要求12所述的疫苗,其中所述疫苗配制为单次0.5ml剂量,包括2 μ g至2.5 μ g的除血清型6B的荚膜多糖外的每种荚膜多糖和4 μ g至5 μ g的血清型6B。

14. 如权利要求13所述的疫苗,其中所述疫苗配制为单次0.5ml剂量,包含2.2 μ g除血清型6B的荚膜多糖外的每种荚膜多糖和4.4 μ g来自血清型6B的荚膜多糖。

15. 如权利要求12所述的疫苗,其中所述疫苗配制为单次0.5ml剂量,包含2 μ g至2.5 μ g的来自血清型1、5、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、14、15B、18C、22F、23F和33F的每种荚膜多糖和4 μ g至5 μ g的每个来自血清型3、4、6B、9V、19A和19F的荚膜多糖。

16. 如权利要求15所述的疫苗,其中所述疫苗配制为单次0.5ml剂量,其包含2.2 μ g来自血清型1、5、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、14、15B、18C、22F、23F和33F的每种荚膜多糖和4.4 μ g来自血型3、4、6B、9V、19A和19F的每种荚膜多糖。

17. 如权利要求12所述的疫苗,其中所述疫苗配制为单次0.5ml剂量,其包含2.2 μ g除选自血清型1、3、4、5、6B、9V、19A和19F的至多六种血清型外的每种荚膜多糖,以及4.4 μ g选自选自血清类型1、3、4、5、6B、9V、19A和19F的至多6种血清型的每种荚膜多糖。

18. 如权利要求12所述的疫苗,其中所述疫苗被配制为单次0.5ml剂量,包括:

2.2 μ g除血清型6B外的每种荚膜多糖;

4.4 μ g来自血清型6B的荚膜多糖;

2 μ g至25 μ g破伤风类毒素;

40 μ g至75 μ g CRM197;

0.125至0.250mg的元素铝佐剂;

氯化钠;和

琥珀酸钠缓冲液。

19. 如权利要求18所述的疫苗,其进一步包含聚山梨醇酯80。

20. 如权利要求18所述的疫苗,其中所述元素铝佐剂包括磷酸铝。

21. 权利要求12-20中任一项所述的疫苗在制备用于在受试者中预防肺炎链球菌感染或疾病的药物中的用途。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述受试者是至少50岁的人并且所述疾病是肺炎或侵入性肺炎球菌疾病(IPD)。

23. 如权利要求21所述的用途,其中所述受试者是至少6周的人并且所述疾病是肺炎、侵入性肺炎球菌疾病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。

24. 如权利要求23所述的用途,其中所述受试者为6周至5岁、2至15个月或6至17岁。

25. 如权利要求21所述的用途,其中所述受试者是人。

26. 如权利要求21所述的用途,其中所述疫苗通过肌肉注射施用。

27. 如权利要求21所述的用途,其中所述疫苗作为免疫系列的一部分施用。

28. 权利要求11所述的疫苗在制备用于在受试者中预防肺炎链球菌感染或疾病的药物中的用途。

多价肺炎球菌多糖-蛋白质缀合物组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年2月5日提交的美国临时专利申请号62/626,482和2018年4月18日提交的韩国专利申请号10-2018-0045246的权益并且依赖于其提交日期,所述专利的整体公开内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本申请总体涉及混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物、包含所述组合物的疫苗以及用于在受试者中使用这些组合物和疫苗用于预防肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 感染或疾病的方法。

背景技术

[0004] 肺炎球菌(肺炎链球菌)是具有超过90种已知血清型的革兰氏阳性、柳叶刀形、兼性厌氧性细菌。大多数肺炎链球菌血清型已经显示出会造成疾病,其中23种最常见的血清型在世界各地导致大约90%的侵入性疾病。血清型是根据荚膜多糖(肺炎球菌最重要的毒力因子)的血清学反应进行分类。荚膜多糖是T细胞非依赖性抗原,其在不存在T辅助细胞的情况下诱导抗体产生。T细胞非依赖性抗原通常诱导低亲和力抗体和短期免疫反应以及很少甚至没有免疫记忆。

[0005] 初始肺炎球菌疫苗包括来自不同血清型的荚膜多糖的组合。这些疫苗可赋予具有发达或健康的免疫系统的患者对抗肺炎链球菌的免疫力,然而,它们在缺乏发达的免疫系统的婴儿和通常免疫功能减弱的老年受试者中没有效果。为了改善肺炎球菌疫苗的免疫反应,特别是在处于发展肺炎链球菌感染较高风险下的婴儿和老年受试者中,使荚膜多糖与合适的载体蛋白缀合以产生肺炎球菌缀合物疫苗。与合适的载体蛋白缀合使荚膜多糖由T细胞非依赖性抗原改变成T细胞依赖性抗原。确切而言,对抗缀合的荚膜多糖的免疫反应涉及T辅助细胞,所述T辅助细胞在再暴露于荚膜多糖时协助诱导更有力且快速的免疫反应。

[0006] 存在至少两种开发肺炎球菌缀合物疫苗的方法:单一载体方法和混合载体方法。不同的荚膜多糖缀合物的免疫原性可取决于所用的肺炎球菌血清型和载体蛋白而变化。在单一载体方法中,来自不同血清型的荚膜多糖与单一蛋白质载体缀合。其中不同的荚膜多糖与CRM₁₉₇蛋白质载体(一种具有以甘氨酸单一氨基酸取代谷氨酸的白喉类毒素的无毒变体)进行缀合的单一载体方法的实例是辉瑞的(Pfizer's)沛儿系列疫苗。7价沛儿疫苗(PREVNAR)首先在2000年得到批准并且含有来自7种最流行的血清型:4、6B、9V、14、18C、19F和23F的荚膜多糖。13价疫苗,PREVNAR 13,将血清型1、5、7F、3、6A和19A添加至CRM₁₉₇蛋白质载体。PREVNAR疫苗内使用的单一载体,蛋白质载体CRM₁₉₇,从未用作肺炎球菌缀合物疫苗的混合载体系统的一部分。

[0007] 第二种肺炎球菌疫苗方法是混合载体方法。在混合载体方法中,使用两种或更多种蛋白质载体,而非使用单一蛋白质载体,其中来自特定血清型的荚膜多糖与第一蛋白质载体缀合并且来自不同血清型的荚膜多糖与至少第二、不同的蛋白质载体缀合。例如,葛兰

素史克 (GlaxoSmithKline) 已经开发出双伏威 (SYNFLORIX), 一种10价 (血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F)、混合载体、肺炎球菌缀合物疫苗, 其使用流感嗜血杆菌蛋白D、破伤风类毒素和白喉类毒素作为蛋白质载体。在双伏威中, 血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和23F与蛋白D缀合; 血清型18C与破伤风类毒素缀合; 并且血清型19F与白喉类毒素缀合 [2]。由11价前体部分地去除血清型3成为双伏威, 因为所述血清型3在急性中耳炎试验中没有显示出血清型特异性功效 [1]。另一集团, 安万特巴斯德 (Aventis Pasteur), 开发了一种使用白喉类毒素和破伤风类毒素作为蛋白质载体的11价 (血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F和23F)、混合载体、肺炎球菌缀合物疫苗 [3]。来自血清型3、9V、14和18C的荚膜多糖在与白喉类毒素缀合时可引起比其与破伤风类毒素缀合时引起的反应更佳 [6]。因此, 血清型3、6B、14和18C与白喉类毒素缀合并且血清型1、4、5、7F、9V、19F和23F与破伤风类毒素缀合。此混合载体、肺炎球菌疫苗的开发被终止, 部分是由于技术因素以及与非细胞性百日咳疫苗一起施用反应潜力的降低 [3]。近来, 血清型5和1被报道为具有从所有PREVNAR 13血清型观察到的最低OPA效价中的一个, 其中在IgG效价与OPA活性之间存在关联的相关性 [4]。还有人建议对于血清型3, 保护作用将需要高得多的血清IgG浓度 [5]。

发明内容

[0008] 本申请提供了新且改进的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物以及包含所述组合物的疫苗。在一个方面, 本申请提供了一种混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物, 其包含21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物, 其中各肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物包含与来自不同肺炎链球菌血清型的荚膜多糖缀合的蛋白质载体, 其中肺炎链球菌血清型选自1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F, 其中蛋白质载体是CRM₁₉₇或破伤风类毒素, 其中荚膜多糖中的两种与破伤风类毒素缀合并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合, 并且其中与破伤风类毒素缀合的两种荚膜多糖选自血清型1、3和5组成的组。

[0009] 在混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物的一些实施方案中, 来自血清型1和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合, 并且来自血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0010] 在混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物的另一个实施方案中, 来自血清型1和3的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合, 并且来自血清型4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0011] 在混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物的另一个实施方案中, 来自血清型3和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合, 并且来自血清型1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0012] 在一些实施方案中, 混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物还包含佐剂, 诸如铝基 (aluminum-based) 佐剂, 包括但不限于磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

[0013] 另一方面涉及混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物作为疫苗的用途。

[0014] 另一方面涉及一种疫苗, 其包含混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物和药学上可接受的赋形剂。

[0015] 另一方面涉及一种用于在诸如人的受试者中预防肺炎链球菌感染或疾病的方法,

所述方法包括向受试者施用预防有效量的混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或包含所述组合物的疫苗。

[0016] 在某些实施方案中,受试者是至少50岁的人并且疾病是肺炎或侵入性肺炎球菌疾病(IPD)。

[0017] 在其他实施方案中,受试者是至少6周大的人并且疾病是肺炎、侵入性肺炎球菌疾病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在一些实施方案中,人受试者是6周至5岁。在其他实施方案中,人受试者是2至15个月或6至17岁。

[0018] 在某些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或疫苗通过肌肉注射施用。在某些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或疫苗作为免疫系列(immunization series)的一部分施用。

[0019] 另一方面涉及一种肺炎链球菌血清型9N的免疫原性缀合物,其包含:来自肺炎链球菌的血清型9N荚膜多糖;以及与荚膜多糖结合的载体蛋白质,其中载体蛋白质是CRM₁₉₇。在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,血清型9N多糖可与CRM₁₉₇结合形成缀合物,所述血清型9N多糖的状态是被活化具有2-19或5-10的氧化程度以及200-700kDa的分子量。在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,免疫原性血清型9N缀合物可具有500-4,000kDa的分子量。

[0020] 在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,免疫原性血清型9N缀合物中血清型9N荚膜多糖与载体蛋白质的比率是0.1-5(w/w)。在某些实施方案中,比率是0.5-2.5。

[0021] 在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,免疫原性血清型9N缀合物的15-60%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的K_d。

[0022] 在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,免疫原性血清型9N缀合物已经用已经活化以达到2-19的氧化程度的血清型9N多糖进行制备。在某些实施方案中,免疫原性血清型9N缀合物已经用已经活化以达到5-10的氧化程度的血清型9N多糖进行制备。

[0023] 在免疫原性血清型9N缀合物、该混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗(以及其方法/用途)的某些实施方案中,当通过每1μg的糖添加0.02-0.19μg的过碘酸盐使肺炎链球菌血清型9N糖与CRM₁₉₇缀合时,缀合物可具有500-4,000kDa的分子量、15-60%的分子量分布(K_d≤0.3)和0.5-2.5的糖/蛋白质比率。

[0024] 在另一方面,本公开还提供一种用于制备肺炎链球菌血清型9N的免疫原性缀合物的方法,所述方法包括:

[0025] (a) 通过发酵产生肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖的细菌细胞使其裂解;

[0026] (b) 从裂解细胞中纯化肺炎链球菌血清型9N荚膜糖;

[0027] (c) 通过与氧化剂反应而使肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖活化以达到2-19或5-10的氧化程度;以及

[0028] (d) 通过将活化的糖与CRM₁₉₇混合而形成肺炎链球菌血清型9N荚膜糖与CRM₁₉₇结合的缀合物。

[0029] 在某些实施方案中,在步骤(d)中混合的CRM₁₉₇可与还原剂反应以形成具有活化的肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖的缀合物。在某些实施方案中,在步骤(c)中,0.02-0.19 μ g的过碘酸盐可与1 μ g的肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖在20-25 $^{\circ}$ C下反应15-20小时。

[0030] 在某些实施方案中,在步骤(c)中与氧化剂反应的肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖可具有400-900kDa的分子量。在某些实施方案中,在步骤(d)中与CRM₁₉₇混合的活化的肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖可具有200-700kDa的分子量。在某些实施方案中,肺炎链球菌血清型9N的免疫原性缀合物可具有500-4,000kDa的分子量。在某些实施方案中,CRM₁₉₇与活化的血清型9N荚膜糖的初始投入比率(载体CRM₁₉₇:糖)可以是0.5-2.5:1。在某些实施方案中,免疫原性缀合物的至少15-60%如在CL-4B柱中所测可具有0.3或更低的K_d。

[0031] 在某些实施方案中,当通过每1 μ g的糖添加0.02-0.19 μ g的过碘酸盐使本公开的肺炎链球菌血清型9N多糖与CRM₁₉₇缀合时,免疫原性缀合物具有500-4,000kDa的分子量、如在CL-4B柱中测量为15-60%的分子量分布(K_d \leq 0.3)以及0.5-2.5的CRM₁₉₇/多糖比率。

[0032] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物的前述和其他目的、特征和优点将由于下列详细描述而变得更显而易见。

[0033] 定义

[0034] 为了更容易理解本公开,首先定义某些术语如下。在本说明书中可能会提出下列术语的另外定义和其他术语。

[0035] 如在本说明书和随附权利要求中所用,除非上下文另外明确指定,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述”包括复数个指代物。因此例如,提及“一种方法”包括本文所述的一种或多种方法,和/或类型的步骤和/或本领域技术人员在阅读本公开后将变得显而易见的那些等等。

[0036] 施用:如本文所用,向受试者“施用”组合物是指给予、应用或使组合物接触受试者。施用可以通过多种途径的任一个来完成,诸如,局部、口腔、皮下、肌肉、腹膜内、静脉内、鞘内和真皮内。

[0037] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”,当用于一个或多个感兴趣的数值时,是指与所述参考值相似的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落在所述参考值的任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小之内范围的值,除非另外陈述或从上下文明白(除了此数字将超过可能值的100%以外)。

[0038] 缀合物:如本文所用,并且由合适的上下文了解到,术语“缀合物”或“糖缀合物(glycoconjugate)”是指使用任何共价或非共价生物缀合策略而与载体蛋白质缀合的肺炎链球菌多糖。

[0039] 氧化程度:如本文所用,术语“氧化程度”(DO)是指当用氧化剂活化经过纯化或粒度分级的糖时,每醛基产生的糖重复单元的数目。糖的氧化程度可使用本领域普通技术人员已知的常规方法确定。

[0040] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指组合物中可包括的非治疗剂,例如用以提供或促进所期望的稠度(consistency)或稳定化作用。

[0041] 混合载体:如本文所用,混合载体、肺炎球菌缀合物组合物是指具有多于一种类型的蛋白质载体的肺炎球菌缀合物组合物。

[0042] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物:如本文所用,术语“混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物”是指一种组合物,其包含21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物或由所述21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物组成,其中各肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物包含与来自不同肺炎链球菌血清型的荚膜多糖缀合的蛋白质载体,其中肺炎链球菌血清型是1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F,其中蛋白质载体是CRM₁₉₇或破伤风类毒素,其中荚膜多糖中的两种与破伤风类毒素缀合并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合,并且其中与破伤风类毒素缀合的两种荚膜多糖选自血清型1、3和5组成的组。在一些实施方案中,来自血清型1和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自其余血清型的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。在一些实施方案中,来自血清型1和3的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自其余血清型的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。在另一个实施方案中,来自血清型3和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0043] 分子量:如本文所用,除非另有说明,否则术语荚膜糖或荚膜糖-载体蛋白质缀合物的“分子量”是指通过尺寸排阻层析(SEC)与多角度激光散射(MALLS)组合所计算的平均分子量。

[0044] 多价:如本文所用,术语“多价”是指具有来自多于一种肺炎链球菌血清型的肺炎球菌荚膜多糖的肺炎球菌缀合物组合物。

[0045] 药学上可接受的赋形剂:本公开中可用的药学上可接受的赋形剂是常用的。E.W.Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975)的Remington's Pharmaceutical Sciences描述了适于药学递送一种或多种治疗组合物的组合物和制剂,包括疫苗,以及另外的药剂。合适的药学赋形剂包括,例如,淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、干燥脱脂牛奶、甘油、丙烯(propylene)、二醇、水、乙醇等等。一般而言,赋形剂的性质将取决于所使用的特定施用模式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体,包括药学和生理上可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、缓冲液、含水右旋糖、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如,粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式),常用的无毒固体赋形剂可包括,例如,药品级甘露糖醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载体之外,待施用的药物组合物可包含少量无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0046] 预防有效量:如本文所用,术语“预防有效量”或“预防有效剂量”是指诱发足以使肺炎链球菌感染所造成的一种或多种症状的发作延迟和/或降低频率和/或严重性的免疫反应所需的量或剂量。

[0047] 预防:如本文所用,术语“预防”是指避免疾病显现、延迟发作和/或降低特定疾病、病症或病状(例如,肺炎链球菌感染)的一种或多种症状的频率和/或严重性。在一些实施方案中,预防以群体基础进行评估,使得如果在疾病、病症或病状易感的群体内观察到该疾病、病症或病状的一种或多种症状的发展、频率及/或强度有统计上显著的下降,那么认为药剂对特定疾病、病症或病状提供预防。

[0048] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指任何哺乳动物,包括小鼠、兔和人。在某些实施方案中,受试者是成人、青少年或婴儿。在一些实施方案中,使用术语“个体”或“患者”

并且旨在与“受试者”可互换。

具体实施方式

[0049] 下列所公开的实施方案和实施例的描述在本质上仅仅是示例性的并且决不旨在限制本发明、其应用或用途。

[0050] 本申请提供了新且改进的混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物和包含所述组合物的疫苗。虽然蛋白质载体CRM₁₉₇先前已用于单一载体、肺炎球菌缀合物疫苗中,但本申请描述了CRM₁₉₇在混合载体、肺炎球菌缀合物疫苗中的用途。特别地,本申请描述了CRM₁₉₇和破伤风类毒素在多价肺炎球菌缀合物组合物和疫苗中作为用于特定肺炎球菌血清型的载体蛋白质的组合用途。

[0051] 如以上讨论,不同荚膜多糖缀合物的免疫原性可取决于所用的肺炎球菌血清型和载体蛋白质而变化。本申请描述血清型3与破伤风类毒素成功缀合作为混合载体疫苗的一部分,尽管先前的教导内容是血清型3在与白喉类毒素缀合而非破伤风类毒素时是更有免疫原性的[6]。还描述了血清型1和5与破伤风类毒素成功缀合作为混合载体疫苗的一部分。还公开了意想不到的发现,即对混合载体、多价,例如21价,肺炎球菌缀合物组合物中与破伤风类毒素缀合的血清型3的抗体反应,比单一载体、13价肺炎球菌缀合物组合物(沛儿13)中血清型3与CRM₁₉₇缀合时高约4-5倍。

[0052] 另外,意想不到的发现不限于血清型3,而且对于在混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物中与破伤风类毒素缀合的其他血清型也观察到。如实施例中所示,与单一载体、肺炎球菌缀合物组合物(沛儿13)中与CRM₁₉₇缀合的相同血清型的抗体反应(IgG反应或MOPA效价)相比,混合载体、肺炎球菌缀合物组合物中血清型1和5或3和5与破伤风类毒素缀合且其余血清型与CRM₁₉₇缀合(例如,PCV21 (1/5) -TT和PCV21 (3/5) -TT)一致地对与破伤风类毒素缀合的血清型诱发显著提高的抗体反应。

[0053] 本申请中所述的混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物还包括目前在全球市场上可得的三种肺炎球菌缀合物疫苗:沛儿(PREVNAR)(一些国家称为沛儿(Prevenar))、双伏威(SYNFLORIX)和沛儿(PREVNAR)13,目前未涵盖的肺炎球菌血清型。目前未涵盖的肺炎球菌血清型造成的疾病在上升中,部分是由于发展出抗菌抗性(antibacterial resistance)、免疫功能低下患者数量增加以及缺乏免疫压力。例如,目前可得的肺炎球菌缀合物疫苗中没有一个包括血清型9N。此外,目前可得的肺炎球菌缀合物疫苗中没有一个包括血清型8、10A、11A、12F、15B、22F和33F。本公开展示出将血清型8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F成功提供到混合载体(破伤风类毒素与CRM₁₉₇)、肺炎球菌缀合物疫苗中,并且血清型9N诱发比沛儿13高约40至50倍的抗体反应。

[0054] 肺炎球菌多糖血清型9N

[0055] 可通过使用本领域技术人员已知的分离程序(包括但不限于美国专利申请公布号2006/0228380中公开的方法)从细菌直接获得血清型9N多糖。此外,所述糖可使用合成方案生产。

[0056] 血清型9N肺炎链球菌菌株可从建立的培养物保藏中心(例如,疾病控制和预防中心的链球菌参考实验室(Streptococcal Reference Laboratory of the Centers for Disease Control and Prevention(Atlanta,Georgia)))或临床样本获得。

[0057] 细菌细胞通常在培养基中生长,诸如大豆基培养基。在产生肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖的细菌细胞发酵之后,使细菌细胞裂解以产生细胞裂解物。接着,可将血清型9N多糖使用本领域已知的纯化技术从细胞裂解物中分离,所述纯化技术包括离心、深度过滤、沉淀、超过滤、活性炭处理、透析过滤和/或柱层析(包括但不限于美国专利申请公布号2006/0228380中公开的方法)。纯化的血清型9N荚膜多糖可用于制备免疫原性缀合物。通过纯化来自肺炎链球菌裂解物的血清型9N多糖并且任选地将纯化的多糖粒度分级而获得的血清型9N荚膜多糖可通过不同的参数表征,包括例如血清型9N荚膜多糖的分子量(MW)。

[0058] 在某些实施方案中,从肺炎链球菌血清型9N纯化的纯化多糖在缀合前具有5-5,000kDa的分子量。在某些实施方案中,血清型9N荚膜多糖在缀合前具有50-1,000kDa的分子量。在某些实施方案中,血清型9N荚膜多糖在缀合前具有70-900kDa的分子量。在某些实施方案中,血清型9N荚膜多糖在缀合前具有100-800kDa的分子量。在某些实施方案中,纯化的血清型9N荚膜多糖在缀合前可进行活化以具有以下分子量:50-800kDa、80-780kDa、100-770kDa、120-760kDa、140-750kDa、150-740kDa、160-730kDa、170-735kDa、180-720kDa、190-710kDa、200-700kDa、220-690kDa、240-680kDa、260-670kDa、270-660kDa或类似的分子量范围。涵盖以上范围中的任一个内的任何整数作为本公开的实施方案。

[0059] 活化的血清型9N多糖可通过氧化程度和分子量表征。在某些实施方案中,活化的血清型9N多糖可具有0.5-25、0.6-23、0.8-21、1-20.8、1.1-20.5、1.2-20.3、1.3-20、1.4-19.5、1.5-19.3、1.6-19.2、1.7-19.1 2-19、3-18、4-15或5-10的氧化程度。

[0060] 多糖的大小可在正常的纯化程序期间略微减小。另外,如本公开所述,可使多糖在缀合前进行粒度分级。上文所提及的分子量范围是指在缀合前的最终粒度分级步骤之后(例如,纯化、水解及活化后)的纯化多糖的分子量范围。

[0061] 混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物及其制备方法

[0062] 本公开提供一种混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物,其包含21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物或由所述21种不同的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物组成,其中各肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物包含与来自不同肺炎链球菌血清型的荚膜多糖缀合的蛋白质载体,其中肺炎链球菌血清型是1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F,其中蛋白质载体是CRM₁₉₇或破伤风类毒素,其中荚膜多糖中的两种与破伤风类毒素缀合并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合,并且其中与破伤风类毒素缀合的两种荚膜多糖选自血清型1、3和5组成的组。

[0063] 在一些实施方案中,来自血清型1和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自其余血清型的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。在另一个实施方案中,来自血清型1和3的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。在另一个实施方案中,来自血清型3和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合。

[0064] 在多糖-蛋白质缀合物疫苗中,载体蛋白质与多糖抗原缀合,主要以帮助提高对多糖抗原的免疫反应(例如抗体反应)。载体蛋白质优选地是无毒性的。载体蛋白质应能够经受使用标准缀合程序与肺炎球菌多糖进行缀合,如以下更详细地讨论。混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物中使用的载体蛋白质是破伤风类毒素(TT)和CRM₁₉₇,其中是每一种已经用于设计肺炎球菌缀合物疫苗,但是从未处于同一、混合的载体疫苗中。

[0065] CRM₁₉₇是保留野生型白喉毒素的免疫特性的白喉毒素的无毒变体(即,类毒素)。

CRM₁₉₇与野生型白喉毒素的差异在于结构基因中的单个碱基,其导致从谷氨酸单一氨基酸取代为甘氨酸。CRM₁₉₇通常从酪蛋白氨基酸和酵母萃取物培养基上生长的白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)菌株C7(β197)的培养物中分离。CRM₁₉₇可通过超过滤、硫酸铵沉淀以及离子交换层析进行纯化。可替代地,CRM₁₉₇可根据美国专利号5,614,382进行重组制备,所述专利据此通过引用全文并入。CRM₁₉₇已经用于设计肺炎球菌缀合物疫苗,但是从未作为混合载体疫苗的一部分。

[0066] 破伤风类毒素被制备并全球性地用于对抗破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)造成的破伤风(或牙关紧闭(lockjaw))的大规模免疫。破伤风类毒素也单独使用以及与白喉和/或百日咳疫苗组合使用。亲本蛋白,破伤风毒素,通常从破伤风杆菌的培养物中获得。破伤风毒素是约150kDa的蛋白质并且由通过二硫键连接的两个亚基(约100kDa和约50kDa)组成。所述毒素通常用甲醛进行去毒并且可使用已知方法从培养物滤液纯化,诸如硫酸铵沉淀(参见,例如,[7]、[8])或层析技术,如例如WO 1996/025425中所公开。破伤风毒素也可通过重组遗传手段进行灭活。

[0067] 破伤风类毒素还已用作其他疫苗中的载体蛋白质,包括肺炎球菌缀合物疫苗。但是破伤风类毒素与CRM₁₉₇组合用于混合载体、肺炎球菌缀合物疫苗是新的。本领域对于混合载体、肺炎球菌缀合物疫苗中的血清型3与破伤风类毒素缀合也有相反教导,因为该教导显示出与破伤风类毒素相比,血清型3在与白喉类毒素缀合时更具免疫原性[6]。

[0068] 本文所述的组合物和疫苗中使用的肺炎球菌荚膜多糖,包括来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖,可使用任何可得的技术,包括本领域普通技术人员已知的标准技术,从肺炎链球菌制备,所述技术包括例如,WO 2006/110381、WO 2008/118752、WO 2006/110352和美国专利申请公布号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、2008/0102498及2008/0286838中公开的那些,所有这些专利均通过引用全文并入。例如,各肺炎球菌多糖血清型可在培养基(例如,大豆基培养基)中生长。将细胞裂解,并且可通过离心、沉淀、超过滤和/或柱层析而由裂解物纯化个别多糖。此外,肺炎球菌荚膜多糖可使用合成程序产生。

[0069] 肺炎链球菌的荚膜多糖包含重复的寡糖单元,其可包含至多8个糖残基。荚膜糖抗原可以是全长多糖,或其可降低大小(例如,单一寡糖单元,或比重寡糖单元的天然长度的糖链更短)。荚膜多糖的大小可通过本领域已知的各种方法进行降低,诸如酸水解处理、过氧化氢处理、通过高压均质器进行粒度分级,任选地接着过氧化氢处理以产生寡糖片段,或微射流技术。

[0070] 通过使各血清型的荚膜多糖与载体蛋白质缀合可制备各血清型的肺炎球菌缀合物。可将不同的肺炎球菌缀合物配制成组合物,包括单剂量制剂。

[0071] 为了制备多糖-蛋白质缀合物,可对由各肺炎球菌血清型制备的荚膜多糖进行化学活化,以使荚膜多糖可与载体蛋白质反应。一旦活化,各荚膜多糖可分别与载体蛋白质缀合以形成糖缀合物。多糖的化学活化和随后与载体蛋白质的缀合可通过常规方法实现。

[0072] 例如,荚膜多糖末端的邻位羟基可通过氧化剂诸如过碘酸盐(包括过碘酸钠、过碘酸钾或过碘酸)氧化成醛基,如例如美国专利号4,365,170、4,673,574以及4,902,506中所公开的,所述专利据此通过引用整体并入。过碘酸盐随机氧化碳水化合物的邻位羟基以形成反应性醛基并且导致C-C键裂解。术语“过碘酸盐”包括过碘酸盐和过碘酸。此术语还包括

偏过碘酸盐(IO_4^-)和原过碘酸盐(IO_6^{5-})。术语“过碘酸盐”还包括过碘酸盐的各种盐,含括过碘酸钠和过碘酸钾。在某些实施方案中,多糖可在偏过碘酸钠的存在下氧化。

[0073] 在某些实施方案中,每 $1\mu\text{g}$ 的多糖可使用约 $0.03\text{-}0.17\mu\text{g}$ 的量的过碘酸盐。在某些实施方案中,每 $1\mu\text{g}$ 的多糖可使用约 $0.025\text{-}0.18\mu\text{g}$ 或约 $0.02\text{-}0.19\mu\text{g}$ 的量的过碘酸盐。糖可根据需要活化至以上范围内。超出该范围,效果可能会不满意。

[0074] 多糖还可用1-氰基-4-二甲基氨基四氟硼酸吡啶鎓(CDAP)进行活化以形成氰酸酯。活化的多糖接着直接或通过间隔子(spacer)或接头基团而偶合于载体蛋白质上的氨基。

[0075] 例如,间隔子可以是脒胺或半脒胺以得到硫醇化多糖,所述硫醇化多糖可在与马来酰亚胺活化的载体蛋白质(例如使用N-[γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS))或卤代乙酰化载体蛋白质(例如使用碘代乙酰亚胺、溴乙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SBA;SIB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、磺酸琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺酸基-SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SIA)或琥珀酰亚胺基3-[溴乙酰氨基]丙酸酯(SBAP))反应后、通过所获得的硫醚键与载体偶合。优选地,使氰酸酯(任选地通过COAP化学物质制得)与己二胺或己二酸二酰肼(AOH)进行偶合,并且使用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学物质通过蛋白质载体上的羧基使氨基衍生的糖与载体蛋白质缀合。此类缀合物描述于例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中,所有这些专利均据此通过引用整体并入。

[0076] 活化的荚膜多糖和载体蛋白质的缀合可例如,通过还原胺化来实现,如例如,美国专利申请公布号2006/0228380、2007/0231340、2007/0184071和2007/0184072、WO 2006/110381、WO 2008/079653和WO 2008/143709中所述,所有这些专利均通过引用整体并入。例如,活化的荚膜多糖和载体蛋白质可与还原剂反应以形成缀合物。合适的还原剂包括硼氢化物,诸如氰基硼氢化钠、硼烷-吡啶、三乙酰氧基硼氢化钠、钠或硼氢化物,或硼氢化物交换树脂。还原反应结束时,缀合物中可能存在未反应的醛基。未反应的醛基可使用合适的封端剂,诸如硼氢化钠(NaBH_4)进行封端。在一个实施方案中,还原反应在水性溶剂中进行。在另一个实施方案中,反应在非质子溶剂中进行。在一个实施方案中,还原反应在DMSO(二甲亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行。其他可能的还原剂包括但不限于,胺硼烷诸如吡啶-硼烷、2-甲基吡啶-硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、t-BuMeiPrN-BH₃、苯甲基胺-BH₃或5-乙基-2-甲基吡啶-硼烷(PEMB)。

[0077] 活化的荚膜多糖可直接与载体蛋白质缀合或间接地通过使用间隔子或接头,诸如双功能接头而与所述载体蛋白质缀合。接头任选地是异双功能性或同双功能性的,具有例如反应性氨基和反应性羧酸基团、2个反应性氨基或2个反应性羧酸基团。

[0078] 其他合适的缀合技术使用碳二亚胺、肼、活性酯、降硼烷(norborane)、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU,如例如国际专利申请公布号WO 98/42721中所述,其通过引用整体并入。缀合可涉及羰基接头,所述羰基接头可通过使糖的游离羟基与1,1'-羰基二咪唑(CDI)进行反应(参见Bethell等人(1979)J.Biol.Chem.254:2572-2574;Hearn等人(1981)J.Chromatogr.218:509-518)随后与蛋白质进行反应以形成氨基甲酸酯键来形成。这可涉及将变旋异构末端还原成一级羟基,任选的保护/去保护一级羟基,使一级羟基与CDI进行反应以形成CDI氨基甲酸酯中间体以及使CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白质

上的氨基进行偶合。

[0079] 肺炎球菌缀合物疫苗的多糖与载体蛋白质的比率通常在0.3-3.0(w/w)的范围内,但是可以随血清型而变化。可以通过独立测量蛋白质和多糖存在的量,或通过本领域已知的进行直接比率测量的方法来确定比率。包括¹H NMR光谱法或SEC-HPLC-UV/RI加上双重监测(例如总物质和蛋白质含量分别的折射指数和UV)以及通过SEC-HPLC-MALLS或MALDI-TOF-MS的方法,可作出糖/蛋白质比率关于缀合物大小分布的剖面图。

[0080] 如此获得的多糖-蛋白质缀合物可通过多种方法进行纯化和富集。这些方法包括浓缩/透析过滤(diafiltration)、柱层析和深度过滤(depth filtration)。将纯化的多糖-蛋白质缀合物组合以配制混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物,其可以用作疫苗。

[0081] 疫苗组合物的配制可以使用业内公认的方法完成。将疫苗组合物配制成与其预期施用途径相容。可将个别的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质缀合物与生理上可接受的媒介物配制在一起来制备组合物。此类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。

[0082] 在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物还包含佐剂。如本文所用,“佐剂”是指非特异性地提高对抗原的免疫反应的物质或媒介物。佐剂可包括矿物质的悬浮液(明矾、铝盐,诸如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、羟基磷酸铝硫酸盐等等),抗原吸附于其上;或抗原溶液被乳化于矿物油内的油包水乳液(例如,弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant)),有时加上杀死的分枝杆菌内含物(弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant))以进一步提高抗原性。免疫刺激寡核苷酸(诸如包括CpG基序(motif)的那些)也可用作佐剂(例如,参见美国专利号6,194,388;6,207,646;6,214,806;6,218,371;6,239,116;6,339,068;6,406,705;和6,429,199)。佐剂还包括生物分子,诸如脂质和共刺激分子。示例性生物佐剂包括AS04[9]、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L和41BBL。

[0083] 在一些实施方案中,佐剂是铝基佐剂。通常,单一0.5ml疫苗剂量被配制为包含约0.1mg至2.5mg的铝基佐剂。在其他实施方案中,单一0.5ml疫苗剂量被配制为包含介于0.1mg至2mg、0.1mg至1mg、0.1mg至0.5mg、0.1mg至0.2mg、0.125mg至2.5mg、0.125mg至0.5mg、0.125mg至0.2mg或0.125至0.25mg之间的铝基佐剂。在某些实施方案中,单一0.5ml疫苗剂量被配制为包含约0.125mg至约0.250mg的铝基佐剂。在某些实施方案中,单一0.5ml疫苗剂量被配制为包含约0.125mg的铝基佐剂。在某些实施方案中,单一0.5ml疫苗剂量被配制为包含约0.250mg的铝基佐剂。

[0084] 在特定实施方案中,佐剂选自由磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝组成的组。

[0085] 在特定实施方案中,佐剂是磷酸铝。

[0086] 在一些实施方案中,组合物供用作对抗肺炎链球菌感染的疫苗。

[0087] 肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质载体缀合物的表征

[0088] 在某些实施方案中,多糖-蛋白质缀合物可具有100-10,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有200-9,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有300-8,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有400-7,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有500-6,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有600-5,000kDa的分子量。在某些实施方案中,该缀合物具有500-4,000kDa分子量的分子量。涵盖以

上范围中的任一个内的任何整数作为本公开的实施方案。

[0089] 当分子量落在以上范围内时,可以高产率稳定地形成缀合物。另外,可以降低游离多糖的比例。此外,在以上分子量范围内可实现优越的免疫原性。

[0090] 在个别的多糖-蛋白质缀合物纯化之后,使它们复合以配制本公开的免疫原性组合物。

[0091] 本公开的血清型的糖-蛋白质缀合物可通过多糖与蛋白质载体的比率(多糖的量/蛋白质载体的量,w/w)进行表征。

[0092] 在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物中多糖与蛋白质载体的比率(w/w)为0.5-2.5、0.4-2.3、0.3-2.1、0.24-2、0.2-1.8、0.18-1.6、0.16-1.4、0.14-1.2、0.12-1或0.1-1(例如,约0.7、约0.8、约0.9、约1.0、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2.0、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4或约2.5)。

[0093] 当多糖与蛋白质载体的比率落在以上范围内时,可以高产率稳定地形成缀合物。另外,可以降低游离多糖的比例。此外,在以上范围内可实现优越的免疫原性并且缀合物可以稳定维持而不受其他血清型干扰。

[0094] 本公开的缀合物和免疫原性组合物可包含不与蛋白质载体共价缀合,但是却存在于多糖-蛋白质载体缀合物组合物中的游离多糖。游离多糖可与多糖-蛋白质载体缀合物非共价缔合(即,非共价结合多糖-蛋白质载体缀合物、吸附于其上或包埋于其中或通过其包埋)。

[0095] 在某些实施方案中,多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约60%、约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%或15%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约60%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约50%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约40%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约30%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约25%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约20%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约15%的各血清型的游离多糖。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物包含基于各血清型的多糖总量计少于约10%的各血清型的游离多糖。

[0096] 各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物还可通过其分子大小分布(K_d)进行表征。可使用尺寸排阻层析介质(CL-4B;交联的琼脂糖珠粒,4%)确定缀合物的相对分子大小分布。在重力进料柱中使用尺寸排阻层析(SEC)分析缀合物的分子大小分布。介质中从孔排除的大分子比小分子更快洗脱。使用级分收集器收集柱洗脱物。级分通过糖测定以比色方式测试。校准用于测定 K_d 的柱,以确立完全排除分子的级分(V_0 ; $K_d=0$)和代表最大滞留的级分(V_i ; $K_d=1$)。达到指定的样品属性的级分(V_e)通过表达式 $K_d=(V_e-V_0)/(V_i-V_0)$ 而与 K_d 相关。

[0097] 在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少15%在CL-4B柱中

可具有0.3或更低的 K_d 。

[0098] 在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少20%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少60%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少50-80%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。在某些实施方案中,各血清型的多糖-蛋白质载体缀合物的至少65-80%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。在某些实施方案中,各血清型的糖-蛋白质缀合物的至少15-60%在CL-4B柱中可具有0.3或更低的 K_d 。

[0099] 预防方法和用途

[0100] 在一个方面,本公开提供一种疫苗,其包含混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂至少包含缓冲液诸如琥珀酸盐缓冲液、盐诸如氯化钠和/或表面活性剂诸如聚氧乙烯山梨醇酯(polyoxyethylene sorbitan ester)(例如,聚山梨醇酯80)。在一些实施方案中,选自由血清型1、3和5组成的组的两种多糖与破伤风类毒素缀合,并且1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F中的其余荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。

[0101] 在一个实施方案中,来自血清型1和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。

[0102] 在另一个实施方案中,来自血清型1和3的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自血清型4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。

[0103] 在另一个实施方案中,来自血清型3和5的荚膜多糖与破伤风类毒素缀合,并且来自血清型1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。

[0104] 在一些实施方案中,所述疫苗在人受试者中引起对抗由肺炎链球菌感染造成的疾病的保护性免疫反应。

[0105] 根据另一方面,此公开提供一种用于预防肺炎链球菌感染或疾病的方法,所述方法包括向人受试者施用预防有效量的混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或包含所述组合物的疫苗。混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或包含所述组合物的疫苗可通过任何途径施用,包括,例如,通过全身或粘膜途径,如下文更详细地描述。

[0106] 在某些实施方案中,人受试者是老年受试者并且疾病是肺炎或侵入性肺炎球菌疾病(IPD)。在某些实施方案中,老年受试者至少50岁。在其他实施方案中,老年受试者至少55岁。在其他实施方案中,老年受试者至少60岁。

[0107] 在其他实施方案中,人受试者是婴儿并且疾病是肺炎、侵入性肺炎球菌疾病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在某些实施方案中,婴儿0-2岁。在其他实施方案中,婴儿2至15个月。

[0108] 在另一个实施方案中,人受试者6周至17岁并且疾病是肺炎、侵入性肺炎球菌疾病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在某些实施方案中,人受试者6周至5岁。在其他实施方案中,人

受试者5至17岁。

[0109] 各疫苗剂量中缀合物的量或混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物的预防有效量可选择为诱发预防作用而无明显有害作用的量。此量可取决于肺炎球菌血清型而变化。一般而言,每剂量可包括约0.1 μg 至约100 μg 的多糖,具体地,约0.1至10 μg ,并且更具体地,约1 μg 至约5 μg 。用于特定疫苗的组分的最佳量可通过标准研究确定,所述标准研究涉及观察受试者体内适当的免疫反应。例如,用于人受试者的疫苗接种的量可以通过外推动物测试结果来确定。此外,可以凭经验确定剂量。

[0110] 在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约1 μg 至约5 μg 的各荚膜多糖;约1 μg 至约30 μg 的TT;约20 μg 至约85 μg 的CRM₁₉₇;以及任选地约0.1mg至约0.5mg的元素铝佐剂。在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2 μg 至约2.5 μg 的各荚膜多糖,除了血清型6B以及任选地血清型3是以约4 μg 至约5 μg 的量存在;约2 μg 至约25 μg 的TT;约40 μg 至约75 μg 的CRM₁₉₇;以及任选地约0.1mg至约0.25mg的元素铝佐剂。

[0111] 在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2.2 μg 的各荚膜多糖,除了血清型6B是以约4.4 μg 的量存在的。

[0112] 在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2 μg 至约2.5 μg 的各荚膜多糖,除了选自由血清型1、3、4、5、6B、9V、19A和19F组成的组的至多六种荚膜多糖各自是以约4 μg 至约5 μg 的量存在的。在一个实施方案中,以约4 μg 至约5 μg 的量存在的至多六种荚膜多糖选自由血清型1、3、4、6B、9V、19A和19F组成的组。在其他实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2.2 μg 的各荚膜多糖,除了选自由血清型1、3、4、5、6B、9V、19A和19F组成的组的至多六种荚膜多糖各自是以存约4.4 μg 的量存在的。在一个实施方案中,以约4.4 μg 的量存在的至多六种荚膜多糖选自由血清型1、3、4、6B、9V、19A和19F组成的组。

[0113] 在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2 μg 至约2.5 μg 的血清型1、5、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、14、15B、18C、22F、23F和33F的荚膜多糖,以及约4 μg 至约5 μg 的血清型3、4、6B、9V、19A和19F的荚膜多糖。

[0114] 在某些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2至约2.5 μg 的血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖,以及约4至约5 μg 的血清型3和6B的荚膜多糖。

[0115] 在一些实施方案中,疫苗或混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以是单一0.5ml剂量,其被配制为包含约2至约2.5 μg 的血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖,以及约4至约5 μg 的血清型6B的荚膜多糖以及约8至约9 μg 的血清型3的荚膜多糖,以及更优选地约8.8 μg 的血清型3的荚膜多糖。

[0116] 在某些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物或包含所述组合物的疫苗还包含氯化钠和琥珀酸钠缓冲液作为赋形剂。

[0117] 在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可配制为液体制剂,其中血清型1和3的肺炎球菌荚膜多糖中的每一种与TT缀合并且来自血清型4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了血清型6B为约4.4 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型1和3)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125至0.250mg的作为佐剂的元素铝(约0.5至约1.2mg磷酸铝);以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。

[0118] 在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可配制为液体制剂,其中血清型1和5的肺炎球菌荚膜多糖中的每一种与TT缀合并且来自血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。在一个实施方案中,每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了血清型6B为约4.4 μ g并且血清型3为约2.2-8.8 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型1和5)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125至0.250mg的元素铝(约0.5至1.2mg磷酸铝)佐剂;以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。在某些实施方案中,血清型3存在约2.2 μ g。在其他实施方案中,血清型3存在约4.4 μ g。在其他实施方案中,血清型3存在约8.8 μ g。在另一个实施方案中,每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了选自由血清型1、3、4、5、6B、9V、19A和19F组成的组的至多六种荚膜多糖为约4.4 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型1和5)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125mg至0.250mg的元素铝(0.5mg至1.2mg磷酸铝)佐剂;以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。在一个实施方案中,约4.4 μ g的至多六种荚膜多糖选自由血清型1、3、4、6B、9V、19A和19F组成的组。在另一个实施方案中,每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了血清型3、4、6B、9V、19A和19F为约4.4 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型1和5)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125mg至0.250mg的元素铝(0.5mg至1.2mg磷酸铝)佐剂;以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。在另一个实施方案中,每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了血清型3和4为约4.4 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型1和5)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125mg至0.250mg的元素铝(0.5mg至1.2mg磷酸铝)佐剂;以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。

[0119] 在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可配制为液体制剂,其中血清型3和5的肺炎球菌荚膜多糖中的每一种与TT缀合并且来自血清型1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合(21价)。每0.5mL剂量可配制包含以下各项的液体:约2.2 μ g的各荚膜多糖,除了6B为约4.4 μ g;约2 μ g至约25 μ g的TT载体蛋白质(只供用于血清型3和5)以及约40 μ g至约75 μ g的CRM₁₉₇载体蛋白质;约0.125至0.250mg的元素铝(约0.5至1.2mg磷酸铝)佐剂;以及作为赋形剂的氯化钠和琥珀酸钠缓冲液。

[0120] 在一些实施方案中,液体制剂可填装至不含防腐剂的单剂量注射器中。震荡之后,液体制剂变成成为备用于肌肉施用的均质的、白色悬浮液的疫苗。

[0121] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以单一注射方式或作为免疫系列的一部

分施用。例如,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以适当隔开的间隔,诸如1、2、3、4、5或6个月的间隔或其组合,来施用2次、3次、4次或更多次。在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物在出生的第一个15个月之内施用给婴儿4次,包括例如,在年龄约2、3、4和12-15个月时;在年龄约3、4、5和12-15个月时;或在年龄约2、4、6和12-15个月时。此首次剂量可以尽早在年龄6周大时施用。在另一个实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物在出生的第一个15个月之内施用给婴儿3次,包括例如,在约2、4和11-12个月时。

[0122] 混合载体、多价肺炎球菌缀合物组合物也可包括来自肺炎链球菌的一种或多种蛋白质。适合包括的肺炎链球菌蛋白质的实例包括国际专利申请W002/083855中鉴定的那些,以及国际专利申请W002/053761中描述的那些。

[0123] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以通过本领域普通技术人员已知的一种或多种施用途径诸如肠胃外、经皮或经粘膜、鼻内、肌内、腹膜内、皮内、静脉内或皮下途径施用给受试者并相应地进行配制。混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可被配制成与其预期施用途径相容。

[0124] 在一些实施方案中,可以通过肌内、腹膜内、皮下、静脉内、动脉内、或经皮注射或呼吸粘膜注射来施用为液体制剂形式的混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物。混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以液体形式或冻干形式配制。在一些实施方案中,可注射组合物以常规形式制备,如液体溶液或悬浮液、适合用于液体的溶液或悬浮液的注射前的固体形式,或乳剂。在一些实施方案中,注射溶液或悬浮液由无菌粉末或颗粒制备。用于通过这些途径施用的药制剂的配制和制造中一般需要考虑的事可以,例如,在Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中找到;其通过引用并入本文。目前口服或鼻喷雾或气雾剂(aerosol)途径(例如,通过吸入)最普遍用来将治疗剂直接递送至肺和呼吸系统。在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物使用递送计量剂量的组合物的装置进行施用。用于递送本文所述的真皮内药物组合物的合适装置包括短针装置,诸如在美国专利号4,886,499、美国专利号5,190,521、美国专利号5,328,483、美国专利号5,527,288、美国专利号4,270,537、美国专利号5,015,235、美国专利号5,141,496、美国专利号5,417,662(所有这些专利均通过引用并入本文)中描述的那些。真皮内组合物还可以通过限制针头有效刺入皮肤内的长度的装置进行施用,诸如通过引用并入本文的W01999/34850中描述的那些,以及其功能等效物。同样合适的是喷射注射装置,其通过液体喷射注射器或通过刺穿角质层并产生到达真皮的喷出物的针将液体疫苗递送至真皮。喷射注射装置描述于例如美国专利号5,480,381、美国专利号5,599,302、美国专利号5,334,144、美国专利号5,993,412、美国专利号5,649,912、美国专利号5,569,189、美国专利号5,704,911、美国专利号5,383,851、美国专利号5,893,397、美国专利号5,466,220、美国专利号5,339,163、美国专利号5,312,335、美国专利号5,503,627、美国专利号5,064,413、美国专利号5,520,639、美国专利号4,596,556、美国专利号4,790,824、美国专利号4,941,880、美国专利号4,940,460、W01997/37705和W01997/13537(所有这些专利均通过引用并入本文)中。同样合适的是弹道粉末/颗粒递送装置,其使用压缩气体来使粉末形式的疫苗加速通过皮肤外层至真皮。此外,古典的芒图(Mantoux)真皮内施用方法可使用常规注射器。

[0125] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、油诸如橄榄油,以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。油的实例包括植物油或动物油、花生油、大豆油、橄榄油、向日葵油、肝油、合成油诸如水产油,以及从牛奶或鸡蛋中获得的脂质。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳剂或悬浮液,包括盐水和缓冲培养基。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏(Ringer's)右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏或不挥发油。静脉内媒介物包括流体和营养素补充剂、电解质补充剂(诸如基于林格氏右旋糖的那些)等等。还可存在防腐剂和其他添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等等。

[0126] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可以单位剂量小瓶、多剂量小瓶或预填充注射器的形式配制。用于液体制剂的药学上可接受的载体包括水性或非水性溶剂、悬浮液、乳液或油。组合物可以是等渗的、高渗的或低渗的。然而,希望用于输液或注射的组合物基本上是等渗的。因此,等渗性或高渗性可有利于组合物的储存。当组合物高渗时,可以在施用前将组合物稀释成等渗性。等渗剂(tonicity agent)可以是离子型等渗剂诸如盐,或非离子型等渗剂诸如碳水化合物。离子型等渗剂包括但不限于氯化钠、氯化钙、氯化钾以及氯化镁。非离子型等渗剂包括但不限于山梨醇和甘油。优选地,包括至少一种药学上可接受的缓冲液。例如,在组合物为输液或注射液时,所述组合物优选在具有pH 4至pH 10(诸如pH 5至pH 9或pH 6至pH 8)的缓冲能力的缓冲液中配制。缓冲液可选自适用于美国药典(USP)的那些。例如,缓冲液可自由以下组成的组:一元酸,诸如乙酸、苯甲酸、葡萄糖酸、甘油酸和乳酸;二元酸,诸如乌头酸、己二酸、抗坏血酸、碳酸、谷氨酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸;多元酸,诸如柠檬酸和磷酸;以及碱,诸如氨、二乙醇胺、甘氨酸、三乙醇胺和TRIS。

[0127] 混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可包含表面活性剂。表面活性剂的实例包括但不限于聚氧乙烯山梨醇酯(通常称为吐温(Tweens)),尤其是,聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80;环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)、环氧丁烷(BO)的共聚物(诸如DOWFAX);具有不同的乙氧基(氧基-1,2-乙烷二基)基团重复的辛苯聚醇(octoxynol),尤其是,辛苯聚醇-9(Triton-100);乙基苯氧基聚乙氧基乙醇(ethylphenoxypolyoxyethanol)(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂诸如卵磷脂;壬基苯酚乙氧醚(nonylphenol ethoxylate)诸如TERGITOL NP系列;月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇、油醇衍生的聚氧乙烯脂肪醚(Brij表面活性剂),尤其是,三乙二醇单月桂基醚(Brij 30);称为SPAN的脱水山梨醇醚(sorbitan ether),尤其是,脱水山梨醇三油酸酯(Span 85)和脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0128] 可以使用表面活性剂的混合物,诸如吐温80/Span 85。聚氧乙烯山梨醇酯诸如吐温80和辛苯聚醇诸如Triton X-100的组合也是合适的。月桂醇聚醚9(Laureth 9)和吐温和/或辛苯聚醇的组合也是有利的。优选地,所包括的聚氧乙烯山梨醇酯(诸如吐温80)的量可以是0.01%至1%(w/v)、0.01%至0.1%(w/v)、0.01%至0.05%(w/v)或约0.02%;所包括的辛基酚聚氧乙醚(octylphenoxy polyoxyethanol)或壬基酚聚氧乙醚(诸如Triton X-100)的量可以是0.001%至0.1%(w/v),尤其是0.005%至0.02%;并且所包括的聚氧乙醚(诸如月桂醇聚醚9)的量可以是0.1%至20%(w/v),可能是0.1%至10%,尤其是0.1%至1%或约0.5%。

[0129] 在一些实施方案中,混合载体、21价肺炎球菌缀合物组合物可通过释放控制系统递送。例如,可以使用静脉内输液、经皮贴片、脂质体或其他途径施用。在一个方面,可以使

用大分子诸如微球体或植入物。

[0130] 以上公开内容概括地说明本发明。参考以下具体实施例可以获得更为全面的理解。这些实施例仅用于举例说明的目的并且不旨在限制本发明的范围。

[0131] 实施例

[0132] 实施例1.肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0133] 肺炎链球菌的培养和荚膜多糖的纯化如本领域技术人员所已知的那样进行。肺炎链球菌血清型获自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)(血清型1:ATCC编号6301;血清型3:ATCC编号6303;血清型4:ATCC编号6304;血清型5:ATCC编号6305;血清型6A:ATCC编号6306;血清型6B:ATCC编号6326;血清型7F:ATCC编号10351;血清型9N:ATCC编号6309;血清型9V:ATCC编号10368;血清型14:ATCC编号6314;血清型18C:ATCC编号10356;血清型19A:ATCC编号10357;血清型19F:ATCC编号6319;血清型23F:ATCC编号6323)。血清型8、10A、11A、12F、15B、22F和33F使用内部菌株(Internal strains),但也可使用任何公开可得的菌株。肺炎链球菌的特征在于荚膜和运动性、革兰氏阳性(Gram-positive)、柳叶刀形双球菌,以及在血液琼脂培养基中为 α 溶血性。血清型通过使用特异性抗血清的抑制(Quelling)测试来鉴定(美国专利号5,847,112)。

[0134] 细胞库的制备

[0135] 产生若干代菌种储备物(seed stocks)以便扩增菌株并去除动物源的组分(F1、F2和F3代)。产生另外的两代菌种储备物。另外的第一代由F3小瓶培养,并且随后的一代由另外的第一代的小瓶进行培养。用合成甘油作为低温保存剂来冷冻(低于 -70°C)保存菌种小瓶。对于细胞库制备,使所有培养物在大豆基培养基中生长。冷冻之前,通过离心浓缩细胞,去除用过的培养基,并将细胞沉淀物重悬于包含低温保存剂(诸如合成甘油)的新鲜培养基中。

[0136] 培养和收获

[0137] 将来自工作细胞库的培养物接种到含有大豆基培养基的菌种瓶中并进行培养。达到目标光密度(吸光度)之后,使用菌种瓶接种含有大豆基培养基的发酵器。当光密度值开始保持固定后终止培养。终止培养之后,向培养物中添加去氧胆酸钠以裂解细胞。将所得的发酵器内含物冷却,并诱导蛋白质沉淀。接着,将混合物离心以移去沉淀的蛋白质和细胞碎片。

[0138] 纯化

[0139] 由离心获得的溶液通过深度过滤器过滤,以移去离心中尚未沉淀的蛋白质和细胞碎片。在100kDa MW膜上浓缩滤液并且用10倍体积的25mM磷酸钠缓冲液(pH 7.2)透析过滤浓缩物以获得样品。将样品过滤以收集悬浮液,由所述悬浮液沉淀和过滤多糖。在30kDa膜上浓缩滤液,并且使用约10倍体积的三次蒸馏水透析过滤浓缩物。进行透析过滤之后,剩余的溶液通过 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器进行过滤。对滤液进行过程中的控制测试(外观、剩余的蛋白质、剩余的核酸、内毒素、分子量和多糖的总量)。对浓缩物进行无菌过滤并且储存于 -20°C 下。

[0140] 实施例2.肺炎链球菌荚膜多糖和载体蛋白质的缀合物的制备

[0141] 不同血清型的多糖按照不同的途径进行活化,然后与载体蛋白质CRM₁₉₇或TT缀合。具体地讲,通过使所有血清型的荚膜多糖中的每一种与CRM₁₉₇缀合并且通过使血清型1、3和5的荚膜多糖中的每一种与TT缀合来制备缀合物。活化过程取决于天然血清型的大小而可

包括将各荚膜多糖的大小减少至目标分子量、化学活化以及通过超过滤进行缓冲液交换(buffer exchange)。缀合物使用超过滤进行纯化并且最终通过 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器进行过滤。过程参数诸如pH、温度、浓度和时间如下。

[0142] (1) 活化过程

[0143] 步骤1:水解

[0144] 还原胺化作用是用于缀合聚合物的已知方法,其中蛋白质的一级胺($-\text{NH}_2$)基团与糖的醛之间形成酰胺键。将醛基添加至肺炎球菌荚膜多糖以促进与载体蛋白质的缀合。单糖的邻位二元醇结构可以通过过碘酸钠(NaIO_4)氧化以形成醛基。来自血清型1、3、4、6A、8、11A、12F、14、15B、18C、22F和33F的荚膜多糖如下进行预处理。

[0145] 在血清型1的情况中,将氢氧化钠(处于 0.05M 的最终碱浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $50\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加盐酸至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0146] 在血清型3、8、11A和15B的情况中,将盐酸(处于 0.01M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $60\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 0.1M 磷酸钠至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0147] 在血清型4的情况中,将盐酸(处于 0.1M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $45\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 1M 磷酸钠至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0148] 在血清型6A的情况中,将冰醋酸(处于 0.1M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $60^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 1M 氢氧化钠至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0149] 在血清型12F的情况中,将盐酸(处于 0.01M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $70^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 0.1M 磷酸钠至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0150] 在血清型14及18C的情况中,将冰醋酸(处于 0.2M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $94\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 1M 磷酸钠以使溶液的最终pH为 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0151] 在血清型22F及33F的情况中,将盐酸(处于 0.01M 的最终酸浓度)添加到荚膜多糖的溶液中,并且在 $60^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育溶液。接着将溶液冷却至约 21°C 至约 25°C 范围内的温度下,并且向其中添加 0.1M 磷酸钠至最终pH 6.0 ± 0.1 ,由此停止水解。

[0152] 将每种所获得的荚膜多糖用注射用水(WFI)、乙酸钠和磷酸钠稀释至介于约 1.0mg/mL 与约 2.0mg/mL 之间的最终浓度。

[0153] 步骤2:过碘酸盐反应

[0154] 用于每种肺炎球菌糖活化的过碘酸钠的摩尔当量基于重复单元摩尔质量进行确定。在充分混合下,所有的血清型都在 21°C 至 25°C 下进行持续16至20小时的氧化反应,除了血清型1、7F和19F以外,其温度为 10°C 或更低。为了帮助维持一致且稳定的缀合物产生,设定缀合过程期间每种血清型的氧化程度(Do)水平范围。表1和表2示出每种血清型的 Do 水平的优选的设定范围。

[0155] 表1. 待与 CRM_{197} 缀合的所有血清型的 Do 范围

血清型	Do 范围	血清型	Do 范围
血清型 1	4 至 10	血清型 11A	1 至 15
血清型 3	2 至 8	血清型 12F	1 至 9
血清型 4	1 至 5	血清型 14	6 至 13
血清型 5	2 至 6	血清型 15B	1 至 17
血清型 6A	5 至 15	血清型 18C	6 至 14
血清型 6B	7 至 13	血清型 19A	7 至 13
血清型 7F	2 至 8	血清型 19F	6 至 12
血清型 8	1 至 17	血清型 22F	1 至 16
血清型 9N	5 至 10	血清型 23F	6 至 14
血清型 9V	4 至 9	血清型 33F	1 至 15
血清型 10A	1 至 12		

[0157] 表2. 待与TT缀合的血清型1、3和5的Do范围

血清型	Do范围
血清型1 (1-TT)	1至15
血清型3 (3-TT)	2至14
血清型5 (5-TT)	1至15

[0159] 步骤3: 超过滤

[0160] 将氧化的糖浓缩并用WFI在100kDa MWC0超滤器(对于血清型1为30kDa超滤器并且对于血清型18C为5kDa超滤器)上进行透析过滤。血清型1的透析过滤使用0.9%氯化钠溶液进行,对于血清型7F和23F为0.01M乙酸钠缓冲液(pH 4.5),并且对于血清型19F为0.01M磷酸钠缓冲液(pH 6.0)。丢弃渗透物并且通过0.2 μ m过滤器过滤渗余物。

[0161] 步骤4: 冷冻干燥

[0162] 对于待通过使用水性溶剂而与载体蛋白质缀合的血清型3、4、5、8、9N、9V、10A、14、15B、22F和33F的荚膜多糖,在不添加更多蔗糖的情况下制备多糖和载体蛋白质的混合溶液、冷冻干燥,然后储存于-25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

[0163] 对于待通过使用水性溶剂而与载体蛋白质缀合的血清型1和18C的荚膜多糖,在不添加更多蔗糖的情况下,独立地制备多糖和载体蛋白质、冷冻干燥,然后储存于-25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

[0164] 对于待通过使用DMSO溶剂而与载体蛋白质缀合的血清型6A、6B、7F、19A、19F和23F的荚膜多糖,将达到5% \pm 3% (w/v)的最终蔗糖浓度的预定量的蔗糖添加到活化的糖中,并且独立地制备样品、冷冻干燥,然后储存于-25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

[0165] 对于血清型11A的荚膜多糖,将达到20% \pm 5% (w/v)的最终蔗糖浓度的预定量的蔗糖添加到活化的糖中,并且独立地制备多糖和载体蛋白质、冷冻干燥,然后储存于-25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

[0166] 对于血清型12F的荚膜多糖,将达到10% \pm 5% (w/v)的最终蔗糖浓度的预定量的蔗糖添加到活化的糖中,并且独立地制备多糖和载体蛋白质、冷冻干燥,然后储存于-25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

[0167] (2) 缀合过程

[0168] 对血清型1、3、4、5、8、9N、9V、10A、14、15B、18C、22F和33F进行水性缀合,并且对血清型6A、6B、7F、11A、12F、19A、19F和23F进行DMSO缀合。每种荚膜多糖以0.2至2:1的比率与载体蛋白质缀合。

[0169] 步骤1:溶解

[0170] 水性缀合

[0171] 对于血清型1、3、4、5、8、9N、9V、10A、14、15B、18C、22F和33F,在室温下解冻并平衡冷冻干燥的样品。针对各血清型设定的比率、在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下、通过使用磷酸钠缓冲液将冷冻干燥的样品重构成反应浓度。

[0172] 二甲亚砜(DMSO)缀合

[0173] 对于血清型6A、6B、7F、11A、12F、19A、19F和23F,将冷冻干燥的样品在室温下解冻、平衡并重构成DMSO中。

[0174] 步骤2:缀合反应

[0175] 水性缀合

[0176] 对于血清型3-TT、4、5、5-TT、8、9N、9V、10A、14、15B、18C、22F和33F,通过添加氰基硼氢化钠溶液(100mg/mL)至每摩尔糖1.0至1.4摩尔的氰基硼氢化钠来起始缀合反应。然而,对于血清型1、1-TT和3,通过添加氰基硼氢化钠溶液至每摩尔糖0.5摩尔的氰基硼氢化钠来起始反应。

[0177] 反应混合物在 23°C 至 37°C 下孵育44至106小时。根据血清型调整反应温度和时间。接着将温度降低至 $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 并且向反应器中添加氯化钠0.9%。添加硼氢化钠溶液(100mg/mL)以实现每摩尔糖1.8至2.2摩尔当量的硼氢化钠。混合物在 $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育3至6小时。此程序减少糖上存在的任何未反应的醛。接着,将混合物用氯化钠0.9%进行稀释并且将稀释的缀合物混合物用0.8或 $0.45\mu\text{m}$ 预过滤器过滤。

[0178] DMSO缀合

[0179] 对于血清型6A、6B、7F、11A、12F、19A、19F和23F的荚膜多糖,通过添加氰基硼氢化钠溶液(100mg/mL)至每一摩尔活化的糖0.8至1.2摩尔当量的氰基硼氢化钠的比率来起始缀合反应。将WFI添加到反应混合物中至1% (v/v)的目标浓度,并且将混合物在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育12至26小时。将100mg/mL的硼氢化钠溶液(通常每摩尔活化的糖1.8至2.2摩尔当量的硼氢化钠)和WFI(目标5% v/v)添加至反应并且将混合物在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育3至6小时。此程序减少糖上存在的任何未反应的醛。接着,将反应混合物用氯化钠0.9%稀释,并且稀释的缀合物混合物用0.8或 $0.45\mu\text{m}$ 预过滤器过滤。

[0180] 步骤3:超过滤

[0181] 将稀释的缀合物混合物浓缩并且用最少15倍体积的0.9%氯化钠或缓冲液,在100kDa MWC0超过滤过滤器或300kDa MWC0超过滤过滤器上进行透析过滤。另外,此过程中使用的组合物和缓冲液的pH取决于每种血清型而变化。

[0182] 步骤4:无菌过滤

[0183] 对超过滤后的渗余物进行无菌过滤($0.2\mu\text{m}$),并且对过滤的缀合物进行过程中的控制(外观、游离蛋白质、游离糖、分子大小分布、无菌、糖含量、蛋白质含量、pH、内毒素、残余氰化物、残余DMSO、糖鉴定、TT鉴定以及CRM₁₉₇鉴定)。将最终浓缩物冷藏并储存于 2°C 至 8°C

°C。

[0184] 实施例3.多价肺炎球菌缀合物疫苗的配制

[0185] 根据批料体积和本体糖浓度计算实施例2获得的最终本体浓缩物的期望体积。在将0.85%氯化钠(生理盐水)、聚山梨醇酯80和琥珀酸盐缓冲液添加到预先标记的制剂容器中之后,添加本体浓缩物。接着将制剂充分混合并且通过0.2 μ m膜进行无菌过滤。在添加本体磷酸铝期间和之后轻轻地混合配制的本体。检查pH并且在需要时调整pH。将配制的本体产物储存于2至8°C。制备下列非限制性多价肺炎球菌缀合物疫苗制剂并且命名为PCV21(1/5)-TT及PCV21(3/5)-TT:

[0186] 通过使血清型1和5的各多糖与TT缀合并且血清型3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的各多糖与CRM₁₉₇缀合来制备包括多糖缀合物的PCV21(1/5)-TT;并且

[0187] 通过使血清型3和5的各多糖与TT缀合并且血清型1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的各多糖与CRM₁₉₇缀合来制备包括多糖缀合物的PCV21(3/5)-TT。

[0188] 总剂量0.5ml的PCV21(1/5)-TT组合物包括2.2 μ g的各多糖,除了血清型6B为4.4 μ g之外;2 μ g至25 μ g的TT(用于血清型1和5)以及40 μ g至75 μ g的CRM₁₉₇;0.125mg的元素铝(0.5mg磷酸铝)佐剂;4.25mg的氯化钠;约295 μ g的琥珀酸盐缓冲液;以及约100 μ g的聚山梨醇酯80,总计0.5ml剂量。在某些实施方案中,PCV21(1/5)-TT组合物中的血清型3多糖的量增加至4.4 μ g或8.8 μ g。在某些实施方案中,PCV21(1/5)-TT组合物中的血清型3、4、6B、9V、19A和19F中的每一个的多糖的量增加至4.4 μ g。

[0189] 总剂量0.5ml的PCV21(3/5)-TT组合物分别包括2 μ g至25 μ g的TT(用于血清型3和5)以及40 μ g至75 μ g CRM₁₉₇,并且其他组分及其含量与PCV21(1/5)-TT的那些完全相同。在某些实施方案中,0.5ml剂量中的元素铝的量增加至0.250mg。

[0190] 实施例4.多价肺炎球菌缀合物疫苗的免疫原性

[0191] 测试实施例3中制备的混合载体、多价肺炎球菌疫苗,PCV21(1/5)-TT和PCV21(3/5)-TT在兔子体内诱发免疫性反应的能力。免疫原性评估通过针对血清IgG浓度的抗原特异性ELISA以及针对抗体功能性的调理吞噬测定(opsonophagocytic assay)(OPA)来进行。在第0周和第2周用每种多糖有比计划的人临床剂量更高5%的剂量(每种多糖2.31 μ g,除了6B为4.62 μ g之外)在制剂中或以人剂量(每种多糖2.2 μ g,除了6B为4.4 μ g之外)肌内免疫新西兰白兔。免疫作用后的每2周对血清取样。两种浓度均显示相同的结果。

[0192] 4-1.PCV21(3/5)-TT

[0193] 血清型特异性IgG浓度测量

[0194] 每种血清型的荚膜多糖(PnPs)以0.5 μ g/孔至1 μ g/孔涂板于96孔平板。从各个受试者取样相等量的血清并且按组别混合。用包含吐温20和获自Statens Serum Institut的肺炎球菌细胞壁多糖(CWPS)(5 μ g/mL)的抗体稀释缓冲液、以2.5倍连续稀释血清池,然后在室温下反应30分钟。用洗涤缓冲液洗涤平板5次,然后预先吸收并且将稀释的血清50 μ l添加到涂板的孔状平板,接着在室温下孵育2小时至18小时。以相同方式洗涤孔状平板,然后向每个孔中添加山羊抗兔IgG-碱性磷酸酶缀合物,接着在室温下孵育2小时。如上所述洗涤平板并且向每个孔中添加作为底物的1mg/mL对硝基苯胺缓冲液,然后在室温下反应2小时。通过

添加50 μ l的3M NaOH将反应淬灭并且测量405nm和690nm的吸光度。可商购获得的13价疫苗(沛儿13)经过相同的程序作为比较例。结果在表3中示出。

[0195] 表3. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的IgG浓度(U/mL)

血清型	沛儿 13	PCV21(3/5)-TT 0.125mg Al	PCV21(3/5)-TT 0.250mg Al
1	16770.4	15320.6	38499.1
3	6603.4	30132.8	32029.7
4	27969.9	51034.4	71638.3
5	5758.6	15627.5	11044.7
6A	9493.7	14205.8	30453.5
6B	8690.6	15023.6	11633.1
7F	60819.7	53696.7	48511.1
8	594.8	58391.9	62852.2
9N	5186.2	208401.8	259323.2
9V	30043.9	38143.9	48677.2
10A	169.8	36437.6	55124.5
11A	184.5	36771.1	45762.9
12F	130.0	22278.5	14475.3

血清型	沛儿 13	PCV21(3/5)-TT 0.125mg Al	PCV21(3/5)-TT 0.250mg Al
14	21906.0	37577.9	64409.8
15B	843.5	22065.2	25248.8
18C	91500.7	88824.7	137638.5
19A	16470.7	13070.9	11387.0
19F	13956.4	40516.9	84553.8
22F	139.7	51649.9	62072.7
23F	12089.4	5772.9	15565.5
33F	143.2	35602.4	46272.8

[0198] 与血清型3和5的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合时所获得的相比,当其与TT缀合时,血清型特异性IgG浓度显著地增高。用PCV21(3/5)-TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)的IgG浓度显著增加。特别地,与沛儿13相比,当血清型9N与0.125mg和0.250mg的铝一起施用,血清特异性IgG浓度分别有出乎意料40倍和50倍的增加。此外,PCV21(3/5)-TT中多种其他的血清型荚膜多糖显示出比沛儿13显著更高的血清特异性IgG浓度水平。

[0199] 功能性免疫原性测试(MOPA)

[0200] 抗体功能通过在MOPA测定中测试血清进行评估。将储存在-70°C或更低温度下的肺炎链球菌MOPA菌株稀释至对应的最终稀释倍数,使得各菌株的浓度为约50,000CFU/mL。从各个受试者取样相等量的血清,按组别混合并且2倍连续稀释,使得20 μ l血清剩余在U底平板中。稀释样品之后,将针对各血清型制备的10 μ l菌株与稀释的样品混合,并且使混合物

在室温下反应30分钟,使得肺炎链球菌和抗体充分混合。添加预先分化的(pre-differentiated)HL-60细胞和补体的混合物并且在CO₂培养箱(37°C)中反应45分钟。降低温度以停止吞噬作用并且将10μl的反应溶液沾至预先干燥30至60分钟的琼脂平板上,然后使其被吸收到平板上20分钟直至干燥。将25mg/mL TTC储备液添加至制备的覆盖琼脂,并且向其中添加对于相应菌株适当的抗体。使混合物充分混合,然后将约25mL的混合物添加到平板上并硬化约30分钟。将完全硬化的平板在CO₂培养箱(37°C)中孵育12至18小时,然后对菌落计数。MOPA效价表示为观察到50%致死时的稀释率。可商购获得的13价疫苗(沛儿13)经过相同的程序作为比较例。结果在表4中示出。

[0201] 表4. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的MOPA效价

血清型	沛儿 13	PCV21(3/5)-TT 0.125mg Al	PCV21(3/5)-TT 0.250mg Al
1	94	72	244
3	829	740	3515
4	2428	2698	2675
5	1169	4154	2735
6A	4925	4567	4761
6B	5693	4959	6629
7F	2731	2095	2103
8	未测试	710	731
9N	未测试	4660	1371
9V	271	280	254
10A	未测试	952	935
11A	未测试	743	1053
12F	未测试	846	737
14	1917	2119	2170
15B	未测试	713	849
18C	5347	2620	4546
19A	5760	2464	2253
19F	2059	2071	2137
22F	未测试	6022	7783
23F	1975	1487	1566
33F	未测试	824	1924

[0203] 与血清型3和5与CRM₁₉₇缀合时所获得的MOPA效价相比,其与TT缀合时的功能性MOPA效价显著增加。用PCV21(3/5)-TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)中的每一个的功能性MOPA效价显著增加。

[0204] 4-2.PCV21(1/5)-TT

[0205] 血清型特异性IgG浓度和功能性免疫原性效价以与4-1中相同的方式测量,并且结果示出如下。测试三种不同的PCV21(1/5)-TT实施方案:一种具有来自血清型3的荚膜多糖2.2μg(“3-CRM₁₉₇ 2.2”)、一种具有来自血清型3的荚膜多糖4.4μg(“3-CRM₁₉₇ 4.4”)并且一

种具有来自血清型3的荚膜多糖8.8 μ g (“3-CRM₁₉₇ 8.8”)。

[0206] 血清型特异性IgG浓度测量

[0207] 表5. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的IgG浓度 (U/mL)

血清型	沛儿 13	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 8.8
1	5105.5	33530.6	96552.2	44714.9
3	6303.0	7827.2	14676.2	13239.6
4	46727.3	58893.8	54382.8	39691.0
5	6873.9	14918.4	18743.2	11499.5
6A	32561.4	11493.2	13053.0	12494.6
6B	25398.7	11856.7	10013.2	4455.6
7F	27560.5	25799.0	70917.5	56448.2
8	521.0	70060.4	86634.8	63337.9
9N	5198.2	169584.3	240858.5	187203.6
9V	62169.3	42445.1	64084.4	34876.4
10A	166.4	25682.8	44186.9	15827.4
11A	195.3	34050.4	42558.8	33264.2
12F	154.4	27629.4	38459.7	25874.3
14	17765.9	23787.4	29262.4	24116.4
15B	436.0	22060.6	21777.0	22573.1
18C	103154.7	119672.1	141889.4	75549.1
19A	19191.1	4690.5	5516.9	3407.3
19F	16349.2	31789.8	24370.0	18846.2
22F	130.0	40963.1	49475.5	36246.2
23F	15166.5	6312.7	7499.9	5431.5
33F	146.1	39803.9	38378.5	26837.2

[0209] 与血清型1和5的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合时所获得的相比,当其于TT缀合时,血清型特异性IgG浓度显著地增高。用PCV21(1/5)-TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)的IgG浓度显著增加。同样,与沛儿13相比,血清型9N出乎意料地显示出显著增高(约32至46倍的增高)。此外,PCV21(1/5)-TT中一些其他的血清型荚膜多糖显示出比沛儿13显著更高的血清特异性IgG浓度水平。还观察到血清型3抗原的量从2.2 μ g加倍至4.4 μ g出乎意料地使血清型1、3、5、6A、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、22F和23F的血清特异性IgG浓度增高,并且血清型1和7F的增高超过2倍。

[0210] 功能性免疫原性测试(MOPA)

[0211] 表6. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的MOPA效价

血清型	沛儿13	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 8.8
1	99	198	916	241
3	479	565	1072	929
4	2560	3201	2571	2012
5	1046	3717	5430	2025
6A	5624	2708	5249	2415
6B	5451	3903	4143	2452
7F	2355	2521	2576	2125
8	未测试	525	719	630
9N	54	790	1680	885
9V	282	251	307	183
10A	未测试	684	1065	760
11A	未测试	887	1751	747
12F	未测试	856	1016	824
14	1052	1221	1929	1513
15B	59	1042	823	732
18C	6257	4440	4663	2821
19A	2962	828	1362	686
19F	968	1971	1835	1453
22F	未测	3576	5599	7193

[0212]

血清型	沛儿13	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 8.8
	试			
23F	1854	769	1358	1050
33F	未测试	932	1982	808

[0213]

[0214] 与血清型1和5与CRM₁₉₇缀合时所获得的MOPA效价相比,其与TT缀合时的功能性MOPA效价显著增加。用PCV21(1/5)-TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)中的每一个的功能性MOPA效价显著增加。此外,若干其他的血清型显示出比沛儿13显著更高的功能性MOPA效价水平。还观察到血清型3抗原的量从2.2 μ g加倍至4.4 μ g出乎意料地使血清型4、15B和19F以外的各血清型的血清特异性IgG浓度增高,并且血清型1的增高超过4.5倍。

[0215] 4-3.PCV21(1/5)-TT

[0216] 用具有来自血清型3的荚膜多糖 $2.2\mu\text{g}$ (“3-CRM₁₉₇ 2.2”)的PCV21 (1/5) -TT实施方案、具有来自血清型3的荚膜多糖 $4.4\mu\text{g}$ (“3-CRM₁₉₇ 4.4”)的PCV21 (1/5) -TT实施方案,以及具有来自血清型3、4、6B、9V、19A和19F的荚膜多糖 $4.4\mu\text{g}$ (“多-CRM₁₉₇ 4.4”)的PCV21 (1/5) -TT实施方案重复4-2的实验。血清型特异性IgG浓度和功能免疫原性效价以与4-1中相同的方式测量,并且结果示出如下。

[0217] 血清型特异性IgG浓度测量

[0218] 表7. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的IgG浓度 (U/mL)

[0219]

血清型	沛儿 13	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5)-TT 多-CRM ₁₉₇ 4.4
1	14208.3	34503.1	49226.1	40684.4
3	6575.6	6634.1	13769.4	10841.3
4	16600.3	33352.0	43605.9	34387.8
5	5079.3	10847.5	20866.2	13405.1

[0220]

血清型	沛儿 13	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5)-TT 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5)-TT 多-CRM ₁₉₇ 4.4
6A	8965.5	2607.1	13781.5	9194.9
6B	5105.2	1233.5	9225.5	2428.9
7F	59993.0	27961.7	57039.5	33913.6
8	274.7	56735.3	72822.9	65528.5
9N	3824.7	140424.7	181325.9	142736.9
9V	39503.5	29139.3	61759.9	48711.5
10A	130.0	8017.0	14061.8	15832.8
11A	163.9	33051.7	51222.1	39311.8
12F	130.0	18160.9	22634.9	14877.6
14	12312.4	12868.7	15953.4	8538.5
15B	280.6	14339.7	22347.7	22692.0
18C	62963.5	56059.2	141911.5	70910.8
19A	9807.5	1185.7	4233.4	2649.2
19F	9838.7	9825.8	21175.9	10889.9
22F	130.0	20120.0	37833.7	21807.5
23F	5835.1	2084.1	4016.2	3152.3
33F	141.4	22732.6	19748.9	19179.6

[0221] 与4-2中一样,与血清型1和5的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合时所获得的相比,其与TT缀合时的血清型特异性IgG浓度显著地增高。用PCV21 (1/5) -TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)的IgG浓度显著增加,并且血清型4的荚膜多糖显示出比沛儿13显著更高的血清特异性IgG浓度水平。还观察到血清型3抗原的量从 $2.2\mu\text{g}$ 加倍至 $4.4\mu\text{g}$ 出乎意料地使除了三个以外的所有血清型的血清特异性IgG浓度增高。还可以使用更高剂量的多血清型,如PCV21 (1/5) -TT实施方案所示,其中血清型3、4、6B、9V、19A和19F的量从 $2.2\mu\text{g}$ 增加到 $4.4\mu\text{g}$ (“多-CRM₁₉₇ 4.4”)。

[0222] 功能性免疫原性测试 (MOPA)

[0223] 表8. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的MOPA效价

血清型	沛儿 13	PCV21(1/5-TT) 3-CRM ₁₉₇ 2.2	PCV21(1/5-TT) 3-CRM ₁₉₇ 4.4	PCV21(1/5-TT) 多-CRM ₁₉₇ 4.4
1	109	236	276	255
3	740	514	836	768
4	2272	2522	2216	2376
5	3638	12393	18293	2559
6A	4949	2187	3607	2401
6B	4915	767	5196	1555
7F	2414	2014	2227	1781
8	未测试	582	694	690
9N	84	937	1252	983
9V	295	474	419	290
10A	未测试	566	737	674
11A	未测试	801	1666	1878
12F	未测试	600	1008	1298
14	1659	1503	1200	959
15B	79	902	1459	1794
18C	2933	2594	4095	2968
19A	3910	957	1244	751
19F	1570	908	2175	1453
22F	未测试	2268	7833	3516
23F	1956	677	786	709
33F	未测试	1021	1115	736

[0226] 与4-2中一样,与血清型1和5与CRM₁₉₇缀合时所获得的功能性免疫原性相比,其与TT缀合时的功能性免疫原性获得改良。用PCV21 (1/5) -TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在、与CRM₁₉₇缀合的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)中的每一个的功能性MOPA效价显著增加。还可以使用更高剂量的多血清型,如PCV21 (1/5) -TT多-CRM₁₉₇ 4.4所示,其中血清型3、4、6B、9V、19A和19F的量从2.2 μ g增加到4.4 μ g。

[0227] 4-4.PCV21 (1/5) -TT

[0228] 用具有来自血清型3和4的荚膜多糖4.4 μ g (“3,4-CRM₁₉₇ 4.4”)的PCV21 (1/5) -TT实施方案重复4-2的实验。血清型特异性IgG浓度和功能免疫原性效价以与4-1中相同的方式测量,并且结果示出如下。

[0229] 血清型特异性IgG浓度测量

[0230] 表9. 3,4-CRM₁₉₇ 4.4的21种血清型在二次免疫作用2周之后的IgG浓度 (U/mL)

血清型	沛儿 13	PCV21 (1,5-TT) 3,4-CRM ₁₉₇ 4.4
1	2512.6	11687.9
3	6160.3	16537.5
4	13018.1	23834.9
5	7738.6	35815.1
6A	13701.1	6476.3
6B	2290.0	881.1
7F	22885.1	25523.5
8	170.1	19027.5
9N	971.4	35064.1
[0231] 9V	13803.2	18139.3
10A	130.0	7028.4
11A	165.6	10215.7
12F	130.0	3770.0
14	3333.0	4977.4
15B	203.2	8956.5
18C	28120.5	21748.1
19A	18587.6	6785.8
19F	29732.6	34497.2
22F	130.0	21193.6
23F	3962.9	1791.5
33F	130.0	13194.5

[0232] 与血清型1和5的荚膜多糖与CRM₁₉₇缀合时所获得的相比,其与TT缀合时的血清型特异性IgG浓度显著地增高。用PCV21 (1/5) -TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)的IgG浓度显著增加。还观察到血清型3和血清型4抗原的量从2.2 μ g加倍到4.4 μ g显示出比沛儿13显著更高的血清特异性IgG浓度水平。还可以使用更高剂量的多血清型,如PCV21 (1/5) -TT实施方案所示,其中血清型3和4的量从2.2 μ g增加到4.4 μ g (“3,4-CRM₁₉₇ 4.4”)。

[0233] 功能性免疫原性测试 (MOPA)

[0234] 表10. 21种血清型在二次免疫作用2周之后的MOPA效价

血清型	沛儿 13	PCV21 (1,5-TT) 3,4-CRM ₁₉₇ 4.4
1	54	455
3	393	968
4	2072	3331
5	306	1621
6A	2355	1315
6B	1614	1410
7F	952	981
8	5	986
9N	52	2072
[0235] 9V	324	479
10A	2	427
11A	4	1103
12F	2	266
14	539	969
15B	5	255
18C	1996	1392
19A	1870	774
19F	1516	1352
22F	2	1796
23F	928	496
33F	2	292

[0236] 与血清型1和5与CRM₁₉₇缀合时所获得的功能性免疫原性相比,其与TT缀合时的功能性免疫原性获得改良。用PCV21 (1/5) - TT免疫的兔子还表现出对沛儿13中不存在、与CRM₁₉₇缀合的八种另外的血清型(即,8、9N、10A、11A、12F、15B、22F和33F)中的每一个的功能性MOPA效价显著增加。还可以使用更高剂量的多血清型,如PCV21 (1/5) - TT 3,4-CRM₁₉₇ 4.4所示,其中血清型3和4的量从2.2 μ g增加到4.4 μ g。

[0237] 实施例5.关于来自肺炎链球菌血清型9N的糖-蛋白质缀合物的制备的另外细节

[0238] 细胞库的制备

[0239] 肺炎链球菌血清型9N(ATCC 6309)从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。为了菌株增殖并去除动物源的组分,培养若干代菌种储备物。储备物小瓶和作为低温保存剂的合成甘油一起保存于冷冻机中(<-70°C)。对于细胞库的制备,使细胞培养物在大豆基培养基中增殖。冷冻之前,通过离心浓缩细胞,并且,在去除用过的培养基之后,将细胞沉淀物重悬于含有低温保存剂(例如合成甘油)的新鲜培养基中。

[0240] 发酵

[0241] 将来自细胞库的培养物接种到含有大豆基培养基的菌种瓶中。在没有搅拌的情况下恒温孵育培养物,直到满足生长条件。使用菌种瓶将培养物接种到含有大豆基培养基的菌种发酵器中,并且控制温度、pH和搅拌速度。生长停止或到达发酵器的工作容量后终止发酵。通过添加去活化剂终止发酵之后,使用连续流离心法和过滤的组合除去细胞碎片。

[0242] 纯化

[0243] 肺炎球菌多糖纯化过程由多层过滤、重复浓缩/透析过滤和过滤/洗脱组成。

[0244] 活化

[0245] 通过依序添加计算量的WFI将最终多糖浓度调整至约2.0g/L。如果需要,将反应pH调整至大约6.0。在调整pH之后,将反应温度调整至21-25°C。每1mg糖添加大约0.024-0.189mg的过碘酸钠以起始氧化。氧化反应在21-25°C下进行16-20小时。

[0246] 活化多糖使用100-kDa MWC0超过滤膜进行浓缩和透析过滤。透析过滤以透析过滤体积的10倍体积的WFI进行。接着,将纯化的活化多糖储存在2-8°C下。纯化的活化糖的特征在于(i)通过比色测定确定的糖浓度,(ii)通过比色测定确定的醛浓度,(iii)氧化的程度,以及(iv)通过SEC-MALLS测得的分子量。

[0247] SEC-MALLS用于确定多糖和多糖-蛋白质缀合物的分子量。SEC用于根据流体力学体积分离多糖。折射率(RI)检测器和多角度激光散射(MALLS)检测器用于确定分子量。当光与物质反应时,光被散射。散射光的量与浓度、 dn/dc 的平方(比折射率增量)和物质的摩尔质量相关。分子量基于来自MALLS检测器的散射光的信号和来自RI检测器的浓度信号进行计算。

[0248] 活化多糖的氧化程度(DO)作为糖重复单元的摩尔数除以醛的摩尔数进行确定。糖重复单元的摩尔数通过多种比色技术确定,例如使用蒽酮测定。并且,醛的摩尔数通过帕克-杰克森(Park-Johnson)比色测定进行确定。

[0249] 使用以上所述的这些技术,确定通过上述方法获得的活化的肺炎链球菌血清型9N荚膜多糖具有2-19的氧化程度,更通常为5-10的氧化程度,以及约200-700kDa的分子量。

[0250] 缀合

[0251] 以每1g活化多糖0.5-2g的CRM₁₉₇的比率,将活化多糖与载体蛋白质CRM₁₉₇共混。接着,将共混的混合物冷冻干燥。将活化多糖与CRM₁₉₇的冷冻干燥混合物储存在-20°C下。

[0252] 将活化多糖和CRM₁₉₇的冷冻干燥混合物在0.1M磷酸钠溶液中重构,然后充分混合。反应溶液中的最终多糖浓度为约10-20g/L。通过将1.0-1.2摩尔当量的氰基硼氢化钠(NaBH₃CN)添加到反应混合物中而起始缀合之后,反应在35-39°C下进行44-52小时。通过添加与缀合反应溶液相同体积的0.9%氯化钠溶液而终止缀合反应,然后添加1.8-2.2摩尔当量的硼氢化钠(NaBH₄)以将未反应的醛封端。封端反应在21-25°C下进行3-6小时。

[0253] 用0.9%氯化钠溶液稀释缀合物溶液,以用于使用100-kDa MWC0膜进行浓缩和透析过滤。稀释的缀合物溶液通过0.8-0.45 μ m过滤器进行过滤并且通过浓缩和透析过滤进行纯化。使用100-kDa MWC0膜的透析过滤使用15-40倍透析过滤体积的0.9%氯化钠溶液进行。在完成透析过滤之后,通过0.2 μ m过滤器来过滤剩余溶液。将缀合物溶液稀释至低于大约0.55mg/mL的浓度,无菌过滤并且然后储存于2-8°C。

[0254] 纯化的血清型9N缀合物特别地特征在于(i)通过比色(洛瑞(Lowry))测定确定的蛋白质浓度,(ii)通过比色测定确定的醛浓度,(iii)糖对蛋白质比率,(iv)通过尺寸排阻层析(CL-4B)确定的分子大小分布,以及(v)通过SEC-MALLS测得的分子量。

[0255] 改变氧化程度(DO)时,观察到血清型9N缀合物的特征变化。结果总结于表11中。

[0256] 表11

缀合物编号	1	2	3	4	5	6
活化多糖的分子量, kDa	582	619	459	563	490	427
DO	18.2	9.4	7.4	6.7	4.3	2.3
投入比率(P:S)	0.8:1					
缀合反应溶液中的多糖浓度, g/L	20.0					
缀合物产率%	53	43	39	32	33	39
糖对蛋白质比率	2.1	1.5	1.3	1.1	1.0	0.78
游离糖%	44	28	22	20	21	31
分子量分布%	52	49	50	55	44	31
缀合物分子量, kDa	860	1,110	1,912	1,168	1,189	1,160

[0257] 改变冷冻干燥期间活化多糖与CRM₁₉₇的共混比率时,观察到血清型9N缀合物的特征变化。结果总结于表12中。

[0258] 表12

缀合物编号	7	8	9	10	11
活化多糖的分子量, kDa	287				
DO	5.6				
投入比率(P:S)	2:1	1.5:1	1:1	0.67:1	0.5:1
缀合反应溶液中的多糖浓度, g/L	20.0				
缀合物产率%	25	50	43	41	66
糖对蛋白质比率	0.71	0.85	1.0	1.2	1.8
游离糖%	5	6	15	27	62
分子量分布%	52	58	50	40	22
缀合物分子量, kDa	3,720	3,713	1,327	1,016	545

[0260] 改变缀合反应溶液中的多糖浓度时,观察到血清型9N缀合物的特征变化。结果总结于表13中。

[0261] 表13

缀合物编号	12	13	14	15	16
活化多糖的分子量, kDa	560				
DO	6.1				
投入比率(P:S)	0.8:1				
[02663] 缀合反应溶液中的多糖 浓度, g/L	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
缀合物产率%	20	31	28	40	42
糖对蛋白质比率	1.0	1.0	0.93	0.99	0.97
游离糖%	32	30	22	21	18
分子量分布%	17	27	40	47	54
缀合物分子量, kDa	560	546	845	932	1,438

[0264] 实施例6. 免疫原性的分析

[0265] 配制含有与CRM₁₉₇缀合的肺炎链球菌血清型9N糖-蛋白质缀合物的单价缀合物组合物。

[0266] 表11-13的单价免疫原性组合物的免疫原性通过ELISA进行分析。确定血清型特异性IgG的血清浓度。

[0267] 五只称重2.5-3.5kg的雌性纽西兰白兔在第0周时用建议的人临床剂量(缀合物2.2 μ g; +0.25mg/mL铝, 如AlPO₄) 经由肌肉途径进行免疫。在第2周时再次用相同剂量的缀合物疫苗对兔子进行免疫并在第4周取血液样品。在第0周和第4周进行血清样品的血清型特异性ELISA。

[0268] 表14示出分析结果。用单价缀合物组合物(缀合物编号8) 免疫的兔子显示出对于血清型9N的总IgG效价显著增加。用其他缀合物免疫的兔子也显示出总IgG效价显著增加。

[0269] 表14示出用表12的缀合物编号8免疫兔子之后测量IgG浓度的结果。

[0270] 表14

血清型	IgG 浓度(U/mL)	
	免疫前	免疫后
9N	130.0	656,345.3

[0272] 虽然本说明书中已经描述了一个或多个示例性实施方案, 但是本领域普通技术人员应了解, 在形式和细节上可做出各种变化而不偏离如下列权利要求所限定的本发明概念的精神和范围。

[0273] 参考文献

[0274] 下列参考文献在本申请中引用并且提供关于本技术领域的一般信息并且提供本申请中讨论的测定和其他细节。下列参考文献通过引用整体并入本文。

[0275] [1] Prymula et al., The Lancet, 367:740-48 (2006) .

[0276] [2] Vesikari et al., PIDJ, 28(4) :S66-76 (2009) .

[0277] [3] Dagan et al., Infection&Immunity, 5383-91 (2004) .

- [0278] [4] Juergens et al., Clinical and Vaccine Immunology, 21(9):1277-1281 (2014).
- [0279] [5] Andrews et al., The Lancet, 14:839-846 (2014).
- [0280] [6] Nurkka et al., Vaccine, 20:194-201 (2001).
- [0281] [7] Levin and Stone, J. Immunol., 67:235-242 (1951).
- [0282] [8] W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev. I.)
- [0283] [9] Didierlaurent et al., J. Immunol., 183:6186-6197 (2009).