(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116898959 A
(43)申请公布日 2023.10.20

(21)申请号 202311046367.2
(22)申请日 2018.09.04
(30)优先权数据
62/555,451 2017.09.07 US
(62)分案原申请数据
201880058174.X 2018.09.04
(71)申请人 默沙东有限责任公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 R·J·波拉姆博
C·阿拜古纳瓦达纳 L·K·穆塞
M·J·科辛斯基 Y·A·崔
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 王北南
(51)Int.Cl.
A61K 39/09(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)
A61K 47/02(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)

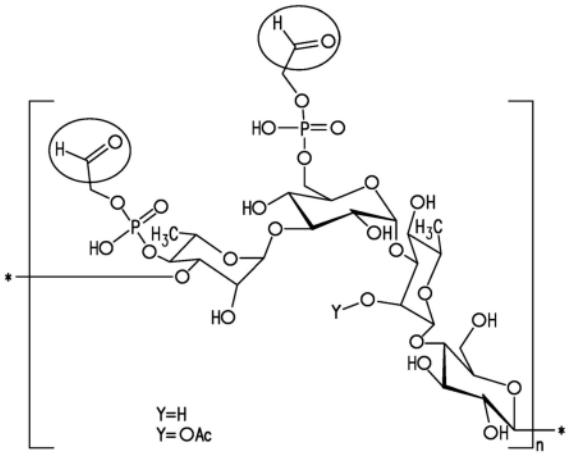
权利要求书2页 说明书26页 附图13页

(54)发明名称

肺炎球菌多糖及其在免疫原性多糖-载体蛋白缀合物中的用途

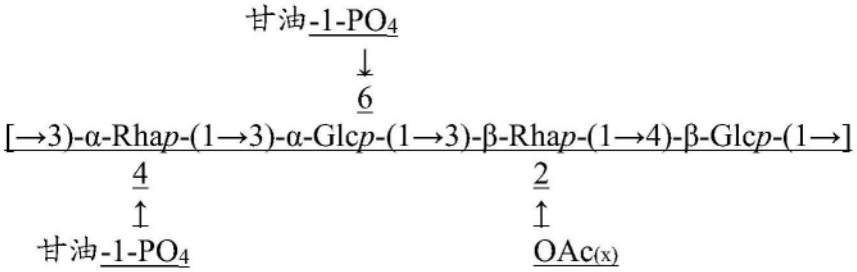
(57)摘要

本发明提供了使用NMR鉴定的来自肺炎链球菌血清型的荚膜多糖。本发明还提供了多糖-蛋白缀合物,其中来自一种或多种这些血清型的荚膜多糖缀合至载体蛋白,例如CRM197。来自一种或多种这些血清型的多糖-蛋白缀合物可被包含在具有来自多种另外的肺炎链球菌血清型的多糖的多价肺炎球菌缀合物疫苗中。



CN 116898959 A

1.一种免疫原性组合物,其包含多糖-载体蛋白缀合物和药学上可接受的载体,其中所述多糖-载体蛋白缀合物的多糖包含以下结构的重复单元:



其中x表示0至1.0的摩尔比;其中所述载体蛋白是CRM197;其中所述多糖-载体蛋白缀合物具有1,000kDa至10,000kDa的分子量;并且进一步地其中所述多糖-载体蛋白缀合物具有0.5至2.0的多糖与载体蛋白重量比率。

2.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其还包含一种或多种另外的多糖-载体蛋白缀合物,其中每种缀合物包含与CRM197缀合的特定肺炎链球菌的血清型的多糖,其中所述肺炎链球菌的血清型选自1,2,3,4,5,6A,6B,6C,6D,7B,7C,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15A,15B,15C,17F,18C,19A,19F,20,21,22A,22F,23A,23B,23F,24F,27,28A,31,33F,34,35A,35B,35F和38。

3.根据权利要求2所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物被配制为包含:0.4至4μg/mL的每种存在的多糖,除了血清型6B多糖,如果存在,包含0.8至8μg/mL的多糖;和量为多糖总量的约0.5倍至3倍的CRM197载体蛋白。

4.根据权利要求3所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物被配制为进一步包含150mM氯化钠,20mM L-组氨酸缓冲液,和0.05至2%w/v表面活性剂。

5.根据权利要求4所述的免疫原性组合物,其还包含佐剂。

6.根据权利要求5所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂是铝基佐剂。

7.根据权利要求6所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

8.根据权利要求7所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂是磷酸铝。

9.根据权利要求8所述的免疫原性组合物,其中磷酸铝佐剂以0.05至0.5mg/mL的浓度存在。

10.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中x为0.5至1.0。

11.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中x为0.7至1.0。

12.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述载体蛋白通过甘油-1-PO_4糖的碳2位与所述多糖缀合。

13.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述缀合物的缀合度为3至13之间。

14.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述多糖具有在50kDa和1,000kDa之间的分子量。

15.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述多糖具有在100kDa和300kDa之间的分子量。

16.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述多糖-载体蛋白缀合物具有0.5至1.5的多糖与载体蛋白重量比率。

17.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述多糖-载体蛋白缀合物具有0.8至1.2的多糖与载体蛋白重量比率。

18.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中与多糖的总量相比,所述免疫原性组合物包含少于约25%的非共价关联的多糖。

19.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中与多糖的总量相比,所述免疫原性组合物包含少于约15%的非共价关联的多糖。

20.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中x为0.7至1.0;其中所述载体蛋白通过甘油-1-PO_4糖的碳2位与所述多糖缀合;其中所述缀合物的缀合度为3至13之间;其中所述多糖具有在100kDa和300kDa之间的分子量;其中多糖与载体蛋白在所述缀合物中的重量比率为0.5至1.5;并且其中与多糖的总量相比,所述多糖-载体蛋白缀合物包含少于约15%的非共价关联的多糖。

肺炎球菌多糖及其在免疫原性多糖-载体蛋白缀合物中的用途

[0001] 本申请是申请号为201880058174.X、申请日为2018年9月4日、名称为“肺炎球菌多糖及其在免疫原性多糖-载体蛋白缀合物中的用途”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供了来自肺炎链球菌血清型16F的纯化的荚膜多糖,以及具有来自该血清型的多糖的多糖-蛋白缀合物。来自该血清型的多糖-蛋白缀合物可以包含在多价肺炎球菌缀合物疫苗中。

背景技术

[0003] 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)是一种荚膜细菌,并且是全世界严重疾病的重要原因。1997年,美国疾病控制与预防中心(CDC)估计,美国每年有3,000例肺炎球菌脑膜炎、50,000例肺炎球菌菌血症、7,000,000例肺炎球菌中耳炎和500,000例肺炎球菌性肺炎。参见Centers for Disease Control and Prevention,MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997,46(RR-8):1-13。此外,这些疾病的并发症可能很严重,一些研究报道,肺炎球菌脑膜炎的死亡率高达8%,神经系统后遗症高达25%。参见Arditi等,1998,Pediatrics 102:1087-97。

[0004] 事实证明,已获许可多年的多价肺炎球菌多糖疫苗在预防成年人,尤其是老年人和高危人群的肺炎球菌疾病方面具有不可估量的价值。然而,婴幼儿对未缀合的肺炎球菌多糖反应较差。细菌多糖是不依赖T细胞的免疫原,在婴儿中引起微弱反应或无反应。细菌多糖免疫原与载体蛋白的化学缀合可将婴儿的免疫应答转化为一种依赖T细胞的免疫应答。白喉类毒素(DTx,DT的化学去毒版本)和CRM_{197}被描述为细菌多糖免疫原的载体蛋白,因为它们的氨基酸序列中存在刺激T细胞的表位。

[0005] 肺炎球菌缀合物疫苗Prevnar®于2000年2月首次在美国获得许可,其含有当时在婴幼儿中引起侵袭性肺炎球菌疾病的7种最常见的血清型(4,6B,9V,14,18C,19F和23F)。在美国普遍使用Prevnar®后,由于Prevnar®中存在的血清型,儿童的侵袭性肺炎球菌疾病已显著减少。参见Centers for Disease Control and Prevention,MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005,54(36):893-7。但是,在世界某些地区,Prevnar®的血清型覆盖受限,并且在美国存在某些新兴血清型的证据(例如19A等)。参见O’Brien等,2004,Am J Epidemiol159:634-44;Whitney等,2003,N Engl J Med 348:1737-46;Kyaw等,2006,N Engl J Med 354:1455-63;Hicks等,2007,J Infect Dis196:1346-54;Traore等,2009,Clin Infect Dis 48:S181-S189。

[0006] Prevnar13®是一种13价肺炎球菌多糖-蛋白缀合物疫苗,包括血清型1,3,4,5,6A,6B,7F,9V,14,18C,19A,19F和23F。参见例如,美国专利申请公开号US2006/0228380 A1、Prymula等,2006,Lancet 367:740-48和Kieninger等,Safety and Immunologic Non-

inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers,presented at the 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC,October25-28,2008。还参见Dagan等,1998,Infect Immun.66:2093-2098和Fattom,1999,Vaccine 17:126。

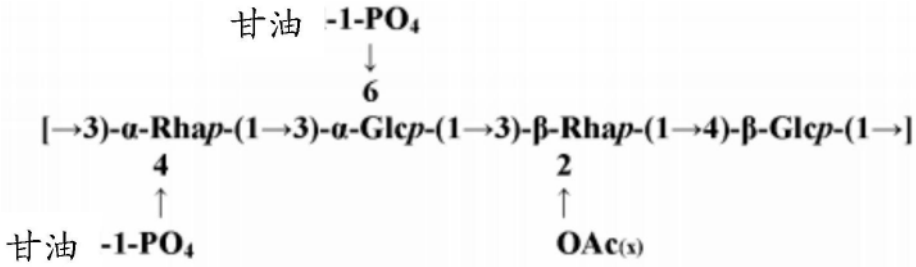
[0007] 根据荚膜多糖的结构,肺炎链球菌已分类为90多种血清型。Geno,2015,Clinical Microbiology Reviews 28:871-899中提供了已知的肺炎球菌荚膜多糖结构的列表。

[0008] 当前的多价肺炎球菌缀合物疫苗已经有效地减少了与疫苗中存在的那些血清型有关的肺炎球菌疾病的发病率。然而,表达疫苗中不存在的血清型的肺炎球菌的流行率正在增加。因此,需要鉴定并表征新兴的肺炎球菌血清型以包含在未来的疫苗中。

发明内容

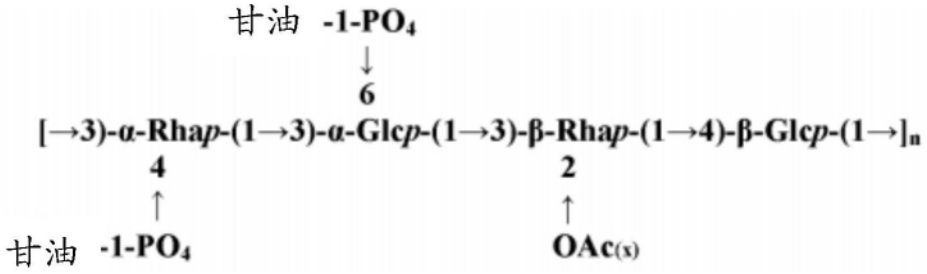
[0009] 本发明提供了来自肺炎链球菌血清型16F的纯化的荚膜多糖,和具有该血清型的多糖蛋白缀合物。本发明部分基于来自该血清型的荚膜多糖的结构鉴定。

[0010] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了具有以下重复单元的多糖:

[0011] 

[0012] 其中x表示0.0至1.0的摩尔比。

[0013] 来自肺炎链球菌血清型16F的多糖可以表示为

[0014] 

[0015] 其中n表示重复单元的数量。

[0016] 在某些实施方式中,多糖具有10至5,000个重复单元。在某些方面,多糖具有50至4,500,150至4,500或150至2,000个重复单元。

[0017] 在某些实施方式中,多糖的分子量为50kDa至4,000kDa。在某些方面,多糖的分子量为100kDa至3,500kDa,或100kDa至1,500kDa。

[0018] 在某些实施方式中,肺炎链球菌血清型16F多糖中O-乙酰基与血清型16F重复单元的摩尔比为0.0至1.0,例如至少任何0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9至1.0。

[0019] 本发明还提供了由以上任何实施方式产生的活化多糖,其中所述多糖用化学试剂活化以产生用于缀合至接头或载体蛋白的反应性基团。在某些实施方式中,活化发生在一

个或多个甘油-1-PO_4糖上。在某些实施方式中，多糖用高碘酸盐活化。在该实施方式的某些方面，活化发生在甘油-1-PO_4糖两者之一或两者的碳2位上。

[0020] 本发明还提供了多糖-蛋白缀合物，其中如上所述的多糖或活化多糖缀合至载体蛋白。在某些方面，载体蛋白选自CRM197，白喉毒素片段B(DTFB)，DTFB C8，白喉类毒素(DT)，破伤风类毒素(TT)，TT片段C，百日咳类毒素，霍乱类毒素，大肠杆菌LT，大肠杆菌ST和铜绿假单胞菌的外毒素A。在一个特定方面，载体蛋白是CRM197。

[0021] 在某些方面，在水性条件下或在非质子溶剂例如二甲基亚砜(DMSO)中，使用还原胺化化学方法制备多糖-蛋白缀合物。在一个特定的方面，在DMSO中使用还原胺化化学方法来制备多糖-蛋白缀合物。

[0022] 在一个实施方式中，本发明提供了一种多价免疫原性组合物，其包含来自肺炎链球菌血清型16F的未缀合的多糖或多糖-蛋白缀合物和来自一种或多种以下肺炎链球菌血清型的未缀合的多糖或多糖-蛋白缀合物：1，2，3，4，5，6A，6B，6C，6D，7B，7C，7F，8，9N，9V，10A，11A，12F，14，15A，15B，15C，17F，18B，18C，19A，19F，20，21，22A，22F，23A，23B，23F，24F，24B，27，28A，31，33F，34，35A，35B，35F和38。在一个子实施方式中，多价免疫原性组合物包含未缀合的多糖或多糖-载体蛋白缀合物，但不包含两者。在一个子实施方式中，多价免疫原性组合物包含未缀合的多糖或多糖-载体蛋白缀合物的混合物。在某些实施方式中，本发明的多价免疫原性组合物具有至多4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90种血清型。

附图说明

[0023] 图1描绘了肺炎链球菌血清型16F多糖的重复单元结构的图示。高碘酸盐的活化位点显示在椭圆形中。对于活化多糖，并非所有重复单元的活化位点都被活化。这反映了甘油-1-PO_4糖的碳2位。

[0024] 图2A-B描述了A：在50℃下在氧化氘(D_2O)中来自肺炎链球菌血清型16F的荚膜多糖的600MHz一维^1H NMR谱。标记由内标(DMSO和DSS-d_6)，残留水(HOD)，乙醇(EtOH)，异丙醇(IPA)和醋酸酯引起的信号。用*标记的次要信号是由于肺炎链球菌的细胞壁残留物，例如C-多糖和/或肽聚糖。B：在27℃下在氧化氘(D_2O)中来自肺炎链球菌血清型16F的氧化和衍生的荚膜多糖的600MHz一维^1H NMR谱。插图是通过用氨基硫脲衍生而形成的亚胺信号的放大。标记由内标(DMSO和DSS-d6)，残留水(HOD)和缓冲液(柠檬酸盐)引起的信号。

[0025] 图3描绘了用于肺炎链球菌血清型16F的血清型鉴定的一维(1D)^1H NMR同一性区域。标记来自每个单糖残基的重复单元的每个异头质子(anomeric proton)的信号位置。

[0026] 图4描绘了在重复结构的糖残基之间建立共价键的脱-O-乙酰化肺炎链球菌血清型16F的部分二维(2D)^1H-^{13}C多键相关NMR谱。在图中标记了建立糖苷键的相关性。

[0027] 图5描绘了在肺炎链球菌血清型16F的荚膜多糖重复单元中磷酸二酯键的建立。

[0028] 图6描绘了氧化和衍生的肺炎链球菌血清型16F的部分1D(顶部)和2D ^1H-^{13}C相关NMR谱。

[0029] 图7描绘了氧化和衍生的肺炎链球菌血清型16F的部分1D(顶部)和2D ^1H-^{13}C相关NMR谱，仅显示了来自亚甲基碳的信号。圈出了来自衍生化的其他亚甲基信号。

[0030] 图8A-8E描绘了在600MHz获得的氧化的纯化血清型16F多糖并用氨基硫脲衍生的NMR数据的合成图(composite)。A)1D ^{1}H光谱显示亚胺质子。B)2D梯度COSY,显示从7.5ppm处的亚胺信号到4.57ppm处的信号的交叉峰。C)2D TOCSY光谱显示到4.57ppm处的信号的信号交叉峰。D和E)2D ^{1}H-^{13}C相关谱,显示交叉峰(D)和亚胺(E)的碳化学位移。

[0031] 图9显示了用与CRM197缀合并用磷酸铝佐剂(APA)配制的肺炎链球菌单价血清型免疫的兔子的ELISA IgG抗体滴度(给药2后)。误差棒表示几何平均值+95%置信区间。

[0032] 图10显示了用与CRM197缀合并用磷酸铝佐剂(APA)配制的的肺炎链球菌单价血清型免疫的兔子的血清型特异性OPA滴度(给药2后)。误差棒表示几何平均值+95%置信区间。

[0033] 图11显示了免疫前血清型特异性(肺炎链球菌血清型16F,23A,23B,24F,31),用多价肺炎球菌缀合物疫苗(2μg/PnPs)免疫的兔子的PD1和PD2几何平均抗体滴度。误差棒表示每种血清型(X轴)的几何平均滴度的2个标准误差(2standard errors)。

[0034] 图12显示了免疫前血清型特异性(肺炎链球菌血清型16F,23A,23B,24F,31),用多价肺炎球菌缀合物疫苗(2μg/PnPs)免疫的兔子的PD1和PD2 OPA稀释滴度。符号表示个体滴度,误差棒表示几何平均滴度(GMT)的95%置信区间(CI)。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,ns=不显著。

具体实施方式

[0035] 本发明部分基于通过NMR技术鉴定一种或多种新型肺炎球菌多糖结构。据信本文提供的结构是肺炎链球菌血清型16F的第一次鉴定或第一次正确的鉴定。

[0036] 从其各自的菌株产生肺炎链球菌血清型16F多糖并对其纯化。产生的(和纯化的)多糖用于产生多糖-CRM197缀合物。肺炎链球菌血清型16F具有独特的多糖结构,这导致独特的缀合物生产过程。在动物研究中证明了所得的缀合物具有免疫原性。

[0037] 如本文所用,术语“多糖”(Ps)是指包括免疫和细菌疫苗领域中常用的任何抗原性糖元素(或抗原单位),包括但不限于“糖”,“寡糖”,“多糖”,“脂糖”,“脂寡糖(LOS)”,“脂多糖(LPS)”,“糖基化物(glycosylate)”,“糖缀合物”,“衍生或活化的多糖或寡糖”,等等。除非另有说明,否则本文中使用的多糖命名法遵循IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBM)Recommendations 1980。参见JCBN,1982,J.Biol.Chem.257:3352-3354。

[0038] 如本文所用,“免疫原性组合物”是指含有抗原的组合物,例如细菌荚膜多糖或多糖-蛋白缀合物,其具有在宿主例如哺乳动物中通过体液或细胞或两者介导引发免疫应答的能力。所述免疫原性组合物可通过呈递与细胞表面的MHC分子相关联的抗原而用于致敏宿主。另外,可以产生抗原特异性的T细胞或抗体,以便将来保护被免疫的宿主。因此,免疫原性组合物可以保护宿主免受细菌感染,降低严重性,或者可以保护宿主免受细菌感染导致的死亡。免疫原性组合物也可用于产生多克隆或单克隆抗体,其可用于赋予受试者被动免疫。免疫原性组合物也可用于产生具有功能性的抗体,如通过在动物功效模型中或通过调理吞噬细胞杀伤测定中细菌杀伤来测量。

[0039] 如本文所用,与多糖有关的术语“分离的”是指使用本领域已知的纯化技术从纯化的多糖中分离肺炎链球菌血清型特异性荚膜多糖,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。通常,分离的多糖是指部分去除蛋白质、核酸和非特异性内源

性多糖(C-多糖)。分离的多糖包含少于10%、8%、6%、4%或2%的蛋白质杂质和/或核酸。相对于类型特异性多糖,分离的多糖包含少于20%的C-多糖。

[0040] 如本文所用,与细菌荚膜多糖有关的术语"纯化的"是指通过诸如离心、沉淀和超滤的方法从细胞裂解物中纯化多糖。通常,纯化的多糖是指去除细胞碎片和DNA。

[0041] 如本文所用,术语"Mw"是指重均分子量(weight averaged molecular weight),并且通常以Da或kDa表示。Mw考虑到较大的分子比较小的分子包含更多的聚合物样品总质量。Mw可以通过诸如静态光散射、小角度中子散射、X射线散射和沉降速度的技术来确定。

[0042] 如本文所用,术语"Mn"是指数均分子量,并且通常以Da或kDa表示。Mn通过将样品的总重量除以样品中的分子数来计算,并且可以通过诸如凝胶渗透色谱法,通过(Mark-Houwink方程式)的粘度测定法,诸如蒸汽压渗透法的依数法,端基测定或质子NMR。Mw/Mn反映了多分散性。

[0043] 如本文所用,术语"摩尔比"是通常表示为十进制至十分位或百分位。例如,以十分位表示的0或0.1至1.0的摩尔比将包括任何0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0。

[0044] 如本文所用,缩写"PnPs"是指肺炎球菌多糖。

[0045] 如本文所用,术语"包括/包含"当与本发明的免疫原性组合物一起使用时是指包括任何其他成分(对于抗原混合物,受限于"由...组成"语言的限制),例如佐剂和赋形剂。当与本发明的多价多糖-蛋白缀合物混合物一起使用时,术语"由...组成"是指具有那些特定的肺炎链球菌多糖蛋白缀合物而没有来自不同血清型的其他肺炎链球菌多糖蛋白缀合物的混合物。

[0046] 如本文所用,糖上的短语"活化位点"是指该位点可以被化学修饰以形成反应性基团。活化位点考虑了活化剂在特定位点反应的优选趋势。

[0047] 如本文所用,短语"活化多糖"是指已经被化学修饰以在多糖链中形成反应性基团的多糖。活化多糖不一定意味着所有可用的活化位点均已化学修饰。

[0048] 如本文所用,短语多糖链上的"活化程度"是指活化化学基团数与多糖链上重复单元数之间的总比率。

[0049] 除非另有说明,否则本文提供的所有范围均包括所列举的下限和上限。

[0050] 肺炎链球菌血清型16F的单糖分析显示Glc(葡萄糖),Gal(半乳糖),Rha(鼠李糖),GlcN(葡萄糖胺),GalN(半乳糖胺)和Gro-P(磷酸甘油酯)为成分。参见Kamerling,2000,Pneumococcal polysaccharides:a chemical view,p.81-114.In Tomasz(ed),Streptococcus pneumoniae molecular biology&mechanisms of disease.Mary Ann Liebert,Inc.,Larchmont,NY。实施例中鉴定的结构与先前鉴定的单糖组成的不同之处在于不存在半乳糖、半乳糖胺或葡糖胺。迄今为止,尚无血清型16A的完整多糖结构信息可用于比较。

[0051] 肺炎链球菌16F结构表明在β-Rha上存在O-乙酰基。实施例中的分析表明,O-Ac基存在于多糖上约90%的重复单元上。在某些实施方式中,16F血清型多糖每mM血清型16F多糖具有0(即,完全脱-O-乙酰化)或至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9mM醋酸酯。

[0052] 对这种血清型的结构的鉴定可以允许其以未缀合的或以多糖-蛋白缀合物形式掺

入肺炎球菌疫苗中。包含链球菌和肺炎球菌多糖的缀合物疫苗是本领域众所周知的。参见例如美国专利号6,248,570;5,866,135;和5,773,007。

[0053] 荚膜多糖

[0054] 可以通过本领域技术人员已知的标准技术来制备来自本发明血清型的肺炎链球菌的荚膜多糖。例如,可以从细菌中分离多糖,并且可以通过已知方法将多糖尺寸到一定程度(参见,例如,欧洲专利号EP497524和EP497525);并且优选通过使用均质器或化学水解完成的微流化。在一个实施方式中,对应于每种多糖血清型的肺炎链球菌菌株在基于大豆的培养基中生长。然后通过标准步骤(包括离心、沉淀和超滤)纯化各种多糖。参见,例如,美国专利申请公开号2008/0286838和美国专利号5847112。可以对多糖进行尺寸(size),以降低粘度和/或改善后续缀合产物的过滤性。可以使用乙酸进行化学水解。机械尺寸可使用高压均质剪切进行。

[0055] 在一些实施方式中,缀合之前的纯化的多糖具有在5kDa至4,000kDa之间的分子量。分子量可以通过尺寸排阻色谱法(SEC)结合多角度光散射检测器(MALS)和折射率检测器(RI)来计算。在其他这样的实施方式中,多糖的平均分子量为10kDa至4,000kDa之间;50kDa至4,000kDa之间;50kDa至3,000kDa之间;50kDa至2,000kDa之间;50kDa至1,500kDa之间;50kDa至1,000kDa之间;50kDa至750kDa之间;50kDa至500kDa之间;80kDa至2000kDa之间;100kDa至4,000kDa之间;100kDa至3,000kDa之间;100kDa和2,000kDa;100kDa至1,500kDa之间;100kDa至1,000kDa之间;100kDa至750kDa之间;100kDa至500kDa之间;100至400kDa之间;100kDa至300kDa之间;或100kDa至200kDa之间。在某些实施方式中,来自肺炎链球菌血清型16F的多糖的平均分子量为100kDa至200kDa之间。

[0056] 在某些实施方式中,肺炎链球菌血清型16F多糖具有10至5000个重复单元。在某些方面,多糖具有50至3000,100至2500或100至2000。在某些实施方式中,来自血清型16F的多糖具有100至300个重复单元或128至256个重复单元。

[0057] 在某些实施方式中,肺炎链球菌血清型16F多糖的O-乙酰基与血清型16F重复单元的摩尔比为0.0-1.0,例如至少任何0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9至1.0。

[0058] 载体蛋白

[0059] 可以将来自一种或多种肺炎链球菌血清型的多糖与载体蛋白("Pr")缀合,以改善在儿童、老年人和/或免疫功能低下的受试者中的免疫原性。在多价组合物中使用一种以上血清型的情况下,可以用相同的载体蛋白或不同的载体蛋白制备血清型。通常将相同血清型的每种荚膜多糖缀合至相同的载体蛋白。

[0060] 在本发明的特定实施方式中,CRM197用作载体蛋白。CRM197是白喉毒素(DT)的无毒变体。CRM197载体蛋白是DT的突变形式,通过片段A中第52位残基的单个氨基酸置换使其无毒。在一个实施方式中,从在酪蛋白氨基酸和基于酵母提取物的培养基中生长的白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)菌株C7(β197)的培养物中分离得到CRM197载体蛋白。在另一个实施方式中,根据美国专利号5,614,382中描述的方法重组制备CRM197。通常,通过超滤、硫酸铵沉淀和离子交换色谱法组合纯化CRM197。在一些实施方式中,使用Pfenex Expression Technology™(Pfenex Inc.,San Diego,CA)制备荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)中的CRM197。

[0061] 其他合适的载体蛋白包括另外的灭活细菌毒素,例如DT、白喉类毒素片段B

(DTFB)、TT(破伤风类毒素)或TT的片段C、百日咳类毒素、霍乱类毒素(例如,如国际专利申请公开号WO 2004/083251中所述)、大肠杆菌LT(热不稳定性肠毒素)、大肠杆菌ST(热稳定性肠毒素)和铜绿假单胞菌的外毒素A。也可以使用细菌外膜蛋白,例如外膜复合物c(OMPC)、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌表面蛋白A(PspA;参见国际申请专利公开号WO 02/091998)、肺炎球菌粘附素蛋白(PsaA)、来自A组或B组链球菌的C5a肽酶、或流感嗜血杆菌蛋白D、肺炎球菌溶血素(Kuo等,1995,Infect Immun 63:2706-13),包括以某种方式解毒的ply,例如dPLY-GMBS(参见国际专利申请公开号WO 04/081515)或dPLY-formol、PhtX,包括PhtA、PhtB、PhtD、PhtE和Pht蛋白的融合物,例如PhtDE融合物、PhtBE融合物(参见国际专利申请公开号WO 01/98334和WO 03/54007)。其他蛋白,例如卵清蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或结核菌素的纯化蛋白衍生物(PPD)、PorB(来自脑膜炎奈瑟氏菌)、PD(流感嗜血杆菌蛋白D;例如参见欧洲专利号EP 0 594 610 B)或其免疫功能等同物、合成肽(参见欧洲专利号EP0378881和EP0427347)、热激蛋白(参见国际专利申请公开号WO 93/17712和WO 94/03208)、百日咳蛋白(参见国际专利申请公开号WO 98/58668和欧洲专利号EP0471177)、细胞因子、淋巴因子、生长因子或激素(参见国际专利申请公开号WO 91/01146)、包含多个来自各种病原体衍生抗原的人CD4+T细胞表位的人工蛋白(参见Falugi等,2001,Eur JImmunol 31:3816-3824),例如N19蛋白(参见Baraldoi等,2004,Infect Immun 72:4884-7)、铁摄取蛋白(参见国际专利申请公开号WO 01/72337)、艰难梭菌(C.difficile)的毒素A或B(参见国际专利公开号WO 00/61761)和鞭毛蛋白(参见Ben-Yedidia等,1998,Immunol Lett 64:9)也可用作载体蛋白。

[0062] 其他DT突变体也可以用作载体蛋白,例如CRM176、CRM228、CRM45(Uchida等,1973,J Biol Chem 218:3838-3844)、CRM9、CRM45、CRM102、CRM103和CRM107,以及由Nicholls和Youle在Genetically Engineered Toxins,Ed:Frankel,Maecel Dekker Inc,1992中描述的其他突变;Glu-148缺失或突变为Asp、Gln或Ser和/或Ala 158突变为Gly以及在美国专利号4,709,017或美国专利号4,950,740中描述的其他突变;至少一个或多个残基Lys 516、Lys 526、Phe 530和/或Lys 534的突变以及在美国专利号5,917,017或美国专利号6,455,673中描述的其他突变;或在美国专利号5,843,711中描述的片段。

[0063] 在使用多价疫苗的情况下,第二载体蛋白可以用于一种或多种抗原。第二载体蛋白优选是无毒且无反应原性并且可以足够量和纯度获得的蛋白。第二载体蛋白也与抗原例如肺炎链球菌多糖缀合或连接,以增强抗原的免疫原性。载体蛋白应符合标准的缀合程序。在一个实施方式中,未与第一载体蛋白缀合的每个荚膜多糖与相同的第二载体蛋白缀合(例如,每个荚膜多糖分子与单个载体蛋白缀合)。在另一个实施方式中,未与第一载体蛋白缀合的荚膜多糖与两个或更多个载体蛋白缀合(每个荚膜多糖分子与单个载体蛋白缀合)。在这样的实施方式中,相同血清型的每个荚膜多糖通常与相同的载体蛋白缀合。

[0064] 缀合

[0065] 在缀合之前,可以将纯化的多糖化学活化以使糖能够与载体蛋白反应以形成活化多糖。如本文所用,术语“活化多糖”是指如下所述已经被化学修饰以使得能够缀合至接头或载体蛋白的多糖。纯化的多糖可以任选地连接至接头。一旦被活化或连接到接头,每个荚膜多糖分别与载体蛋白缀合以形成糖缀合物。多糖缀合物可以通过已知的偶联技术制备。

[0066] 在某些实施方式中,肺炎链球菌血清型16F多糖的活化发生在一个或多个甘油-1-

PO_4糖上。在某些实施方式中，多糖用高碘酸盐活化。在该实施方式的某些方面，活化发生在甘油-1-PO_4糖两者之一或两者的碳2位上。

[0067] 在某些实施方式中，可以将多糖偶联至接头以形成多糖-接头中间体，其中接头的自由末端为酯基。因此，接头是其中至少一个末端是酯基的接头。选择另一个末端，以使其可以与多糖反应形成多糖-接头中间体。

[0068] 在某些实施方式中，偶联还可以间接发生，即在偶联至接头之前通过用于衍生多糖的另外的接头进行。在多糖的还原末端使用羰基将多糖偶联至另外的接头。该偶联包括两个步骤：(a1)使羰基与另外的接头反应；和(a2)使另外的接头的自由末端与接头反应。在这些实施方式中，另外的接头通常在两个末端均具有伯胺基，从而允许步骤(a1)通过还原胺化使伯胺基之一与多糖中的羰基反应而进行。使用与多糖中的羰基反应的伯胺基。酰肼或羟氨基是合适的。相同的伯胺基通常存在于另外的接头的两个末端。该反应产生多糖-另外接头中间体，其中多糖通过C-N键与另外的接头偶联。

[0069] 在某些实施方式中，可以使用多糖中的不同基团，特别是羧基，将多糖偶联至另外的接头。该偶联包括两个步骤：(a1)使基团与另外的接头反应；和(a2)使另外的接头的自由末端与接头反应。在这种情况下，所述另外的接头通常在两个末端均具有伯胺基，从而允许步骤(a1)通过EDAC活化使所述伯胺基之一与多糖中的羧基反应而进行。使用与多糖中的EDAC活化的羧基反应的伯胺基。酰肼基是合适的。相同的伯胺基通常存在于另外的接头的两个末端。该反应产生多糖-另外的接头中间体，其中多糖通过酰胺键与另外的接头偶联。

[0070] 在一个实施方式中，多糖的化学活化和随后通过还原胺化与载体蛋白的缀合可以通过美国专利号4,365,170、4,673,574和4,902,506，美国专利申请公开号2006/0228380、2007/184072、2007/0231340和2007/0184071，和国际专利申请公开号WO2006/110381，WO2008/079653和WO2008/143709中所描述的方法实现。化学反应可能需要在氧化剂存在下，通过用使伯羟基变为醛的任何氧化剂(例如TEMPO)的反应使肺炎球菌多糖活化(WO2104/097099)，或使两个邻(vicinal)羟基反应为醛，例如高碘酸盐(包括高碘酸钠、高碘酸钾或高碘酸)。反应导致碳水化合物的伯羟基的氧化或碳水化合物的邻羟基的氧化裂解，形成反应性醛基。

[0071] 在该实施方式中，通过直接胺化还原胺化至蛋白质的赖氨酰基来偶联至载体蛋白。例如，通过在镍的存在下使活化多糖和载体蛋白的混合物与还原剂例如氰基硼氢化钠反应进行缀合。缀合反应可以在水溶液或二甲基亚砜(DMSO)的存在下进行。参见，例如，美国专利申请公开号US2015/0231270和US2011/0195086以及欧洲专利号EP 0471177 B1。然后通过加入强还原剂(例如硼氢化钠)将未反应的醛封端。

[0072] 还原胺化涉及两个步骤，(1)多糖的氧化以形成反应性醛，(2)还原在活化多糖与载体蛋白之间形成的亚胺(席夫碱)以形成稳定的胺共轭键。在氧化之前，任选地将多糖尺寸减小。可以采用机械方法(例如均质化)或化学水解。可以使用乙酸进行化学水解。氧化步骤可涉及与高碘酸盐反应。为了本发明的目的，术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸。该术语还包括偏高碘酸盐(metaperiodate)(IO_4^-)和原高碘酸盐(orthoperiodate)($IO_6 5^-$)，并且包括高碘酸盐的各种盐(例如高碘酸钠和高碘酸钾)。在一个实施方式中，在偏高碘酸盐的存在下，优选在高碘酸钠($NaIO_4$)的存在下，氧化荚膜多糖。在另一个实施方式中，在原高碘酸盐存在下，优选在高碘酸存在下，氧化荚膜多糖。

[0073] 在一个实施方式中，氧化剂(oxidizing agent)是稳定的硝酰基或硝基氧(nitroxide)自由基化合物，例如哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物，在氧化剂(oxidant)存在下选择性氧化伯羟基(例如，国际专利申请公开号WO 2014/097099所述)。在所述反应中，在催化循环中，实际的氧化剂是N-氧代铵盐。在一方面，所述稳定的硝酰基或硝基氧自由基化合物是哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物。在一个方面，所述稳定的硝酰基或硝基氧自由基化合物带有TEMPO(2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧基)或PROXYL(2,2,5,5-四甲基-1-吡咯烷基氧基)部分。在一个方面，所述稳定的硝酰基自由基化合物是TEMPO或其衍生物。在一个方面，所述氧化剂是带有N-卤代部分的分子。在一个方面，所述氧化剂选自N-氯琥珀酰亚胺，N-溴琥珀酰亚胺，N-碘琥珀酰亚胺，二氯异氰尿酸，1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮，二溴异氰尿酸，1,3,5-三溴-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮，二碘异氰尿酸和1,3,5-三碘-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮。优选地，所述氧化剂是N-氯代琥珀酰亚胺。

[0074] 在某些方面，氧化剂是2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧基(TEMPO)游离自由基和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)作为助氧化剂(如国际专利申请公开号WO2014/097099中所述)。因此，在一个方面，来自肺炎链球菌的糖缀合物可通过包括以下步骤的方法获得：a)使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水性溶剂中反应产生活化的糖；b)使活化的糖与包含一个或多个胺基的载体蛋白反应(所述方法下文称为“TEMPO/NCS-还原胺化”)。

[0075] 任选地，通过添加淬灭剂来淬灭氧化反应。淬灭剂可以选自邻二醇，1,2-氨基醇，氨基酸，谷胱甘肽，亚硫酸盐，硫酸氢盐，连二亚硫酸盐，偏亚硫酸氢盐，硫代硫酸盐，亚磷酸盐，次磷酸盐或亚磷酸(例如甘油，乙二醇，丙-1,2-二醇，丁-1,2二醇或丁-2,3-二醇，抗坏血酸)。

[0076] 还原胺化的缀合过程的第二步是使用还原剂还原活化多糖和载体蛋白之间的亚胺(席夫碱)键以形成稳定的共轭键(所谓的还原胺化)。合适的还原剂包括氰基硼氢化物(例如氰基硼氢化钠)或硼氢化钠。在一个实施方式中，还原剂是氰基硼氢化钠。

[0077] 在本发明方法的某些实施方式中，还原胺化反应在非质子溶剂(或非质子溶剂的混合物)中进行。在一个实施方式中，还原反应在DMSO(二甲基亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行。如果冻干，则可以使用DMSO或DMF溶剂重构活化多糖和载体蛋白。在一个实施方式中，非质子溶剂是DMSO。

[0078] 在还原反应结束时，缀合物中可能残留有未反应的醛基，可以使用合适的封端剂或淬灭剂将其封端或淬灭。在一个实施方式中，该封端剂或淬灭剂是硼氢化钠($NaBH_4$)。合适的替代物包括在布朗斯台德酸或路易斯酸存在下的三乙酰氧基硼氢化钠或硼氢化钠或硼氢化锌，胺硼烷，例如吡啶硼烷，2-吡啶啉硼烷，2,6-二硼烷-甲醇，二甲胺-硼烷，t-BuMe’PrN-BH_3，苄胺-BH_3或5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)或硼氢化物交换树脂。

[0079] 在非质子溶剂中使用还原胺化制备的糖缀合物通常用于多价肺炎球菌缀合物疫苗中。因此，在某些实施方式中，对于不是所有血清型都在非质子溶剂中制备的多价组合物，其余血清型的还原反应是在水性溶剂中进行(例如，选自PBS(磷酸盐缓冲盐水)，MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)，HEPES，(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)，Bis-tris，ADA(N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸)，PIPES(哌嗪-N,N’-双(2-乙磺酸))，MOPSO(3-吗啉代-2-羟基丙烷磺酸)，BES(N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸)，MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)，DIPSO(3-双(2-

羟乙基)氨基-2-羟基丙烷-1-磺酸),MOBS(4-(N-吗啉代)丁磺酸),HEPPSO(N-(2-羟乙基)哌嗪-N-(2-羟基丙磺酸)),POPSO(哌嗪-1,4-双(2-羟基-3-丙烷磺酸)),TEA(三乙醇胺),EPPS(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸酸),N-二甘氨酸或HEPB,pH在6.0和8.5,7.0和8.0或7.0和7.5之间)。

[0080] 在一些实施方式中,本发明的糖缀合物包含分子量为10kDa至10,000kDa之间的多糖。在其他这样的实施方式中,多糖的分子量在25kDa和5,000kDa之间。在其他这样的实施方式中,多糖的分子量在50kDa和1,000kDa之间。在其他这样的实施方式中,多糖的分子量在70kDa和90 0kDa之间。在其他这样的实施方式中,多糖的分子量在100kDa和800kDa之间。在其他这样的实施方式中,多糖的分子量在200kDa和600kDa之间。在进一步的这样的实施方式中,多糖的分子量为100kDa至1000kDa;100kDa至900kDa;100kDa至800kDa;100kDa至700kDa;100kDa至600kDa;100kDa至500kDa;100kDa至400kDa;100kDa至300kDa;150kDa至1,000kDa;150kDa至900kDa;150kDa至800kDa;150kDa至700kDa;150kDa至600kDa;150kDa至500kDa;150kDa至400kDa;150kDa至300kDa;200kDa至1,000kDa;200kDa至900kDa;200kDa至800kDa;200kDa至700kDa;200kDa至600kDa;200kDa至500kDa;200kDa至400kDa;200kDa至300;250kDa至1,000kDa;250kDa至900kDa;250kDa至800kDa;250kDa至700kDa;250kDa至600kDa;250kDa至500kDa;250kDa至400kDa;250kDa至350kDa;300kDa至1,000kDa;300kDa至900kDa;300kDa至800kDa;300kDa至700kDa;300kDa至600kDa;300kDa至500kDa;300kDa至400kDa;400kDa至1,000kDa;400kDa至900kDa;400kDa至800kDa;400kDa至700kDa;400kDa至600kDa;或500kDa至600kDa。

[0081] 在某些实施方式中,通过还原胺化来进行缀合反应,其中使用镍来提高缀合反应效率并有助于除去游离氰化物。已知过渡金属可与氰化物形成稳定的络合物,并已知可与改善蛋白质氨基和甲醛与氰基硼氢化钠的还原甲基化(S Gidley等,Biochem J.1982,203:331-334;Jentoft等Anal Biochem.1980,106:186-190)。通过络合残留的抑制性氰化物,镍的添加增加了蛋白在缀合过程中的消耗,并导致形成更大、可能更具免疫原性的缀合物。

[0082] 合适的替代化学方法包括用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓四氟硼酸酯(CDAP)活化糖以形成氰酸酯。因此,活化的糖可以直接或通过间隔子(接头)基团与载体蛋白上的氨基偶联。例如,间隔子可以是胱胺或半胱胺,以得到硫醇化的多糖,其可以通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如,使用GMBS)或卤代乙酰化的载体蛋白(例如使用碘乙酰亚胺(例如盐酸碘乙乙酰胺)或N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯或SIAB,或SIA或SBAP))反应后获得的硫醚键与载体偶联。优选地,将氰酸酯(任选地通过CDAP化学方法制得)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联,并且使用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学方法经由蛋白载体上的羧基将氨基衍生的糖缀合至载体蛋白。在国际专利申请公开号WO 93/15760,WO 95/08348和WO 96/29094;和Chu等,1983,Infect.Immunity 40:245-256中描述了这样的缀合物。

[0083] 其他合适的技术使用碳二亚胺,酰肼,活性酯,降硼烷,对硝基苯甲酸,N-羟基琥珀酰亚胺,S-NHS,EDC,TSTU。在国际专利申请公开号WO 98/42721中描述了许多。缀合可以涉及羰基接头,其可以通过糖的游离羟基与CDI反应形成(参见Bethell等,1979,J.Biol.Chem.254:2572-4;Hearn等,1981,J.Chromatogr.218:509-18),然后与蛋白质反应形成氨基甲酸酯键。这可能涉及将端基(anomeric terminus)还原为伯羟基,任选地伯羟基的保护/脱保护,伯羟基与CDI反应形成CDI氨基甲酸酯中间体并将CDI氨基甲酸酯中间体与

蛋白上的氨基偶联。

[0084] 缀合(还原反应和任选的加帽或淬灭反应)后,可以通过技术人员已知的多种技术纯化糖缀合物(相对于多糖-蛋白缀合物的量富集)。这些技术包括渗析,浓缩/渗滤操作,切向流过滤,超滤,沉淀/洗脱,柱色谱(离子交换色谱,多峰离子交换色谱,DEAE或疏水相互作用色谱)和深度过滤。参见例如美国专利号6,146,902。在一个实施方式中,通过渗滤或离子交换色谱或尺寸排阻色谱纯化糖缀合物。

[0085] 表征本发明的糖缀合物的一种方法是通过载体蛋白(例如,CRM197)中变得与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为一系列缀合的赖氨酸(缀合度)。由于与多糖的共价键合,对载体蛋白进行赖氨酸修饰的证据可以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。与用于产生缀合物材料的载体蛋白起始材料相比,缀合导致回收的赖氨酸残基数量减少。在一个优选的实施方式中,本发明的糖缀合物的缀合度为2至15之间,2至13之间,2至10之间,2至8之间,2至6之间,2至5之间,2至4之间,3与15之间,3与13之间,3与10之间,3与8之间,3与6之间,3与5之间,3与4之间,5与15之间,5与10之间,8与15之间,8至12之间,10至15之间,或10至12之间。在一个实施方式中,本发明的糖缀合物的缀合度为约2,约3,约4,约5,约6,约7,约8,约9,约10,约11,约12,约13,约14或约15。在一个优选的实施方式中,本发明的糖缀合物的缀合度在4至7之间。在一些这样的实施方式中,载体蛋白是CRM197。

[0086] 本发明的糖缀合物还可以通过糖与载体蛋白的比率(重量/重量)来表征。在一些实施方式中,糖缀合物中多糖与载体蛋白的比率(w/w)为0.5至3.0(例如,约0.5,约0.6,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,约2.5,约2.6,约2.7,约2.8,约2.9,或约3.0)。在其他实施方式中,糖与载体蛋白的比率(w/w)为0.5至2.0,0.5至1.5,0.8至1.2,0.5至1.0,1.0至1.5或1.0至2.0。在其他实施方式中,糖与载体蛋白的比率(w/w)为0.8至1.2。在一个优选的实施方式中,缀合物中荚膜多糖与载体蛋白的比率为0.9至1.1。在一些这样的实施方式中,载体蛋白为CRM197。本发明的糖缀合物和免疫原性组合物可包含未与载体蛋白共价缀合但仍存在于糖缀合物组合物中的游离糖。游离糖可以与糖缀合物非共价关联(即,非共价结合,吸附或捕获于其中或与之捕获)。

[0087] 在一个优选的实施方式中,与多糖的总量相比,糖缀合物包含少于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%或15%的游离多糖。在一个优选的实施方式中,与多糖的总量相比,糖缀合物包含少于约25%的游离多糖。在一个优选的实施方式中,与多糖的总量相比,糖缀合物包含少于约20%的游离多糖。在一个优选的实施方式中,与多糖的总量相比,糖缀合物包含少于约15%的游离多糖。

[0088] 多价多糖-蛋白缀合物疫苗

[0089] 在本发明的某些实施方式中,多价多糖疫苗包含未缀合的肺炎链球菌血清型16F多糖和/或来自血清型16F的多糖-蛋白缀合物和来自一种或多种肺炎链球菌血清型1,2,3,4,5,6A,6B,6C,6D,7B,7C,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15A,15B,15C,17F,18B,18C,19A,19F,20,21,22A,22F,23A,23B,23F,24B,24F,27,28A,31,33F,34,35A,35B,35F和38的荚膜多糖作为游离多糖,多糖-蛋白缀合物的组分或其组合,以提供多价肺炎球菌疫苗。在本发明的某些实施方式中,免疫原性组合物包含各自与一种或多种载体蛋白缀合的来自2,3,4,

5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43或44肺炎链球菌血清型的荚膜多糖,基本由以上组成,或由以上组成。优选地,来自特定血清型的糖不与一种以上载体蛋白缀合。

[0090] 在纯化各种糖缀合物之后,将它们复合以配制本发明的免疫原性组合物。这些肺炎球菌缀合物是通过分别的方法制备的,并大量配制成单剂量制剂。

[0091] 药物/疫苗组合物

[0092] 本发明还提供了组合物,其包括药物、免疫原性和疫苗组合物,其包含上述任何多糖肺炎链球菌血清型组合以及药学上可接受的载体和佐剂,基本上由以上组成,或由以上组成。

[0093] 本发明的多糖-蛋白缀合物的配制可以使用本领域公认的方法来完成。例如,可以将各自的肺炎球菌缀合物与生理上可接受的载剂一起配制以制备组合物。这样的载剂的实例包括但不限于水、缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇)和葡萄糖溶液。

[0094] 在优选的实施方式中,疫苗组合物在含氯化钠的L-组氨酸缓冲液中配制。

[0095] 如本文所定义,"佐剂"是用于增强本发明的免疫原性组合物的免疫原性的物质。单独施用时,免疫佐剂可以增强对免疫原性弱的抗原的免疫应答,例如,不诱导抗体滴度或细胞介导的免疫应答或诱导弱的抗体滴度或细胞介导的免疫应答,增加抗体对抗原的滴度和/或降低有效实现个体免疫应答的抗原剂量。因此,佐剂通常用以增强免疫应答,并且是技术人员众所周知的。增强组合物有效性的合适佐剂包括但不限于:

[0096] (1)铝盐(铝),例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;

[0097] (2)水包油乳剂制剂(有或没有其他特定的免疫刺激剂,例如鼠酰胺基肽(以下定义)或细菌细胞壁成分),例如(a)MF59(国际专利申请公开号WO 90/14837),其包含5%角鲨烯、0.5% Tween80和0.5% Span 85(任选地包含各种量的MTP-PE),并使用微射流仪,例如110Y型微射流仪(Microfluidics,Newton,MA)配制成亚微米颗,(b)SAF,其包含10%角鲨烯、0.4% Tween 80、5%pluronic嵌段的聚合物L121和thr-MDP,它们被微流化成亚微米乳剂或涡流产生更大粒径的乳剂,(c)Ribi™佐剂体系(RAS),(Corixa,Hamilton,MT),其包含2%角鲨烯、0.2%Tween 80和一种或多种选自以下的细菌细胞壁成分:美国专利号4,912,094中描述的3-O-脱酰基的单磷脂A(MPL™)、海藻糖二甲酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+CWS(Detox™);和(d)Montanide ISA;

[0098] (3)可以使用皂苷佐剂,例如Quil A或STIMULON™ QS-21(Antigenics,Framingham,MA)(参见例如,美国专利号5,057,540),或由其产生的颗粒,例如ISCOM(由胆固醇、皂素、磷脂和两亲性蛋白组合形成的免疫刺激复合物)和Iscomatrix®(与ISCOM具有基本相同的结构,但没有蛋白);

[0099] (4)细菌脂多糖、合成脂质A类似物,例如氨基烷基葡糖胺磷酸酯化合物(AGP),或其衍生物或类似物,其可从Corixa获得并在美国专利号6,113,918中描述;一种AGP是2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰氨基]乙基2-脱氧-4-O-膦酰基-3-O-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰]-2-[(R)-3-十四烷氧基氧基十四烷酰氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷,也称为529(以前称为RC529),其被配制成水性形式或稳定的乳剂;

[0100] (5)合成的多核苷酸,例如含有CpG基序的寡核苷酸(美国专利号6,207,646);

[0101] (6)细胞因子,例如白介素(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B7-1和B7-2等;和

[0102] (7)补体,例如补体成分C3d的三聚体。

[0103] 在另一个实施方式中,佐剂是2种、3种或更多种上述佐剂的混合物,例如SBAS2(一种水包油乳液,也包含3-脱酰基单磷酰基脂质A和QS21)。

[0104] 胞壁酰基肽包括但不限于N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(MTP-PE)等。

[0105] 在某些实施方式中,佐剂是铝盐。铝盐佐剂可以是明矾沉淀的疫苗或明矾吸附的疫苗。铝盐佐剂在本领域中是众所周知的,并且描述于例如Harlow,E.and D.Lane(1988;Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory)和Nicklas,W.(1992;Aluminum salts.Research in Immunology 143:489-493)。铝盐包括但不限于水合氧化铝、氧化铝水合物、三水合氧化铝(ATH)、水合铝、三水合铝、Alfogel®、Superfos、Amphogel®、氢氧化铝(III)、羟基磷酸铝(磷酸铝助剂(APA))、无定形氧化铝、三水合氧化铝或三羟基铝。

[0106] APA是羟基磷酸铝的水性悬浮液。通过将氯化铝和磷酸钠以1:1的体积比混合以沉淀羟基磷酸铝来制造APA。在共混过程后,用高剪切混合器减小物料的尺寸,以获得单分散的粒径分布。然后生理盐水对产品进行渗滤,并进行蒸汽灭菌。

[0107] 在某些实施方式中,使用市售的$Al(OH)_3$(例如,Alhydrogel®或丹麦/Accurate Chemical and Scientific Co.,Westbury,NY的Superhydros或Superfos)吸附蛋白质。在另一个实施方式中,蛋白质的吸附取决于蛋白质的pI(等电pH)和培养基的pH。pI较低的蛋白质比pI较高的蛋白质更强烈地吸附带正电的铝离子。铝盐可以建立一个Ag储备库,该储备库会在2-3周内缓慢释放,参与巨噬细胞的非特异性激活和补体激活,和/或刺激先天免疫机制(可能通过刺激尿酸)。参见例如,Lambrecht等,2009,Curr Opin Immunol 21:23。

[0108] 通常将单价大量水性缀合物混合在一起并稀释。稀释后,将批料进行无菌过滤。无菌添加磷酸铝佐剂,以使除血清型6B(将其稀释至目标8μg/mL)外的所有肺炎链球菌血清型的终浓度均为4μg/mL,铝的终浓度为250μg/mL。将佐剂配制好的批次装入小瓶或注射器中。

[0109] 在某些实施方式中,佐剂是含CpG的核苷酸序列,例如含CpG的寡核苷酸,特别是含CpG的寡脱氧核苷酸(CpG ODN)。在另一个实施方式中,佐剂是ODN 1826,其可以获自Coley Pharmaceutical Group。

[0110] "含CpG的核苷酸"、"含CpG的寡核苷酸"、"CpG寡核苷酸"和类似术语是指长度为6-50个核苷酸且包含未甲基化的CpG部分的核苷酸分子。参见例如,Wang等,2003,Vaccine 21:4297。在另一个实施方式中,包括任何其他本领域可接受的对该术语的定义。含CpG的寡核苷酸包括使用任何合成的核苷间键、修饰的碱基和/或修饰的糖的修饰的寡核苷酸。

[0111] 使用CpG寡核苷酸的方法是本领域已知的,并且描述于例如Sur等,1999,J Immunol.162:6284-93;Verthelyi,2006,Methods Mol Med.127:139-58;和Yasuda等,2006,Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.23:89-110。

[0112] 施用/剂量

[0113] 通过经由全身或粘膜途径施用疫苗，本发明的组合物和制剂可用于保护或治疗易于感染(例如肺炎球菌感染)的人。在一个实施方式中，本发明提供了一种诱导针对肺炎链球菌荚膜多糖缀合物的免疫应答的方法，所述方法包括向人施用免疫有效量的本发明的免疫原性组合物。在另一个实施方式中，本发明提供了一种疫苗接种人以抵抗肺炎球菌感染的方法，所述方法包括以下步骤：向人施用免疫有效量的本发明的免疫原性组合物。

[0114] 可以通过包括在受试者中观察适当的免疫应答的标准研究确定特定疫苗的成分的最佳量。例如，在另一个实施方式中，通过从动物研究到人类数据的外推法确定用于人类疫苗接种的剂量。在另一个实施方式中，剂量根据经验确定。

[0115] 本发明的组合物的“有效量”是指在随后的攻击过程中引发显著降低了微生物例如肺炎链球菌的感染可能性或严重性的抗体的剂量。

[0116] 本发明的方法可用于预防和/或减少由微生物例如肺炎链球菌引起的原发性临床综合症，包括侵入性感染(脑膜炎，肺炎和菌血症)和非侵入性感染(急性中耳炎和鼻窦炎)。

[0117] 本发明的组合物的施用可以包括以下一种或多种：通过肌内，腹膜内，皮内或皮下途径注射；或通过粘膜施用到口腔/消化道，呼吸道或泌尿生殖道。在一个实施方式中，鼻内施用用于治疗肺炎或中耳炎(因为可以更有效地预防肺炎球菌的鼻咽运送，因此可以在早期减轻感染)。

[0118] 选择每种疫苗剂量中的缀合物的量作为诱导免疫保护应答而无明显不利影响的量。这样的量可以根据肺炎球菌血清型而变化。通常，对于基于多糖的缀合物，每个剂量将包含0.1至100μg的每种多糖，特别是0.1至10μg，并且更特别地是1至5μg。例如，每个剂量可包含100、150、200、250、300、400、500或750ng或1、1.5、2、3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、22、25、30、40、50、60、70、80、90或100μg的每种多糖。

[0119] 可以通过包括在受试者中观察适当的免疫应答的标准研究确定特定疫苗的成分最佳量。例如，在另一个实施方式中，通过从动物研究到人类数据的外推法确定用于人类疫苗接种的剂量。在另一个实施方式中，剂量根据经验确定。

[0120] 在一个实施方式中，铝盐的剂量为10、15、20、25、30、50、70、100、125、150、200、300、500或700μg，或1、1.2、1.5、2、3、5mg或更多。在另一个实施方式中，上述铝盐的剂量是基于每微克重组蛋白。

[0121] 通常，每0.5ml剂量配制为包含：2μg的每种肺炎链球菌多糖，但血清型6B多糖是4μg；约32μg CRM197载体蛋白(例如32μg±5μg，±3μg，±2μg或±1μg)；0.125mg元素铝(0.5mg磷酸铝)佐剂；氯化钠和L-组氨酸缓冲液。氯化钠浓度为约150mM(例如150mM±25mM，±20mM，±15mM，±10mM或±5mM)和约20mM(例如20mM±5mM，±2.5mM，±2mM，±1mM或±0.5mM)L-组氨酸缓冲液。

[0122] 根据本发明的的任何方法，并且在一个实施方式中，所述受试者是人。在某些实施方式中，人患者是婴儿(小于1岁)，学步儿童(约12至24个月)或幼儿(约2至5岁)。在其他实施方式中，人患者是老年患者(>65岁)。本发明的组合物也适用于年龄较大的儿童、青少年和成人(例如18至45岁或18至65岁)。

[0123] 在本发明的方法的一个实施方式中，本发明的组合物作为单次接种施用。在另一个实施方式中，将所述组合物施用两次、三次或四次或更多次，并充分间隔开。例如，组合物可以1、2、3、4、5或6个月的间隔或其任何组合施用。免疫时间表可以遵循针对肺炎球菌疫苗

指定的时间表。例如，针对由肺炎链球菌引起的侵袭性疾病的婴幼儿的常规时间表是2、4、6和12-15个月大。因此，在一个优选的实施方式中，该组合物在2、4、6和12-15个月大时以4剂量系列施用。

[0124] 本发明的组合物还可包含一种或多种来自肺炎链球菌的蛋白。适于包含的肺炎链球菌蛋白的实例包括在国际专利申请公开号WO 02/083855和WO 02/053761中鉴定的那些。

[0125] 制剂

[0126] 可以通过本领域技术人员已知的一种或多种方法施用本发明的组合物，例如肠胃外、透粘膜、透皮、肌内、静脉内、皮内、鼻内、皮下、腹膜内，并据此配制。

[0127] 在一个实施方式中，本发明的组合物通过表皮注射、肌内注射、静脉内、动脉内、皮下注射或呼吸内粘膜注射液体制剂施用。用于注射的液体制剂包括溶液等。

[0128] 本发明的组合物可以配制成单剂量小瓶、多剂量小瓶或预填充注射器。

[0129] 在另一个实施方式中，本发明的组合物经口服施用，并因此被配制成适于口服施用的形式，即固体或液体制剂。固体口服制剂包括片剂、胶囊、丸剂、颗粒、小丸等。液体口服制剂包括溶液、悬浮液、分散剂、乳剂、油剂等。

[0130] 用于液体制剂的药学上可接受的载体是水性或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯，例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。油的实例是动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、橄榄油、葵花籽油、鱼肝油，另一种海产油或来自牛奶或鸡蛋的脂质。

[0131] 药物组合物可以是等渗的、低渗的或高渗的。然而，通常优选用于输注或注射的药物组合物在施用时基本上是等渗的。因此，为了储存，药物组合物可以优选是等渗的或高渗的。如果药物组合物是高渗性的，则可以在施用前将其稀释成等渗溶液。

[0132] 等渗剂可以是离子等渗剂(例如盐)或非离子等渗剂(例如碳水化合物)。离子等渗剂的实例包括但不限于NaCl，$CaCl_2$，KCl和$MgCl_2$。非离子等渗剂的实例包括但不限于蔗糖，海藻糖，甘露醇，山梨糖醇和甘油。

[0133] 还优选至少一种药学上可接受的添加剂是缓冲剂。出于某些目的，例如，当药物组合物用于输注或注射时，通常期望该组合物包含缓冲剂，该缓冲剂能够将溶液缓冲至4-10，例如5-9，例如6-8的pH。

[0134] 缓冲液可以例如选自Tris、乙酸盐、谷氨酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、甘氨酸盐、L-组氨酸、甘氨酸、琥珀酸盐和三乙醇胺缓冲液。

[0135] 缓冲液还可以例如选自用于肠胃外用途的USP兼容缓冲液，特别是当药物制剂用于肠胃外用途时。例如，缓冲液可以选自一元酸，例如乙酸、苯甲酸、葡萄糖酸、甘油和乳酸；二元酸，例如乌头酸、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，例如柠檬酸和磷酸；和碱，例如氨水、二乙醇胺、甘氨酸、三乙醇胺和Tris。

[0136] 肠胃外载剂(用于皮下、静脉内、动脉内或肌内注射)包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液和不挥发性油。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂，例如基于林格氏葡萄糖的那些，等等。实例是添加或不添加表面活性剂和其他药学上可接受的佐剂的无菌液体，例如水和油。通常，水、盐水、葡萄糖水溶液和相关的糖溶液，乙二醇(例如丙二醇或聚乙二醇)、聚山梨醇酯80(PS-80)、聚山梨醇酯20(PS-20)和泊洛沙姆188(P188)是优选的液体载体，特别是用于注射溶液。油的实例是动物、植物或合成来

源的油，例如花生油、大豆油、橄榄油、葵花籽油、鱼肝油，另一种海产(marine)油或来自牛奶或鸡蛋的脂质。

[0137] 制剂还可包含表面活性剂。优选的表面活性剂包括但不限于：聚氧乙烯脱水山梨醇酯表面活性剂(通常称为Tween)，特别是PS-20和PS-80；以DOWFAX™商标出售的环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物，例如线性EO/PO嵌段共聚物；辛苯聚醇，其乙氧基(氧基-1,2-乙二基)的重复数目可以变化，其中辛苯聚醇-9(Triton X-100或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)特别令人感兴趣；(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40)；磷脂，例如磷脂酰胆碱(卵磷脂)；壬基酚乙氧基化物，例如Tergitol™ NP系列；衍生自月桂基、鲸蜡基、硬脂基和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂)，例如三乙二醇单月桂基醚(Brij 30)；脱水山梨糖醇酯(通常称为SPAN)，例如脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。用于包括在乳剂中的优选表面活性剂是PS-20或PS-80。

[0138] 可以使用表面活性剂的混合物，例如PS-80/Span 85混合物。聚氧乙烯脱水山梨醇酯例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(PS-80)和辛醇例如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100)的组合也是合适的。另一种有用的组合包括月桂酸酯9加上聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯和/或辛醇。

[0139] 表面活性剂的优选量为：聚氧乙烯脱水山梨醇酯(例如PS-80)为0.01-1％w/v，特别是约0.1％w/v；辛基或壬基苯氧基聚氧乙醇(例如Triton X-100或Triton系列中的其他去污剂)为0.001-0.1％w/v，特别是0.005-0.02％w/v；聚氧乙烯醚(例如月桂酸酯9)为0.1-20％w/v，优选0.1-10％w/v，特别是0.1-1％w/v或约0.5％w/v。

[0140] 在某些实施方式中，所述组合物基本上由L-组氨酸(20mM)，盐水(150mM)和0.2％w/v PS-20(在5.8的pH下)与250μg/mL的APA(磷酸铝佐剂)组成。在模拟制备过程中以及在使用初级包装运输的过程中，在控制制剂聚集中在存在PS-20或PS-80的情况下，PS-20的范围可以为0.005％至0.1％w/v。该方法由以下组成：在L-组氨酸、氯化钠和PS-20中混合至多44种肺炎链球菌多糖血清型的共混物，然后将这种共混物质与APA和氯化钠混合，并添加或不添加抗菌防腐剂。

[0141] 表面活性剂的选择可能需要针对不同的药物产品和药物物质进行优化。对于含有15种或更多种肺炎链球菌多糖血清型的多价疫苗，PS-20和P188是优选的。用于制备缀合物的化学方法的选择也会影响制剂的稳定性。特别地，如下文所例举的，在水性或DMSO溶剂中制备并组合为多价组合物的肺炎球菌多糖-蛋白缀合物在稳定性方面存在显著差异，取决于用于制剂的特定表面活性剂体系。

[0142] 对于本文所述的制剂，泊洛沙姆的分子量通常为1,100Da至17,400Da，7,500Da至15,000Da，或7,500Da至10,000Da。泊洛沙姆可选自泊洛沙姆188或泊洛沙姆407。泊洛沙姆在本发明制剂中的最终浓度为0.001至5％w/v，或0.025至1％w/v。包含泊洛沙姆的表面活性剂体系必须还包含多元醇。在某些方面，多元醇为丙二醇，且终浓度为1至20％w/v。在某些方面，多元醇为聚乙二醇400，且终浓度为1至20％w/v。

[0143] 用于制剂的合适的多元醇是聚合多元醇，特别是聚醚二醇，包括但不限于丙二醇和聚乙二醇，聚乙二醇单甲基醚。丙二醇的单体分子量范围为～425Da至～2,700Da。也可以获得分子量为～200Da至～35,000Da的聚乙二醇和聚乙二醇单甲醚，包括但不限于PEG200，

PEG300,PEG400,PEG1000,PEG MME 550,PEG MME 600,PEG MME 2000,PEG MME 3350和PEG MME4000。优选的聚乙二醇是聚乙二醇400。制剂中多元醇的最终浓度可以为1至20%w/v或6至20%w/v。

[0144] 制剂还包含pH缓冲盐水溶液。缓冲液可以例如选自Tris、乙酸盐、谷氨酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、甘氨酸盐、L-组氨酸、甘氨酸、琥珀酸盐、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙烷磺酸)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)和三乙醇胺缓冲液。缓冲液能够将溶液缓冲至pH为4-10、5.2-7.5或5.8-7.0的范围。在某些方面,缓冲液选自磷酸盐、琥珀酸盐、L-组氨酸、MES、MOPS、HEPES、乙酸盐或柠檬酸盐。缓冲液还可以例如选自肠胃外使用的USP兼容缓冲液,特别是当药物制剂用于肠胃外使用时。缓冲液的浓度范围为1mM-50mM或5mM-50mM。在某些方面,缓冲液是终浓度为5mM-50mM的L-组氨酸,或终浓度为1mM-10mM的琥珀酸盐。在某些方面,L-组氨酸的终浓度为20mM±2mM。

[0145] 尽管盐溶液(即,含有NaCl的溶液)是优选的,但其他适合制剂的盐包括但不限于$CaCl_2$,KCl和$MgCl_2$及其组合。可以使用非离子等渗剂,包括但不限于蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇和甘油来代替盐。合适的盐范围包括但不限于25mM至500mM或40mM至170mM。在一个方面,盐水是NaCl,任选地以20mM至170mM的浓度存在。

[0146] 在一个优选的实施方式中,所述制剂包含含有氯化钠的L-组氨酸缓冲液。

[0147] 在另一个实施方式中,药物组合物以控释系统递送。例如,可以使用静脉内输注、透皮贴剂,脂质体或其他施用方式来施用。在另一个实施方式中,使用聚合物材料,例如在微球中或在植入物中。

[0148] 本发明的组合物还可包含一种或多种来自肺炎链球菌的蛋白。适于包含的肺炎链球菌蛋白的实例包括在国际专利申请公开号WO 02/083855和WO 02/053761中鉴定的那些。

[0149] 分析方法

[0150] 使用HPSEC/UV/MALS/RI测定分析缀合物的分子量和浓度

[0151] 注入缀合物样品,并通过高性能尺寸排阻色谱法(HPSEC)进行分离。检测是通过串联的紫外线(UV)、多角度光散射(MALS)和折射率(RI)检测器完成的。使用消光系数由UV280计算蛋白质浓度。使用dn/dc因子(这是溶液折射率的变化,溶质浓度的变化以mL/g表示)从RI信号(由蛋白质和多糖共同贡献)中反褶积多糖浓度。样品的平均分子量通过Astra软件(Wyatt Technology Corporation,Santa Barbara,CA)使用整个样品峰上测得的浓度和光散射信息进行计算。多分散分子的分子量平均值有多种形式。例如,数均分子量Mn,重均分子量Mw和z均分子量Mz(Molecules,2015,20:10313-10341)。除非另有说明,否则在整个说明书中使用的术语“分子量”是重均分子量。

[0152] 测定缀合蛋白中赖氨酸的消耗,以衡量多糖和载体蛋白之间共价连接的数量

[0153] Waters AccQ-Tag氨基酸分析(AAA)用于测量缀合物样品中的缀合程度。在Eldex工作站中使用气相酸水解法水解样品,以将载体蛋白分解成其组分氨基酸。游离氨基酸使用6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)衍生化。然后使用UPLC在C18色谱柱上进行紫外检测,分析衍生样品。使用赖氨酸以外的代表性氨基酸获得平均蛋白质浓度。缀合过程中赖氨酸的消耗量(即赖氨酸损失)由缀合物中赖氨酸的平均测得量与起始蛋白中预期赖氨酸的量之差确定。

[0154] 游离多糖的测试

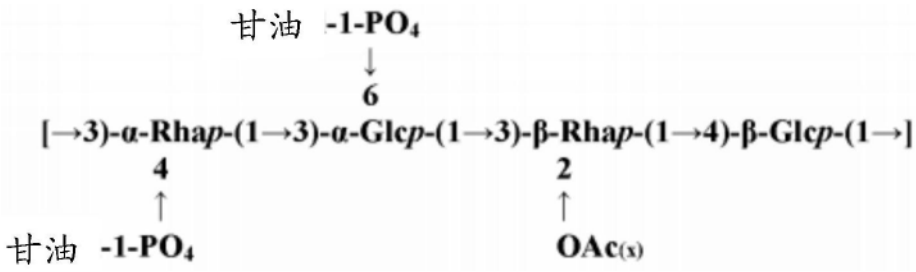
[0155] 缀合物样品中的游离多糖(即未与CRM197缀合的多糖)是通过首先将游离蛋白和缀合物与脱氧胆酸盐(DOC)和盐酸沉淀而测定的。然后滤出沉淀物,并通过HPSEC/UV/MALS/RI分析滤液中游离多糖的浓度。游离多糖计算为通过HPSEC/UV/MALS/RI测量的总多糖的百分比。

[0156] 游离蛋白的测试

[0157] 通过胶束电动色谱(MEKC)模式下的毛细管电泳分离缀合物样品中的游离多糖,多糖-CRM197缀合物和游离CRM197。简而言之,将样品与含有25mM硼酸盐,100mM SDS,pH 9.3的MEKC运行缓冲液混合,并在预处理的裸露石英毛细管中分离。在200nm处监测分离,并用CRM197标准曲线对游离CRM197进行定量。游离蛋白结果报告为通过HPSEC/UV/MALS/RI方法测定的总蛋白含量的百分比。

[0158] 本发明还包含以下项目:

[0159] 1.一种纯化的多糖,其包含具有以下结构的重复单元:

[0160] 

[0161] 其中x表示0.0至1.0的摩尔比。

[0162] 2.根据项目1所述的多糖,其中所述多糖具有10至5000个重复单元。

[0163] 3.根据项目1所述的多糖,其中所述多糖具有150至2000个重复单元。

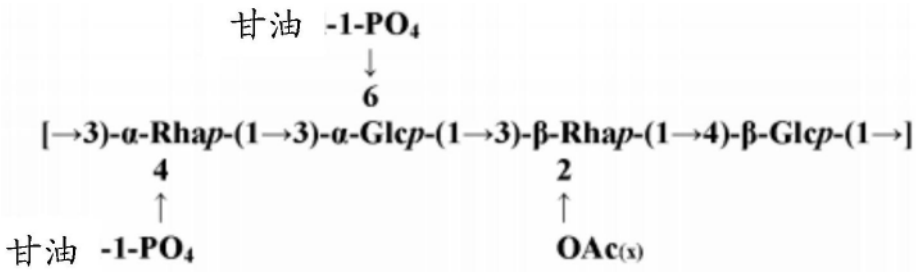
[0164] 4.根据项目1所述的多糖,其中所述多糖具有如通过MALS测定的50kDa至4000kDa的平均分子量。

[0165] 5.根据项目1所述的多糖,其中所述多糖具有如通过MALS测定的100kDa至3500kDa的分子量。

[0166] 6.根据项目1所述的多糖,其中x为0.5至1.0。

[0167] 7.根据项目6所述的多糖,其中x为0.7至1.0。

[0168] 8.一种由具有以下结构的重复单元的多糖制得的活化多糖:

[0169] 

[0170] 其中x表示0.0至1.0的摩尔比,并且所述多糖用化学试剂活化以产生用于缀合至接头或载体蛋白的反应性基团。

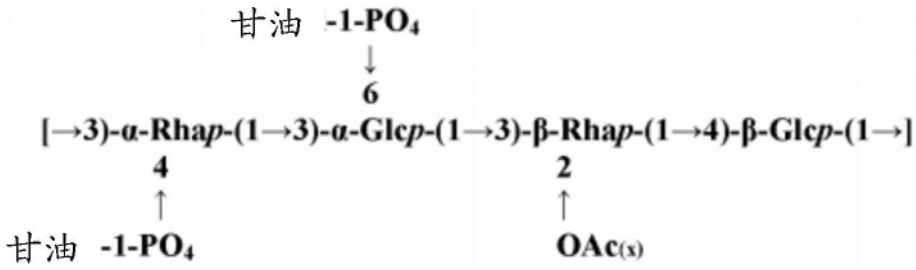
[0171] 9.根据项目8所述的活化多糖,其中所述活化发生在一个或多个甘油-1-PO_4糖上。

[0172] 10.根据项目8所述的活化多糖,其中所述多糖用高碘酸盐活化。

[0173] 11.根据项目10所述的活化多糖,其中所述活化发生在一个或多个所述甘油-1-PO_4糖的碳2位上。

[0174] 12.根据项目11所述的活化多糖,其中活化程度在各个所述甘油-1-PO_4糖上近似均等地发生。

[0175] 13.一种多糖-蛋白缀合物,其包含与载体蛋白缀合的具有以下结构的重复单元的多糖:

[0176] 

[0177] 其中x表示0至1.0的摩尔比。

[0178] 14.根据项目13所述的多糖-蛋白缀合物,其中所述载体蛋白是CRM197、白喉毒素片段B(DTFB)、DTFB C8、白喉类毒素(DT)、破伤风类毒素(TT)、TT片段C、百日咳类毒素、霍乱类毒素、大肠杆菌LT、大肠杆菌ST或铜绿假单胞菌的外毒素A。

[0179] 15.根据项目14所述的多糖-蛋白缀合物,其中所述载体蛋白是CRM197。

[0180] 16.根据项目15所述的多糖-蛋白缀合物,其中所述多糖-蛋白缀合物的分子量为1,000kDa至10,000kDa。

[0181] 17.根据项目15所述的多糖-蛋白缀合物,其中所述多糖-蛋白缀合物的多糖与蛋白的比率为0.4至2.0。

[0182] 18.根据项目13所述的多糖-蛋白缀合物,其中所述蛋白通过甘油-1-PO_4糖的碳2位与所述多糖缀合。

[0183] 19.一种免疫原性组合物,其包含项目13至18中任一项所述的多糖-蛋白缀合物;和药学上可接受的载体。

[0184] 20.根据项目19所述的免疫原性组合物,其还包含多糖-蛋白缀合物,所述多糖-蛋白缀合物包含与CRM197缀合的来自至少一种以下肺炎链球菌的血清型的荚膜多糖:1,2,3,4,5,6A,6B,6C,6D,7B,7C,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15A,15B,15C,17F,18C,19A,19F,20,21,22A,22F,23A,23B,23F,24F,27,28A,31,33F,34,35A,35B,35F和38。

[0185] 21.根据项目20所述的免疫原性组合物,其被配制为包含:0.4至4μg/mL的每种多糖,除了血清型6B多糖(如果存在)包含0.8至8μg/mL的多糖;和量为多糖总量的约0.5倍至3倍的CRM197载体蛋白。

[0186] 22.根据项目21所述的免疫原性组合物,其还包含150mM氯化钠,20mM L-组氨酸缓冲液和0.05至2%w/v表面活性剂。

[0187] 23.根据项目22所述的免疫原性组合物,其还包含佐剂。

[0188] 24.根据项目23所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂是铝基佐剂。

[0189] 25.根据项目24所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

[0190] 26.根据项目25所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂是磷酸铝。

[0191] 27.根据项目26所述的免疫原性组合物,其中磷酸铝佐剂以0.05至0.5mg/mL的浓度存在。

[0192] 28.根据项目27所述的免疫原性组合物,其还包含150mM氯化钠,20mM L-组氨酸缓冲液和0.05至2%w/v表面活性剂。

[0193] 29.一种诱导对肺炎链球菌荚膜多糖的免疫应答的方法,其包括向人施用免疫学有效量的项目19至28中任一项所述的免疫原性组合物。

[0194] 30.根据项目29所述的方法,其中所述免疫原性组合物是0.5mL的单剂量,其被配制为包含:2μg的每种多糖,除了血清型6B多糖(如果存在)是4μg;约32μg CRM197载体蛋白;0.125mg磷酸铝佐剂;150mM氯化钠,20mM L-组氨酸缓冲液和0.2%w/vPS-20。

[0195] 已经参考所附描述和附图描述了本发明的各种实施方式,应当理解,本发明不限于那些精确的实施方式,并且在不背离所附权利要求书中所限定的本发明的范围或精神的情况下,本领域技术人员可以在其中进行各种改变和修改。

[0196] 下列实施例说明但不限制本发明。

[0197] 实施例

[0198] 实施例1:肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0199] 培养肺炎球菌的方法是本领域众所周知的。参见例如Chase,1967,Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52。制备肺炎球菌荚膜多糖的方法也是本领域众所周知的。参见例如欧洲专利号EP 0 497 524B1。下文所述的方法通常遵循欧洲专利号EP 0 497 524B1中所述的方法,并且通常适用于所有肺炎球菌血清型,除非被特别修饰。

[0200] 肺炎球菌亚型16F的分离株(isolate)是从Merck Culture Collection获得的。如果需要,可以使用特定的抗血清根据Quelling反应区分亚型。参见例如,美国专利号5,847,112。通过在琼脂平板上分两个阶段连续铺板来进一步克隆分离所获得的分离株,琼脂平板由无动物成分的培养基组成,所述培养基含有大豆蛋白胨、酵母提取物和葡萄糖而不含血红素(hemin)。使用含有大豆蛋白胨、酵母提取物、HEPES、氯化钠、碳酸氢钠、磷酸钾、葡萄糖和甘油的无动物成分培养基在液体培养中进一步扩增每种血清型的克隆分离株以制备预主细胞库(pre-master cell banks)。

[0201] 每种血清型的肺炎球菌多糖的产生由细胞扩增和分批生产发酵组成,然后在下游纯化前进行化学灭活。使用装有预先消毒的无动物成分的生长培养基的摇瓶或培养瓶扩增来自各种血清型的解冻的细胞库小瓶,所述培养基含有大豆蛋白胨或大豆蛋白胨超滤液,酵母提取物或酵母提取物超滤液,HEPES,氯化钠,碳酸氢钠,磷酸钾和葡萄糖。细胞扩增培养物在密封的摇瓶或培养瓶中生长,以在温度和搅拌控制下最小化气体交换。在达到指定的培养密度后(通过600nm的光密度测量),将一部分细胞扩增培养物转移至含有预先灭菌的无动物成分的生长培养基的生产发酵罐中,所述培养基含有大豆蛋白胨或大豆蛋白胨超滤液,酵母提取物或酵母提取物超滤液,氯化钠,磷酸钾和葡萄糖。控制温度、pH、压力和搅拌。气流覆盖也得到控制,因为不使用鼓泡(sparging)。

[0202] 当葡萄糖几乎耗尽时,通过添加化学灭活剂苯酚终止分批发酵。加入纯苯酚至终浓度为0.8-1.2%,以灭活细胞并从细胞壁释放荚膜多糖。初级(primary)灭活发生在发酵罐中指定的时间内,其中继续控制温度和搅拌。在初级灭活后,将批料转移到另一个容器中,其中在受控的温度和搅拌下持续另外的指定时间以完全失活。这可以通过微生物铺板

技术或通过验证苯酚浓度和指定的时间来确认。然后纯化灭活的培养基(broth)。

[0203] Ps的纯化

[0204] 肺炎球菌多糖的纯化由多次离心、深度过滤、浓缩/渗滤操作和沉淀步骤组成。除非另有说明,所有步骤均在室温下进行。

[0205] 用阳离子聚合物(例如BPA-1000,Petrolite“Tretolite”和“Spectrum 8160”和聚(乙烯亚胺),“Millipore pDADMAC”)将来自肺炎链球菌的发酵罐培养物的灭活培养基絮凝。阳离子聚合物与杂质蛋白、核酸和细胞碎片结合。在絮凝步骤和老化阶段之后,通过离心和多次深度过滤步骤除去絮凝的固体。浓缩澄清的培养基,并使用100kDa至500kDa MWCO(分子量截留值)过滤器进行渗滤。渗滤是使用Tris,$MgCl_2$缓冲液和磷酸钠缓冲液完成的。渗滤去除了残留的核酸和蛋白质。

[0206] 通过用变性的醇和/或异丙醇使醋酸钠和苯酚中的多糖再沉淀,可以进一步去除杂质。在苯酚沉淀步骤中,将磷酸钠盐水缓冲液中的醋酸钠和苯酚(液化酚或固体酚)装入渗滤过的渗余物(retentate)中。然后分两个阶段进行多糖的酒精分馏。在第一阶段中,将低百分比的乙醇添加到制剂中,以沉淀细胞碎片和其他有害杂质,而粗多糖保留在溶液中。经由离心和之后的深度过滤步骤除去杂质。然后通过向批料中添加另外的异丙醇或变性醇从溶液中回收多糖。通过离心回收沉淀的多糖沉淀,将其研磨并干燥为粉末,并在-70℃下冷冻保存。

[0207] 实施例2:多糖的NMR结构分析

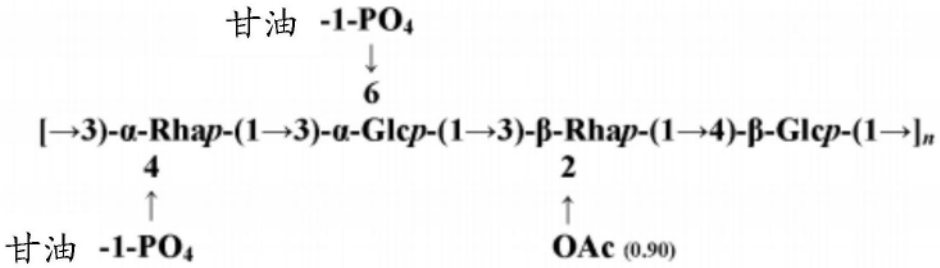
[0208] 确定多糖结构的策略包括基本上如Abeygunawardana等,Determination of the Chemical Structure of Complex Polysaccharides by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Advances in Biophysical Chemistry 1993,Vol 3,pages 199-249,JAI Press Inc所述进行的多步骤过程。使用标准的1D和2D NMR技术检测纯化的多糖。由于来自肺炎链球菌16F血清型的多糖被鉴定为含有O-乙酰基,因此对脱O-乙酰化多糖进行了详细分析(使用碱水解除去O-醋酸酯基)。最后,使用^{31}P NMR检测多糖中磷酸酯的存在。

[0209] 单糖残基的分配(assignment)通过^{1}H-^{1}H COSY、双量子过滤同核COSY和总相关光谱法(TOCSY)进行。通过异核单量子相干光谱法(HSQC)和HSQC-TOCSY组合确定^{13}C化学位移。多重编辑的HSQC用于区分亚甲基和次甲基。通过HMBC和NOESY光谱法的组合确定残基间键(Inter-residue linkage)。

[0210] 纯化的肺炎链球菌血清型16F多糖的^{1}H NMR谱显示一个O-甲基共振,表明一个位点处的O-乙酰化。通过分析由于O-乙酰化作用引起的化学位移变化来确定O-乙酰基在纯化的多糖上的位置。0.8-0.5ppm的大的低场(downfield)^{1}H化学位移变化表示O-乙酰基取代。长程(long range)C-H异核多键相关(HMBC)和^{13}C NMR光谱法将羰基分配给了它们各自的残基。

[0211] 1D磷NMR光谱表明,血清型16F多糖的结构中含有磷。将磷键合位点分配给多糖的去磷酸化形式是通过^{1}H-^{31}P HMBC光谱和化学位移差异的组合来完成的。

[0212] 根据图2A,3,4和5中的NMR数据,确定来自血清型16F的肺炎链球菌荚膜多糖的结构如下:

[0213] 

[0214] 其中n表示构成多糖的重复单元的数目。

[0215] 血清型16F多糖的糖残基包括鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glc)和甘油。

[0216] 斜体字母(p和f)表示吡喃糖(由六个原子组成的闭环)和呋喃糖(由五个原子组成的闭环)。血清型16F多糖中的任何一种糖都不是呋喃糖形式。

[0217] α和β是指与糖单元的异头碳相连的质子的构型。当标记糖单元中的碳原子时(通常为1至6),异头碳始终为1。α表示异头质子是在3D结构中的赤道位置。β表示异头质子是在轴向位置。

[0218] 与箭头相关的数字表示各个糖单元如何相互连接。例如,命名法α-Rhap-(1→3)-α-Glcp-表示鼠李糖的1号碳与葡萄糖的3号碳相连(p表示它们都是吡喃糖环)。

[0219] 与OAc相关联的0.90表示约90%的重复单元在该位置具有O-乙酰基。

[0220] 实施例3:在水溶液中使用还原胺化将肺炎链球菌血清型16F多糖缀合至CRM197

[0221] 将多糖溶解,减小尺寸,化学活化并通过超滤进行缓冲液交换。然后在反应混合物中使用氯化镍将纯化的CRM197与活化多糖缀合,在最终0.2微米过滤之前,通过超滤纯化所得的缀合物。控制每个步骤中的多个过程参数,例如pH、温度、浓度和时间,以产生具有期望属性的缀合物。

[0222] 多糖尺寸减小和氧化

[0223] 将纯化的肺炎球菌荚膜多糖粉末溶解在水中,并进行0.45微米过滤。将溶解的多糖均质化以降低分子量。将均质压力和通过均质器的次数控制为200bar/通过5次,然后是500bar/通过5次以减小尺寸至目标分子量。然后将尺寸减小的多糖浓缩并使用10kDa NMWCO切向流超滤膜用水进行渗滤。

[0224] 然后用醋酸钠缓冲液将多糖溶液调节至22℃和pH 5,以最小化由于活化引起的多糖尺寸减小。通过添加100mM偏高碘酸钠溶液来引发多糖活化。偏高碘酸钠的添加量为每摩尔多糖重复单元0.15摩尔偏高碘酸钠,以达到多糖活化的目标水平(每摩尔多糖重复单元的摩尔醛数)。氧化反应在22℃下进行2小时。

[0225] 将活化产物使用10kDa NMWCO切向流超滤膜用10mM磷酸钾(pH 6.4)进行渗滤。超滤在2-8℃下进行。

[0226] 多糖与CRM197缀合

[0227] 将氧化的多糖溶液与水和1.5M磷酸钾(pH 7.0)混合。选择的缓冲液pH值是为了提高缀合反应过程中活化多糖的稳定性。将如前所述(WO 2012/173876 A1)通过在荧光假单胞菌中表达而获得的纯化的CRM197进行0.2微米过滤,并在多糖与CRM197的质量比为0.7的条件下与缓冲多糖溶液合并。选择质量比以控制所得缀合物中多糖与CRM197的比率。多糖和磷酸盐的浓度分别为7.5g/L和100mM。选择多糖浓度以控制所得缀合物的尺寸。然后将溶液进行0.2微米过滤。使用100mM氯化镍溶液将氯化镍添加至约2mM。加入氰基硼氢化钠(每

摩尔多糖重复单元2摩尔)。缀合进行122小时以最大程度地消耗多糖和蛋白质。

[0228] 用硼氢化钠还原

[0229] 缀合反应后,将批料稀释至多糖浓度为约3.0g/L,冷却至2-8℃,并进行1.2微米过滤。批料使用100kDa NMWCO切向流超滤膜在2-8℃下用100mM磷酸钾(pH 7.0)进行渗滤。然后将在渗余物(retentate)中回收的批料稀释至约2.0g多糖/L,并通过添加1.2M碳酸氢钠(pH 9.4)进行pH调节。加入硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元1摩尔)。随后加入1.5M磷酸钾(pH 6.0)。

[0230] 最终过滤和产品存储

[0231] 然后将批料浓缩,并在4℃下使用300kDa NMWCO切向流超滤膜用在150mM氯化钠(pH 7.0)中的10mM L-组氨酸进行渗滤。将聚山梨醇酯20添加到渗余物批料中至0.05%(w/v)的浓度,然后将该批料进行0.2微米过滤。

[0232] 用另外的在含0.03%(w/v)聚山梨醇酯20的150mM氯化钠(pH7.0)缓冲液中的10mM L-组氨酸将批料调整为多糖浓度1.0g/L。将批料分配成等分试样,并在≤-60℃下冷冻。

[0233] 表1显示了在水性条件下根据上述方法制备的肺炎链球菌血清型16F缀合物的属性。

[0234] 表1水性缀合的肺炎链球菌血清型16F缀合物的属性

[0235]

氧化的 Ps Mw	缀合物 Mw	Ps:Pr	赖氨酸消耗 (mol/ mol CRM197)	游离 Ps / 总 Ps	游离蛋白 / 总蛋白
139 kD	5539 kD	1.1	3.3	7%	0.6%

[0236] 实施例4:鉴定肺炎链球菌血清型16F多糖上的活化位点

[0237] 肺炎链球菌血清型16F多糖上的活化位点是通过使(水合)醛与氨基硫脲(TSC)在5mM柠檬酸盐缓冲液在pH 5下反应来鉴定的。TSC与醛(以及水合醛)反应形成亚胺(二级醛亚胺(secondary aldimine))。形成的亚胺质子具有独特的化学位移,该化学位移是多糖信号的低场,并用于探测多糖的氧化位点。

[0238] 将氧化的血清型16F多糖(如实施例3所述制备)用柠檬酸钠缓冲液(pH 5)稀释至10mM的浓度,然后与氨基硫脲(终浓度60mM)反应,在环境温度下连续混合24小时,然后冻干。将冻干的样品溶于0.9mL氧化氘中,用于NMR分析。

[0239] 使用低温冷却的探针在600MHz下于27℃的探针温度下进行NMR实验。使用具有16个瞬态(transient)的90度脉冲和脉冲之间的10秒延迟(包括3秒的采集时间)来采集1D质子谱。TOCSY和梯度COSY数据分别用第一维度上的4个瞬态和第二维度上的256和512增量来采集。用32个瞬态和512个增量采集了多重编辑的gHSQCAD。

[0240] 1D质子谱显示亚胺信号为线形相似并且峰高在～7.48和7.49ppm处的重叠三重态(图2B)。gCOSY和TOCSY数据显示了从亚胺信号到以4.57ppm为中心的信号的交叉峰。根据gHSQCAD数据,在质子化学位移～4.57ppm处观察到三个信号,但碳化学位移不同(图6和7)。～107ppm(碳)处的低场信号是β-葡萄糖的异头碳。在67.16和67.41ppm处的其他信号被识别为亚甲基(在多重编辑的gHSQCAD实验中,亚甲基碳具有次甲基和甲基碳的反相)。1D光谱中亚胺信号(7.48和7.49ppm)的重叠三重态以及与亚甲基信号(～4.57ppm ^{1}H,～61.16,

67.41ppm ^{13}C)的相关性识别了磷酸甘油侧链的氧化位点(图8A-E)。亚胺信号的峰高的相似性表明两个磷酸甘油基团都具有相似的氧化水平。

[0241] 实施例5:在二甲基亚砜中使用还原酰胺化将肺炎链球菌血清型16F多糖缀合至CRM197

[0242] 将多糖溶解,尺寸至目标分子量,化学活化并通过超滤进行缓冲液交换。将活化多糖和纯化的CRM197分别冻干,然后再溶解在二甲基亚砜(DMSO)中。然后将再溶解的多糖和CRM197溶液合并,并如下所述进行缀合。在最终的0.2微米过滤之前,通过超滤纯化所得的缀合物。控制每个步骤中的多个过程参数,例如pH、温度、浓度和时间,以产生具有期望属性的缀合物。

[0243] 多糖尺寸减小和氧化

[0244] 将纯化的肺炎球菌荚膜Ps粉末溶于水,并进行0.45微米过滤。将溶解的多糖均质化以尺寸减小Ps的分子量。均质压力和通过均质器的次数控制为800-1000bar/通过5次。

[0245] 浓缩尺寸减小的多糖,并使用5或10kDa NMWCO切向流超滤膜用水进行渗滤。

[0246] 然后用醋酸钠缓冲液将多糖溶液调节至22℃和pH 5,以最小化由于活化引起的多糖尺寸减小。通过添加100mM偏高碘酸钠溶液来引发多糖活化。偏高碘酸钠的添加量为每摩尔多糖重复单元0.18摩尔偏高碘酸钠,以达到多糖活化的目标水平(每摩尔多糖重复单元的摩尔醛数)。氧化反应在22℃下进行2小时。

[0247] 将活化产物用10mM磷酸钾(pH 6.4)进行渗滤,然后使用5或10kDa NMWCO切向流超滤膜用水进行渗滤。超滤在2-8℃下进行。

[0248] 多糖与CRM197缀合

[0249] 将如前所述(WO 2012/173876 A1)通过在荧光假单胞菌中表达而获得的纯化的CRM197使用5kDa NMWCO切向流超滤膜用2mM磷酸盐(pH 7.0)缓冲液进行渗滤,并进行0.2微米过滤。

[0250] 以6mg Ps/mL、蔗糖浓度为5%w/v配制活化多糖用于冻干。以6mg Pr/mL、蔗糖浓度为1%w/v配制CRM197用于冻干。

[0251] 将配制的Ps和CRM197溶液分别冻干。将冻干的Ps和CRM197材料分别再溶解在等体积的DMSO中。多糖溶液中加入(spike)氯化钠至浓度为25-50mM。将多糖和CRM197溶液共混,以达到1.5-2.0g Ps/L(克多糖/升)的多糖浓度和1.5的多糖与CRM197的质量比。选择质量比以控制所得缀合物中多糖与CRM197的比率。加入氰基硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元1摩尔),并在22℃下缀合进行2小时。

[0252] 用硼氢化钠还原

[0253] 缀合反应后,添加硼氢化钠(每摩尔多糖重复单元2摩尔),并在22℃下孵育1小时。将该批料在约4℃下稀释到含约0.025%(w/v)聚山梨醇酯20的150mM氯化钠中。然后加入磷酸钾缓冲液以中和pH。对于某些批次,将批料浓缩,并在约4℃下使用30kD NMWCO切向流超滤膜用150mM氯化钠,25mM磷酸钾(pH 7)进行渗滤。

[0254] 最终过滤和产品存储

[0255] 然后将该批料浓缩,并在4℃下使用300kDa NMWCO切向流超滤膜用含0.015%(w/v)聚山梨醇酯20的150mM氯化钠(pH 7.0)中的10mM组氨酸进行渗滤。

[0256] 将渗余物批料进行0.2微米过滤,然后用另外的含0.015%(w/v)聚山梨醇酯20的

150mM氯化钠(pH 7.0)中的10mM组氨酸稀释,分配成等分试样,并在≤-60℃下冷冻。

[0257] 表2显示了根据以上描述的方法在DMSO中制备的肺炎链球菌血清型16F缀合物的属性。

[0258] 表2DMSO缀合的肺炎链球菌血清型16F缀合物的属性

[0259]

氧化的 Ps Mw	缀合物 Mw	Ps:Pr	赖氨酸消耗 (mol/ mol CRM197)	游离 Ps / 总 Ps	游离蛋白 / 总蛋白
177 kD	3966 kD	1.29	11.0	0.3%	<1%
110 kD	4460 kD	1.23	11.2	0.3%	<1%

[0260] 实施例6:单价缀合物的配制

[0261] 如实施例3所述制备肺炎球菌多糖-CRM197缀合物。基于批料体积和各种的大的多糖的浓度,计算获得各种血清型的目标浓度所需的大的缀合物的期望体积。将各种血清型与赋形剂组合,无菌过滤并在混合条件下添加到APA中。每种单价缀合物疫苗的终浓度为4μg/mL(w/v PnPs),其中含有20mM组氨酸,150mM NaCl,0.2%(w/v)PS-20和0.250mg/mL(w/v Al)以APA的形式。

[0262] 实施例7:单价缀合物新西兰白兔免疫原性研究

[0263] 在新西兰白兔(NZWR)模型中评估了单价缀合物的免疫原性。在第0天和第14天(交替侧)用0.25ml相应的单价缀合物疫苗肌内(IM)免疫成年新西兰白兔(NZWR,n=3/组)。单价肺炎球菌疫苗以每次免疫1μg PnPs(与CRM197缀合的肺炎链球菌血清型16F多糖)与62.5μg磷酸铝佐剂(APA)给药。在研究开始前(免疫前)和第14天(给药1后,PD1)和第28天(给药2后,PD2)收集血清。至少每天由训练有素的动物护理人员观察NZWR,看是否有任何疾病或困扰的迹象。NZWR中的疫苗制剂被认为是安全且耐受性良好的。所有动物实验均严格按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)《实验动物的护理和使用指南》中的建议进行。NZWR实验方案得到了Merck&Co.,Inc(Kenilworth,NJ)和Covance(Denver,PA)两者的机构动物护理和使用委员会的批准。

[0264] 使用1-2mg/ml的相应PnPs包被浓度在ELISA测定中测试NZWR血清,以评估IgG的免疫原性。根据前述方案,通过调理吞噬作用测定法(OPA)确定功能性抗体。参见例如Caro-Aguilar等,2017,Vaccine 35:865-72和Burton等,2006,Clin Vaccine Immunol13(9):1004-9。

[0265] 发现含肺炎链球菌血清型16F多糖的单价肺炎球菌缀合物疫苗在兔子中均具有免疫原性(图9),并产生杀死相应细菌菌株的功能性抗体(图10)。

[0266] 实施例8:用于兔多价研究的肺炎球菌缀合物疫苗的配制由不同缀合物大的共混物制剂组成的多价肺炎球菌缀合物疫苗(包含来自肺炎链球菌血清型16F,23A,23B,24F和31)通过使用肺炎球菌多糖-CRM197缀合物制备,并以每种血清型4μg/mL,总多糖浓度为84μg/mL在20mM组氨酸pH 5.8和150mM氯化钠和0.1%w/v聚山梨醇酯20(PS-20)中制备。通过分别将CRM197蛋白与肺炎球菌多糖(PnPs)类型(包括来自肺炎链球菌血清型16F,23A,23B,24F和31)缀合来制备缀合物。基于批料体积和各种的大的多糖的浓度,计算获得各种血清型目标浓度所需的大的缀合物的期望体积。将各种缀合物添加到组氨酸、氯化钠和聚山梨

醇酯-20(PS-20)的溶液中,以创建缀合物共混物。使用磁力搅拌棒将包含缀合物共混物的配制容器混合,并无菌过滤到另一个容器中。然后将制剂装入塑料注射器,玻璃注射器或小瓶中,并在2-8℃下储存。

[0267] 实施例9:多价肺炎球菌缀合物疫苗在新西兰白兔中的免疫原性

[0268] 在第0天和第14天(交替侧)用0.5ml实施例8中所述的多价肺炎球菌缀合物疫苗肌内免疫(IM)成年新西兰白兔(NZWR,n=5/组)。多价肺炎球菌缀合物疫苗以每次免疫接种2μg每种缀合的PnPs给药。在研究开始前(免疫前)和第14天(给药1后,PD1)和第28天(给药2后,PD2)收集血清。至少每天由训练有素的动物护理人员观察NZWR,看是否有任何疾病或困扰的迹象。NZWR中的疫苗制剂被认为是安全且耐受性良好的。所有动物实验均严格按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)《实验动物的护理和使用指南》中的建议进行。NZWR实验方案得到了Merck&Co.,Inc和Covance(Denver,PA)两者的机构动物护理和使用委员会的批准。

[0269] 使用多重电化学发光(ECL)测定评估NZWR血清的IgG免疫原性。基于Marchese等(Optimization and validation of a multiplex,electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum.Clin Vaccine Immunol.16(3):387-96(2009))描述的人测定使用由MesoScale Discovery(MesoScale Diagnostics,LLC的分公司,Gaithersburg,MD)开发的采用在电化学刺激下发光的SULFO-TAG™标记的技术,开发了该测定法用于与兔血清一起使用。SULFO-TAG™标记的抗兔IgG用作测试NZWR血清样品的二抗。使用Opsotiter®3软件(UAB Research Foundation,Caro-Aguilar等,2017,同上,Burton等,2006,同上)基于先前描述的可在Birmingham的University of Alabama的Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory网络在线获得的方案,通过多重调理吞噬作用测定法(MOPA)确定功能性抗体。

[0270] 发现在多价肺炎球菌缀合物疫苗中由肺炎链球菌血清型16F,23A,23B,24F和31制备的多糖-蛋白缀合物在兔子的给药1后(PD1)和给药2后(PD2)两者中均具有免疫原性(图11)。它们还产生了杀死疫苗型细菌菌株的功能性抗体(图12)。与免疫前的兔血清相比,用2μg剂量的多价肺炎球菌缀合物疫苗免疫的兔子对四种血清型具有显著更高的PD1 MOPA滴度(图12)。与免疫前的兔血清相比,用2μg剂量的多价肺炎球菌缀合物疫苗免疫的兔子对所有五种血清型具有显著更高的PD2 MOPA滴度(图12)。通过单向方差分析和Dunnett检验分析对数转换后的数据,以确定其显著性。

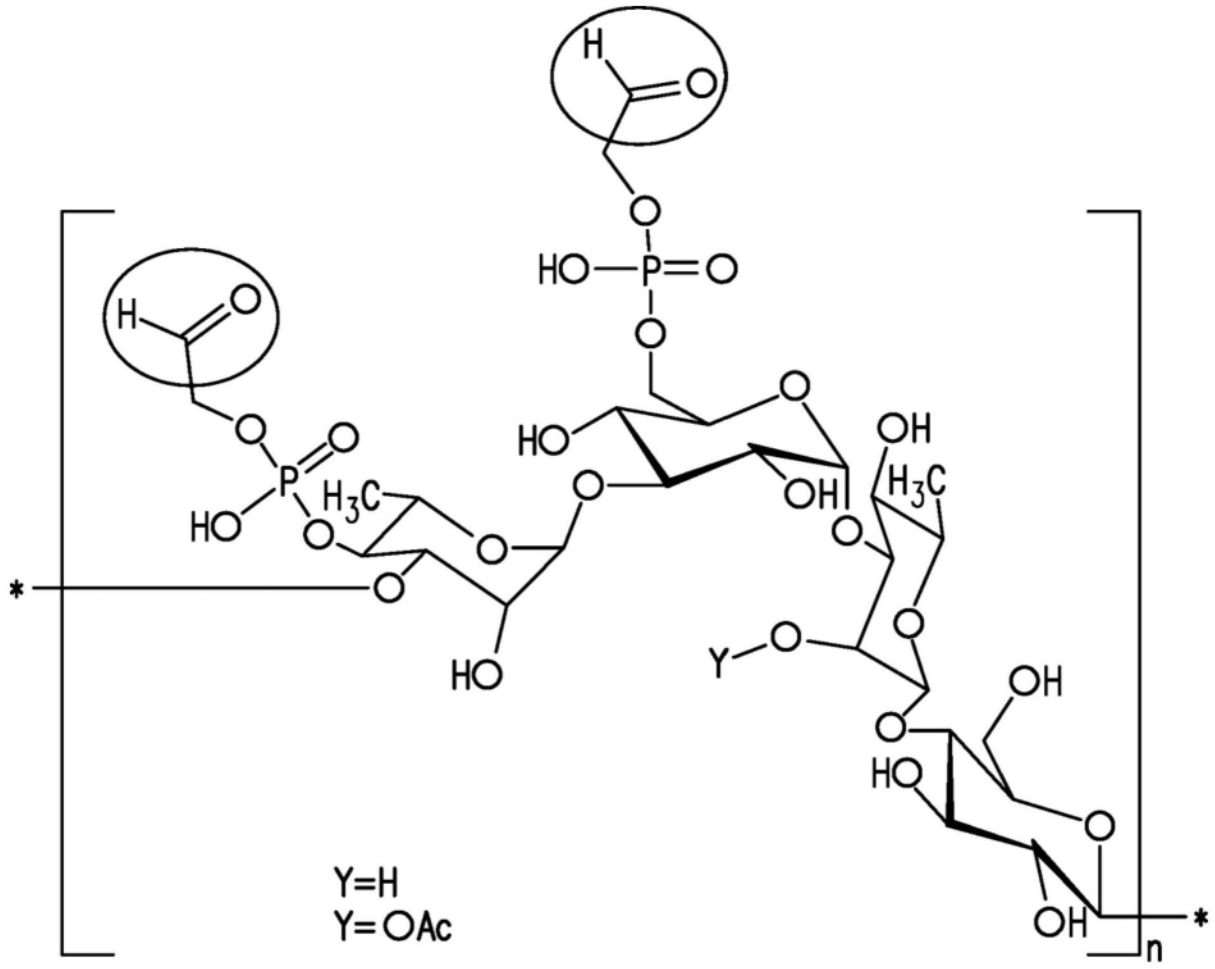


图1

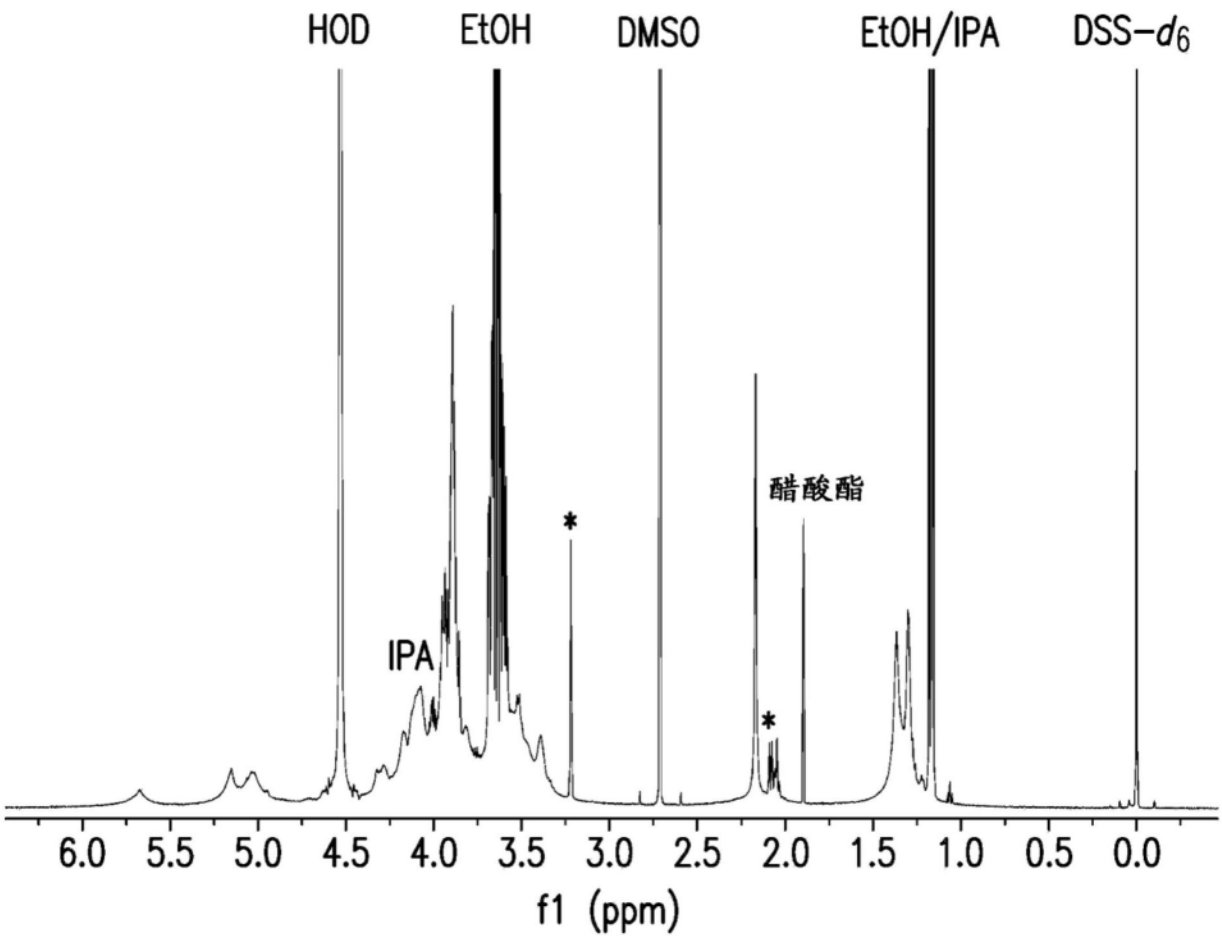

HOD
EtOH
DMSO
EtOH/IPA
DSS-d_6
醋酸酯
IPA
*
*
6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

图2A

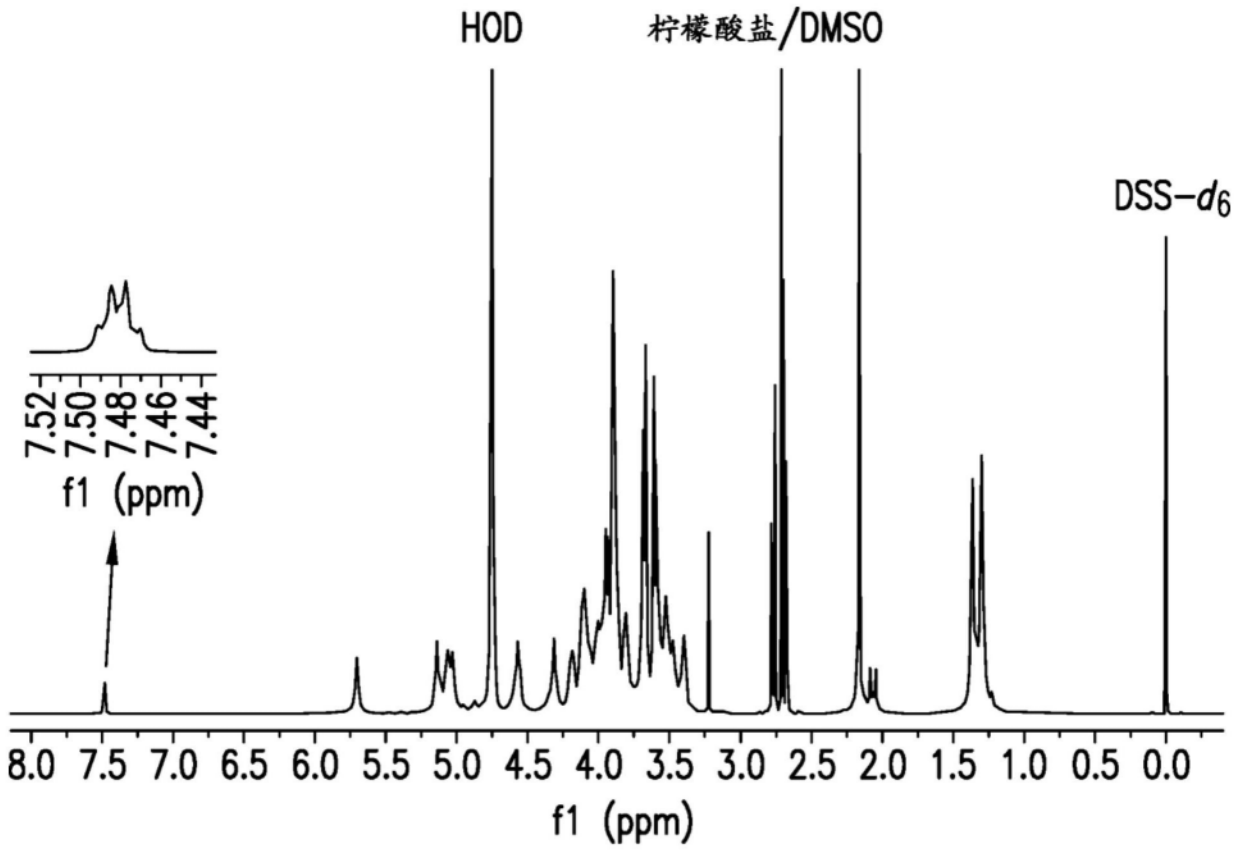

HOD
柠檬酸盐/DMSO
DSS-d_6
7.52
7.50
7.48
7.46
7.44
f1 (ppm)
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

图2B

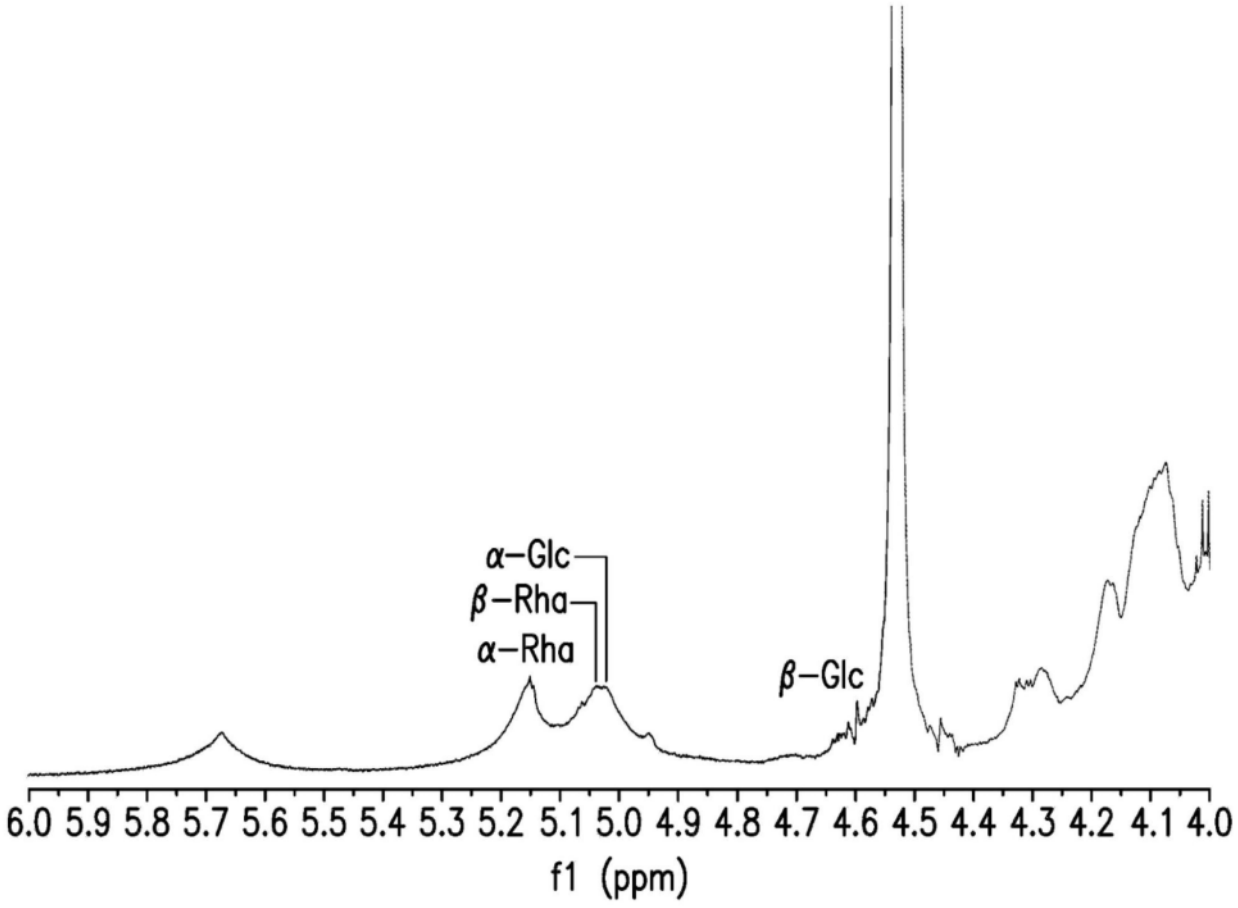

α–Glc
β–Rha
α–Rha
β–Glc
6.0 5.9 5.8 5.7 5.6 5.5 5.4 5.3 5.2 5.1 5.0 4.9 4.8 4.7 4.6 4.5 4.4 4.3 4.2 4.1 4.0
f1 (ppm)

图3

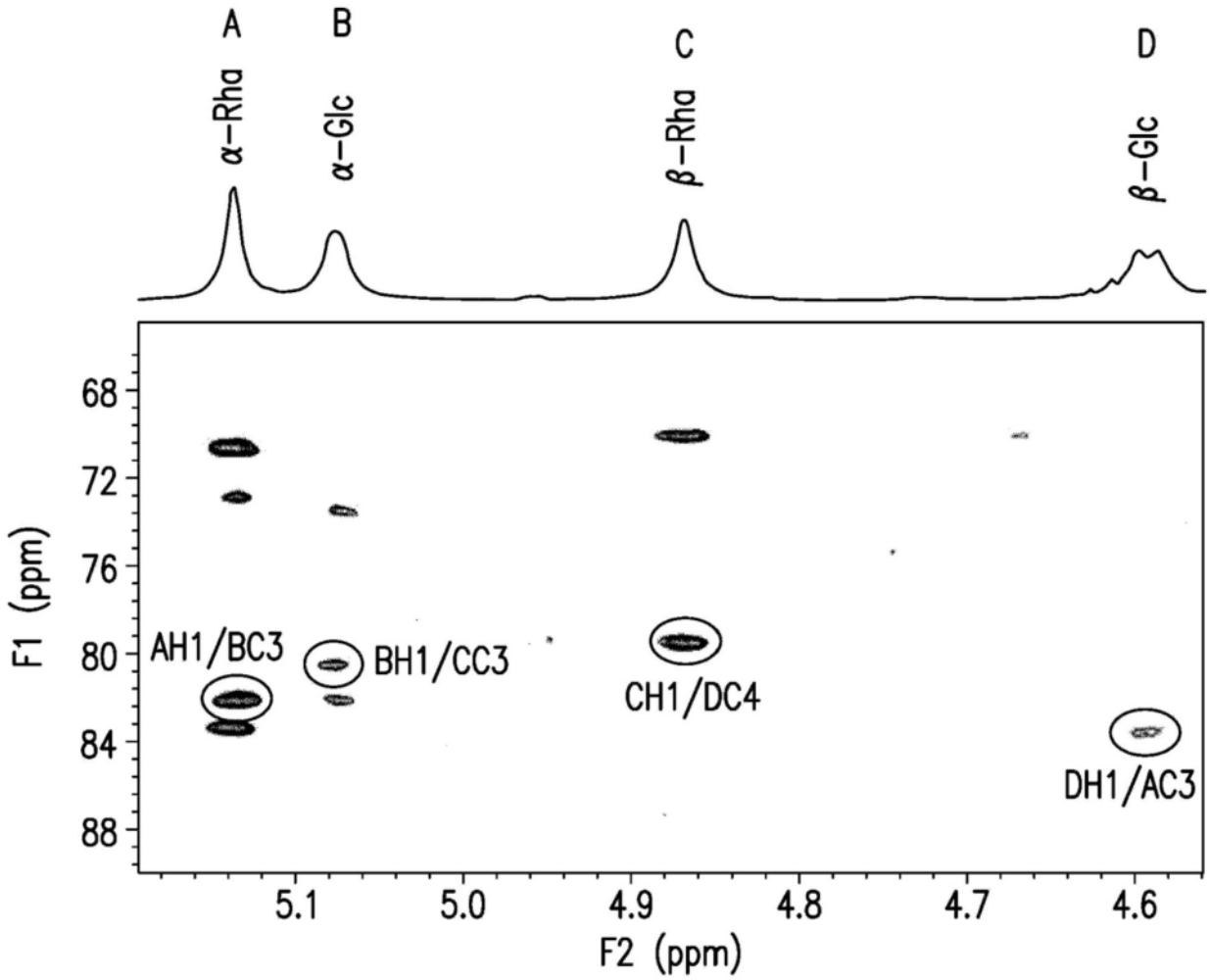

A
α-Rha
B
α-Glc
C
β-Rha
D
β-Glc
68
72
76
80
84
88
F1 (ppm)
AH1/BC3
BH1/CC3
CH1/DC4
DH1/AC3
5.1
5.0
4.9
4.8
4.7
4.6
F2 (ppm)

图4

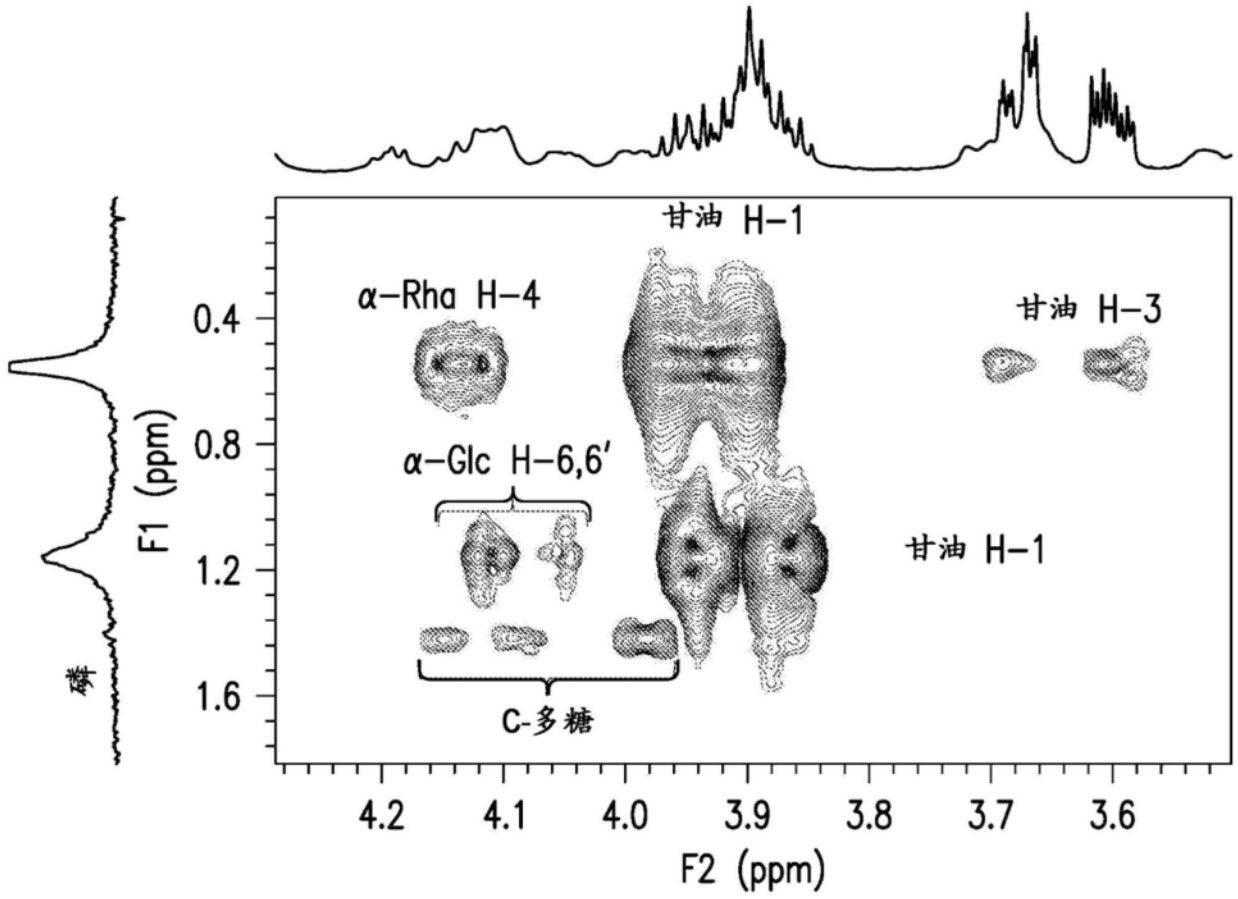

甘油 H-1
α-Rha H-4
甘油 H-3
α-Glc H-6,6′
甘油 H-1
C-多糖
F1 (ppm)
0.4
0.8
1.2
1.6
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
F2 (ppm)

图5

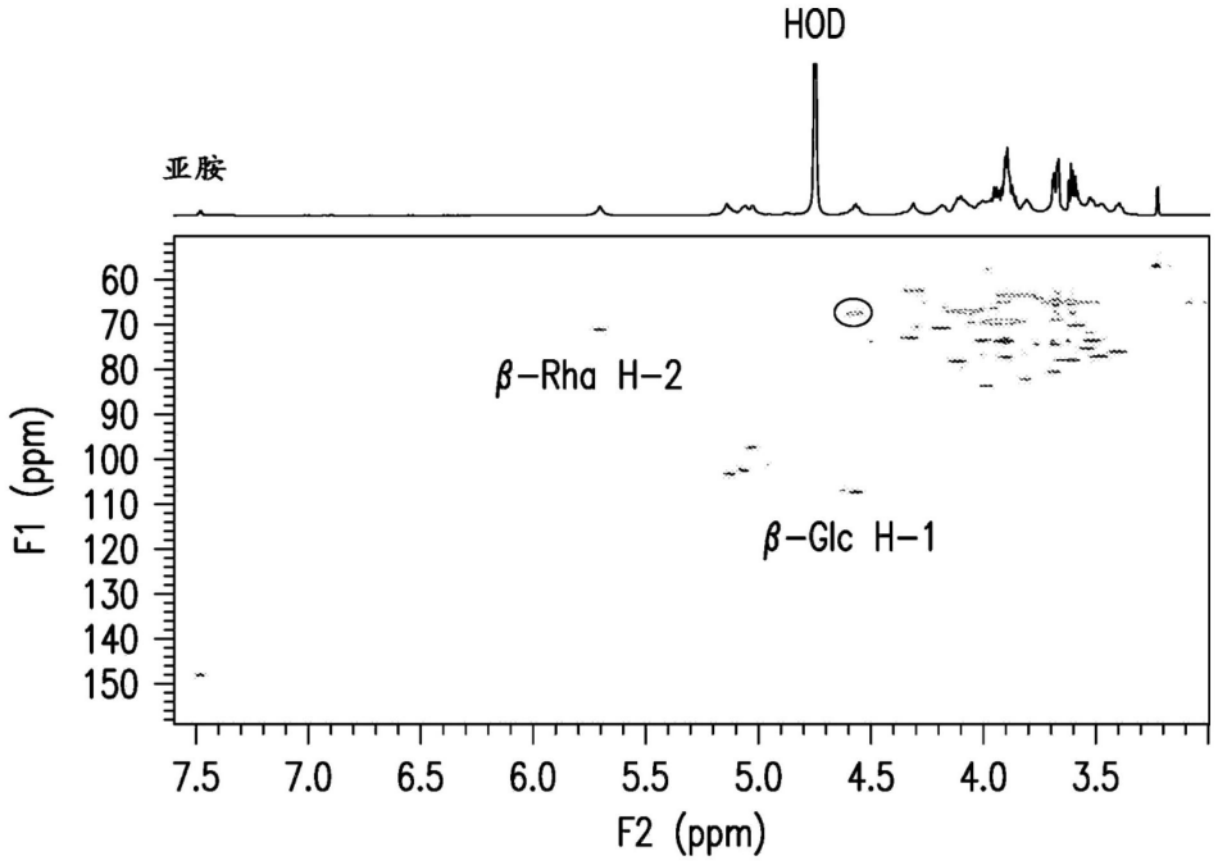

HOD
亚胺
β-Rha H-2
β-Glc H-1
F1 (ppm)
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
F2 (ppm)

图6

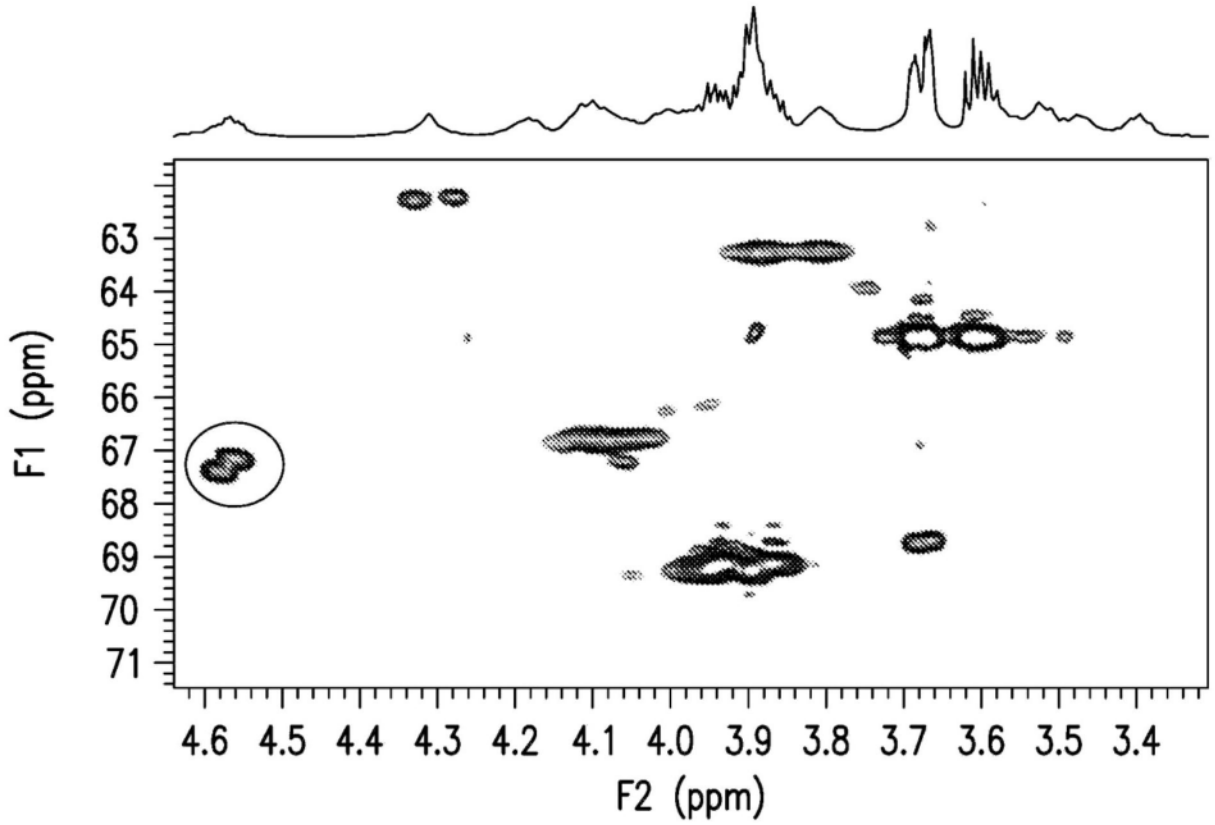

63
64
65
66
67
68
69
70
71
F1 (ppm)
4.6 4.5 4.4 4.3 4.2 4.1 4.0 3.9 3.8 3.7 3.6 3.5 3.4
F2 (ppm)

图7

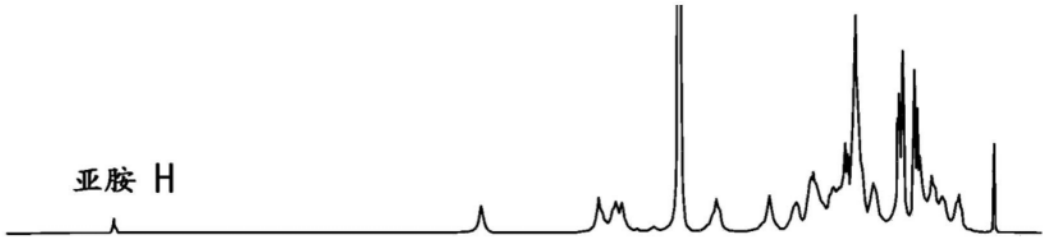

亚胺 H

图8A

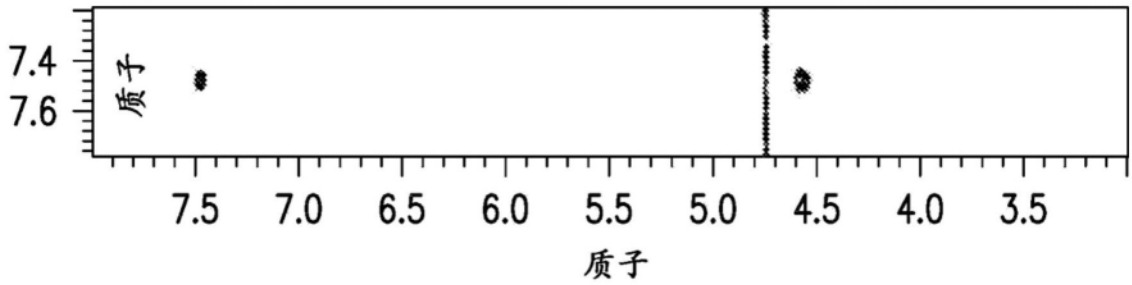

7.4
7.6
质子
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5
质子

图8B

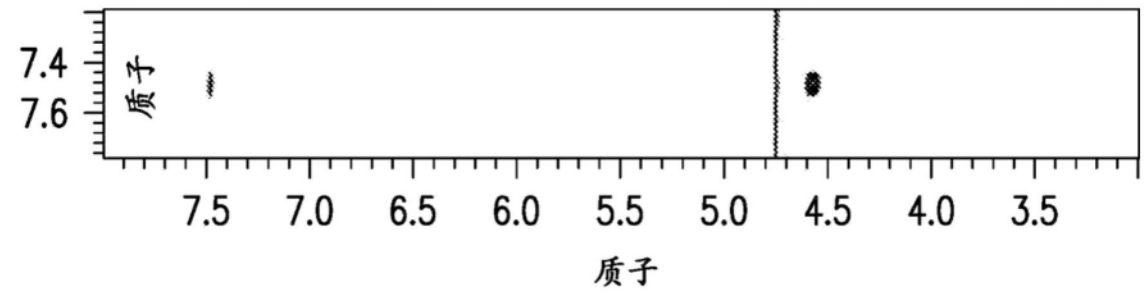

7.4
7.6
质子
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5
质子

图8C

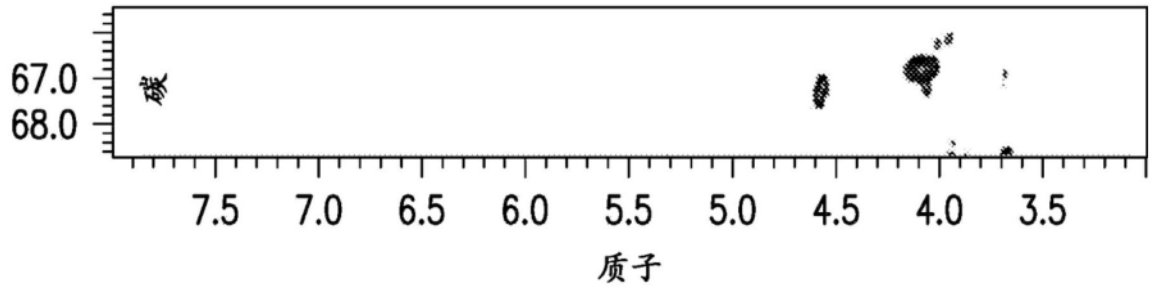

67.0
68.0
碳
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5
质子

图8D

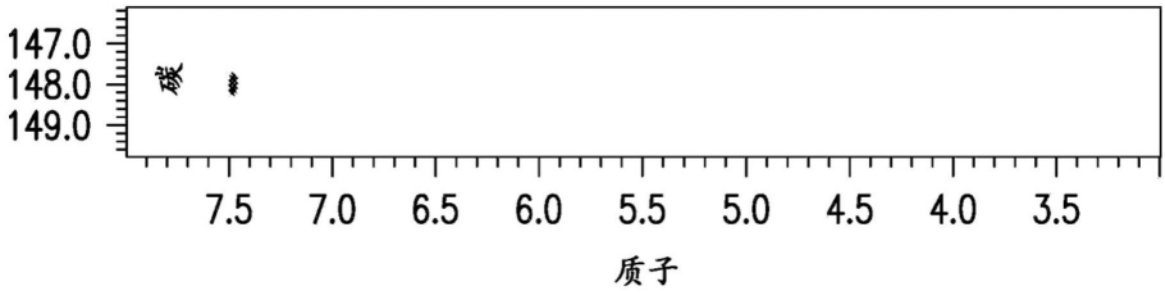

147.0
148.0
149.0
碳
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5
质子

图8E

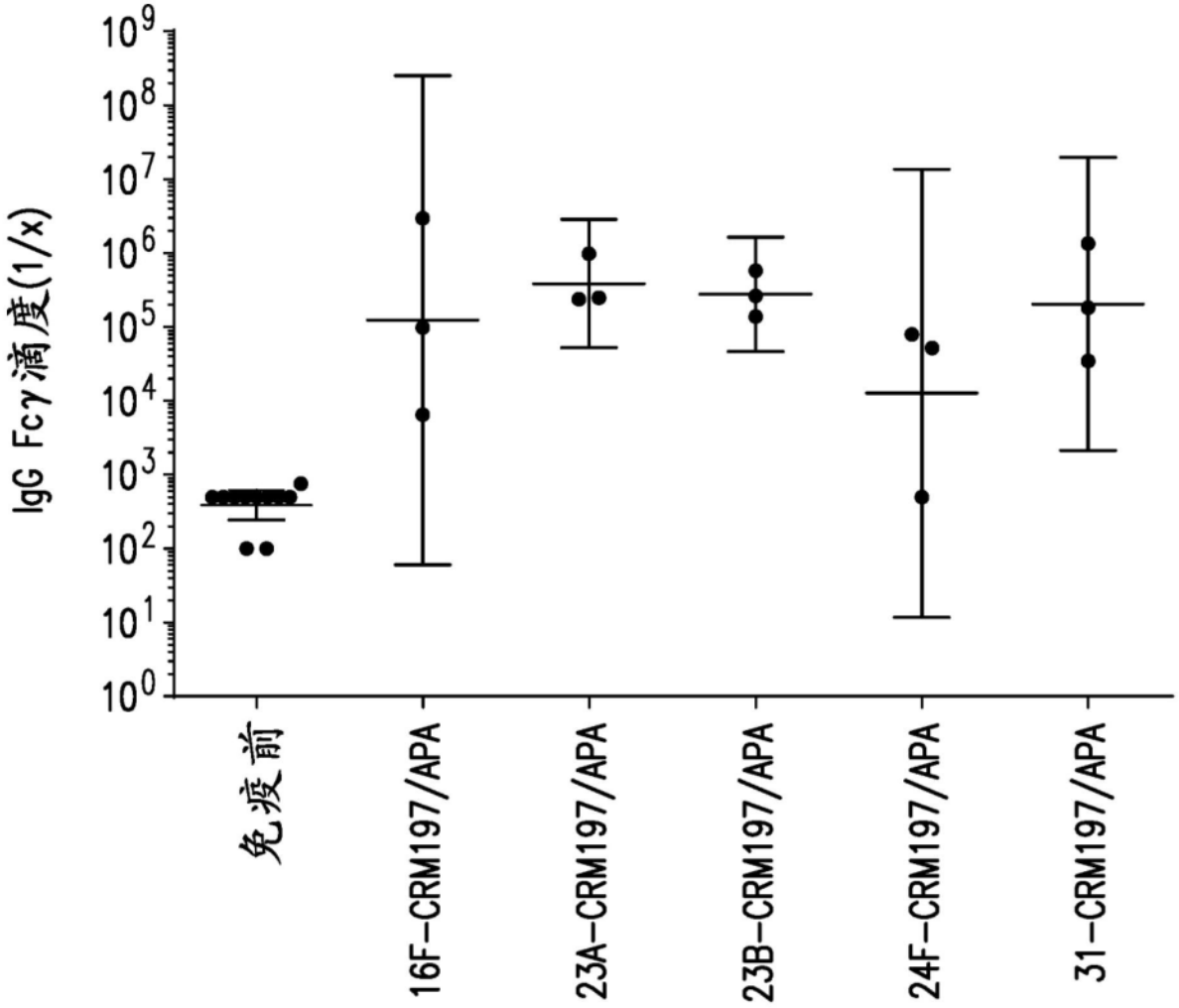

IgG Fcγ滴度(1/x)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
免疫前
16F-CRM197/APA
23A-CRM197/APA
23B-CRM197/APA
24F-CRM197/APA
31-CRM197/APA

图9

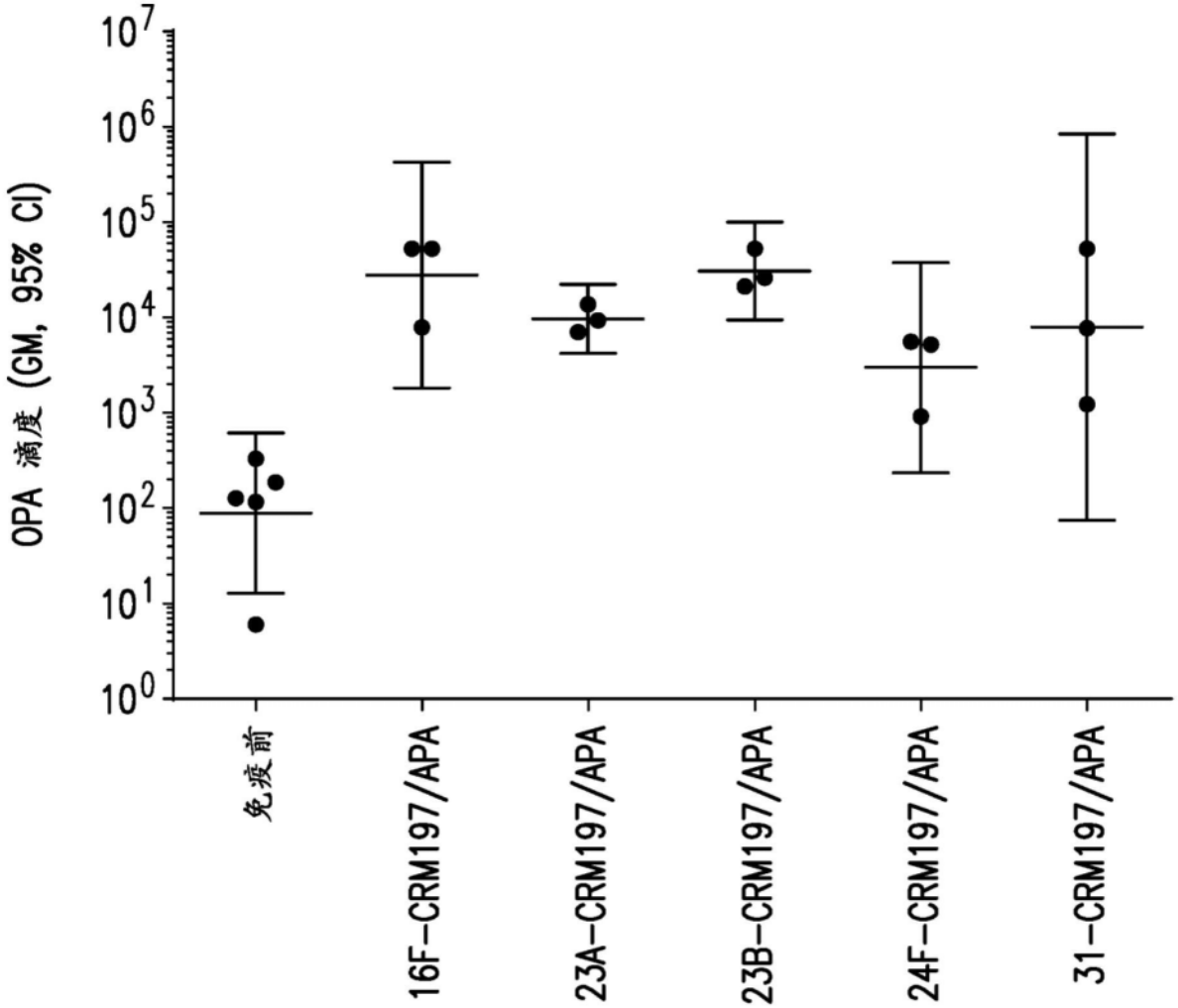

OPA 滴度 (GM, 95% CI)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
免疫前
16F-CRM197/APA
23A-CRM197/APA
23B-CRM197/APA
24F-CRM197/APA
31-CRM197/APA

图10

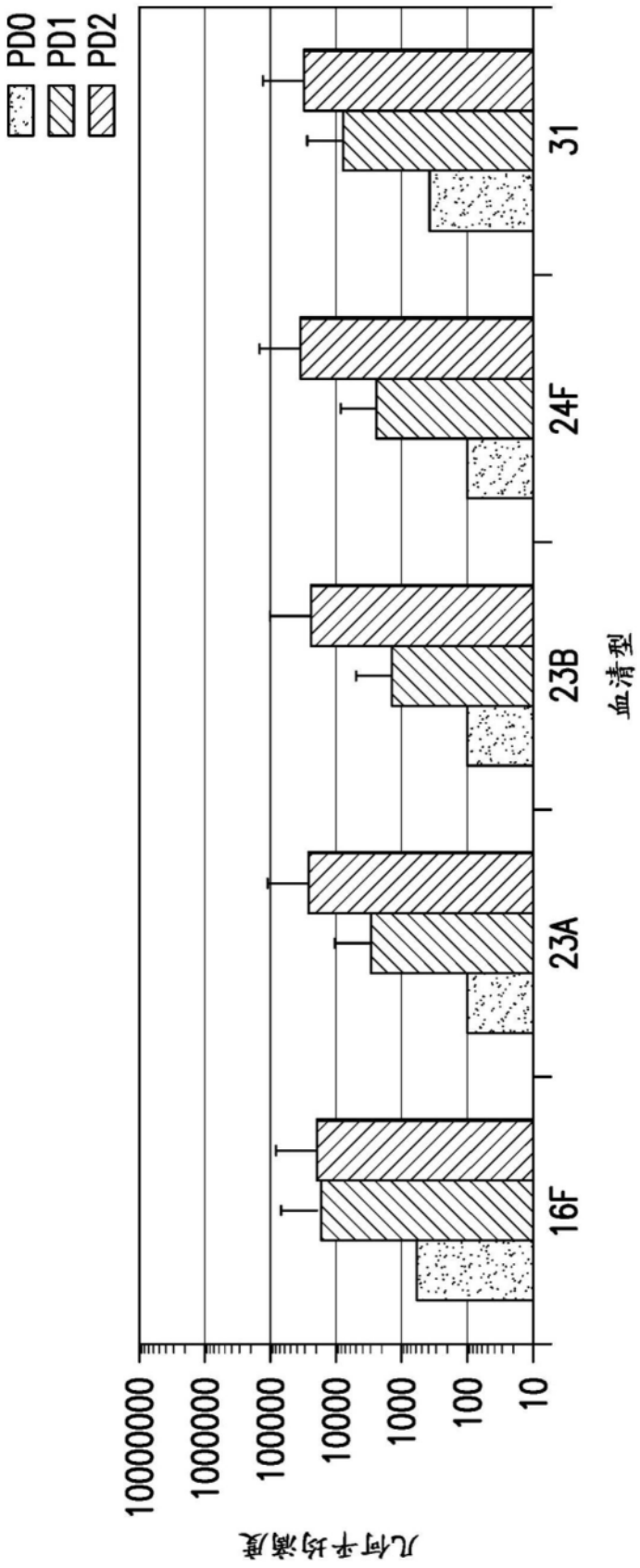

PD0
PD1
PD2
几何平均滴度
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
16F
23A
23B
24F
31
血清型

图11

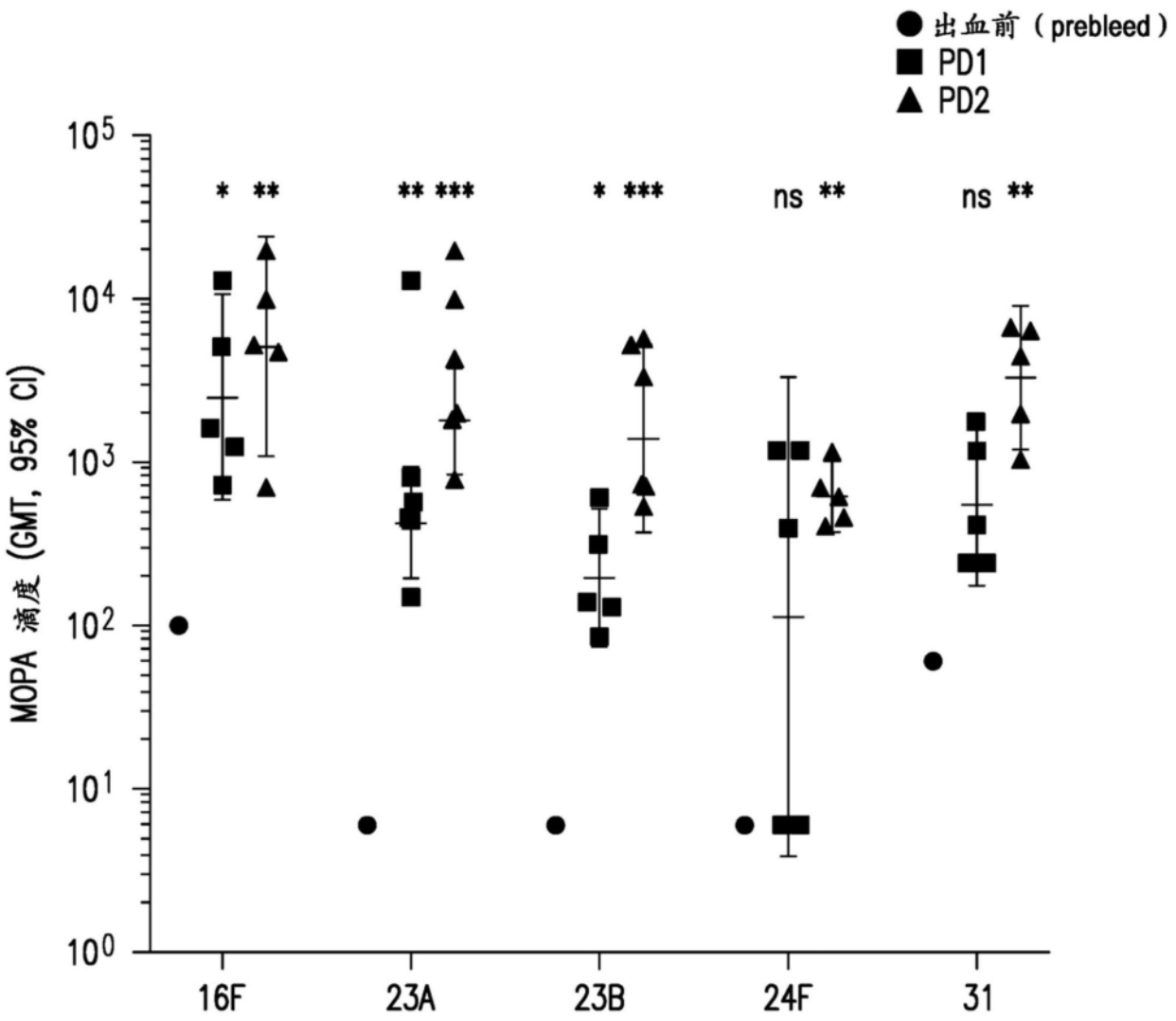

出血前（prebleed）
PD1
PD2
MOPA 滴度 (GMT, 95% CI)
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
* **
** ***
* ***
ns **
ns **
16F
23A
23B
24F
31

图12