(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108524931 B
(45)授权公告日 2023.02.03

(21)申请号 201810670091.8

(22)申请日 2013.12.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108524931 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(30)优先权数据
61/740,311 2012.12.20 US

(62)分案原申请数据
201380066823.8 2013.12.13

(73)专利权人 辉瑞公司
地址 美国纽约

(72)发明人 M·韩 R·K·凯因森 J-H·金 A·K·普拉萨德

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 安琪 张晓威

(51)Int.Cl.
A61K 39/385(2006.01)
A61K 39/09(2006.01)
A61K 39/095(2006.01)
A61K 47/64(2017.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

(56)对比文件
CN 101600459 A,2009.12.09
Zuchao Ma et al..TEMPO-mediated glycoconjugation: a scheme for the controlled synthesis of polysaccharide conjugates..《Carbohydrate Research》.2010,第346卷(第2期),343-347.
Jacques Einhorn et al..Efficient and Highly Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes by N-Chlorosuccinimide Mediated by Oxoammonium Salts..《J. Org. Chem.》.1996,第61卷(第21期),7452-7454.
A Fattom et al..Serum Antibody Response in Adult Volunteers Elicited by Injection of Streptococcus pneumoniae Type 12F Polysaccharide Alone or Conjugated to Diphtheria Toxoid..《Infect Immun.》.1990,第58卷(第7期),2309-2312.

审查员 李楠

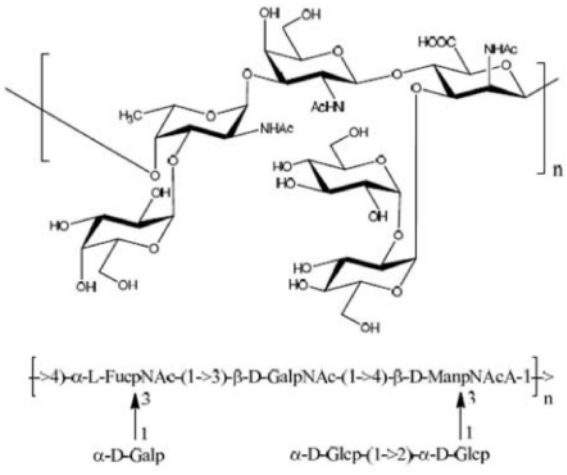
权利要求书1页 说明书26页 附图7页

(54)发明名称

糖缀合物

(57)摘要

本发明涉及糖缀合物。具体而言,本发明涉及通过使用稳定的硝酰基相关的试剂/氧化剂作为氧化物质来制备的包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物以及包含此类糖缀合物的免疫原性组合物。



CN 108524931 B

1.制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法,其包括以下步骤:a) 使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水性溶剂中反应以产生活化的糖,其中所述糖为肺炎链球菌血清型12F荚膜多糖;以及b) 使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应,其中所述载体蛋白为CRM_{197}。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述糖与0.1摩尔当量至10摩尔当量的N-氯代琥珀酰亚胺反应。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述糖与0.5摩尔当量至1.5摩尔当量的N-氯代琥珀酰亚胺反应。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)以催化量存在。

5.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述糖与少于0.3摩尔当量的2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)反应。

6.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述活化的糖的氧化度为3至40。

7.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述活化的糖的氧化度为6至14。

8.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤a)之前,将所述糖按尺寸分级。

9.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤a)之前,将所述糖水解或机械地按尺寸分级。

10.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤a)之前,将所述糖水解或通过加压均化而机械地按尺寸分级以实现50 kDa至500 kDa的分子量。

11.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤a)之前,将所述糖水解至100 kDa至400 kDa的分子量。

12.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤a)之前,将所述糖水解至150 kDa至350 kDa的分子量。

糖缀合物

[0001] 本申请是2013年12月13日提交的发明名称为“糖缀合方法”的中国专利申请201380066823.8的分案申请。

技术领域

[0002] 概括而言，本发明涉及通过使用TEMPO/NCS作为氧化物质(oxidizing agent)来制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物(glycoconjugate)的方法、包含此类糖缀合物的免疫原性组合物以及使用此类糖缀合物和免疫原性组合物的方法。本发明还涉及通过在选择性氧化糖的伯羟基的氧化剂的存在下使用稳定的硝酰基或氮氧(nitroxide)自由基(例如哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基)化合物制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法、包含此类糖缀合物的免疫原性组合物以及使用此类糖缀合物和免疫原性组合物的方法。

背景技术

[0003] 使用与蛋白载体连接的多糖(通常来自细菌的表面包衣)制备多糖蛋白缀合物疫苗。多糖与蛋白载体的化学键合诱导针对在其表面上展现疫苗内所包含的多糖的细菌的免疫应答，由此预防疾病。因此，使用来自致病细菌的多糖的疫苗接种是增强宿主免疫力的潜在策略。覆盖细菌的多糖大为不同，甚至在单一细菌物种内也是如此。例如，在肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae，全世界范围内婴儿和幼儿的脑膜炎、肺炎及严重的侵袭性疾病的主要诱因)中，由于细菌多糖包衣的变化而具有超过90种不同的血清型。因此，多糖疫苗通常由一组多糖组成以增加保护。

[0004] 尽管多糖自身是免疫原性的，但多糖与蛋白载体的缀合已用于改善免疫原性。载体蛋白可以是来自靶标病原体的增强对该病原体的特异性免疫应答的相关蛋白抗原，或是主要作为佐剂或一般免疫应答刺激剂的一般免疫原性蛋白。

[0005] 多价肺炎球菌多糖-蛋白缀合物疫苗已经被许可多年，并且已证明在预防婴儿的肺炎球菌疾病方面是有价值的，并且最近已经推荐用于成人。

发明内容

[0006] 在一个方面，本发明提供了制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法，其包括以下步骤：a)使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水性溶剂中反应以产生活化的糖；以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。在另一方面，所述活化的糖的氧化度为1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5、3至40、3至30、3至20、3至10、4至40、4至30、4至20、4至10、5至30、5至25、5至20、5至10、6至50、6至40、6至30、6至20、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至40、7至30、7至20、7至15、7至14、7至13、7至12、7至11、7至10、8至40、8至30、8至20、8至15、8至14、8至13、8至13、8至12、8至11、8至10、9至40、9至30、9至20、9至15、10至40、10至30、10至20或10至15。在另一方面，所述活化的糖的氧化度为1、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或40。

[0007] 在另一方面，本发明提供了制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法，其包括以下步骤：a)在选择性氧化糖的伯羟基的氧化剂的存在下，使所述糖与稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物如哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物反应以产生包含醛基的活化的糖；以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。

[0008] 在所述反应中，实际的氧化剂为催化性循环的N-氧代铵盐(N-oxoammonium salt)。优选地，所述稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物具有在氧化剂的存在下将伯醇选择性氧化成醛而不过度氧化成羧酸的能力。

[0009] 在一方面，反应的步骤a)在水性溶剂中进行。在另一方面，步骤a)在非质子溶剂中进行。在一方面，步骤a)在DMSO(二甲亚砜)、二甲基乙酰胺(DMA)、环丁砜、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、六甲基磷酰胺(HMPA)中或在DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行。

[0010] 在一方面，未反应的醛基在与载体蛋白缀合之后使用硼氢化物在加帽步骤中被转化回伯醇，由此使在涉及氧化及随后的缀合的修饰步骤期间的糖表位修饰最小化。

[0011] 在一方面，所述稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物是哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物。优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不影响仲羟基的能力。更优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不过度氧化成羧基的能力。

[0012] 在一方面，所述稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物带有TEMPO或PROXYL(2,2,5,5-四甲基-1-吡咯烷氧基)部分。优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不影响仲羟基的能力。更优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不过度氧化成羧基的能力。

[0013] 在一方面，所述稳定的硝酰基化合物是TEMPO或其衍生物。在一个方面，所述稳定的硝酰基化合物选自TEMPO、2,2,6,6-四甲基-4-(甲基磺酰氧基)-1-哌啶氧基、4-膦酰氧基-TEMPO、4-氧代-TEMPO、4-甲氧基-TEMPO、4-异硫氰酸基-TEMPO、4-(2-碘乙酰氨基)-TEMPO自由基、4-羟基-TEMPO、4-氰基-TEMPO、4-羧基-TEMPO、4-(2-溴乙酰氨基)-TEMPO、4-氨基-TEMPO、4-乙酰氨基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基。优选地，所述硝酰基化合物是TEMPO。

[0014] 在另一方面，所述稳定的硝酰基化合物选自3β-DOXYL-5α-胆甾烷、5-DOXYL-硬脂酸、16-DOXYL-硬脂酸、5-DOXYL-硬脂酸甲酯、3-(氨基甲基)-PROXYL、3-氨甲酰基-PROXYL、3-氨甲酰基-2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-氧基、3-羧基-PROXYL、3-氰基-PROXYL。

[0015] 在一个方面，所述氧化剂是带有N-卤代部分的分子。优选地，所述分子具有在硝酰基化合物的存在下选择性氧化伯醇的能力。

[0016] 在一个方面，所述氧化剂选自N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺、二氯异氰尿酸、1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二溴异氰尿酸、1,3,5-三溴-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二碘异氰尿酸以及1,3,5-三碘-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮。优选地，所述氧化剂为N-氯代琥珀酰亚胺。

[0017] 在一方面，所述活化的糖的氧化度为1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5、3至40、3至30、3至20、3至10、4至40、4至30、4至20、4至10、5至30、5至25、5至20、5至10、6至50、6至40、6至30、6至20、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至40、7至30、7至20、7至15、7至14、7至13、7至12、7至11、7至10、8至40、8至30、8至20、8至15、8至14、8至13、8至13、8至

12、8至11、8至10、9至40、9至30、9至20、9至15、10至40、10至30、10至20或10至15。在另一方面，所述活化的糖的氧化度为1、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或40。

[0018] 在一方面，所述糖与0.1至10摩尔当量的所述氧化剂反应。优选地，所述糖与0.2至5、0.5至2.5或0.5至1.5摩尔当量的所述氧化剂反应。在一方面，所述多糖与约0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2、2.2、2.4、2.6、2.8、3、3.2、3.4、3.6、3.8、4、4.2、4.4、4.6、4.8或5摩尔当量的所述氧化剂反应。

[0019] 在一方面，所述稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物以催化量存在。在一方面，所述糖与少于约0.3摩尔当量的稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物反应。在一方面，所述糖与少于约0.005摩尔当量的稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物反应。在一方面，所述糖与约0.005、0.01、0.05或0.1摩尔当量的稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物反应。

[0020] 在另一方面，所述糖是细菌荚膜多糖。在另一方面，所述糖是合成得到的寡糖或多糖。在一个方面，所述荚膜多糖源自肺炎链球菌(Pn)。在另一方面，所述荚膜多糖选自Pn-血清型10A、Pn-血清型12F和Pn-血清型33F荚膜多糖。例如，在一方面，所述荚膜多糖是Pn-血清型12F荚膜多糖。

[0021] 在另一方面，所述荚膜多糖源自脑膜炎奈瑟氏球菌(N.meningitidis)。在一个方面，所述荚膜多糖选自脑膜炎球菌(Mn)-血清型A、C、W135和Y荚膜多糖。

[0022] 在另一方面，所述荚膜多糖是脑膜炎球菌(Mn)-血清型X荚膜多糖。

[0023] 在另一方面，所述荚膜多糖源自B组链球菌(Group B Streptococcus,GBS)。在一方面，所述荚膜多糖选自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII。

[0024] 在一方面，本发明提供了本文所公开的任何方法，其中所述载体蛋白是来自破伤风、白喉、百日咳、假单胞菌属(Pseudomonas)、大肠杆菌(E.coli)、葡萄球菌属(Staphylococcus)或链球菌属(Streptococcus)的毒素。在一方面，所述载体蛋白是CRM_{197}。

[0025] 在另一方面，本发明提供了本文所述的方法，其中在步骤a)之前，将所述糖水解至100kDa至400kDa的分子量。例如，在一方面，所述分子量为100kDa至350kDa、100kDa至300kDa、100kDa至250kDa、100kDa至200kDa、100kDa至150kDa、200kDa至400kDa、200kDa至350kDa、200kDa至300kDa、200kDa至250kDa、300kDa至400kDa、或300kDa至350kDa。

[0026] 在另一方面，本发明提供了本文提供的任何方法，其还包括在步骤b)之前纯化所述活化的多糖的步骤。在另一方面，所述方法还包括在步骤b)之后添加还原剂的步骤。在一方面，所述还原剂为$NaCNBH_3$。在另一方面，所述方法还包括在添加$NaCNBH_3$之后添加$NaBH_4$的步骤。在另一方面，所述方法包括在添加$NaBH_4$之后的纯化步骤。

[0027] 在另一方面，本发明提供了通过本文所公开的任何方法而产生或可获得的糖缀合物。例如，在一个方面，本发明提供了通过包括以下步骤的方法产生或可获得的包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物:a)使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水性溶剂中反应以产生活化的糖;以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。在另一方面，本发明提供了通过包括以下步骤的方法产生或可获得的包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物:a)使糖与稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物和氧化剂反应以产生包含醛基的活化的糖;以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。稳定的硝酰基化合物和氧化剂可以如上文所定义。

[0028] 在另一方面，本发明提供了包含本文所公开的任何糖缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的免疫原性组合物。在另一方面，所述免疫原性组合物包含其它抗原。在另一方面，所述其它抗原包括蛋白抗原或源自肺炎链球菌的荚膜多糖的糖缀合物。例如，在一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖选自Pn-血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、11A、14、15B、18C、19A、19F、22F和23F荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括蛋白抗原或源自脑膜炎奈瑟氏球菌的荚膜多糖的糖缀合物。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖选自血清型A、C、W135和Y荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖来自血清型X荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖源自B组链球菌(GBS)。在一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖选自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII。

[0029] 在另一方面，本发明提供了本文所公开的任何免疫原性组合物，其还包含佐剂。在一方面，所述佐剂是铝系佐剂。在另一方面，所述铝系佐剂选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

[0030] 在另一方面，本发明提供了预防、治疗或改善个体的细菌感染、疾病或病症的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所公开的任何免疫原性组合物。在一方面，所述感染、疾病或病症与肺炎链球菌相关。在一方面，所述感染、疾病或病症与脑膜炎奈瑟氏球菌相关。

[0031] 在另一方面，本发明提供了在个体中诱导保护性免疫应答的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所公开的任何免疫原性组合物。

[0032] 在另一方面，本发明提供了包含与载体蛋白缀合的Pn-血清型12F的免疫原性组合物，其中所述缀合物是稳定的。例如，在一方面，本发明提供了包含与载体蛋白缀合的Pn-血清型12F的免疫原性组合物，其中从其制备时起120天之后，所述组合物中游离Pn-血清型12F多糖的量少于35％。在另一方面，从其制备时起120天之后，游离Pn-血清型12F多糖的量少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起90天之后，游离Pn-血清型12F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起60天之后，游离Pn-血清型12F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起30天之后，游离Pn-血清型12F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，本发明提供了包含与载体蛋白缀合的Pn-血清型3、10A或33F的组合物，其中从其制备时起120天之后，所述组合物中游离Pn-血清型3、10A或33F多糖的量分别少于35％。在另一方面，从其制备时起120天之后，游离Pn-血清型3、10A或33F多糖的量少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起90天之后，游离Pn-血清型3、10A或33F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起60天之后，游离Pn-血清型3、10A或33F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在另一方面，从其制备时起30天之后，游离Pn-血清型3、10A或33F多糖的量少于35％、少于30％、少于28％、少于27％、少于26％、或少于25％。在一方面，上文所讨论的游离多糖的量是在25℃下测量的。在一方面，上文所公开的组合物中的载体蛋白是来自来自破伤风、白喉、百日咳、假单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌或链球菌的毒素。在另一方面，所述载体蛋白是CRM_{197}。

[0033] 本发明还提供了包含上文所公开的任何此类糖缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的免疫原性组合物。在另一方面，此类免疫原性组合物包含其它抗原。例如，在另一方面，所述其它抗原包括蛋白抗原或源自肺炎链球菌的荚膜多糖的糖缀合物。在一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖选自Pn-血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、11A、14、15B、18C、19A、19F、22F和23F荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括蛋白抗原或源自脑膜炎奈瑟氏球菌的荚膜多糖的糖缀合物。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖选自血清型A、C、W135和Y荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖来自血清型X荚膜多糖。在另一方面，所述其它抗原包括荚膜多糖的糖缀合物，所述荚膜多糖来自B组链球菌(GBS)。在一方面，所述荚膜多糖选自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII和VIII。

[0034] 在另一方面，此类免疫原性组合物还包含佐剂。例如，在一方面，所述佐剂是铝系佐剂。在另一方面，所述铝系佐剂选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝。

附图说明

[0035] 图1示出Pn-血清型12F的荚膜多糖的结构。

[0036] 图2示出N-氯代琥珀酰亚胺在Tempo/NCS氧化(oxidationation)反应中对氧化度(DO)的依赖性。

[0037] 图3示出Pn-血清型10A的荚膜多糖的结构。

[0038] 图4示出Pn-血清型33F的荚膜多糖的结构。

[0039] 图5示出Pn-血清型3的荚膜多糖的结构。

[0040] 图6示出使用TEMPO/NCS氧化/缀合Pn-血清型12F的推定机制。

[0041] 图7示出使用高碘酸盐氧化相对于使用TEMPO/NCS氧化所制备的Pn-血清型12F的稳定性比较。

[0042] 发明详述

[0043] 通过参考本发明的各种实施方案的以下详细说明和本文中所包括的实施例可以更容易地理解本发明。除非另有定义，否则本文所用的所有技术术语和科学术语都与本发明所属领域技术人员通常所理解的含义相同。虽然本文中描述了某些优选方法和材料，但类似或等同于本文所述的那些的任何方法和材料均可用于实践或测试本发明。在描述实施方案及权利要求书时，会根据下文所述的定义使用某些术语。

[0044] 除非另有说明，否则如本文所使用的单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指代。因此，例如，“所述方法”包括本文所述类型的一种或多种方法和/或一个或多个步骤，和/或其会在本领域技术人员阅读本公开内容之后而变得明了。

[0045] 如本文所使用的术语“约”意指在某一值的统计学上有意义的范围内，例如所述浓度范围、时间范围、分子量、温度或pH。此类范围可在所给定的值或范围的一个数量级内，通常在20％内，更通常在10％内，甚至更通常在5％内或在1％内。有时，此类范围可在用于测量和/或测定给定值或范围的标准方法的典型实验误差内。术语“约”所涵盖的允许变化会取决于所研究的具体系统，并且可容易被本领域技术人员所理解。无论何时在本申请内列举一个范围，所述范围内的每个整数也被涵盖作为本发明的实施方案。

[0046] 应注意，在本公开内容中，诸如“包括”、“包含”等术语可具有在美国专利法中所归

属于它们的含义;例如,它们可意指“包括”等。此类术语是指包括具体成分或成分组而不排除任何其他的成分。诸如“基本上由……组成”等术语具有在美国专利法中所归属于它们的含义,例如,它们允许包括不损害本发明的新颖或基本特征的其他成分或步骤,即,它们排除损害本发明的新颖或基本的特征的其他未列举的成分或步骤。术语“由……组成”具有在美国专利法中所归属于它们的含义;也就是说,这些术语是封闭式的。因此,这些术语是指包括具体成分或成分组并且排除所有其他成分。

[0047] 如本文所使用的术语“糖”可以用于指多糖、寡糖或单糖。

[0048] 如本文所使用的关于糖的术语“氧化度”是指每摩尔醛的糖重复单元摩尔比。糖的氧化度可以使用本领域技术人员已知的常规方法而测定。

[0049] 如本文所使用的术语“缀合物”或“糖缀合物”是指与载体蛋白共价缀合的糖。本发明的糖缀合物和包含其的免疫原性组合物可以包含一定量的游离糖。

[0050] 如本文所使用的术语“游离糖”意指未与载体蛋白共价缀合但仍然存在于糖缀合物组合物中的糖。所述游离糖可与缀合的糖-载体蛋白糖缀合物非共价缔合(即,非共价结合到缀合的糖-载体蛋白糖缀合物、吸附到缀合的糖-载体蛋白糖缀合物或截留于缀合的糖-载体蛋白糖缀合物中或与其一起被截留)。术语“游离多糖”和“游离荚膜多糖”可在本文中用于传达关于糖缀合物的相同含义,其中所述糖分别是多糖或荚膜多糖。

[0051] 如本文所使用的“缀合”是指借以使例如细菌荚膜多糖的糖与载体分子或载体蛋白共价连接的过程。可根据下文所述的方法或通过本领域内已知的其他方法进行缀合。缀合增强了细菌荚膜多糖的免疫原性。

[0052] 术语“个体”是指包括人类在内的哺乳动物,或指鸟、鱼、爬行动物、两栖动物或任意其他动物。术语“个体”还包括家庭宠物或研究用动物。家庭宠物和研究用动物的非限制性实例包括:狗、猫、猪、兔、大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、豚鼠、白鼬、猴、鸟、蛇、蜥蜴、鱼、乌龟和青蛙。术语“个体”还包括牲畜动物。牲畜动物的非限制性实例包括:羊驼、美洲野牛、骆驼、牛、鹿、猪、马、美洲驼、骡、驴、绵羊、山羊、兔、驯鹿、牦牛、鸡、鹅和火鸡。

[0053] 糖缀合物

[0054] 本发明涉及制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法,所述方法特别通过使用稳定的硝酰基或氮氧自由基化合物将所述糖的伯醇选择性氧化成醛,并且使用氧化剂来进行。在一方面,所述稳定的硝酰基化合物是哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物。优选地,所述化合物具有在氧化剂的存在下将伯醇选择性氧化成醛而不过度氧化成羧酸且不影响仲羟基的能力。在一方面,所述稳定的硝酰基化合物是带有TEMPO或PROXYL(2,2,5,5-四甲基-1-吡咯烷氧基)部分的分子。优选地,所述分子具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不影响仲羟基的能力。更优选地,所述分子具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不过度氧化成羧基的能力。在一个方面,所述稳定的硝酰基化合物选自TEMPO、2,2,6,6-四甲基-4-(甲基磺酰氧基)-1-哌啶氧基、4-膦酰氧基-TEMPO、4-氧代-TEMPO、4-甲氧基-TEMPO、4-异硫氰酸基-TEMPO、4-(2-碘乙酰氨基)-TEMPO自由基、4-羟基-TEMPO、4-氰基-TEMPO、4-羧基-TEMPO、4-(2-溴乙酰氨基)-TEMPO、4-氨基-TEMPO、4-乙酰氨基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基。优选地,所述稳定的硝酰基化合物是TEMPO。在另一方面,所述稳定的硝酰基化合物选自3β-DOXYL-5α-胆甾烷、5-DOXYL-硬脂酸、16-DOXYL-硬脂酸、5-DOXYL-硬脂酸甲酯、3-(氨基甲基)-PROXYL、3-氨甲酰基-PROXYL、3-氨甲酰基-2,2,5,5-

四甲基-3-吡咯啉-1-氧基、3-羧基-PROXYL、3-氰基-PROXYL。在一个方面，所述氧化剂是带有N-卤代部分的分子。优选地，所述分子具有在硝酰基化合物的存在下选择性氧化伯醇的能力。在一个方面，所述氧化剂选自N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺、二氯异氰尿酸、1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二溴异氰尿酸、1,3,5-三溴-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二碘异氰尿酸以及1,3,5-三碘-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮。优选地，所述氧化剂为N-氯代琥珀酰亚胺。

[0055] 在一方面，本发明涉及制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法，所述方法特别通过使用2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基自由基(TEMPO)、使用作为共氧化剂(cooxidant)的N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)将所述糖的伯醇氧化成醛来进行。

[0056] 在本发明的糖缀合物中，所述糖选自多糖、寡糖和单糖，并且所述载体蛋白选自本文进一步描述或本领域技术人员已知的任意合适的载体。在一些实施方案中，所述糖是多糖，尤其是细菌荚膜拖多糖，例如肺炎链球菌血清型10A(Pn-血清型10A)、Pn-血清型12F或Pn-血清型33F。在一些此类实施方案中，所述载体蛋白是CRM_{197}。

[0057] 荚膜多糖可以通过本领域技术人员已知的标准技术制备。例如，荚膜多糖可以由多种血清型制备，例如肺炎链球菌的1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F。这些肺炎球菌缀合物通过分离过程而制备，并被配制成单剂量制剂。例如，在一个实施方案中，每一肺炎球菌多糖血清型在大豆基培养基中生长。然后，通过离心、沉淀、超滤和柱层析来纯化各多糖。纯化的多糖经化学活化以使所述糖(即，活化的糖)能够与载体蛋白反应。一旦活化，则每一荚膜多糖分别与载体蛋白缀合以形成糖缀合物。在一个实施方案中，每一荚膜多糖与相同的载体蛋白缀合。多糖的化学活化及随后与载体蛋白的缀合可以通过常规手段而实现。参见例如第4,673,574、4,902,506、7,709,001和7,955,605号美国专利。

[0058] 在一个实施方案中，本发明的糖缀合物具有约50kDa至约20,000kDa的分子量。在另一实施方案中，所述糖缀合物具有约200kDa至约10,000kDa的分子量。在另一实施方案中，所述糖缀合物具有约500kDa至约5,000kDa的分子量。在一个实施方案中，所述糖缀合物具有约1,000kDa至约3,000kDa的分子量。在其他实施方案中，所述糖缀合物具有约600kDa至约2800kDa、约700kDa至约2700kDa、约1000kDa至约2000kDa、约1800kDa至约2500kDa、约1100kDa至约2200kDa、约1900kDa至约2700kDa、约1200kDa至约2400kDa、约1700kDa至约2600kDa、约1300kDa至约2600kDa、约1600kDa至约3000kDa的分子量。任何上述范围内的任何整数也被涵盖作为本发明的实施方案。

[0059] 本发明的糖缀合物的新颖特征还包括所述糖和得到的缀合物的分子量分布(profile)、每个载体蛋白缀合的赖氨酸与共价连接到多糖的赖氨酸的数量的比率、作为糖的重复单元的函数的载体蛋白与所述糖之间的共价键的数量、以及游离糖相对于总糖的相对量。

[0060] 在另一实施方案中，所述多糖是源自脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidi)的荚膜多糖。在一些此类实施方案中，所述荚膜多糖选自脑膜炎奈瑟氏球菌的血清型A、B、C、W135、X和Y荚膜多糖。在一个此类实施方案中，所述荚膜多糖是血清型C荚膜多糖。在另一此类实施方案中，所述荚膜多糖是血清型W135荚膜多糖。在另一此类实施方案中，所述荚膜多糖是血清型Y荚膜多糖。

[0061] 在一些实施方案中，本发明的糖缀合物包括细菌荚膜多糖，其中所述荚膜多糖具有10kDa至2,000kDa或50kDa至1,000kDa的分子量。在一些此类实施方案中，所述荚膜多糖源自肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌。在一些此类实施方案中，所述荚膜多糖源自肺炎链球菌，并选自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F荚膜多糖。在其他此类实施方案中，所述荚膜多糖源自脑膜炎奈瑟氏球菌并选自血清型A、B、C、W135、X和Y荚膜多糖。

[0062] 在一个实施方案中，本发明提供了包含与载体蛋白共价缀合的荚膜多糖的糖缀合物，其具有下列特征中的一个或多个：所述多糖具有50kDa至1000kDa的分子量；所述糖缀合物具有1000kDa至3000kDa的分子量；以及所述缀合物包含相对于总多糖少于约45％的游离多糖。在一些实施方案中，所述多糖具有10kDa至2000kDa的分子量。在一些实施方案中，所述糖缀合物具有50kDa至20000kDa的分子量。在其他实施方案中，所述糖缀合物具有200kDa至10000kDa的分子量。在其他实施方案中，所述缀合物包含相对于总多糖少于约30％、20％、15％、10％或5％的游离多糖。可以时间函数的形式测量游离多糖的量，例如在制备缀合物之后的10、20、30、40、50、60、70、80、90或120天之后或更久。

[0063] 在与糖缀合的载体蛋白中的赖氨酸残基的数量可以表征为缀合的赖氨酸的范围，其可以摩尔比形式表示。例如，在其中CRM_{197}的4至15个赖氨酸残基与糖共价连接的免疫原性组合物中，缀合的赖氨酸与CRM_{197}在糖缀合物中的摩尔比为约10:1至约40:1。在其中CRM_{197}的2至20个赖氨酸残基与糖共价连接的免疫原性组合物中，缀合的赖氨酸与CRM_{197}在糖缀合物中的摩尔比为约5:1至约50:1。

[0064] 在一个实施方案中，缀合的赖氨酸与载体蛋白的摩尔比为约10:1至约25:1。在一些此类实施方案中，所述载体蛋白为CRM_{197}。

[0065] 在一个实施方案中，糖:载体蛋白的比率(w/w)为0.2至4。在另一实施方案中，糖:载体蛋白的比率(w/w)为1.1至1.7。在一些实施方案中，所述糖是细菌荚膜多糖，并且糖:载体蛋白的比率(w/w)为0.2至4。在其他实施方案中，所述糖是细菌荚膜多糖，并且糖:载体蛋白的比率(w/w)为1.1至1.7。在一些此类实施方案中，所述载体蛋白是CRM_{197}。

[0066] 糖链与载体蛋白上的赖氨酸的连接频率是表征本发明的糖缀合物的另一参数。例如，在一个实施方案中，对于多糖的每100个糖重复单元，在载体蛋白与多糖之间存在至少一个共价键。在一个实施方案中，对于多糖的每50个糖重复单元，在载体蛋白与多糖之间存在至少一个共价键。在一个实施方案中，对于多糖的每25个糖重复单元，在载体蛋白与多糖之间存在至少一个共价键。在另一实施方案中，在多糖的每4个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。在另一实施方案中，在多糖的每10个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。在其他实施方案中，在多糖的每15个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。

[0067] 在常见的实施方案中，所述载体蛋白是CRM_{197}，并且在多糖的每4、10、15或25个糖重复单元中CRM_{197}与多糖之间的共价键出现至少一次。在一些此类实施方案中，所述多糖是细菌荚膜多糖，例如源自肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的荚膜多糖。

[0068] 在其他实施方案中，对于每5至10个糖重复单元、每2至7个糖重复单元、每3至8个糖重复单元、每4至9个糖重复单元、每6至11个糖重复单元、每7至12个糖重复单元、每8至13个糖重复单元、每9至14个糖重复单元、每10至15个糖重复单元、每2至6个糖重复单元、每3

至7个糖重复单元、每4至8个糖重复单元、每6至10个糖重复单元、每7至11个糖重复单元、每8至12个糖重复单元、每9至13个糖重复单元、每10至14个糖重复单元、每10至20个糖重复单元、或每4至25个糖重复单元，所述缀合物包含至少一个在载体蛋白与糖之间的共价键。

[0069] 在另一实施方案中，对于多糖的每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个糖重复单元，发生载体蛋白与糖之间的至少一个键合。

[0070] 在一个实施方案中，对于多糖的每25个糖重复单元，本发明的糖缀合物包含至少一个在载体蛋白与多糖之间的共价键。在另一实施方案中，在多糖的每4个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。在另一实施方案中，在多糖的每10个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。在又一实施方案中，在多糖的每15个糖重复单元中载体蛋白与多糖之间的共价键出现至少一次。

[0071] 在一个实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约45％的游离糖。在另一实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约30％的游离糖。在另一实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约20％的游离糖。在其他实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约10％的游离糖。在另一实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约5％的游离糖。

[0072] 在另一实施方案中，与糖的总量相比，所述糖缀合物包含少于约20摩尔％的载体蛋白残基。

[0073] 在另一方面，本发明提供了免疫原性组合物，其包含本发明的糖缀合物以及佐剂、稀释剂或载体中的至少一种。

[0074] 在一个实施方案中，本发明提供了免疫原性组合物，其包含本发明的糖缀合物以及佐剂、稀释剂或载体中的至少一种，其中所述糖缀合物包含与载体蛋白共价缀合的细菌荚膜多糖。在一些此类实施方案中，所述荚膜多糖源自肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌。

[0075] 在一些实施方案中，所述免疫原性组合物包含佐剂。在一些此类实施方案中，所述佐剂是选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的铝系佐剂。在一个实施方案中，所述免疫原性组合物包含佐剂磷酸铝。

[0076] 在一些实施方案中，本发明的糖缀合物或免疫原性组合物可以用于生成功能性的抗体，如通过在动物效力模型中或通过调理吞噬杀灭测定对细菌的杀灭所测量的。

[0077] 在一个实施方案中，本发明提供了诱导个体的免疫应答的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所述的本发明的免疫原性组合物。在另一方面，本发明提供了在个体中诱导针对致病菌的免疫应答的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所述的免疫原性组合物。在另一方面，本发明提供了预防或改善个体的由致病菌引发的疾病或病症的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所述的免疫原性组合物。在另一方面，本发明提供了降低个体的由致病菌的感染而引发的疾病或病症的至少一种症状的严重性的方法，其包括向所述个体给药免疫有效量的本文所述的免疫原性组合物。在一些实施方案中，所述致病菌是肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌。

[0078] 此外，本发明提供了诱导针对肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的免疫应答的方法、预防由肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌引发的疾病的方法、以及降低由肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌的感染而引发的疾病的至少一种症状的严重性的方法。

[0079] 糖

[0080] 糖包括多糖、寡糖和单糖。在一些实施方案中，所述糖是多糖，尤其是细菌荚膜多糖。

[0081] 荚膜多糖的分子量是供在免疫原性组合物中使用的一个考虑因素。高分子量荚膜多糖由于存在于抗原表面上的表位的化合价较高而能够诱导某些抗体免疫应答。高分子量荚膜多糖的分离和纯化被涵盖用于本发明的缀合物、组合物和方法中。

[0082] 在一个实施方案中，所述荚膜多糖具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中，所述荚膜多糖具有50kDa至1,000kDa的分子量。在另一实施方案中，所述荚膜多糖具有50kDa至300kDa的分子量。在另一实施方案中，所述荚膜多糖具有70kDa至300kDa的分子量。在其他实施方案中，所述荚膜多糖具有90kDa至250kDa、90kDa至150kDa、90kDa至120kDa、80kDa至120kDa、70kDa至100kDa、70kDa至110kDa、70kDa至120kDa、70kDa至130kDa、70kDa至140kDa、70kDa至150kDa、70kDa至160kDa、80kDa至110kDa、80kDa至120kDa、80kDa至130kDa、80kDa至140kDa、80kDa至150kDa、80kDa至160kDa、90kDa至110kDa、90kDa至120kDa、90kDa至130kDa、90kDa至140kDa、90kDa至150kDa、90kDa至160kDa、100kDa至120kDa、100kDa至130kDa、100kDa至140kDa、100kDa至150kDa、100kDa至160kDa的分子量；以及类似的期望分子量范围。任何上述范围内的任何整数也被涵盖作为本发明的实施方案。

[0083] 肺炎链球菌血清型12F(Pn-血清型12F)的荚膜多糖具有图1所示的结构。肺炎链球菌血清型10A(Pn-血清型10A)的荚膜多糖具有图3所示的结构。肺炎链球菌血清型33F(Pn-血清型33F)的荚膜多糖具有图4所示的结构。肺炎链球菌血清型3(Pn-血清型3)的荚膜多糖具有图5所示的结构。

[0084] 在一些实施方案中，本发明的荚膜多糖、糖缀合物或免疫原性组合物用于生成功能性的抗体，如通过在证实抗体杀灭细菌的动物效力模型中或调理吞噬杀灭测定中对细菌的杀灭所测量的。可使用本领域普通技术人员已知的分离操作直接从细菌获得荚膜多糖。参见例如Fournier等人(1984)，见上文；Fournier等人(1987)Ann.Inst.Pasteur/Microbiol.138:561-567；美国专利申请公开第2007/0141077号；以及国际专利申请公开第WO 00/56357号；这些文献各自以其整体援引加入本文。另外，可使用合成方案产生荚膜多糖。此外，可使用本领域普通技术人员还已知的基因工程操作重组产生荚膜多糖(参见Sau等人(1997)Microbiology143:2395-2405；以及美国专利第6,027,925号；这些文献各自以其整体援引加入本文)。从已确定的培养收集物或临床样本获得的肺炎链球菌株或脑膜炎奈瑟氏球菌(N.menigitidis)菌株可用于制备各自的多糖。

[0085] 载体蛋白

[0086] 本发明的糖缀合物的另一组分是与所述糖缀合的载体蛋白。术语“蛋白载体”或“载体蛋白”或“载体”是指可与期望的免疫应答所针对的抗原(例如荚膜多糖)缀合的任何蛋白分子。

[0087] 与载体缀合可增强抗原的免疫原性。用于所述抗原的蛋白载体可为毒素，类毒素，或来自破伤风、白喉、百日咳、假单胞菌属、大肠杆菌、葡萄球菌属和链球菌属的毒素的任何突变交叉反应性物质(CRM)。在一个实施方案中，载体是源自产生CRM_{197}蛋白的白喉棒杆菌(C.diphtheriae)菌株C7(β197)的白喉类毒素CRM_{197}。这一菌株具有ATCC保藏号53281。产生CRM_{197}的方法描述于美国专利第5,614,382号中，该美国专利以其整体援引加入本文。或者，可使用蛋白载体或其他免疫原性蛋白的片段或表位。例如，半抗原可偶联到细菌毒素、类毒

素或CRM的T细胞表位。其他合适的载体蛋白包括灭活的细菌毒素，例如霍乱类毒素(例如，如国际专利申请第WO 2004/083251号中所述)、大肠杆菌LT、大肠杆菌ST和来自绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)的外毒素A。还可使用细菌外膜蛋白，例如外膜复合物c(OMPC)、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌粘着蛋白(PsaA)或流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)蛋白D。还可使用其他蛋白(例如卵白蛋白、钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或纯化的结核菌素蛋白衍生物(PPD))作为载体蛋白。

[0088] 如本文先前所讨论，在变得与糖缀合的载体蛋白中的赖氨酸残基的数量可被表征为缀合的赖氨酸的范围。例如，在给定的免疫原性组合物中，CRM_{197}可在39个赖氨酸残基中包含1至15个与糖共价连接的赖氨酸残基。表示此参数的另一方式是约2.5％至约40％的CRM_{197}赖氨酸与糖共价连接。例如，在给定的免疫原性组合物中，CRM_{197}可在39个赖氨酸残基中包含1至20个与糖共价连接的赖氨酸残基。表示此参数的另一方式是约2.5％至约50％的CRM_{197}赖氨酸与糖共价连接。

[0089] 制备糖缀合物的方法

[0090] 为了制备糖缀合物，首先必须将多糖活化(即化学修饰)，然后其可与诸如蛋白质的载体化学连接。在活化步骤之前，可将糖水解或通过加压均化而机械地按尺寸分级(size)以达到适于活化和后续缀合的分子量(例如50kDA至500kDa)。在多糖中的碳水化合物的部分氧化已有效地用于生成醛基，所述醛基随后偶联到氨基如载体蛋白的赖氨酸残基以产生免疫原性缀合物。重要的是，用于使多糖与载体蛋白缀合的方法产生稳定的共价键，并且反应条件足够温和到保持各组分的结构完整性。常用于活化多糖并使多糖与载体蛋白偶联的方法包括还原氨基化化学(RAC)、氰化以及使用碳二亚胺。还原氨基化通常包括使用高碘酸钠或高碘酸钾或高碘酸以将邻近的-OH基团选择性氧化成活性醛基。氰化用于将-OH基团随机地转化成活性-CN基团。碳二亚胺用于通过由碳二亚胺替代-OH基团而活化羧基。

[0091] 还原氨基化化学(RAC)是用于将多糖与蛋白质偶联的最常见的方法之一，因为多糖的所得羰基与载体蛋白的氨基之间的反应可以形成相应的席夫碱，其可随后在氰基硼氢化钠($NaCNBH_3$)的存在下被选择性还原成非常稳定的饱和碳-氮键。此外，在温和到足以保持糖和蛋白组分的结构完整性的条件下，在水溶液中进行还原氨基化。在缀合之后，未反应的醛可随后经由硼氢化钠($NaBH_4$)还原而加帽。缀合物随后可被纯化(例如通过超滤/渗滤)，在琥珀酸盐缓冲盐水中产生最终的大量糖缀合物。

[0092] 然而，根据特定的多糖，使用上述常用方法并非总是提供恰当的结果。例如，多糖与高碘酸钠的直接氧化可能导致多糖骨架的裂解。

[0093] 例如，观察到对于使用标准高碘酸盐氧化条件(然后是还原氨基化)制备的缀合物，典型批次在25℃以上表现出游离多糖的增加和分子量的降低。本发明提供了下述发现：使用基于N-氧代铵盐的氧化法导致多种肺炎链球菌糖缀合物(尤其是血清型12F)的稳定性得到改善。特别地，如实施例1至7中进一步详细所示的，使用自由基2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)与N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)的组合有效地氧化了血清型12F、10A、3和33F的伯羟基，从而改善了所得的缀合物的稳定性。尽管在有机溶剂中使用小分子的有机化学反应的情形中已证明使用TEMPO/NCS将伯醇选择性氧化成醛(参见例如Einhorn等人，J.Org.Chem.61,pp.7452-7454(1996))，但本发明提供了新颖的发现，即，TEMPO/NCS可用作

氧化物质以在水溶液中选择性氧化复合多糖，从而产生稳定的多糖蛋白缀合物。

[0094] 因此，在一个实施方案中，本发明提供了制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法，其包括以下步骤：a)使糖与稳定的硝酰基化合物和氧化剂反应以产生活化的糖；以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。

[0095] 在一方面，在与载体蛋白缀合之后，在加帽步骤中使用硼氢化物将未反应的醛基转化回伯醇，由此使在涉及氧化及随后的缀合的修饰步骤期间的糖表位修饰最小化。

[0096] 在一方面，反应的步骤a)在水性溶剂中进行。在另一方面，步骤a)在非质子溶剂中进行。在一方面，步骤a)在DMSO(二甲亚砜)、二甲基乙酰胺(DMA)、环丁砜、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、六甲基磷酰胺(HMPA)中或在DMF(二甲基甲酰胺)中进行。

[0097] 在一方面，所述稳定的硝酰基化合物是哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物。优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不影响仲羟基的能力。更优选地，所述化合物具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不过度氧化成羧基的能力。在一个实施方案中，所述稳定的硝酰基化合物是带有TEMPO或PROXYL(2,2,5,5-四甲基-1-吡咯烷氧基)部分的分子。优选地，所述分子具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不影响仲羟基的能力。更优选地，所述分子具有在氧化剂的存在下选择性氧化伯醇以生成醛基而不过度氧化成羧基的能力。在一方面，所述稳定的硝酰基化合物是TEMPO或其衍生物。在一个实施方案中，所述稳定的硝酰基化合物选自TEMPO、2,2,6,6-四甲基-4-(甲基磺酰氧基)-1-哌啶氧基、4-膦酰氧基-TEMPO、4-氧代-TEMPO、4-甲氧基-TEMPO、4-异硫氰酸基-TEMPO、4-(2-碘乙酰氨基)-TEMPO自由基、4-羟基-TEMPO、4-氰基-TEMPO、4-羧基-TEMPO、4-(2-溴乙酰氨基)-TEMPO、4-氨基-TEMPO、4-乙酰氨基-2,2,6,6-四甲基哌啶1-氧基。优选地，所述硝酰基化合物是TEMPO。在另一实施方案中，所述稳定的硝酰基化合物选自3β-DOXYL-5α-胆甾烷、5-DOXYL-硬脂酸、16-DOXYL-硬脂酸、5-DOXYL-硬脂酸甲酯、3-(氨基甲基)-PROXYL、3-氨甲酰基-PROXYL、3-氨甲酰基-2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-氧基、3-羧基-PROXYL、3-氰基-PROXYL。在一个实施方案中，所述氧化剂是带有N-卤代部分的分子。优选地，所述分子具有在硝酰基化合物的存在下选择性氧化伯醇的能力。在一个实施方案中，所述氧化剂选自N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺、二氯异氰尿酸、1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二溴异氰尿酸、1,3,5-三溴-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮、二碘异氰尿酸以及1,3,5-三碘-1,3,5-三嗪-2,4,6-三酮。优选地，所述氧化剂为N-氯代琥珀酰亚胺。

[0098] 在一方面，所述糖与0.1至10摩尔当量的氧化剂反应。优选地，所述糖与0.2至5、0.5至2.5或0.5至1.5摩尔当量的氧化剂反应。在一方面，所述多糖与约0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2、2.2、2.4、2.6、2.8、3、3.2、3.4、3.6、3.8、4、4.2、4.4、4.6、4.8或5摩尔当量的氧化剂反应。

[0099] 在一方面，所述稳定的硝酰基化合物以催化量存在。在一方面，所述糖与少于约0.3摩尔当量的稳定的硝酰基化合物反应。在一方面，所述糖与少于约0.005摩尔当量的稳定的硝酰基化合物反应。在一方面，所述糖与约0.005、0.01、0.05或0.1摩尔当量的稳定的硝酰基化合物反应。

[0100] 在一个实施方案中，本发明提供了制备包含与载体蛋白缀合的糖的糖缀合物的方法，其包括以下步骤：a)使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺

(NCS)在水性溶剂中反应以产生活化的糖;以及b)使所述活化的糖与包含一个或多个氨基的载体蛋白反应。

[0101] 在其他实施方案中,所述方法还包括例如通过渗滤纯化所述糖缀合物的步骤。

[0102] 在每一情况下,所述糖选自多糖、寡糖和单糖。

[0103] 在每一情况下,所述糖可从发酵培养基纯化,或可为合成得到的。

[0104] 在常见的实施方案中,载体蛋白是CRM_{197}。在一个实施方案中,所述细菌荚膜多糖是源自肺炎链球菌的荚膜多糖。在另一优选的实施方案中,所述细菌荚膜多糖是源自脑膜炎奈瑟氏球菌的荚膜多糖。

[0105] 在一个实施方案中,产生本发明的糖缀合物的方法包括在糖-载体蛋白缀合物产生之后将其分离的步骤。在常见的实施方案中,通过超滤分离所述糖缀合物。

[0106] 在一个实施方案中,用于产生分离的肺炎链球菌荚膜多糖-载体蛋白缀合物的方法的载体蛋白包括CRM_{197}。在一个实施方案中,用于产生分离的脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜多糖-载体蛋白缀合物的方法的载体蛋白包括CRM_{197}。

[0107] 在一个实施方案中,CRM_{197}以约1:1的重量比与所述活化的多糖反应。

[0108] 在一个实施方案中,产生分离的肺炎链球菌荚膜多糖:载体蛋白缀合物的方法包括对多糖-载体蛋白缀合物反应混合物加帽以去除未反应的活化基团的步骤。

[0109] 在一个实施方案中,在产生荚膜多糖-CRM_{197}缀合物的方法中的CRM_{197}以约0.4:1的CRM_{197}:荚膜多糖分子的重量比添加。在其他实施方案中,CRM_{197}:荚膜多糖的重量比为约0.5:1、约0.6:1、约0.7:1、约0.8:1、约0.9:1、约1:1、约1.1:1、约1.2:1、约1.3:1、约1.4:1、或约1.5:1。

[0110] 在一个实施方案中,用于产生本发明的糖缀合物的方法的糖具有约10kDa至约2,000kDa的分子量。在其他实施方案中,所述分子量为约50kDa至约1,000kDa、约50kDa至约20,000kDa、约200kDa至约10,000kDa、约1,000kDa至约3,000kDa。

[0111] 在另一方面,本发明提供了包含通过本文所述的任何方法产生的糖缀合物的免疫原性组合物。

[0112] 在另一方面,本发明提供了包含可通过本文所述的任何方法而获得的糖缀合物的免疫原性组合物。

[0113] 免疫原性组合物

[0114] 术语“免疫原性组合物”是指含有抗原如微生物或其组分的任何药物组合物,该组合物可用于在个体中诱发免疫应答。

[0115] 如本文所使用的“免疫原性”意指抗原(或抗原的表位)例如细菌荚膜多糖或包含该抗原的糖缀合物或免疫原性组合物在宿主(例如哺乳动物)中诱发体液或细胞介导的免疫应答或二者的能力。

[0116] 因此,如本文所使用的“糖缀合物”或“缀合物”意指包含与可用于诱发免疫应答的载体分子缀合的细菌荚膜多糖的抗原或抗原决定子(即表位)的任何糖缀合物。

[0117] 所述糖缀合物可通过在细胞表面提供与MHC分子相关的抗原而用于使宿主敏化。另外,可生成抗原特异性T细胞或抗体以允许对被免疫宿主的未来保护。因此,糖缀合物可保护宿主免于一种或多种与细菌感染相关的症状,或可保护宿主免于因与荚膜多糖相关的细菌感染所致的死亡。还可使用糖缀合物来生成可用于赋予个体被动免疫的多克隆抗体或

单克隆抗体。还可使用糖缀合物来生成功能性的抗体，如通过在动物效力模型中或通过调理吞噬杀灭测定对细菌的杀灭所测量的。

[0118] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合到靶标(例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文所使用，除非上下文另有说明，否则所述术语意图不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体，而且涵盖工程抗体(例如，经嵌合、人源化和/或衍生化以改变效应子功能、稳定性和其他生物活性)及其片段(例如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv)、单链(ScFv)和域抗体(包括鲨鱼和骆驼抗体)和包含抗体部分的融合蛋白、多价抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体，只要它们表现出期望的生物活性即可)和如本文所述的抗体片段，以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体包括任何类别的抗体，例如IgG、IgA或IgM(或其亚类)，并且所述抗体不必属于任何具体类别。取决于其重链的恒定域的抗体氨基酸序列，可将免疫球蛋白归属于不同类别。存在5大类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且这些中的若干类别可进一步被划分为亚类(同种型)，例如，人类中的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别被称为α、δ、ε、γ 和μ。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是公知的。

[0119] “抗体片段”仅包含完整抗体的一部分，其中该部分在存在于完整抗体中时优选保留通常与该部分相关的至少一种、优选大部分或所有功能。

[0120] 术语“抗原”通常是指免疫原性组合物中的生物分子，通常为蛋白质、肽、多糖或缀合物，或者可刺激动物中产生抗体或T细胞反应或两者的免疫原性物质，包括被注射或吸收到动物中的组合物。可针对整个分子或针对所述分子的各个部分(例如，表位或半抗原)生成免疫应答。该术语可用于指单个分子或同源或异源抗原分子群体。抗原由抗体、T细胞受体或具有特定体液免疫性和/或细胞免疫性的其他成分识别。“抗原”还包括所有相关的抗原表位。给定抗原的表位可使用本领域内熟知的任何数量的表位定位技术来鉴别。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第66卷(Glenn E.Morris编辑，1996)Humana Press，Totowa，N.J。例如，线性表位可例如通过以下方式来确定：在固体支撑物上同时合成大量肽，所述肽对应于蛋白分子的各部分，并且在使所述肽仍然连接到所述支撑物的情况下使所述肽与抗体反应。此类技术为本领域内已知并且描述于例如美国专利第4,708,871号；Geysen等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3998-4002；Geysen等人(1986)Molec.Immunol.23:709-715中；这些文献各自以其整体援引加入本文。类似地，构象表位可通过例如x射线晶体学和二维核磁共振确定氨基酸的空间构象来鉴别。参见例如Epitope Mapping Protocols，见上文。

[0121] 此外，出于本发明的目的，“抗原”还可用于指包括对天然序列所作的修饰(例如缺失、添加和取代)(通常性质保守，但它们可为不保守的)的蛋白质，只要所述蛋白质维持诱发免疫应答的能力即可。这些修饰可以是人为的，如通过定点诱变、或通过特定合成操作、或通过遗传工程方法，或可为偶发性的，例如通过产生抗原的宿主的突变。此外，抗原可从微生物(例如，细菌)衍生、获得或分离，或可为整个生物体。类似地，所述定义中还包括在例如核酸免疫应用中表达抗原的寡核苷酸或多核苷酸。合成抗原还包括例如多表位、侧接表位(flanking epitope)和其他重组或合成衍生抗原(Bergmann等人(1993)Eur.J.Immunol.23:27772781；Bergmann等人(1996)J.Immunol.157:3242-3249；Suhrbier

(1997)Immunol.Cell Biol.75:402 408;Gardner等人(1998)第12届世界艾滋病会议(12th World AIDS Conference),瑞士日内瓦,1998年6月28日-7月3日)。

[0122] “保护性”免疫应答是指免疫原性组合物诱发用于保护个体免于感染的体液或细胞介导的免疫应答或两者的能力。所提供的保护不必是绝对的,即,不必完全阻止或根除感染,只要相对于对照个体群体(例如未给药疫苗或免疫原性组合物的受感染动物)存在统计学上显著的改进即可。保护可限于缓和感染症状的严重性或发作快速性。通常,“保护性免疫应答”会包括在至少50%的个体中诱导对特定抗原具有特异性的抗体水平增加,包括对各抗原的可测量功能性抗体反应的一定水平的增加。在特定情况下,“保护性免疫应答”可包括在至少50%的个体中诱导对特定抗原具有特异性的抗体水平增加两倍或抗体水平增加4倍,包括对各抗原的可测量功能性抗体反应的一定水平的增加。在某些实施方案中,调理吞噬抗体与保护性免疫应答相关。因此,保护性免疫应答可通过在调理吞噬测定(例如下述测定)中测量细菌计数减少百分比而测定。优选地,细菌计数减少至少10%、25%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或以上。在组合物中的具体缀合物的“免疫原性量”通常基于该缀合物的总多糖(缀合和非缀合的)来给药。例如,在100mcg剂量中,具有20%游离多糖的荚膜糖缀合物具有约80mcg的缀合的多糖和约20mcg的非缀合的多糖。当计算缀合物的剂量时,通常不考虑蛋白质对缀合物的贡献。通常,每一剂量会包含0.1mcg至100mcg,特别是0.1mcg至10mcg,更特别是1mcg至10mcg的多糖。

[0123] 本发明的一个实施方案提供了免疫原性组合物,其包含任何上述包含与载体蛋白缀合的肺炎链球菌荚膜多糖的糖缀合物。

[0124] 本发明的免疫原性组合物可用于借助于通过全身性、皮肤或粘膜途径给药所述免疫原性组合物来保护或治疗易受由例如肺炎链球菌或脑膜炎奈瑟氏球菌引起的细菌感染的人类,或可用于生成可用于赋予另一个体被动免疫的多克隆或单克隆抗体制剂。这些给药可包括通过肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射;或通过粘膜给药到口腔/消化道、呼吸道或泌尿生殖道。还可使用免疫原性组合物来生成功能性的抗体,如通过在动物效力模型中或通过调理吞噬杀灭测定对细菌的杀灭所测量的。

[0125] 用于特定免疫原性组合物的组分的最佳量可通过涉及在个体中观察适当免疫应答的标准研究来确定。在进行初始疫苗接种后,个体可接受一次或若干次充分间隔的加强免疫。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物还包含佐剂、缓冲剂、冷冻保护剂、盐、二价阳离子、非离子清洁剂、自由基氧化抑制剂、稀释剂或载体中的至少一种。在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物中的佐剂是铝系佐剂。在一个实施方案中,所述佐剂是选自磷酸铝、硫酸铝和氢氧化铝的铝系佐剂。在一实施方案中,所述佐剂为磷酸铝。

[0127] 佐剂是当与免疫原或抗原一起给药时增强免疫应答的物质。已证明多种细胞因子或淋巴因子具有免疫调节活性,因此可以与佐剂相同或相似的方式使用,所述包括细胞因子或淋巴因子但不限于:白介素1-α、1-β、2、4、5、6、7、8、10、12(参见例如美国专利第5,723,127号)、13、14、15、16、17和18(及其突变体形式);干扰素-α、β和γ;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(参见例如美国专利第5,078,996号和ATCC保藏号39900);巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF);粒细胞集落刺激因子(G-CSF);以及肿瘤坏死因子α和β。可用于本文所述的免疫原性组合物的其他佐剂包括:趋化因子,其包括而不限于MCP-1、MIP-1α、MIP-1β和

RANTES;粘附分子,例如选择蛋白,如L-选择蛋白、P-选择蛋白和E-选择蛋白;粘蛋白样分子,例如CD34、GlyCAM-1和MadCAM-1;整联蛋白家族中的一员,例如LFA-1、VLA-1、Mac-1和p150.95;免疫球蛋白超家族如PECAM、ICAM中的一员,例如ICAM-1、ICAM-2和ICAM-3、CD2和LFA-3;共刺激分子,例如B7-1、B7-2、CD40和CD40L;生长因子,包括血管生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、上皮生长因子、PDGF、BL-1和血管内皮生长因子;受体分子,包括Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2和DR6;以及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,包括ICE。

[0128] 用于增强免疫应答的合适的佐剂可以还包括而不限于:MPL™(3-O-脱酰基单磷酰脂质A,Corixa;Hamilton,MT),其描述于美国专利第4,912,094号。还适于用作佐剂的是合成脂质A类似物或氨基烷基葡糖胺磷酸盐化合物(AGP)或其衍生物或类似物,其可购自Corixa并且描述于美国专利第6,113,918号中。一种此类AGP是2-[(R)-3-十四酰氧基十四酰氨基]乙基2-脱氧-4-O-膦酰基-3-O-[(R)-3-十四酰氧基十四酰基]-2-[(R)-3-十四酰氧基十四酰氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷,其也被称为529(以前被称为RC529)。这种529佐剂也被配制为含水形式(AF)或稳定乳液(SE)。

[0129] 其他佐剂包括:胞壁肽,例如N-乙酰基胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基去甲胞壁酰基(normuramyl)-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺(MTP-PE);水包油乳液,例如MF59(美国专利第6,299,884号)(使用微型流化器如110Y型微型流化器(Microfluidics,Newton,MA)配制成亚微米粒子,其含有5%角鲨烯、0.5%聚山梨酯80和0.5%Span 85(任选地含有不同量的MTP-PE))、和SAF(微流化为亚微米乳液或涡旋生成较大粒度的乳液,其含有10%角鲨烯、0.4%聚山梨酯80、5%Pluronic封阻的聚合物L121和thr-MDP);弗氏不完全佐剂(IFA);铝盐(alum),例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝;爱菲金(Amphigen);阿夫立定;L121/角鲨烯;D-丙交酯-聚丙交酯/糖苷;普朗尼克多元醇(pluronic polyol);杀灭的博德特菌(Bordetella);皂苷,例如STIMULON™QS-21(Antigenics,Framingham,MA.,描述于美国专利第5,057,540号)、ISCOMATRIX™(CSL Limited,Parkville,Australia,描述于美国专利第5,254,339号)、以及免疫刺激复合物(ISCOMS);结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis);细菌脂多糖;合成多核苷酸,例如含有CpG基序的寡核苷酸(美国专利第6,207,646号);IC-31(Intercell AG,Vienna,Austria),描述于欧洲专利第1,296,713号和第1,326,634号;百日咳毒素(PT)或其突变体、霍乱毒素或其突变体(例如,美国专利第7,285,281号、第7,332,174号、第7,361,355号和第7,384,640号);或大肠杆菌不耐热毒素(LT)或其突变体,特别是LT-K63、LT-R72(例如,美国专利第6,149,919号、第7,115,730号和第7,291,588号)。

[0130] 所述免疫原性组合物可任选地包含药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体包括获得联邦、州政府的管理机构或其他管理机构批准或列示于美国药典(U.S.Pharmacopeia)或其他公认药典中用于动物(包括人类以及非人类哺乳动物)的载体。术语载体可用于指与药物组合物一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。可采用水、盐水溶液以及含水的右旋糖和甘油溶液作为尤其用于注射溶液剂的液体载体。合适药物载体的示例描述于E.W.Martin的"Remington's Pharmaceutical Sciences"中。所述制剂应适合给药方式。

[0131] 本发明的免疫原性组合物还可包含一种或多种额外的免疫调节剂,其是扰乱或改

变免疫系统从而观察到体液和/或细胞介导的免疫的上调或下调的物质。在一个实施方案中，提供了免疫系统的体液和/或细胞介导的能力(arms)的上调。

[0132] 某些细胞调节剂的实例包括例如佐剂或细胞因子，或尤其是ISCOMATRIX™(CSL Limited;Parkville,Australia，描述于美国专利第5,254,339号)。可用于本发明的免疫原性组合物的佐剂的非限制性实例包括RIBI佐剂系统(Ribi Inc.;Hamilton,MT)、明矾(alum)、矿物质凝胶如氢氧化铝凝胶、水包油乳液、油包水乳液如弗氏完全和不完全佐剂、嵌段共聚物(CytRx;Atlanta,GA)、QS-21(Cambridge Biotech Inc.;Cambridge,MA)、SAF-M(Chiron;Emeryville,CA)、AMPHIGEN™佐剂、皂苷、Quil A或其他皂苷部分、单磷酰脂质A、以及阿夫立定(N,N-双十八烷基-N′,N′-双(2-羟乙基)-1,3-二氨基丙烷、N,N-双十八烷基-N′,N′-双(2-羟乙基)丙二胺)脂质-胺佐剂。可用于本发明的免疫原性组合物中的水包油乳液的非限制性实例包括改性的SEAM62和SEAM 1/2制剂。改性SEAM62是包含5%(v/v)角鲨烯(Sigma)、1%(v/v)SPAN™85清洁剂(ICI Surfactants)、0.7%(v/v)聚山梨酯80清洁剂(ICI Surfactants)、2.5%(v/v)乙醇、200mcg/mL Quil A、100mcg/ml胆固醇和0.5%(v/v)卵磷脂的水包油乳液。改性SEAM 1/2是包含5%(v/v)角鲨烯(Sigma)、1%(v/v)SPAN™85清洁剂、0.7%(v/v)聚山梨酯80清洁剂、2.5%(v/v)乙醇、100mcg/mL Quil A和50mcg/ml胆固醇的水包油乳液。可包含在免疫原性组合物中的其他免疫调节剂包括例如一种或多种白介素、干扰素或其他已知的细胞因子或趋化因子。在一个实施方案中，佐剂可以是环糊精衍生物或多聚阴离子聚合物，例如分别在美国专利第6,165,995号和第6,610,310号中描述的那些。应理解，所用的免疫调节剂和/或佐剂会取决于被给药所述免疫原性组合物的个体、规定的注射途径及注射次数。

[0133] 除多种荚膜多糖-蛋白缀合物外，本发明的免疫原性组合物还可包含一种或多种防腐剂。FDA要求存于多剂量(multiple-dose、multi-dose)小瓶中的生物产品含有防腐剂，只有少数例外。含防腐剂的疫苗产品包括含有苄索氯铵(炭疽热)、2-苯氧基乙醇(DTaP、HepA、莱姆病(Lyme)、小儿麻痹症(肠胃外))、苯酚(肺炎(Pneumo)、伤寒(肠胃外)、牛痘病)和硫柳汞(DTaP、DT、Td、HepB、Hib、流行性感冒、JE、脑膜炎(Mening)、肺炎、狂犬病)的疫苗。被批准用于注射药物的防腐剂包括例如氯代丁醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、苄索氯铵、苯扎氯铵、苯甲酸、苯甲醇、苯酚、硫柳汞和硝酸苯汞。

[0134] 包装和给药形式

[0135] 本发明的制剂还可包含缓冲剂、盐、二价阳离子、非离子清洁剂、冷冻保护剂如糖、以及抗氧化剂如自由基清除剂或螯合剂、或其任意多重组合中的一种或多种。任一组分(例如螯合剂)的选择可以决定是否需要另一组分(例如清除剂)。为给药而配制的最终组合物应是无菌的和/或无热原的。本领域技术人员可根据多种因素如所需的特定储存和给药条件来凭经验决定这些组分及其他组分的哪种组合对于包含在本发明的含防腐剂的免疫原性组合物中是最佳的。

[0136] 在某些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种生理学可接受的缓冲剂，其选自但不限于Tris(氨基丁三醇)、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸和琥珀酸盐。在某些实施方案中，将制剂缓冲到约6.0至约9.0、优选约6.4至约7.4的pH范围内。

[0137] 在某些实施方案中，可能期望调节本发明的免疫原性组合物或制剂的pH。可使用

本领域的标准技术来调节本发明的制剂的pH。制剂的pH可以调节到3.0至8.0。在某些实施方案中，制剂的pH可以为或可调节到3.0至6.0、4.0至6.0、或5.0至8.0。在其他实施方案中，制剂的pH可以为或可调节到约3.0、约3.5、约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约5.8、约6.0、约6.5、约7.0、约7.5或约8.0。在某些实施方案中，pH可以为或可调节到4.5至7.5、或4.5至6.5、5.0至5.4、5.4至5.5、5.5至5.6、5.6至5.7、5.7至5.8、5.8至5.9、5.9至6.0、6.0至6.1、6.1至6.2、6.2至6.3、6.3至6.5、6.5至7.0、7.0至7.5、或7.5至8.0。在特定的实施方案中，制剂的pH为约5.8。

[0138] 在某些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种二价阳离子，包括但不限于$MgCl_2$、$CaCl_2$和$MnCl_2$，其浓度为约0.1mM至约10mM，优选至多5mM。

[0139] 在一些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种盐，包括但不限于氯化钠、氯化钾、硫酸钠和硫酸钾，其以当肠胃外给药时对于个体是生理学可接受的离子强度存在，并以在最终制剂中产生选定的离子强度或渗量(osmolarity)的最终浓度而包含在内。制剂的最终离子强度或重量摩尔渗透压浓度(osmolality)会由多种组分(例如来自一种或多种缓冲化合物的离子及其他非缓冲的盐)来决定。优选的盐NaCl以至多约250mM的范围存在，并且选择盐浓度以补足其他组分(例如糖)，从而使制剂的最终总渗量与肠胃外给药(例如肌内注射或皮下注射)相容，并且会促进免疫原性组合物制剂的免疫原性组分在多种温度范围内的长期稳定性。不含盐的制剂会容忍一种或多种选定的冷冻保护剂的范围增加以保持期望的最终渗量水平。

[0140] 在某些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种冷冻保护剂，其选自但不限于二糖(例如乳糖、麦芽糖、蔗糖或海藻糖)以及多羟基烃(例如卫矛醇、甘油、甘露醇和山梨醇)。

[0141] 在某些实施方案中，制剂的渗量为约200mOs/L至约800mOs/L的范围内，并且优选的范围是约250mOs/L至约500mOs/L或约300mOs/L至约400mOs/L。不含盐的制剂可包含例如约5％至约25％的蔗糖，优选约7％至约15％、或约10％至约12％的蔗糖。或者，不含盐的制剂可包含例如约3％至约12％的山梨醇，优选约4％至7％、或约5％至约6％的山梨醇。如果添加诸如氯化钠的盐，则蔗糖或山梨醇的有效范围相对减少。这些及其他此类重量摩尔渗透压浓度和渗量的考虑也完全在本领域技术人员的范围内。

[0142] 在某些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种自由基氧化抑制剂和/或螯合剂。多种自由基清除剂和螯合剂是本领域已知的，并且用于本文所述的制剂及使用方法。实例包括但不限于乙醇、EDTA、EDTA/乙醇混合物、三乙醇胺、甘露醇、组氨酸、甘油、柠檬酸钠、六磷酸肌醇、三聚磷酸盐、抗坏血酸/抗坏血酸盐、琥珀酸/琥珀酸盐、马来酸/马来酸盐、去铁胺、EDDHA和DTPA，以及上述的两种或更多种的各种组合。在某些实施方案中，可以有效增强制剂的长期稳定性的浓度添加至少一种非还原自由基清除剂。还可以各种组合形式添加一种或多种自由基氧化抑制剂/螯合剂，例如清除剂和二价阳离子。螯合剂的选择会决定是否需要添加清除剂。

[0143] 在某些实施方案中，本发明的与肠胃外给药相容的制剂包含一种或多种非离子表面活性剂，包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯，聚山梨酯-80(TWEEN™80)、聚山梨酯-60(TWEEN™60)、聚山梨酯-40(TWEEN™40)和聚山梨酯-20(TWEEN™20)；聚氧乙烯烷基醚，包括但不限于Brij 58、Brij 35；以及其他，例如TRITON™X-100、TRITON™ X-114、NP40(壬

基苯氧基聚乙氧基乙醇)、SPAN™85和PLURONIC™系列的非离子型表面活性剂(例如,PLURONIC™121),并且优选组分为浓度为约0.001%至约2%(优选至多约0.25%)的聚山梨酯-80或浓度为约0.001%至1%(优选至多约0.5%)的聚山梨酯-40。

[0144] 在某些实施方案中,本发明的制剂包含一种或多种适于肠胃外给药的额外的稳定剂,例如包含至少一个巯基(-SH)的还原剂(例如,半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、还原谷胱甘肽、硫基乙醇酸钠、硫代硫酸盐、单硫代甘油或其混合物)。替代地或任选地,本发明的含防腐剂的免疫原性组合物制剂可以通过从储存容器中去除氧、保护制剂免于光(例如,通过使用琥珀色玻璃容器)而进一步稳定化。

[0145] 本发明的含防腐剂的免疫原性组合物制剂可包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,其包含自身不诱导免疫应答的任何赋形剂。合适的赋形剂包括但不限于大分子,例如蛋白质、糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、蔗糖(Paoletti等人,2001,Vaccine,19:2118)、海藻糖、乳糖和脂质聚集体(例如油液滴或脂质体)。此类载体是本领域技术人员熟知的。药学上可接受的赋形剂在例如Gennaro,2000,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,ISBN:0683306472中讨论。

[0146] 本发明的组合物可以被冻干或处于含水形式(即,溶液或悬浮液)。脂质制剂可有利地从其包装形式直接给药而无需在水性介质中复原,因此对于注射是理想的(如本发明的冻干组合物所需的那样)。

[0147] 将本发明的免疫原性组合物直接递送到个体可以通过肠胃外给药(肌内给药、腹腔内给药、皮内给药、皮下给药、静脉内给药、或向组织的间质间隙给药);或通过直肠给药、口服给药、阴道给药、局部给药、经皮给药、鼻内给药、眼部给药、耳部给药、肺部给药或其他粘膜给药而实现。在优选的实施方案中,肠胃外给药是通过肌内注射到例如个体的大腿或上臂来进行的。注射可通过针(例如皮下注射针)进行,或者可使用无针注射。典型的肌内剂量是0.5mL。本发明的组合物可以多种形式制备,例如,作为液体溶液剂或混悬剂用于注射。在某些实施方案中,所述组合物可被制备成粉末或喷雾剂用于肺部给药,例如呈吸入剂形式。在其它实施方案中,所述组合物可被制备成栓剂或阴道栓,或用于鼻、耳或眼给药,例如,制备成喷雾剂、滴剂、凝胶剂或粉末。用于特定免疫原性组合物的组分的最佳量可通过涉及在个体中观察适当免疫应答的标准研究来确定。在进行初始疫苗接种后,个体可接受一次或若干次充分间隔的加强免疫。

[0148] 本发明的免疫原性组合物可以单位剂量或多剂量形式(例如,2剂量、4剂量或更多剂量)包装。对于多剂量形式来说,小瓶通常但未必优于载药注射器。合适的多剂量形式包括但不限于:每个容器2-10剂量,每剂量0.1mL-2mL。在某些实施方案中,所述剂量是0.5mL剂量。参见例如国际专利申请WO 2007/127668,其援引加入本文。

[0149] 组合物可提供于小瓶或其它合适的储存容器中,或可提供于预装药递送装置中,所述装置是例如可供给有针或无针的单组份或多组份注射器。注射器通常但未必含有单剂量的含防腐剂的本发明的免疫原性组合物,但还包括预装药多剂量注射器。同样,小瓶可包括单剂量,但也可包括多剂量。

[0150] 可常规地确定有效剂量体积,但用于注射的组合物的典型剂量为0.5mL的体积。在某些实施方案中,配制剂量以向人类个体给药。在某些实施方案中,配制剂量以向成人、少年、青少年、幼儿或婴儿(即,不超过1周龄)的人类个体给药,并且在优选实施方案中可通过

注射给药。

[0151] 本发明的液体免疫原性组合物还适合用于复原以冻干形式提供的其他免疫原性组合物。倘若免疫原性组合物将用于此类即时复原，则本发明提供具有两个或更多个小瓶、两个或更多个即时装药的(ready-filled)注射器、或每一者中的一个或多个的药盒，其中注射器的内容物用于在注射前复原小瓶的内容物，或反之亦然。

[0152] 或者，本发明的免疫原性组合物可以是冻干并复原的，例如使用本领域熟知的众多冷冻干燥方法之一以形成干燥的、规则成形(例如球形)的颗粒，例如微丸或微球，所述颗粒具有可通过改变用于制备该颗粒的确切方法而选择和控制的颗粒特性，例如平均粒径。所述免疫原性组合物还可包含佐剂，该佐剂可任选地与单独的干燥的、规则成形(例如球形)的颗粒(例如微丸或微球)一起制备或包含在所述颗粒内。在此类实施方案中，本发明还提供了免疫原性组合物药盒，其包含含有稳定的干燥免疫原性组合物的第一组分，任选地还包含本发明的一种或多种防腐剂，以及含有用于复原所述第一组分的无菌水溶液的第二组分。在某些实施方案中，所述水溶液包含一种或多种防腐剂，并且可以任选地包含至少一种佐剂(参见例如WO2009/109550(援引加入本文))。

[0153] 在再一实施方案中，多剂量形式的容器选自但不限于以下中的一种或多种：一般实验室玻璃器皿、烧瓶、烧杯、量筒、发酵器、生物反应器、管道、管、袋、罐、小瓶、小瓶盖(例如，橡皮塞、螺口盖(screw on cap))、安瓿、注射器、双室或多室注射器、注射器塞、注射器柱塞、橡皮盖、塑料盖、玻璃盖、药筒和一次性笔等。本发明的容器不受制造材料限制，并且包括例如玻璃、金属(例如，钢、不锈钢、铝等)和聚合物(例如，热塑性塑料、弹性体、热塑性弹性体)等材料。在具体实施方案中，所述形式的容器是具有丁基塞的5mL Schott 1型玻璃小瓶。本领域技术人员会了解，上述形式决不是详尽列表，而仅仅就可用于本发明的形式种类充当技术人员的指导。用于本发明中的其它形式可在来自实验室设备供应商和制造商(例如United States Plastic公司(Lima,OH),VWR)的公开目录中找到。

[0154] 诱导免疫应答和保护免于感染的方法

[0155] 本发明还包括使用本文所述的免疫原性组合物的方法。例如，本发明的一个实施方案提供诱导抗致病细菌(例如肺炎链球菌)的免疫应答的方法，其包括向个体给药免疫原性量的本文所述的任何免疫原性组合物，所述免疫原性组合物包含细菌抗原，例如源自致病细菌的细菌荚膜多糖。本发明的一个实施方案提供保护个体免于肺炎链球菌感染的方法，或预防肺炎链球菌感染的方法，或降低与由肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的严重性或延迟与由肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的发作的方法，所述方法包括向个体给药免疫原性量的本文所述的任何免疫原性组合物，所述免疫原性组合物包含细菌抗原，例如源自肺炎链球菌的细菌荚膜多糖。本发明的一个实施方案提供了治疗或预防个体的与链球菌属(Streptococcus sp.)相关的链球菌感染、疾病或病症的方法，所述方法包括向所述个体给药治疗有效量或预防有效量的本文所述的免疫原性组合物的步骤。在一些实施方案中，治疗或预防链球菌感染、疾病或病症的方法包括人类、兽类、动物或农业治疗。另一实施方案提供治疗或预防个体的与链球菌属相关的链球菌感染、疾病或病症的方法，所述方法包括由本文所述的免疫原性组合物生成多克隆或单克隆抗体制剂，并且使用所述抗体制剂来赋予所述个体被动免疫。本发明的一个实施方案提供预防正经历手术操作的个体的链球菌感染的方法，所述方法包括在所述手术操作之前向所述个体给药预防

有效量的本文所述的免疫原性组合物的步骤。

[0156] 对抗原或免疫原性组合物的“免疫应答”是个体中产生对存在于目标抗原或疫苗组合物中的分子的体液和/或细胞介导的免疫应答。出于本发明的目的，“体液免疫应答”是抗体介导的免疫应答并且涉及引入和生成以一定亲和力识别和结合本发明的免疫原性组合物中的抗原的抗体，而“细胞介导的免疫应答”是由T细胞和/或其他白细胞介导的免疫应答。“细胞介导的免疫应答”是通过提供与主要组织相容性复合物(MHC)的I类或II类分子、CD1或其他非典型MHC样分子相关的抗原表位而诱发的。这激活了抗原特异性CD4+T辅助细胞或CD8+细胞毒性T淋巴细胞(“CTL”)。CTL对表现出与典型或非典型MHC编码并且在细胞表面上表达的蛋白质有关的肽抗原具有特异性。CTL帮助诱导和促进对细胞内微生物的细胞内破坏、或对受此类微生物感染的细胞的溶解。细胞免疫的另一方面涉及通过辅助T细胞进行的抗原特异性反应。辅助T细胞用于帮助刺激针对表现出与其表面上的典型或非典型MHC分子相关的肽或其他抗原的细胞的非特异性效应细胞的功能，并且集中于所述非特异性效应细胞的活性。“细胞介导的免疫应答”还指由活化的T细胞和/或其他白细胞(包括那些源自CD4+和CD8+T细胞的细胞)产生的细胞因子、趋化因子和其他此类分子的产生。特定抗原或组合物刺激细胞介导的免疫应答的能力可通过多种测定来确定，例如通过淋巴组织增生(淋巴细胞活化)测定、CTL细胞毒性细胞测定，通过测定敏化个体中对所述抗原具有特异性的T-淋巴细胞，或通过测量T细胞响应抗原再刺激而实现的细胞因子产生。此类测定为本领域内所熟知。参见例如Erickson等人(1993)J.Immunol.151:4189-4199；以及Doe等人(1994)Eur.J.Immunol.24:2369-2376。

[0157] 如本文所用的“治疗”(包括其变体，例如“治疗(treat)”或“治疗的(treated)”)意指以下中的任意一个或多个：(i)预防感染或再感染，如在传统疫苗中，(ii)降低症状的严重性或消除症状，和(iii)基本上或完全消除目标病原体或病症。因此，可预防性地(在感染前)或治疗性地(在感染后)实现治疗。在本发明中，预防性治疗是优选方式。根据本发明的特定实施方案，提供针对微生物感染(例如，细菌如链球菌)治疗(包括预防性和/或治疗性免疫)宿主动物的组合物和方法。本发明的方法可用于赋予个体预防性和/或治疗性免疫。还可对用于生物医学研究应用的个体实施本发明的方法。

[0158] 如本文所使用的“哺乳动物”意指人类或非人类动物。更具体地，哺乳动物是指归类为哺乳动物的任何动物，包括人类、驯养和农场动物以及研究用动物、动物园动物、运动型动物和宠物伴侣动物，例如家庭宠物和其他家养动物，包括但不限于牛、绵羊、雪貂、猪、马、兔、山羊、狗、猫等。优选的伴侣动物是狗和猫。优选地，所述哺乳动物是人类。

[0159] “免疫原性量”和“免疫有效量”二者在本文可交换使用，是指抗原或免疫原性组合物足以引发免疫应答(细胞(T细胞)或体液(B细胞或抗体)应答或二者，如通过本领域技术人员已知的标准测定所测量的)的量。

[0160] 组合物中特定缀合物的量通常是基于用于该缀合物的总多糖(缀合和非缀合的)来计算的。例如，在100mcg多糖剂量中，含有20％游离多糖的缀合物会含有约80mcg的缀合的多糖和约20mcg的非缀合多糖。当计算缀合物的剂量时，通常不考虑蛋白质对缀合物的贡献。缀合物的量可根据链球菌血清型而变化。通常，每一剂量会包含0.1mcg至100mcg，特别是0.1mcg至10mcg，更特别是1mcg至10mcg的多糖。免疫原性组合物中不同多糖组分的“免疫原性量”可存在差异，并且各自可包含1mcg、2mcg、3mcg、4mcg、5mcg、6mcg、7mcg、8mcg、9mcg、

10mcg、15mcg、20mcg、30mcg、40mcg、50mcg、60mcg、70mcg、80mcg、90mcg或约100mcg的任何特定的多糖抗原。

[0161] 肺炎链球菌“侵袭性疾病”是指从存在相关的临床疾病体征/症状的通常无菌的部位分离细菌。通常无菌的身体部位包括血液、CSF、胸膜液、心包液、腹膜液、关节/滑液、骨、内部身体部位(淋巴结、脑、心脏、肝、脾、玻璃体液、肾、胰、卵巢)或其他通常无菌的部位。特征为侵袭性疾病的临床病症包括菌血症、肺炎、蜂窝组织炎、骨髓炎、心内膜炎、败血性休克等。

[0162] 抗原作为免疫原的有效性可通过增殖测定、通过细胞溶解测定(例如铬释放测定以测量T细胞溶解其特异性靶细胞的能力)、或通过测量B细胞活性水平(通过测量对血清中抗原具有特异性的循环抗体的水平来测量B细胞活性水平)来测量。如本文所述,免疫应答还可通过测量给药所述抗原之后诱导的抗原特异性抗体的血清水平来检测,并且更特别地,通过测量这样诱导的抗体增强特定白细胞的调理吞噬能力的能力来检测。所述免疫应答的保护水平可通过用已给药的抗原攻击免疫的宿主来测量。例如,如果需要免疫应答的抗原是细菌,则通过检测用所述细菌细胞攻击动物之后的存活百分比或死亡百分比来测量免疫原性量的抗原所诱导的保护水平。在一个实施方案中,保护量可通过测量与细菌感染相关的至少一种症状(例如,与感染相关的发热)来测量。多抗原或多组分疫苗或免疫原性组合物中每种抗原的量会相对于每种其他组分而变化,并且可通过本领域技术人员已知的方法来确定。此类方法会包括用于测量免疫原性和/或体内效力的操作。在某些实施方案中,术语“约”意指指定的值或范围的20%内,优选10%内,且更优选5%内。

[0163] 本发明还提供特异性且选择性地结合到本发明的荚膜多糖或糖缀合物的抗体和抗体组合物。在一些实施方案中,当向个体给药本发明的荚膜多糖或糖缀合物后生成抗体。在一些实施方案中,本发明提供针对本发明的一种或多种荚膜多糖或糖缀合物的纯化或分离的抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是功能性的,如通过在动物效力模型中或通过调理吞噬杀灭测定对细菌的杀灭所测量的。在一些实施方案中,本发明的抗体赋予个体被动免疫。本发明还提供编码本发明的抗体或抗体片段的多核苷酸分子,以及使用本领域技术人员熟知的技术产生本发明的抗体或抗体组合物的细胞、细胞系(例如杂交瘤细胞或用于重组产生抗体的其他工程细胞系)或转基因动物。

[0164] 本发明的抗体或抗体组合物可用于治疗或预防个体的与链球菌属相关的链球菌感染、疾病或病症的方法,所述方法包括产生多克隆或单克隆抗体制剂,并且使用所述抗体或抗体组合物以赋予所述个体被动免疫。本发明的抗体还可用于诊断方法,例如检测荚膜多糖或其糖缀合物的存在、或对荚膜多糖或其糖缀合物的水平进行定量。

[0165] 以下实施例以例示且非限制性方式提供。缩写:MW=分子量;WFI=注射用水;TEMPO=2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基自由基;NCS=N-氯代琥珀酰亚胺。

实施例

[0166] 实施例1:使用TEMPO/NCS的Pn血清型-12F的缀合

[0167] 为了改善血清型12F-CRM_{197}糖缀合物的稳定性,使用2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基自由基(TEMPO)和作为共氧化剂的N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)来将伯醇氧化成醛基,从而开发供替代的化学物。GC/MS分析表明氧化位点与高碘酸盐介导的氧化的位点不同。在TEMPO-

NCS氧化的情况下,α-D-Glcp和2-Glcp被氧化,而当使用高碘酸盐时,α-D-Galp是主要的氧化位点(参见图1)。如本文更详细地所描述的,TEMPO以催化量(≤0.1摩尔当量)使用,并且通过改变所用的NCS的量来实现期望的氧化度(DO)。随后,合成并表征多个缀合物。通常,在多个阶段中进行血清型12F糖缀合物的产生,如下:

[0168] 1)将血清型12多糖水解至50kDa至500kDa的分子量

[0169] 2)用TEMPO/NCS活化血清型12F多糖

[0170] 3)纯化活化的多糖

[0171] 4)将活化的血清型12F与CRM_{197}蛋白缀合

[0172] 5)纯化血清型12F-CRM缀合物。

[0173] 实施例2:血清型12F的水解和氧化

[0174] 通常在酸性条件下通过加热来进行多糖的水解以获得100kDa至350kDa的期望范围的平均分子量。典型的实验在下文描述。

[0175] 水解

[0176] 向带夹套的反应容器添加血清型12F多糖溶液。对此,添加所需体积的0.30M乙酸和注射用水(WFI)以保持约0.1M乙酸浓度。使用1N NaOH或冰乙酸将溶液的pH调节至3.2±0.3。将反应混合物的温度升高至70±5℃。在70±5℃下搅拌反应混合物90分钟至120分钟。将反应混合物冷却至23±2℃,并通过添加1M NaOH溶液而中和(pH 7.0)。使用30K MWCO膜,通过用对WFI的超滤/渗滤来纯化水解的多糖。通过0.22μm过滤器过滤溶液,并在2℃至8℃下储存,直至氧化。通过SEC-MALLS来分析水解的多糖的分子量以确保分子量满足100kDa至350kDa的目标范围。

[0177] 部分氧化

[0178] 在一个实验中,使用微流化器,利用加压均化来机械地按尺寸分级血清型12F多糖,以将分子量降低至约100kDa至500kDa。向反应容器以4.0mg/mL的浓度添加按尺寸分级的多糖,并以1:1v/v的比率与碳酸氢盐/碳酸盐缓冲液(0.5M $NaHCO_3$/0.05M Na_2CO_3缓冲液,pH 8.6)混合。向搅拌的混合物添加≤0.1摩尔当量的TEMPO。通过添加0.6摩尔当量至1.0摩尔当量的NCS来开始反应。将反应混合物在室温下搅拌2小时,此后使用30K超滤膜、通过用WFI渗滤来纯化活化的多糖。将纯化的多糖收集并通过定量测量醛(使用3-甲基-2-苯并异噻唑酮(benziothiazolinone)腙(MBTH)测定)和多糖(使用蒽酮测定)来测定氧化度(DO)。

[0179] 在另一实验中,将血清型12F多糖水解以将分子量降低成约100kDa至500kDa的分子量。向反应容器添加血清型12F多糖并以1:1v/v的比率与0.5M $NaHCO_3$/0.05M Na_2CO_3缓冲液(pH 8.6)混合。向搅拌的混合物添加0.6摩尔当量至1.0摩尔当量的溶解在WFI中的NCS。通过添加约0.1摩尔当量的溶解在WFI中的TEMPO来启动活化。将反应混合物在室温下搅拌2小时,此后使用30K超滤膜通过用WFI渗滤来纯化活化的多糖。将纯化的活化的多糖通过0.2μm过滤器过滤,并在使用前于4℃下储存。

[0180] 还在pH 6.5、7.0、7.5和8.0的磷酸钠缓冲液中成功地进行了TEMPO/NCS介导的氧化。在一些活化实验中,诸如正丙醇的伯醇用于中止试剂,从而避免糖过氧化。在另一组实验中,使化学水解的多糖直接经历氧化,而没有超滤/渗滤纯化步骤。

[0181] 实施例3:血清型12F氧化多糖的缀合

[0182] 在一个实验中,向反应容器添加纯化的氧化的血清型12F多糖,然后添加0.5M磷酸

钠缓冲液(pH 6.5),直至0.1M的最终缓冲浓度。向该溶液添加先前冻干的CRM_{197},并彻底混合,从而获得均质溶液。使用稀HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。之后添加1.5摩尔当量的$NaCNBH_3$。将反应混合物在室温(23℃)搅拌24小时,并在37℃搅拌2.5天。然后,用1×0.9%盐水稀释反应混合物,并用2摩尔当量的硼氢化钠将未反应的醛基"加帽"。加帽反应时间为3小时。

[0183] 在另一实验中,向反应容器添加纯化的活化的血清型12F,然后添加0.5M磷酸钠缓冲液(pH 6.5),直至0.1M的最终缓冲浓度。向该溶液添加先前冻干的CRM_{197},并彻底混合,从而获得均质溶液。使用稀HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。之后添加3摩尔当量的$NaCNBH_3$。将反应混合物在23℃搅拌24小时,并在37℃搅拌48小时。然后,用1×0.9%盐水稀释反应混合物并搅拌,用1摩尔当量硼氢化钠$NaBH_4$将未反应的醛基"加帽"。加帽反应时间为3小时。

[0184] 在另一实验中,向反应容器添加纯化的活化的血清型12F,并与CRM_{197}溶液混合。将混合物冻干,并且将粉末溶解在0.1M磷酸钠缓冲液(pH 6.8)中,直至5mg/mL的最终糖浓度。如需要,使用稀HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。之后添加3摩尔当量$NaCNBH_3$。将反应混合物在23℃搅拌24小时,并在37℃搅拌48小时。然后,用1×0.9%盐水稀释反应混合物,用1摩尔当量硼氢化钠$NaBH_4$将未反应的醛基"加帽"。加帽反应时间为3小时。

[0185] 实施例4:缀合物纯化

[0186] 使用5μm过滤器过滤加帽的反应混合物,然后使用100K MWCO超滤膜纯化。首先使用10mM琥珀酸盐/0.9%盐水,pH 6.0缓冲液渗滤缀合物。然后,将纯化的缀合物通过0.45/0.22μm过滤器过滤以获得大量缀合物。

[0187] 实施例5:氧化度

[0188] 使用TEMPO/NCS体系实现血清型12F多糖中伯醇的成功氧化。通过调节NCS共氧化剂的量来将水解的血清型12F多糖氧化至不同的氧化度(DO)水平。在图2中示出使用不同多糖批次和分子量的由不同量的NCS对DO的影响。通常,0.5摩尔当量至2.5摩尔当量的NCS用于实现目标氧化度。通常,氧化反应在2小时内完成,因为在2小时之后没有观察到DO的显著变化。

[0189] 使用TEMPO/NCS氧化的多糖生成并表征多个血清型12F缀合物。结果总结于表1中。使用其他用TEMPO/NCS体系活化的肺炎球菌血清型也成功地生成了一些代表性缀合物。生成其他肺炎球菌血清型的操作与用于血清型12F的方法相同。结果描述于表2至4中。

[0190] 表1:肺炎球菌血清型12F-CRM_{197}缀合物

[0191]

缀合物批次	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
氧化时间(小时)	2	2	4	2	2	2
氧化度(D.O)	12.0	6.0	9.6	12.0	11.5	11.5
活化的糖的产率百分比	80	71	70	89	86	86
经 MALLS 得到的活化的多糖 MW (kDa)	137	155	170	190	240	240
缀合方法	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
缀合物结果						
糖产率(%)	51.6	76.8	53.6	76.3	65.8	40.7
糖/蛋白比	1.2	0.9	1.0	1.1	1.4	0.9
游离糖的百分比	24	10	17	20	23	14
经 SEC-MALLS 得到的 Mw(kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

[0192] 表2:肺炎球菌血清型3F-CRM_{197}缀合物

[0193]

缀合物批次	Pn3-106-1	Pn3-106-4
多糖MALLS(Mw)kDa	430	430
氧化		
氧化时间(hr)	2	2
D.O.	9.4	15
活化的糖的产率百分比	55	65
经SEC-MALLS得到的活化的糖MW(kDa)	340	360
缀合		
缀合物结果		
糖产率(%)	29.9	55.0
糖-蛋白比	0.7	1.6
游离糖的百分比	21.0	30.0
经SEC-MALLS得到的MW(kDa)	2100	2600

[0194] 表3:肺炎球菌血清型33F-CRM_{197}缀合物

[0195]

缀合物批次	33F-#55	33F-#63
多糖MALLS(Mw)kDa	128kDa	150kDa
D.O.	20	5
产率	92%	97%
糖产率(%)	44%	68%
糖-蛋白比	0.54	0.68
游离糖的百分比	＜1%	1.10%
游离蛋白质	＜1%	＜1%
经SEC-MALLS得到的Mw(kDa)	11160kDa	2730kDa

[0196] 表4:肺炎球菌血清型10A缀合物

[0197]

缀合物批次	10A-#77	10A-#78	10A-#85	10A-#88	10A-#89	10A-#103	10A-#104
多糖 MALLS (Mw)	538kDa	538kDa	538kDa	538kDa	538kDa	509kDa	509kDa
D.O.	7.9	24	12	6.9	10	11.3	5.7
产率	82%	90%	94%	88%	94%	94%	86%
糖产率(%)	35	20	42	35	41	43	36
糖-蛋白比	0.53	0.33	0.73	0.7	0.95	0.6	0.45
游离糖	<1	20	4.6	1.6	5.7	<1	<1
游离蛋白质	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
经 SEC-MALLS 得到的 Mw	3168	16390	4117	3137	2855	4380	3772

[0198] 实施例6:使用TEMPO/NCS氧化法的Pn-血清型12F-CRM197缀合物的免疫原性

[0199] 在标准条件下的小鼠中测定血清型12F-CRM_{197}缀合物在小鼠中的调理吞噬活性(OPA)效价。在表5中示出在4周和7周时具有95％置信区间的OPA效价(几何平均效价(GMT)),证明血清型12F-CRM_{197}缀合物(批次12F-97B;还参见表1对该缀合物的表征数据)在鼠科免疫原性模型中引发OPA效价。与由高碘酸盐氧化生成的对照缀合物(171B)相比,由TEMPO-NCS生成的缀合物免疫原性更高。

[0200] 表5:血清型12F-CRM197缀合物的免疫原性

[0201]

缀合物样品/剂量	0.001ug	0.01ug	0.1ug
高碘酸盐氧化(171B)对照	4	16	172
TEMPO/NCS氧化(12F-97B)	40	417	880

[0202] 实施例7:在诸如TEMPO/NCS的氧化剂的存在下使用硝酰基的Pn-血清型12F的推定机制

[0203] 在图6中示出Pn-血清型12F的氧化/缀合的推定机制。通过催化量的硝酰基如TEMPO以及氧化剂如NCS作为化学计量氧化剂来氧化多糖的伯羟基。在催化周期中,实际的氧化剂为N-氧代铵盐。C-6伯羟基的氧化生成醛基,其随后与载体蛋白(CRM_{197})的赖氨酸的伯氨基反应以生成糖缀合物。

[0204] 实施例8:稳定性比较

[0205] 由高碘酸盐氧化生成的缀合物与由TEMPO/NCS氧化生成的缀合物的稳定性(在25℃)的比较(参见图7)表明由Pn-12F多糖的氧化生成的缀合物是相对更稳定的。如图7所示,对于通过高碘酸盐氧化Pn-12F多糖而生成的糖缀合物,在25℃下观察到游离糖随时间增加。相反,使用TEMPO/NCS氧化Pn-12F多糖而制备的糖缀合物在类似的条件下未表现出对游离糖的显著趋势。

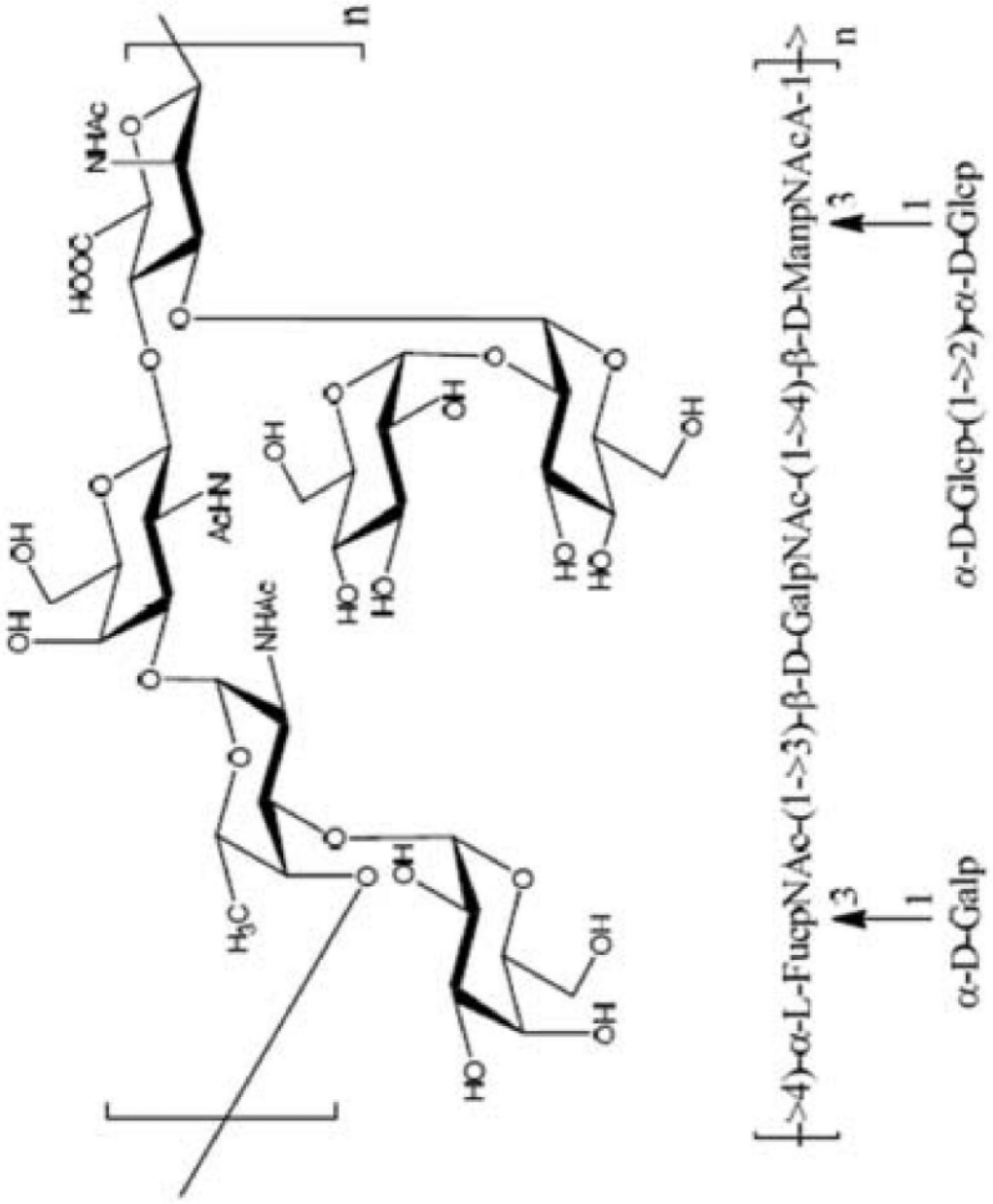

n
NHAc
HOOC
AcHN
NHAc
H3C
OH
HO
[->4)-α-L-FucpNAc-(1->3)-β-D-GalpNAc-(1->4)-β-D-ManpNAcA-1->]n
3
1
α-D-Galp
α-D-Glcp-(1->2)-α-D-Glcp

图1

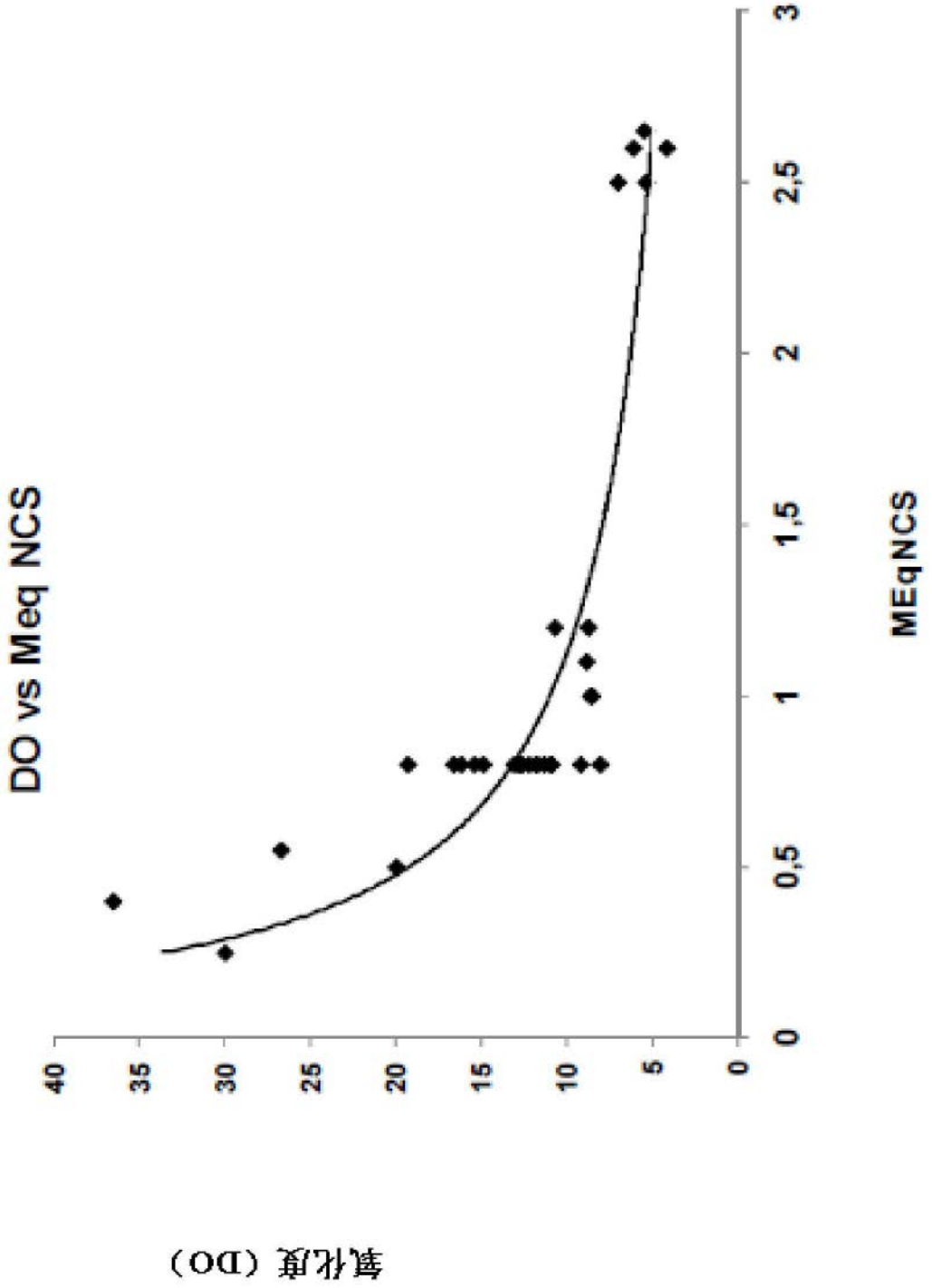


图2

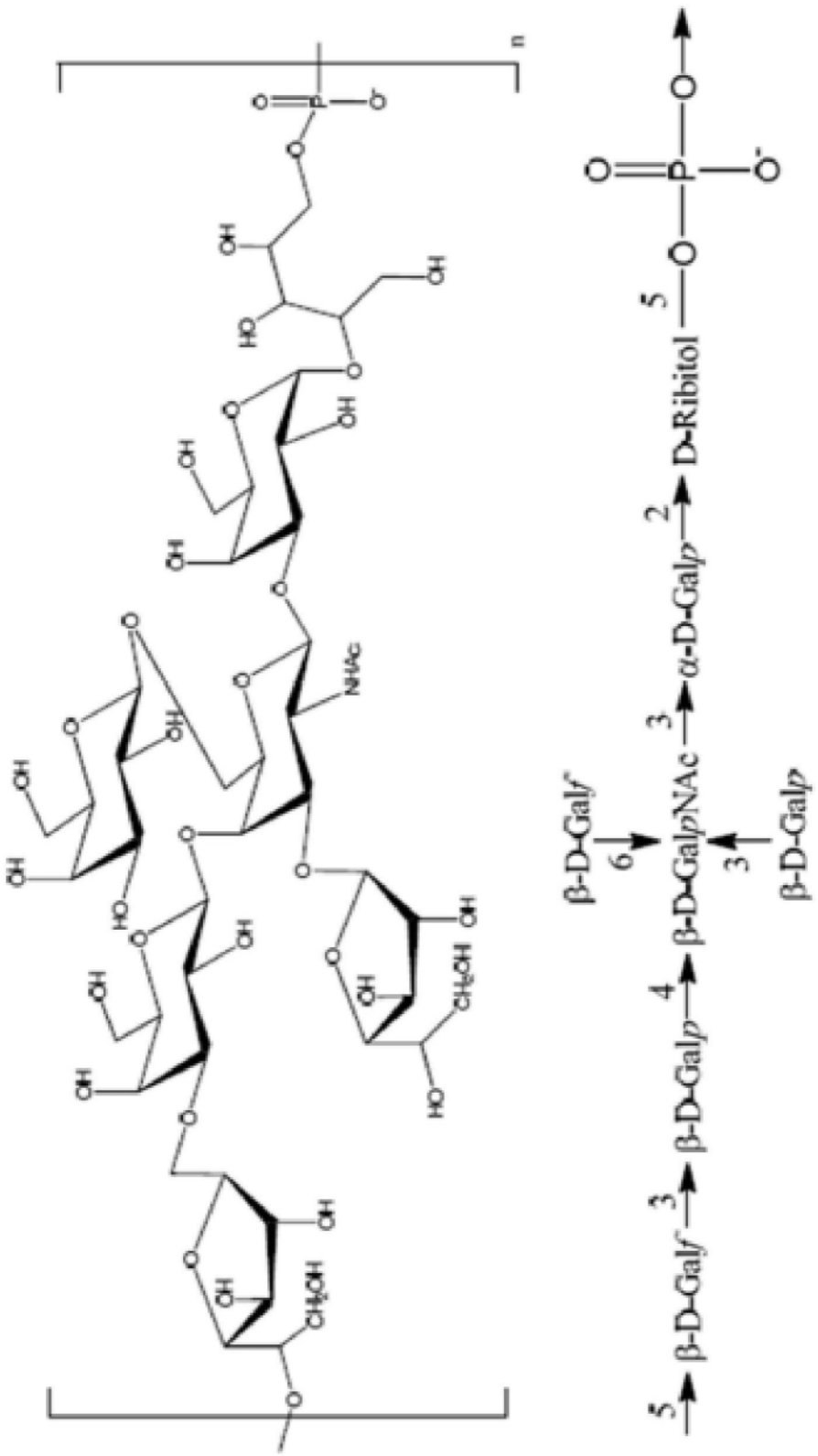

n
β-D-Galf
6
5
β-D-Galf
3
β-D-Galp
4
β-D-GalpNAc
3
α-D-Galp
2
D-Ribitol
5
3
β-D-Galp

图3

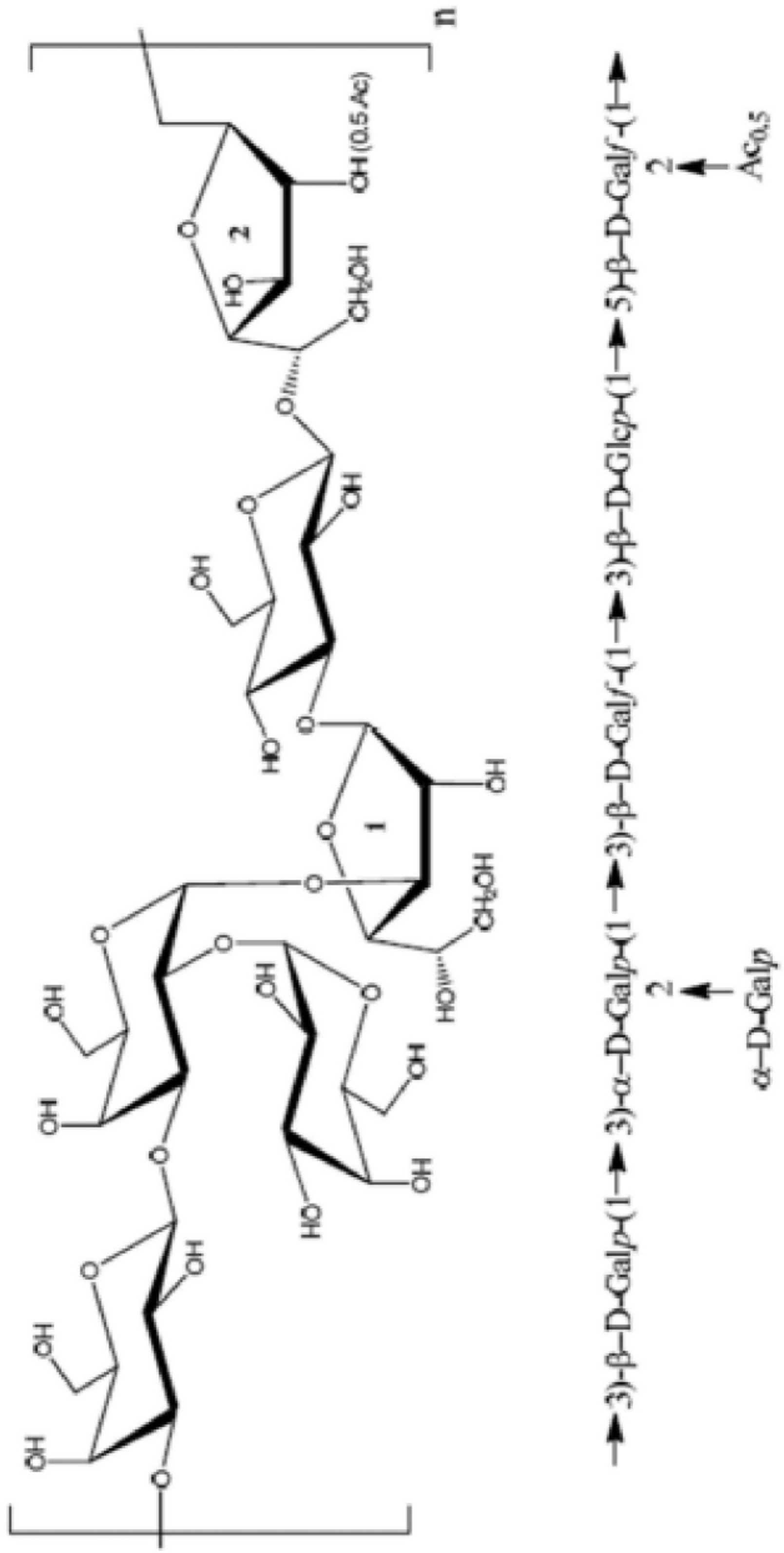

→3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galf-(1→3)-β-D-Glcp-(1→5)-β-D-Galf-(1→
α-D-Galp
$Ac_{0.5}$

图4

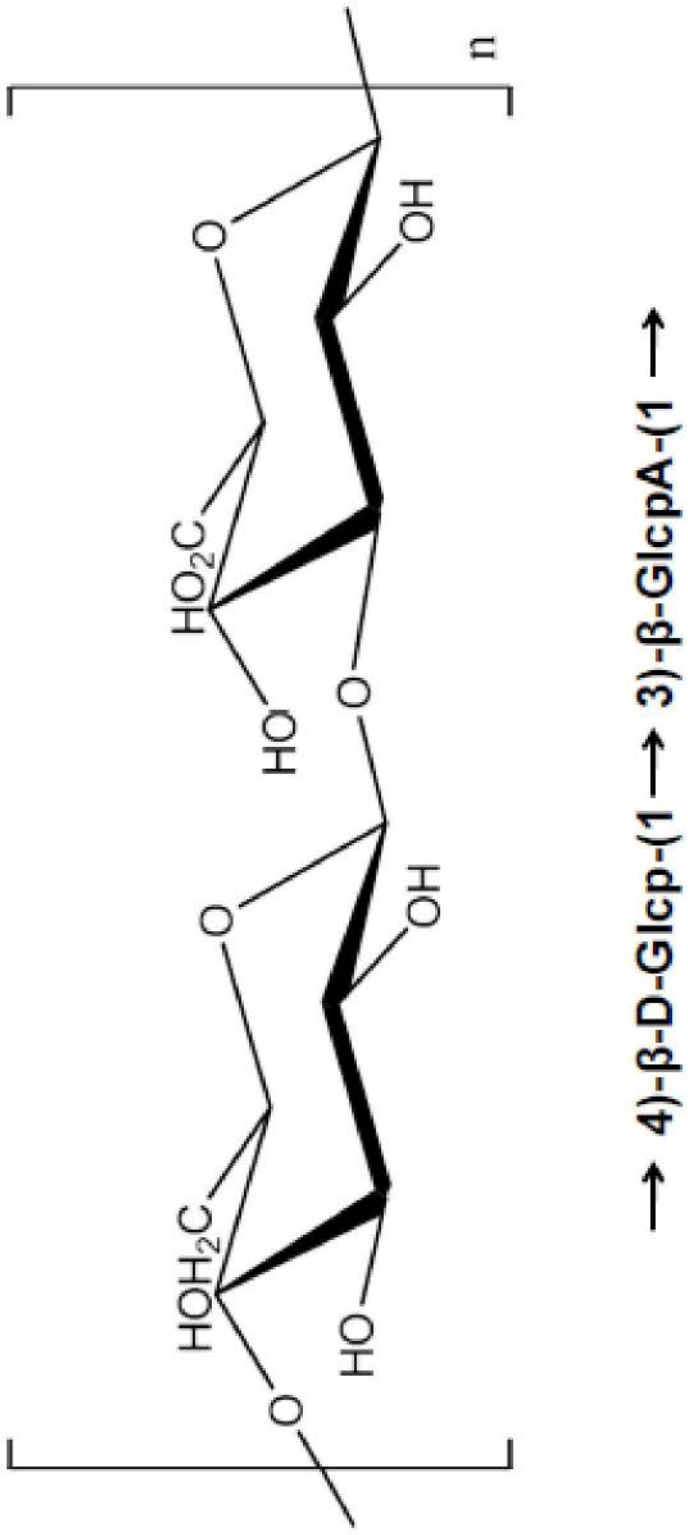


图5

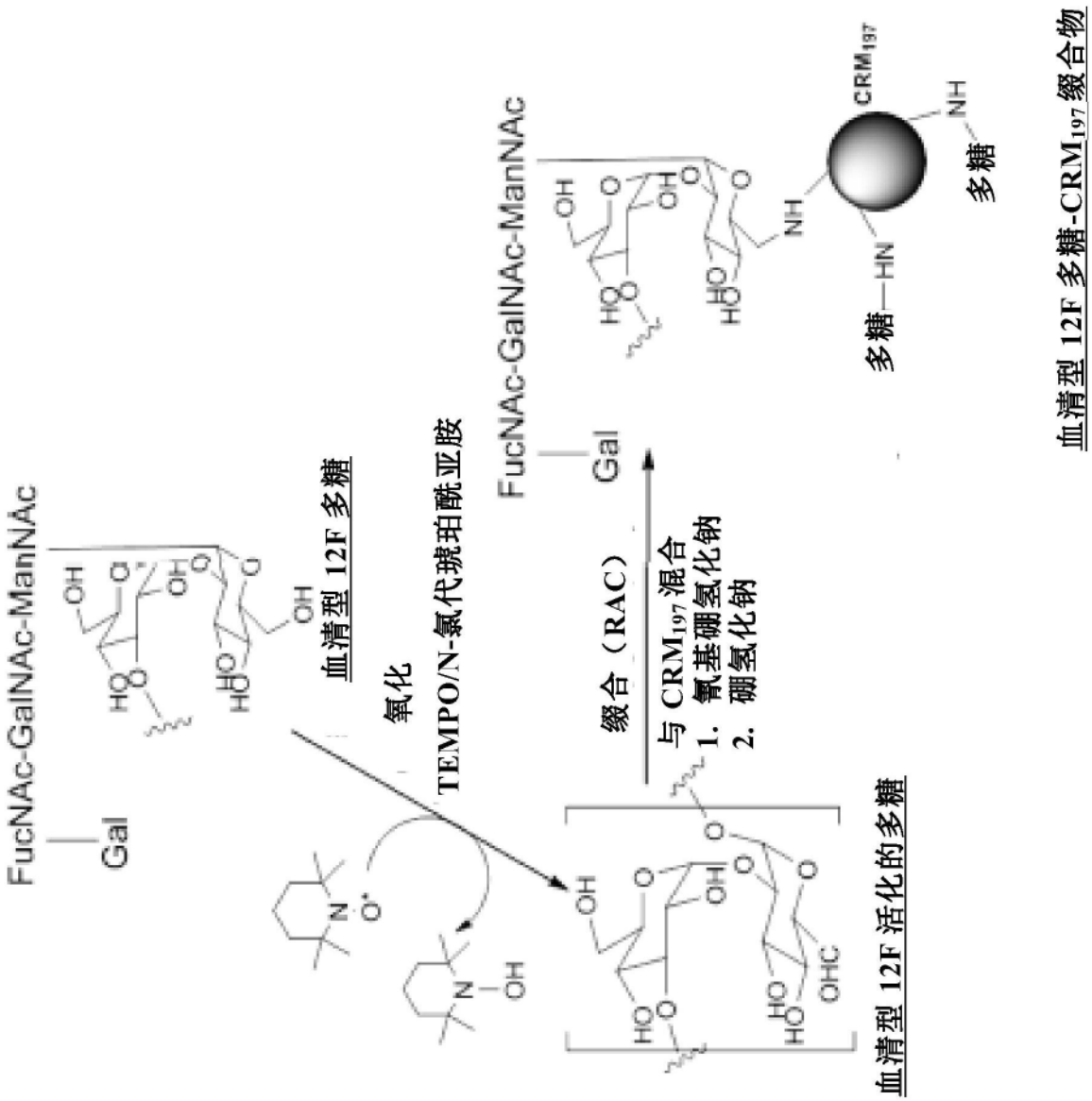

FucNAc-GalNAc-ManNAc
Gal
血清型 12F 多糖
氧化
TEMPO/N-氯代琥珀酰亚胺
缀合（RAC）
与 CRM_{197} 混合
1. 氰基硼氢化钠
2. 硼氢化钠
血清型 12F 活化的多糖
FucNAc-GalNAc-ManNAc
Gal
CRM_{197}
多糖—HN
多糖
血清型 12F 多糖-CRM_{197} 缀合物

图6

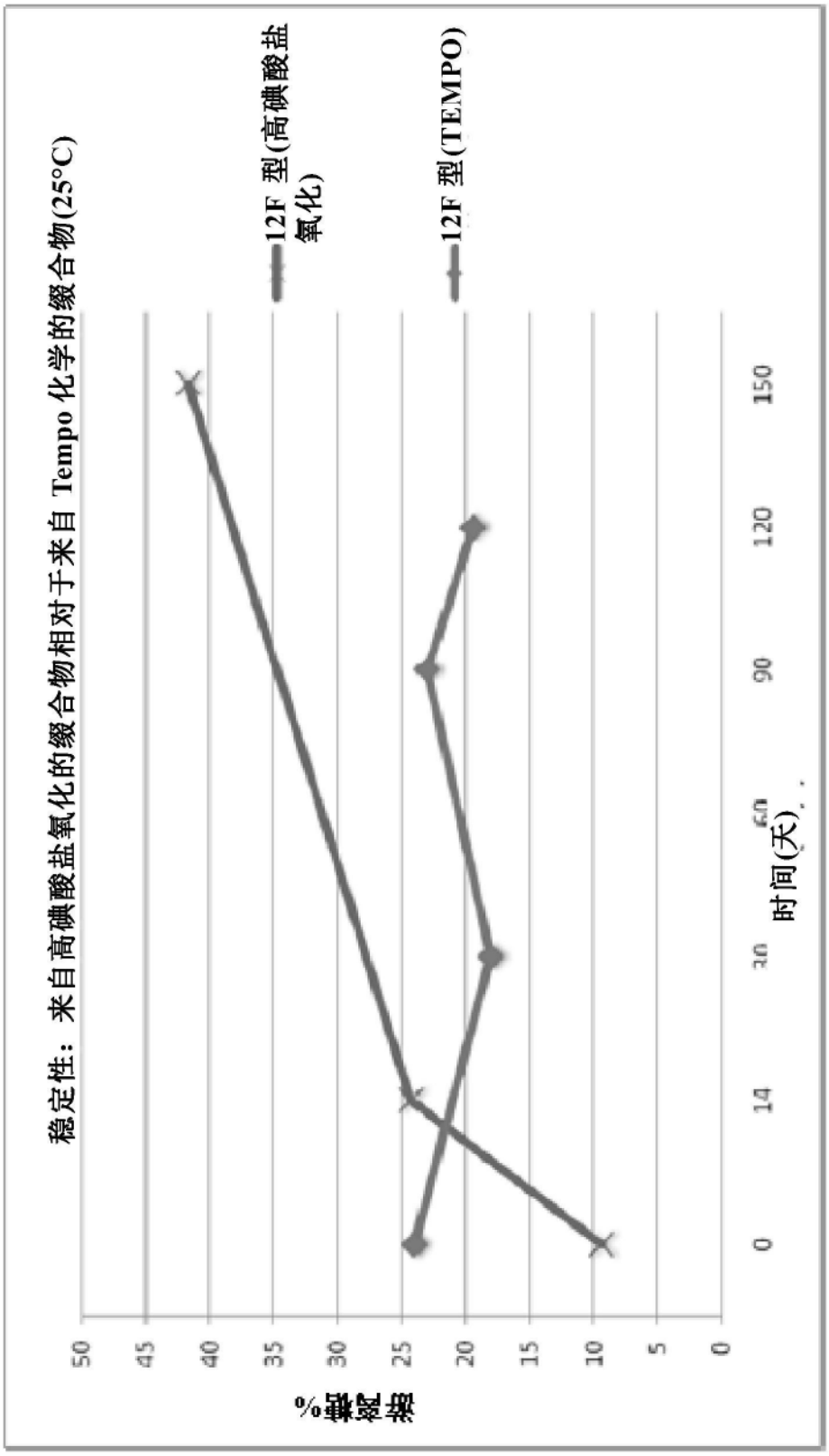

稳定性：来自高碘酸盐氧化的缀合物相对于来自 Tempo 化学的缀合物(25°C)
12F 型(高碘酸盐氧化)
12F 型(TEMPO)
游离糖%
时间(天)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
14
30
90
120
150

图7