



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103656632 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201210359369. 2

CN 102068690A , 2011. 05. 25, 权利要求 6.

(22) 申请日 2012. 09. 24

CN 101785857A , 2010. 07. 28, 说明书实施例  
1、5, 第 8、55 段 .

(73) 专利权人 北京科兴中维生物技术有限公司  
地址 100085 北京市海淀区上地西路 39 号

审查员 程婷

(72) 发明人 高强 蔡芳 王见冬 孙胜军  
王治伟 陈磊 王新立 阮力  
尹卫东

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002

代理人 王朋飞 张庆敏

(51) Int. Cl.

A61K 39/116(2006. 01)

A61K 39/385(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101785857A , 2010. 07. 28, 说明书实施例  
1、5, 第 8、55 段 .

权利要求书2页 说明书13页

(54) 发明名称

多价肺炎球菌荚膜多糖组合物、其制备方法  
及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种多价肺炎球菌荚膜多糖组合物、其制备方法及应用,其是含有血清型 6A 和至少一种选自下组的额外血清型的肺炎链球菌荚膜多糖的组合物;其中,所述额外血清型为 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 或 33F。本发明的多价肺炎球菌荚膜多糖组合物能诱导机体产生体液免疫,对由上述 24 种最常见血清型肺炎球菌引起的感染性疾病能产生较好的保护效果,免疫覆盖率广,效果优于市面上已有的各类肺炎球菌多糖疫苗和结合疫苗。

1. 多价肺炎球菌荚膜多糖组合物,其特征在于,其为含有血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 的肺炎链球菌的荚膜多糖的组合物;

分别对肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6A 和其他血清型的荚膜多糖进行分离纯化,然后将各纯化的不同血清型荚膜多糖等质量混合,并加入赋形剂,即得多价肺炎球菌荚膜多糖组合物,各型荚膜多糖含量为 25-75  $\mu\text{g/ml}$ ;

所述分别对肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6A 和其他血清型的荚膜多糖进行分离纯化的步骤为:

- 1) 建立肺炎球菌菌种库,采用工作种子进行肺炎球菌发酵;
- 2) 向肺炎球菌发酵液中加入适量的去氧胆酸钠进行杀菌并剥离肺炎球菌荚膜多糖;
- 3) 对杀菌后的发酵液进行离心,去除菌体,收集离心上清,然后进行超滤浓缩;
- 4) 向浓缩液中加入无水乙醇,使乙醇终浓度为 25%~45%,搅拌后离心去除核酸;
- 5) 向上清中加入乙醇使其终浓度达到 55%~80%,搅拌后,离心,去除上清收集沉淀;
- 6) 加水溶解沉淀,加入 1-3 倍溶液体积的苯酚进行抽提,去除蛋白;
- 7) 向上清中加入乙醇,使其终浓度达到 55%~80%,离心后收集沉淀,即得纯化的肺炎球菌荚膜多糖。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,24 价肺炎球菌多糖组合物各型多糖的标准物质购自美国标准生物品收藏中心。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,各型荚膜多糖含量为 50  $\mu\text{g/ml}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述组合物中还含有氯化钠和磷酸盐缓冲剂。

5. 制备权利要求 1 所述的多价肺炎球菌荚膜多糖组合物的方法,其特征在于,分别对肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6A 和选自下组的额外血清型的荚膜多糖进行分离纯化,然后将各纯化的血清型荚膜多糖混合,任选加入赋形剂,即得多价肺炎球菌荚膜多糖组合物;其中,所述额外血清型为 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F;肺炎链球菌荚膜多糖分离纯化的步骤为:

- 1) 建立肺炎球菌菌种库,采用工作种子进行肺炎球菌发酵;
- 2) 向肺炎球菌发酵液中加入适量的去氧胆酸钠进行杀菌并剥离肺炎球菌荚膜多糖;
- 3) 对杀菌后的发酵液进行离心,去除菌体,收集离心上清,然后进行超滤浓缩;
- 4) 向浓缩液中加入无水乙醇,使乙醇终浓度为 25%~45%,搅拌后离心去除核酸;
- 5) 向上清中加入乙醇使其终浓度达到 55%~80%,搅拌后,离心,去除上清收集沉淀;
- 6) 加水溶解沉淀,加入 1-3 倍溶液体积的苯酚进行抽提,去除蛋白;
- 7) 向上清中加入乙醇,使其终浓度达到 55%~80%,离心后收集沉淀,即得纯化的肺炎球菌荚膜多糖。

6. 权利要求 1-4 任一项所述组合物在制备用于预防肺炎链球菌所致疾病的药物中的应用。

7. 多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗,其含有将权利要求 1-4 任一项所述组合物与载体蛋白共价连接形成的缀合物,以及任选基于铝的佐剂。

8. 根据权利要求 7 所述的结合疫苗,其特征在于,其为喷雾剂、注射剂、冻干剂、胶囊

剂、片剂或丸剂。

## 多价肺炎球菌荚膜多糖组合物、其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物学及免疫学领域,具体地说,涉及一种多价肺炎球菌荚膜多糖组合物、其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),简称肺炎球菌(*pneumococcus*),1881年首次由法国人巴斯德(Louis Pasteur)及美国人 G. M. Sternberg 分别从患者痰液中分离出。该菌为革兰染色阳性,菌体似矛头状,成双或成短链状排列的双球菌,有毒株在其菌体外形成荚膜多糖。肺炎球菌是细菌感染性疾病的主要病原菌之一,可引起肺炎、脑膜炎、败血症、中耳炎等疾病,5%~10% 健康成年人以及 20%~40% 儿童的鼻咽等呼吸道中携带此菌,有毒株是引起人类疾病的重要病原菌。据联合国统计,每年有超过一百万两岁以下儿童死于肺炎球菌引起的疾病。在我国,由肺炎球菌引起的菌血症的死亡率约为 25%~29%。肺炎链球菌寄居在人类上呼吸道内,通过飞沫传播。不同人群均可被肺炎链球菌感染,但以下 3 类人群特别容易受到侵袭:65 岁以上的人群,5 岁以下儿童,特别是 2 岁以下的幼童,高危族,如长期病患者等。当前由于肺炎球菌对抗菌药物的抗药性增加,以及抗药菌株在世界范围的传播,因此除使用疫苗预防外,尚无其他有效的公共干预措施。

[0003] 肺炎链球菌具有几种致病因子,包括多糖荚膜,能帮助入侵寄主的免疫系统。已经发现的肺炎链球菌有 90 多个血清型,肺炎球菌多糖抗原是非 T 细胞依赖性抗原,初次免疫能诱导产生保护水平的抗体,再次免疫不能诱导产生免疫记忆;并且该疫苗对 2 岁以下的儿童不能引起有效的保护性抗体应答,而该年龄段人群是肺炎球菌感染的高危人群。

[0004] 1880 年美国 Steinberg 和法国 Pasteur 最先分离出肺炎球菌,并于 1882 年的实验中指出通过疫苗预防肺炎球菌感染的可能性。1914 年,全菌体疫苗首次得以使用,但因副反应强、效果差,其安全性和有效性受到广泛质疑,之后逐渐被淘汰。1927 年,Sehiemann 等证明了肺炎球菌荚膜多糖对人的免疫原性,并开始了肺炎球菌多糖疫苗的研究。

[0005] 目前我国仅有 7 价肺炎球菌结合疫苗,如沛儿®被批准上市,针对 2~23 个月大的婴儿或 2~5 岁有存在风险的孩童进行被动免疫,保护孩童免受肺炎链球菌的深层感染,如败血症及脑膜炎;仅能保护 7 个价次,保护范围有限,而 23 价肺炎球菌多糖疫苗(如“纽莫法®”)可以对 85% 的 55 岁以上的人群提供长达五年的保护,由于上述血清型组合主要针对欧美发达国家流行情况而设计,对亚洲特有的血清型缺乏保护。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种多价肺炎球菌荚膜多糖组合物、其制备方法及应用。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种含有上述组合物的多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗。

[0008] 为了实现本发明目的,本发明的一种多价肺炎球菌荚膜多糖组合物,其为含有肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型 6A 和至少一种选自下组的额外血清型的荚

膜多糖的组合物；其中，所述额外血清型为 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 或 33F。

[0009] 优选地，所述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物为含有血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 的肺炎链球菌的荚膜多糖的组合物。

[0010] 前述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物中，不同血清型的荚膜多糖按等质量混合。优选各型荚膜多糖含量为 25-75  $\mu\text{g/ml}$ ，更优选的为 50  $\mu\text{g/ml}$ 。其中，24 价肺炎球菌多糖组合物各型多糖的标准物质可购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。

[0011] 前述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物中，还含有赋形剂，所述赋形剂为氯化钠和磷酸盐缓冲剂等。

[0012] 本发明还提供一种制备多价肺炎球菌荚膜多糖组合物的方法：分别对肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型 6A 和至少一种选自下组的额外血清型的荚膜多糖进行分离纯化，然后将各纯化的血清型荚膜多糖混合，任选加入赋形剂，即得多价肺炎球菌荚膜多糖组合物；其中，所述额外血清型为 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 或 33F。

[0013] 其中，肺炎链球菌荚膜多糖分离纯化的步骤为：

[0014] 1) 建立肺炎球菌菌种库，采用肺炎球菌工作种子进行肺炎球菌发酵；

[0015] 2) 向肺炎球菌发酵液中加入适量的去氧胆酸钠进行杀菌并剥离肺炎球菌荚膜多糖；

[0016] 3) 对杀菌后的发酵液进行离心，去除菌体，收集离心上清，然后进行超滤浓缩；

[0017] 4) 向浓缩液中加入无水乙醇，使乙醇终浓度为 25%~45%，搅拌后离心去除核酸；

[0018] 5) 向上清中加入乙醇使其终浓度达到 55%~80%，搅拌后，离心，去除上清收集沉淀；

[0019] 6) 加水溶解沉淀，加入 1-3 倍溶液体积的苯酚进行多次抽提，去除蛋白质；

[0020] 7) 向上清中加入乙醇，使其终浓度达到 55%~80%，离心后收集沉淀，即得纯化的肺炎球菌荚膜多糖。

[0021] 还可采用本领域熟知的其它纯化技术，如柱层析、乙醇沉淀、酶切等方法对肺炎链球菌荚膜多糖进行纯化。

[0022] 本发明还提供所述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物在制备用于预防或治疗肺炎链球菌所致疾病的药物中的应用。

[0023] 本发明还提供一种多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗，其含有将上述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物与载体蛋白共价连接形成的缀合物，以及任选基于铝的佐剂。所述载体蛋白应为无毒性，且能与肺炎球菌荚膜多糖结合并且能够引起多糖免疫原性显著升高的蛋白，同时易于大量获得。本发明的载体蛋白优选为白喉类毒素或破伤风毒素，更优选为白喉类毒素 CRM197。上述蛋白载体的获得，需经过菌体发酵、超滤、纯化、脱毒等步骤，均为本领域常规技术。

[0024] 本发明还提供制备所述多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的方法，分别对不同血清型肺炎链球菌的荚膜多糖进行分离纯化，然后将各血清型荚膜多糖分别与载体蛋白进行共价连接(例如，先将纯化的荚膜多糖化学活化，通过还原胺化法将活化荚膜多糖分别单独结

合到载体蛋白上),形成单价缀合物,将各型单价缀合物分别采用铝佐剂吸附后混合,或各型单价缀合物混合后再采用铝佐剂吸附,即得多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗。所述基于铝的佐剂,如氧化铝、氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等,其终浓度为0.25-4.0mg/ml。所述基于铝的佐剂可市售获得,也可以采用本领域常规方法进行制备。

[0025] 前述的多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗,其可以为喷雾剂、注射剂、冻干剂、胶囊剂、片剂或丸剂等。可通过以下方式进行免疫:皮肤、注射(包括皮下注射、肌肉注射、静脉注射)、口服、滴鼻或粘膜喷雾等。

[0026] 本发明的多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗可以用于保护或者治疗由于肺炎球菌感染引发肺炎的病人,疫苗可以通过肌肉、皮下、皮内途径注射或经过粘膜给药,适于接种人和动物。

[0027] 本发明是针对我国特有血清型肺炎球菌的流行情况,首次选择了6A以及1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F或33F中至少一种的血清型组合,从而开发出针对我国特有血清型肺炎球菌的流行情况而设计的多价肺炎球菌荚膜多糖组合物,提供最大限度的保护。

[0028] 采用本发明方法制备的多价肺炎球菌荚膜多糖组合物,其稳定性较好。该组合物具有针对上述24种血清型的肺炎球菌侵袭的多重免疫原性和保护性能,血清型覆盖范围更广,理化性质稳定,互无干扰,优于已上市的低价次肺炎组合物,且免疫应答不低于低价次的组合物。接种本发明的多价肺炎球菌荚膜多糖疫苗可以减少接种针次,简化免疫程序,同时可有效预防人及动物因上述24种血清型肺炎球菌所致的疾病,覆盖更加广泛,免疫效果更好。

[0029] 本发明的多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗可以由预防上述24种血清型肺炎球菌所致的侵袭性疾病,更加方便多效,成本更低。上述24种血清型荚膜多糖的生产,均采用发酵后纯化的方式进行制备,具有相似的生产工艺,便于工业化大规模生产,且通过灭活后提纯荚膜多糖,使疫苗具有更高的安全性及良好的免疫原性,同时,所述多价肺炎球菌荚膜多糖组合物吸附完全,理化性质稳定,互无干扰。另外,该多价结合疫苗免疫原性效果远高于同类多价次的多糖类疫苗,可有效激活2岁以下儿童B细胞,从而产生抗体,并激活记忆B细胞,诱发免疫记忆反应,可以起到更好的保护效果。

[0030] 动物实验表明,本发明的多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗可有效诱导机体产生针对上述24种血清型荚膜多糖的高滴度、特异性抗体,体外实验表明,由该多价结合疫苗所诱导的抗体具有明显的反应性与中和活性;特别是组合物中各血清型荚膜多糖的免疫效果不受另一组分的影响与干扰,吸附率大于75%,免疫原性不低于单价缀合物。该多价结合疫苗具有与各血清型单价结合原液相同的免疫原性,组合接种可以在不影响疗效的基础上大大减少接种次数。

## 具体实施方式

[0031] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0032] 实施例1 肺炎球菌荚膜多糖原液制备

[0033] 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、

23F 和 33F 血清型肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 菌株均来源于中国药品生物制品检定所与丹麦血清研究所 (SSI)。将上述菌种进行传代建立原始种子库、主种子库和工作种子库,代次分别为:原始种子批为第 1 代,主种子批为第 4 代,工作种子批为第 8 代。工作种子批启开后至接种发酵罐培养,传代应不超过 10 代。每代种子采用奶粉做冻干保护剂,冻干保藏。取工作种子在大豆蛋白胨固体培养基划线挑取菌种,接种于 5ml 的液体综合培养基,35℃ ± 2℃ 培养后,转种到 500ml 的培养液后经过培养再扩增至 10L 培养液和 50L 培养液。于对数生长期的后期或静止期的前期中止培养,取样进行纯菌检查,纯菌检查合格后在收获的培养液中加入合适量的无菌的去氧胆酸钠至终浓度为 1% 杀菌两小时以裂解细菌细胞并释放荚膜多糖。将已杀菌的培养液离心后收集上清液,上清液用 100KD 截留分子量的超滤膜包超滤浓缩 3-10 倍。

[0034] 用 pH7.0 左右的磷酸盐缓冲液对超滤液采进行超滤换液,然后加入无水乙醇,使乙醇终浓度为 25%~45%,充分搅拌后离心去除核酸。

[0035] 向上清中加入乙醇使其终浓度达到 55%~80%,搅拌后,离心,去除上清收集沉淀。

[0036] 加水溶解沉淀,加入 1-3 倍溶液体积的苯酚进行多次抽提,去除蛋白。

[0037] 向上清中加入乙醇,使其终浓度达到 55%~80%,离心后收集沉淀,将沉淀采用注射水复溶,经过 0.22 μm 的无菌滤器除菌过滤后,获得 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 共 24 种纯化血清型的肺炎球菌荚膜多糖。

[0038] 实施例 2 多价肺炎球菌荚膜多糖组合物的制备

[0039] 将实施例 1 中制备的 24 种肺炎球菌荚膜多糖原液,按照各血清型多糖含量终浓度 50 μg/ml 混合后添加缓冲液(注射水、生理盐水或磷酸盐缓冲液)定容至终体积,制成 24 价肺炎球菌多糖组合物。

[0040] 将上述制备的 24 价肺炎球菌荚膜多糖疫苗,采用低温干燥的方式制成冻干剂型,使用前采用注射水、生理盐水或者磷酸盐缓冲液进行复溶。

[0041] 采用免疫浊度法检测冻干后多价肺炎球菌多糖组合物的各型多糖含量,并与冻干前的检测结果进行对比,比较抗原物质的变化。结果见表 1。

[0042] 表 1 24 价肺炎球菌多糖疫苗各型多糖含量

血清型	多糖理论含量 $\mu\text{g/ml}$	液体制剂		冻干制剂		变异系数 %
		多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	
[0043] 1	50	43	86	48.5	97	8.5
2	50	38.4	77	43.8	87.6	9.3
3	50	52.6	105	46.3	92.6	9.0
4	50	55.6	111	52.4	104.8	4.2
5	50	45.6	91	40.1	80.2	9.1
6A	50	61.8	124	53.6	107.2	10.1
6B	50	63.2	126	60.1	120.2	3.6
7F	50	49.4	99	58.8	117.6	12.3
8	50	51	102	53.7	107.4	3.6
[0044] 9N	50	47	94	55.5	111	11.8
9V	50	44.6	89	48.4	96.8	5.8
10A	50	36.8	74	40.3	80.6	6.4
11A	50	37.2	74	39.4	78.8	4.1
12F	50	38.7	77	35.6	71.2	5.9
14	50	35.2	70	36.9	73.8	3.3
15B	50	54	108	63.4	126.8	11.4
17F	50	45.2	90	41	82	6.9
18C	50	52.4	105	45.7	91.4	9.7
19A	50	63.6	127	52.8	105.6	13.2
19F	50	46.8	94	41.6	83.2	8.3
20	50	52	104	49.2	98.4	3.9
22F	50	56	112	50.4	100.8	7.5
23F	50	68.6	137	60.7	121.4	8.7
33F	50	45.6	91	48.3	96.6	4.1

[0045] 从表1可以看出,冻干制剂的24价肺炎球菌多糖组合物的各型多糖含量与冻干前的变异系数不超过20%,表明两者结果无差异。由于免疫浊度检测的是抗原的表位,抗原表位可引起机体的免疫应答产生保护性抗体,冻干前后免疫原性表位无差异,说明冻干未对免疫原性物质的表位产生可见影响。

[0046] 实施例3 多价肺炎球菌多糖疫苗制备

[0047] 采用三种方式制备多价肺炎球菌荚膜多糖组合物。



[0048] (1) 将纯化后的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型肺炎球菌荚膜多糖分别稀释至 1200  $\mu\text{g/ml}$ ，然后分别等体积混合制备 24 价肺炎球菌荚膜多糖组合物，使各型多糖含量为 50  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0049] (2) 将纯化后的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型肺炎球菌荚膜多糖按照配制疫苗所需的各型多糖的量直接混合，然后采用注射水、生理盐水或磷酸盐缓冲液进行定容至疫苗配制体积，使各型多糖含量为 50  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0050] (3) 将纯化后的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型肺炎球菌荚膜多糖分别进行冻干，配制组合物前复溶所述冻干的多糖，然后混合制备 24 价肺炎球菌荚膜多糖组合物，使各型多糖含量为 50  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0051] 采用免疫浊度法检测上述两种配比方式的各型多糖含量，计算多糖的回收率，要求 70%~130% 之间。表 2 为单独稀释方式配比的各型多糖含量检测结果，表 3 为混合后稀释配比的各型多糖含量检测结果，表 4 为冻干后配比的各型多糖含量检测结果。

[0052] 表 2 24 价肺炎球菌多糖疫苗各型多糖含量(1)

血清型	多糖理论含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	血清型	多糖理论含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %
1	50	43	86	11A	50	37.2	74
2	50	38.4	77	12F	50	38.7	77
3	50	52.6	105	14	50	35.2	70
4	50	55.6	111	15B	50	54	108
[0053] 5	50	45.6	91	17F	50	45.2	90
6A	50	61.8	124	18C	50	52.4	105
6B	50	63.2	126	19A	50	63.6	127
7F	50	49.4	99	19F	50	46.8	94
8	50	51	102	20	50	52	104
9N	50	47	94	22F	50	56	112
9V	50	44.6	89	23F	50	68.6	137
10A	50	36.8	74	33F	50	45.6	91

[0054] 表 3 24 价肺炎球菌多糖疫苗各型多糖含量(2)

血清型	多糖理论含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	血清型	多糖理论含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %
[0055]							

[0056]	1	50	49.2	98.4	11A	50	36.4	72.8
	2	50	45.6	91.2	12F	50	39.9	79.8
	3	50	57.3	114.6	14	50	40.1	80.2
	4	50	52.1	104.2	15B	50	52.2	104.4
	5	50	48.9	97.8	17F	50	39.8	79.6
	6A	50	56.7	113.4	18C	50	46.5	93.0
	6B	50	52.6	105.2	19A	50	52.9	105.8
	7F	50	45	90.0	19F	50	42.6	85.2
	8	50	44.4	88.8	20	50	48.3	96.6
	9N	50	43.3	86.6	22F	50	55.4	110.8
	9V	50	50.7	101.4	23F	50	54.7	109.4
	10A	50	43.6	87.2	33F	50	50.9	101.8

[0057] 表 4 24 价肺炎球菌多糖疫苗各型多糖含量(3)

血清型	多糖理论 含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	血清型	多糖理论 含量 $\mu\text{g/ml}$	多糖含量 $\mu\text{g/ml}$	回收率 %	
[0058]	1	50	45.2	90.4	11A	50	38.5	77
	2	50	52.7	105.4	12F	50	45.2	90.4
	3	50	50.6	101.2	14	50	46.3	92.6
	4	50	45.4	90.8	15B	50	43.7	87.4
	5	50	58.1	116.2	17F	50	58.4	116.8
	6A	50	44.5	89	18C	50	44.7	89.4
	6B	50	39.8	79.6	19A	50	59.1	118.2
	7F	50	45.6	91.2	19F	50	38.8	77.6
	8	50	46.9	93.8	20	50	59.6	119.2
	9N	50	58.3	116.6	22F	50	51.7	103.4
	9V	50	52.7	105.4	23F	50	52.9	105.8
	10A	50	55	110.0	33F	50	42.5	85.0

[0059] 从表 2- 表 4 可以看出, 三种配制方式的各型多糖含量回收均在 70%~130% 之间, 两种配制式对多糖未产生不可逆的干扰, 两种配制方式无显著差异。

[0060] 实施例 4 多价肺炎球菌荚膜多糖疫苗免疫原性分析

[0061] 用实施例 1 制备的 24 种肺炎球菌荚膜多糖分别稀释至  $50 \mu\text{g/ml}$  以及实施例 2 制

备的 24 价肺炎球菌荚膜多糖组合物免疫 18-22g 的 BALB/c 小鼠, 每只小鼠腹腔注射 0.5ml, 第 28 天经眼眶采血, 离心后收集血清, 采用 ELISA 方法检测血清抗上述所有血清型肺炎球菌荚膜多糖的抗体滴度。

[0062] 免疫组分为 24 价肺炎球菌多糖组合物(各型多糖含量均为  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 型各型多糖原液(多糖含量分别为  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、24 种肺炎球菌荚膜多糖和阴性生理盐水组。每组免疫 10 只小鼠。

[0063] 结果表明, 经 24 价肺炎球菌多糖组合物和 24 个血清型的肺炎球菌荚膜多糖原液分别免疫后, 小鼠血清的抗体 IgG 的浓度(OD 值)与生理盐水组相比有显著提高。表明 24 价多糖球菌多糖组合物和 24 种血清型的单价肺炎球菌荚膜多糖原液均具有一定的免疫原性, 可有效诱导机体产生针对上述 24 种血清型荚膜多糖的高滴度、特异性抗体。体外实验证实该组合物所诱导的抗体具有明显的反应性与中和活性。同时 24 价多糖球菌多糖组合物针对各型肺炎球菌荚膜多糖的抗体与 24 种血清型的相应的单价肺炎球菌相应荚膜多糖的抗体无差异, 表明 24 种肺炎球菌荚膜多糖混合后的免疫原性与未混合的单价原液免疫原性相当, 组合物中各血清型荚膜多糖的与免疫效果不受另一组分的影响与干扰, 免疫原性不劣效于单价多糖原液, 具有与各血清型单价肺炎球菌荚膜多糖相同的免疫原性。

[0064] 实施例 5 多价肺炎球菌荚膜多糖-蛋白缀合物组合物的制备

[0065] 将实施例 1 中制备的 24 种肺炎球菌荚膜多糖原液, 采用盐酸进行酸化降解, 然后在多糖中加入高碘酸钠氧化, 氧化后检测多糖的活化度, 然后按照多糖:蛋白=1:2~2:1 的重量比加入纯化后的白喉类毒素 CRM197 蛋白进行结合, 结合后加入硼氢化钠终止结合反应, 制备肺炎球菌荚膜多糖缀合物, 缀合物采用超滤透析, 去除未结合的蛋白和多糖, 纯化后采用  $0.22 \mu\text{m}$  的滤器除菌过滤, 即为肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物。

[0066] 将上述制备的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物按照多糖含量 2-16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  混合, 即得 24 价的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白缀合物组合物。

[0067] 实施例 6 多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的制备

[0068] 将实施例 5 制备的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物按照多糖终浓度 2-16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  混合, 加入磷酸铝、硫酸铝或氢氧化铝佐剂, 制成 24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗, 铝含量为 0.4mg/ml。

[0069] 实施例 7 多价肺炎球菌荚膜多糖组合物的铝吸附

[0070] 采用两种方式对多价肺炎球菌荚膜多糖组合物进行吸附制备疫苗。

[0071] (1) 将纯化后的 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物先混合, 然后与 0.8mg/ml 的磷酸铝佐剂混合, 使各型多糖含量为  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 制成 24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗(24vPnC), 铝佐剂终浓度为 0.4mg/ml。

[0072] (2) 将 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物分别与 0.8mg/ml 的磷酸铝佐剂混合, 使各型多糖含量为  $96 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 铝佐剂浓度为 0.4mg/ml, 然后将各吸附后的溶

液等体积混合,制成终产物。

[0073] 检测上述吸附方式制备的 24vPnC 的吸附完全性、各型多糖含量回收率。24vPnC 各型多糖的吸附效果与各型多糖含量采用免疫浊度法进行检测。

[0074] 多糖吸附完全性与各型多糖回收率计算方法如下：

[0075] 吸附完全性：

[0076]

上清 Xn 型多糖含量

$$\text{Xn 型多糖吸附完全性} = \left[ 1 - \frac{\text{上清 Xn 型多糖含量}}{\text{Xn 型多糖理论含量}} \right] \times 100\%$$

Xn 型多糖理论含量

[0077] Xn 型多糖为 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型。

[0078] 疫苗的吸附完全性反应疫苗中未被铝佐剂捕获的游离的各型多糖的含量占疫苗中总的理论各型多糖含量的比值,结果越高显示疫苗的吸附效果越好,要求不低于 70%。先混合后吸附配比方式的检测结果见表 5,先分别吸附后混合配比方式的检测结果见表 6。

[0079] 表 5 24vPnC 各型多糖吸附完全性结果

[0080]

血清型	多糖理论含量 μg/ml	上清 μg/ml	吸附率 %	是否合格
1	4	<1	>75	合格
2	4	<1	>75	合格
3	4	<1	>75	合格
4	4	<1	>75	合格
5	4	<1	>75	合格
6A	4	<1	>75	合格
6B	4	<1	>75	合格
7F	4	<1	>75	合格
8	4	<1	>75	合格
9N	4	<1	>75	合格
9V	4	<1	>75	合格

[0081]

10A	4	<1	>75	合格
11A	4	<1	>75	合格
12F	4	<1	>75	合格
14	4	<1	>75	合格
15B	4	<1	>75	合格
17F	4	<1	>75	合格
18C	4	<1	>75	合格
19A	4	<1	>75	合格
19F	4	<1	>75	合格
20	4	<1	>75	合格
22F	4	<1	>75	合格
23F	4	<1	>75	合格
33F	4	<1	>75	合格

[0082] 表6 24vPnC 各型多糖吸附完全性检测结果

[0083]

血清型	多糖理论含量 μg/ml	上清 μg/ml	吸附率 %	是否合格
1	4	<1	>75	合格
2	4	<1	>75	合格
3	4	<1	>75	合格
4	4	<1	>75	合格
5	4	<1	>75	合格
6A	4	<1	>75	合格
6B	4	<1	>75	合格
7F	4	<1	>75	合格
8	4	<1	>75	合格
9N	4	<1	>75	合格
9V	4	<1	>75	合格
10A	4	<1	>75	合格
11A	4	<1	>75	合格
12F	4	<1	>75	合格
14	4	<1	>75	合格

[0084]	15B	4	<1	>75	合格
	17F	4	<1	>75	合格
	18C	4	<1	>75	合格
	19A	4	<1	>75	合格
	19F	4	<1	>75	合格
	20	4	<1	>75	合格
	22F	4	<1	>75	合格
	23F	4	<1	>75	合格
	33F	4	<1	>75	合格

[0085] 从表 5 和表 6 可以看出,采用上述方法制得的 24vPnC 组合物(疫苗)的吸附率效果较好,均超过 75% (检测限度)。表明疫苗吸附效率高。同时,两种吸附方式无差异。

[0086] 采用氢氧化铝与硫酸铝,调整铝凝胶佐剂的铝含量终浓度至 0.25mg/ml、4.0mg/ml;制备多价肺炎球菌组合物,铝含量为 0.125mg/ml、2.0mg/ml,亦得到相似的结果。

[0087] 实施例 8 采用不同铝佐剂对多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗吸附效果的影响

[0088] 将 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖-蛋白单价缀合物混合成各血清型多糖含量 8 μg/ml,然后分别与 1.0mg/ml 的磷酸铝、1.0mg/ml 的硫酸铝、1.0mg/ml 的氢氧化铝佐剂等体积混合吸附。吸附后,离心吸附产物,吸取上清,采用免疫浊度法检测上清中的各型多糖含量,检测各配比方式的吸附效果(表 7)。

[0089] 表 7 不同铝佐剂的吸附效果

血清型	多糖理论含	磷酸铝佐剂上清	硫酸铝佐剂上清	氢氧化铝佐剂上清
	量 μg/ml	多糖含量 μg/ml	多糖含量 μg/ml	多糖含量 μg/ml
1	4	<1	<1	<1
2	4	<1	<1	<1

[0091]

3	4	<1	<1	<1
4	4	<1	<1	<1
5	4	<1	<1	<1
6A	4	<1	<1	<1
6B	4	<1	<1	<1
8	4	<1	<1	<1
9N	4	<1	<1	<1
9V	4	<1	<1	<1
10A	4	<1	<1	<1
11A	4	<1	<1	<1
12F	4	<1	<1	<1
14	4	<1	<1	<1
15B	4	<1	<1	<1
17F	4	<1	<1	<1
18C	4	<1	<1	<1
19A	4	<1	<1	<1
19F	4	<1	<1	<1
20	4	<1	<1	<1
22F	4	<1	<1	<1
23F	4	<1	<1	<1
33F	4	<1	<1	<1

[0092] 从表 7 可以看出, 24 价肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白组合物, 经过不同的铝佐剂吸附, 在相同浓度时, 吸附后未吸附的各型多糖含量均低于检测方法的检测下限。该结果表明, 在该铝佐剂浓度下, 三种佐剂对多价肺炎球菌荚膜多糖组合物的吸附效果均较好, 且三种佐剂的吸附效果未见差异。

[0093] 实施例 9 不同载体蛋白对多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的影响

[0094] 将 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 血清型的肺炎球菌荚膜多糖分别与白喉类毒素 CRM197、白喉毒素、破伤风毒素进行偶联, 然后将各偶联方式获得的肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白单价缀合物分别混合后, 与 0.8mg/ml 的氢氧化铝佐剂进行混合, 制备 24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗, 使各血清型荚膜多糖含量各为 4  $\mu$ g/ml, 铝佐剂终浓度 0.4mg/ml。检测不同载体蛋白对于相同的吸附方式下的吸附效果, 以及免疫原性。

[0095] 结果表明, 采用不同的载体蛋白偶联肺炎球菌荚膜多糖后, 采用氢氧化铝吸附, 吸附后离心吸附物质检测上清中各型多糖含量, 检测结果均小于检测下限 1  $\mu$ g/ml, 表明不同的载体对于肺炎球菌荚膜多糖结合后的吸附效果较好, 且无可见差异。

[0096] 实施例 10 多价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗免疫原性分析

[0097] 用实施例 5 制备的 24 价肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白组合物、实施例 6 制备的 24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗及其冻干剂, 以及上述 24 种血清型的单价肺炎球菌荚膜多糖、24 种血清型的肺炎球菌荚膜多糖混合物、24 种血清型的单价肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白单价缀合物, 免疫 18-22g 的 BALB/c 小鼠, 各免疫物质的多糖含量均为各血清型  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。每组免疫小鼠 10 只。0、14 天 2 针腹腔免疫, 每次 0.5ml, 第 28 天采血, 采用 ELISA 方法检测血清抗上述所有血清型肺炎球菌荚膜多糖的抗体滴度。

[0098] 结果表明, 24 种血清型的单价肺炎球菌荚膜多糖与 24 种血清型的肺炎球菌荚膜多糖混合物 2 针免疫小鼠后, 小鼠的抗体 IgG 水平与阴性对照组无差异; 各型多糖蛋白单价缀合物、24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的冻干制品与 24 价肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白组合物免疫小鼠后, 血清的抗 IgG 比阴性对照有显著性提高, 同时, 三者之间相对于同一血清型的肺炎球菌荚膜多糖的抗体水平无显著性差异。24 价肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的抗体水平比阴性对照显著升高, 且高于不含佐剂的 24 价肺炎球菌荚膜多糖 - 蛋白组合物。因此, 多糖在偶联载体蛋白后可产生更高水平的抗体, 同时, 吸附到铝佐剂后抗体水平高于未吸附的多糖 - 蛋白缀合物。

[0099] 虽然, 上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的范围。