



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108524926 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201810693844.7

WO 2016199003 A1,2016.12.15

(22) 申请日 2018.06.29

CN 110179974 A,2019.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109862908 A,2019.06.07

申请公布号 CN 108524926 A

Pichichero. Protein carriers of conjugate vaccines Characteristics, development, and clinical trials.《Human Vaccines & Immunotherapeutics》.2013,第9卷(第12期),

(43) 申请公布日 2018.09.14

(73) 专利权人 康希诺生物股份公司

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区西区南大街185号西区生物医药园四层401-420

Tontini 等. Comparison of CRM197, diphtheria toxoid and tetanus toxoid as protein carriers for meningococcal glycoconjugate vaccines.《Vaccine》.2013,第31卷

(72) 发明人 李军强 巢守柏 朱涛 莘春林

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11690

代理人 张丹

张涛 等. 3 型肺炎球菌荚膜多糖结合疫苗的研制.《中国免疫学杂志》.2015,第31卷(第10期),

(51) Int. Cl.

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

常鑫 等. 不同载体蛋白对18C型肺炎多糖结合疫苗稳定性影响的比较.《中国生物制品学杂志》.2017,第30卷(第4期),

审查员 郝攀

(56) 对比文件

WO 2007071711 A2,2007.06.28

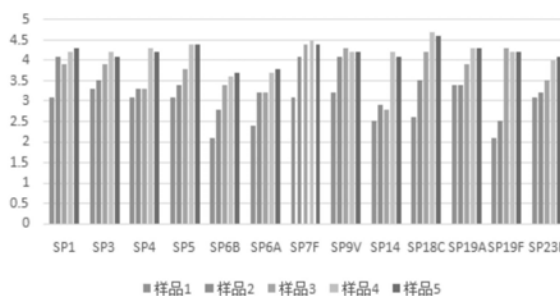
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新型多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合及其制备方法,以及该制剂组合在制备用于预防或治疗肺炎球菌所致疾病的药物中的应用。本发明还保护一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合中的结合物分子量控制方法。本发明所述的肺炎球菌结合疫苗解决了多价肺炎球菌结合疫苗中的血清抑制现象,有效提高其在制剂组合中的免疫原性。通过本发明所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合的制备方法可以有效控制结合物的分子量,更易于除去未参与结合的游离蛋白和游离多糖。



1. 一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,其特征在于,所述的制剂组合包括至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第一载体蛋白和至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第二载体蛋白,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F或33F,血清型为7F和19F的荚膜多糖缀合第二载体蛋白,所述的第一载体蛋白为CRM197,第二载体蛋白为TT或HID,其中,同一血清型的荚膜多糖只缀合一种载体蛋白,所述的多价肺炎球菌结合疫苗为10价肺炎球菌结合疫苗、13价肺炎球菌结合疫苗或15价肺炎球菌结合疫苗,所述的10价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、6B、9V、14、18C或23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F和19F,或者,所述的10价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为6B、9V、14、18C或23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F,或者,所述的13价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、3、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F和19F,或者,所述的13价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括3、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F,所述的15价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括2、3、6A、6B、9V、14、18C、19A、23F和33F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F。

2. 一种权利要求1所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第一载体蛋白,获得第一结合原液,其中,所述的第一载体蛋白为CRM197;

(2) 制备至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第二载体蛋白,获得第二结合原液,其中,血清型为7F和19F的荚膜多糖缀合第二载体蛋白,所述的第二载体蛋白为TT或HID;

(3) 将步骤(1)获得的第一结合原液与步骤(2)获得的第二结合原液合并,即得多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合;

其中,同一血清型的荚膜多糖只缀合一种载体蛋白,所述的多价肺炎球菌结合疫苗为10价肺炎球菌结合疫苗、13价肺炎球菌结合疫苗或15价肺炎球菌结合疫苗,所述的10价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、6B、9V、14、18C或23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F和19F,或者,所述的10价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为6B、9V、14、18C或23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F,或者,所述的13价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、3、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F和19F,或者,所述的13价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括3、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F,所述的15价肺炎球菌结合疫苗中与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括2、3、6A、6B、9V、14、18C、19A、23F和33F,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F和19F。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,缀合第一载体蛋白获得的结合物以膜

包超滤或者离子交换的方法进行柱纯化, 缀合第二载体蛋白获得的结合物以分子筛纯化。

4. 一种权利要求1所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合在制备用于预防肺炎球菌所致疾病的药物中的应用。

## 一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗产品开发技术领域,具体涉及一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合及其制备方法,以及该制剂组合在制备用于预防或治疗肺炎球菌所致疾病的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 肺炎链球菌简称为肺炎球菌,属革兰氏阳性菌,其主要致病因子为荚膜多糖。有荚膜菌株的毒力是无荚膜菌株的 $10^5$ 倍。根据荚膜多糖的抗原结构将肺炎球菌分为90多个血清型,其中约30个血清型的菌株可引发多种侵袭性疾病,包括菌血症、脑膜炎、肺炎球菌性肺炎、侵袭性肺炎球菌病(IPD)等。

[0003] 肺炎球菌主要引起大叶性肺炎,在儿童和老年人群发病率较高,可继发引起胸膜炎,中耳炎,脑膜炎及败血症。其中IPD患者的死亡率为10%~25%,且随着患者年龄的增长,IPD的死亡率呈上升趋势,在美国 $\geq 65$ 岁人群IPD的死亡率高达50%。

[0004] 肺炎患者通常采用抗生素进行治疗,磺胺类药物,青霉素等都对肺炎球菌引起的相关疾病有效,但是随着抗生素耐药菌的大量出现,患者治疗的周期和费用急剧上升。疫苗免疫作为一种预防控制手段,目前证实是最有效的方式,被各国政府大力推广。

[0005] 研究发现,肺炎球菌表面的荚膜多糖可作为肺炎疫苗的核心抗原,但是荚膜多糖为胸腺非依赖性抗原,因此对婴幼儿和免疫力低下的老年人群并不起作用。将荚膜多糖和载体蛋白链接后制备的结合疫苗,即可有效的解决该问题。目前市场上有两种肺炎疫苗,其一为23价肺炎多糖疫苗,其二为7价/10价/13价肺炎多糖蛋白结合疫苗。

[0006] 分析国内外上市的肺炎结合疫苗,其中wyeth的7价(血清型为4型、6B、9V、14型、18C、19F和23F)和13价肺炎结合疫苗,其载体蛋白均为CMR197。但是相比较7价肺炎结合疫苗,13价肺炎结合疫苗其成品制剂中的抗原含量增加10%。GSK的10价肺炎结合疫苗,其载体蛋白为TT,DT和PD,而且10价结合疫苗上市之后,未见GSK开发更多价肺炎结合疫苗的相关报道。开发多价结合疫苗的障碍有很多,其中一个关键的考量就是不同血清型之间的载体抑制。多价结合疫苗的生产工艺,和不同血清型之间载体抑制的解决办法是开发多价结合疫苗必须攻克的技术难关。

[0007] CN101378778A公开了一种多价肺炎链球菌免疫原性组合物,所述荚膜糖得自不同的肺炎链球菌血清型并与两种以上不同的载体蛋白缀合,其中所述组合物包含与DT或CRM197缀合的血清型19F荚膜糖,任选其中19F是组合物中唯一与DT或CRM197缀合的糖。CN103623401A公开了一种多价肺炎球菌荚膜多糖-蛋白质共轭组合物及其制备方法,该共轭组合物是由14种不同血清型的肺炎链球菌荚膜多糖和载体蛋白质共价连接形成的共轭组合物,该共轭组合物吸附效果及稳定性好。本发明提供了一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合及其结合物分子量的控制方法。

## 发明内容

[0008] 多价肺炎球菌结合疫苗中部分血清型因为载体干扰,从而在制剂中表现出比较弱的免疫原性;为解决此种多价肺炎球菌结合疫苗中的血清抑制现象,对抗原性比较弱的血清型选择TT、DT或HID作为载体蛋白,即可以有效的提高其在制剂中的免疫原性。

[0009] 为解决不同血清型结合物分子量要求不同的技术难题,本发明提供了多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合中增大结合物分子量的方法,以TT作为载体蛋白,结合物的分子量比较大,以CRM197作为载体蛋白,结合物的分子量比较小。结合物分子量比较大,结合物的纯化工艺中更易于除去未参与结合的游离蛋白和游离多糖,其免疫原性可能更好。本发明中,将分子量要求比较严格的选择以TT、DT或HID作为蛋白载体,将分子量要求不是很严格的,选择以CRM197作为蛋白载体,实现了不同血清型结合物的分子量控制。

[0010] 在13/15价肺炎结合疫苗中,各血清型结合物的分子量要求不一样,有些结合物分子量较大易于工艺去除游离多糖和游离蛋白,结合物的免疫原性较好。有些血清型分子量较小易于结合物的分离纯化,本发明中,通过不同的血清型特异性的链接不同的载体蛋白,则可以轻松的实现结合物的分子量控制。

[0011] 结合物的纯化有多种生产工艺,如分子筛,膜包超滤,离子交换柱,本发明中,以TT作为载体的结合物优先分子筛的纯化方法,其结果是结合物的分子量更大,分子量更均一,游离蛋白和游离多糖更低。对于以CRM197作为载体的结合物优先离子交换或者分子筛的纯化方法,其结果是游离多糖的含量更低。

[0012] 本发明的第一方面,提供了一种多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,所述的制剂组合包括至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第一载体蛋白和至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第二载体蛋白,血清型为7F和19F的荚膜多糖缀合第二载体蛋白,所述的第一载体蛋白为CRM197,第二载体蛋白为TT、DT或HID,其中,同一血清型的荚膜多糖只缀合一种载体蛋白,所述的制剂组合中包括至少7种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。

[0013] 优选的,所述的制剂组合中包括至少10种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。

[0014] 进一步优选的,所述的制剂组合中包括至少13种或至少15种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。

[0015] 本发明所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F或33F。

[0016] 优选的,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F或33F,或所述的荚膜多糖选自1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F。

[0017] 优选的,根据不同血清型的肺炎荚膜多糖的免疫原性以及与载体的适应性,将其分成两类,一类以CRM197作为载体蛋白,一类以TT、DT或HID作为载体蛋白,其余荚膜多糖既可以选择以CRM197作为载体蛋白,也可选择以TT、DT或HID作为载体蛋白。其中,选择以TT、DT或HID作为载体蛋白的荚膜多糖为由于载体干扰从而在制剂中表现出比较弱的免疫原性,对于此类荚膜多糖选择以TT、DT或HID作为载体蛋白可以有效的提高其在制剂中的免疫原性。

[0018] 优选的,与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F和19F。进一步优选的,所述的与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括1和/或4。

[0019] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F、19F、1和4。

[0020] 优选的,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型选自6B、19A或23F中的一种或两种以上的组合。进一步优选的,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括3、6A、9V、14或18C中的一种或两种以上的组合。

[0021] 在本发明的一个具体实施方式中,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为3、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F。

[0022] 优选的,所述的多价肺炎球菌结合疫苗选自7价肺炎球菌结合疫苗、10价肺炎球菌结合疫苗、13价肺炎球菌结合疫苗或15价肺炎球菌结合疫苗。

[0023] 进一步优选的,所述7价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为4、6B、9V、14、18C、19F或23F,所述10价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F或23F,所述13价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F,所述15价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F或33F。

[0024] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的多价肺炎球菌结合疫苗为13价肺炎球菌结合疫苗,其中,13价肺炎球菌结合疫苗中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12种荚膜多糖的血清型以CRM197作为蛋白载体,余下的12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1种荚膜多糖的血清型以TT、DT或HID作为蛋白载体。

[0025] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的多价肺炎球菌结合疫苗为15价肺炎球菌结合疫苗,其中,15价肺炎球菌结合疫苗中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14种荚膜多糖的血清型以CRM197作为蛋白载体,余下的14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1种荚膜多糖的血清型以TT、DT或HID作为蛋白载体。

[0026] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的13价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括1、3、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F、19F。

[0027] 在本发明的另一个具体实施方式中,所述的13价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括1、3、4、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F、19F。

[0028] 在本发明的另一个具体实施方式中,所述的13价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括3、6A、6B、9V、14、18C、19A和23F,与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F、19F。

[0029] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的15价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括1、2、3、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19A、23F和33F,与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为7F、19F。

[0030] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的15价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括1、2、3、4、6A、6B、9V、14、18C、19A、23F和33F,与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F、19F。

[0031] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的15价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型包括2、3、6A、6B、9V、14、18C、19A、23F和33F,与TT

载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为1、4、5、7F、19F。优选的,所述的荚膜多糖与载体蛋白直接缀合或通过连接基与载体蛋白缀合。

[0032] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的荚膜多糖与载体蛋白通过CDAP或者还原胺法的缀合化学反应缀合。

[0033] 本发明中所述的肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,每剂的抗原荚膜多糖含量包括:SP6B的抗原含量高于其他血清型,一般高2倍以上。优选的,除SP6B之外,其余血清型的抗原含量在一定范围内波动,但是抗原剂量都低于SP6B。进一步优选的,除SP6B之外,其余血清型抗原含量可以选择相同的剂量。

[0034] 优选的,所述抗原荚膜多糖SP6B的抗原剂量为2-10 $\mu$ g/剂。进一步优选的,所述抗原荚膜多糖SP6B的抗原剂量为4.4 $\mu$ g/剂。

[0035] 优选的,除SP6B之外的抗原荚膜多糖的抗原剂量为1-6 $\mu$ g/剂。优选的,除SP6B之外的抗原荚膜多糖的抗原剂量为2-3 $\mu$ g/剂。在本发明的一个具体实施方式中,除SP6B之外的抗原荚膜多糖的抗原剂量为2.2或3 $\mu$ g/剂。

[0036] 优选的,除SP6B之外的以CRM197作载体的抗原荚膜多糖的抗原剂量为1-6 $\mu$ g/剂。进一步优选的,除SP6B之外的以CRM197作载体的抗原荚膜多糖的抗原剂量为1-5 $\mu$ g/剂。在本发明的一个具体实施方式中,除SP6B之外的以CRM197作载体的抗原荚膜多糖的抗原剂量为3 $\mu$ g/剂。

[0037] 优选的,除SP6B之外的以TT、DT或HID作载体的抗原荚膜多糖的抗原剂量为1-5 $\mu$ g/剂。进一步优选的,除SP6B之外的以TT、DT或HID作载体的抗原荚膜多糖的抗原剂量为2.2 $\mu$ g/剂。

[0038] 优选的,所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,还包括基于铝的佐剂、赋形剂和/或防腐剂。

[0039] 优选的,所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合,其剂型可以为喷雾剂、注射剂、冻干剂、胶囊剂、片剂或丸剂。

[0040] 本发明的第二方面,提供了一种上述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合的制备方法,包括如下步骤:

[0041] (1) 制备至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第一载体蛋白,获得第一结合原液,其中,所述的第一载体蛋白为CRM197;

[0042] (2) 制备至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第二载体蛋白,获得第二结合原液,其中,血清型为7F和19F的荚膜多糖缀合第二载体蛋白,所述的第二载体蛋白为TT、DT或HID;

[0043] (3) 将步骤(1)获得的第一结合原液与步骤(2)获得的第二结合原液合并,即得多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合;

[0044] 其中,同一血清型的荚膜多糖只缀合一种载体蛋白,所述的制剂组合中包括至少7种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。

[0045] 优选的,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F或33F;进一步优选的,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F或33F,或所述的荚膜多糖选自1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F。

[0046] 优选的,与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F和19F。进一步优选的,所述的与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括1和/或4。

[0047] 优选的,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型选自6B、19A或23F中的一种或两种以上的组合。进一步优选的,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括3、6A、9V、14或18C中的一种或两种以上的组合。

[0048] 优选的,所述的多价肺炎球菌结合疫苗选自7价肺炎球菌结合疫苗、10价肺炎球菌结合疫苗、13价肺炎球菌结合疫苗或15价肺炎球菌结合疫苗。

[0049] 进一步优选的,所述7价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为4、6B、9V、14、18C、19F或23F,所述10价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F或23F,所述13价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F,所述15价肺炎球菌结合疫苗包括的血清型为1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F或33F。

[0050] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的多价肺炎球菌结合疫苗为13价肺炎球菌结合疫苗或15价肺炎球菌结合疫苗。

[0051] 优选的,所述的荚膜多糖与载体蛋白直接缀合或通过连接基与载体蛋白缀合。

[0052] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的荚膜多糖与载体蛋白通过CDAP或者还原胺法的缀合化学反应缀合。

[0053] 本发明的第三方面,提供了一种上述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合中的结合物分子量控制方法,所述的制剂组合包括至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第一载体蛋白和至少一种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖缀合的第二载体蛋白,血清型为7F和19F的荚膜多糖缀合第二载体蛋白,所述的第一载体蛋白为CRM197,第二载体蛋白为TT、DT或HID,其中,同一血清型的荚膜多糖只缀合一种载体蛋白,所述的制剂组合中包括至少7种来自不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。

[0054] 优选的,缀合第一载体蛋白获得的结合物以膜包超滤或者离子交换的方法进行柱纯化,缀合第二载体蛋白获得的结合物以分子筛纯化。基于该方法制备的结合物分子量都符合要求。

[0055] 优选的,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F或33F;优选的,所述的荚膜多糖选自1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F或33F,或所述的荚膜多糖选自1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F。

[0056] 优选的,将对结合物分子量控制比较严格的,以TT、DT或HID作为蛋白载体,对结合物分子量控制不严格的以CRM197作为载体蛋白。进一步优选的,以TT、或HID作为蛋白载体,对结合物分子量控制不严格的以CRM197作为载体蛋白。

[0057] 优选的,与CRM197载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型选自6B、19A或23F中的一种或两种以上的组合。

[0058] 优选的,与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F和19F。进一步优选的,与TT、DT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括6A和/或14。

[0059] 优选的,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型为5、7F和19F。进一步优选的,与TT或HID载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型还包括6A和/或14。



[0060] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的与TT载体蛋白缀合的荚膜多糖的血清型选自5、6A、7F、14和19F。

[0061] 本发明中,多价肺炎球菌结合疫苗,不同血清型结合物分子量大小不一样,有效血清型结合物的分子量更大点,易于工艺生产,对这些血清型可以选择以TT作为蛋白载体;有些血清型分子量更小点,易于工艺生产,对这些血清型可以选择以CRM197作为蛋白载体。

[0062] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合中的结合物分子量控制方法,包括以TT作为载体蛋白的荚膜多糖的血清型5、6A、7F、14和19F,以及以CRM197作为载体蛋白的荚膜多糖的血清型6B、19A和23F;其余血清型的荚膜多糖任选CRM197、TT、DT或HID作为载体蛋白。

[0063] 本发明的第四方面,提供一种上述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合在制备用于预防或治疗肺炎球菌所致疾病的药物中的应用。

[0064] 优选的,所述的肺炎球菌所致疾病选自肺炎球菌性肺炎、侵袭性肺炎球菌疾病、中耳炎、慢性阻塞性肺病、结膜炎、脑膜炎或菌血症。

[0065] 本发明所述的肺炎球菌结合疫苗解决了多价肺炎球菌结合疫苗中的血清抑制现象,通过将免疫原性较弱的血清型以TT、DT或HID作为载体蛋白,有效提高其在制剂组合中的免疫原性。通过本发明所述的多价肺炎球菌结合疫苗的制剂组合的制备方法可以有效控制结合物的分子量,将分子量控制比较严格的选择以TT、DT或HID作为蛋白载体,分子量大、易于控制,将分子量控制不是很严格的,选择以CRM197作为蛋白载体。

[0066] 本发明所述的“TT”为破伤风类毒素。

[0067] 本发明所述的“DT”为白喉类毒素。

[0068] 本发明所述的“HID”为流感嗜血菌D。

## 附图说明

[0069] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施例,其中:

[0070] 图1:5型荚膜多糖与不同载体蛋白结合获得的结合物的免疫原性;

[0071] 图2:7F型荚膜多糖与不同载体蛋白结合获得的结合物的免疫原性;

[0072] 图3:6B型荚膜多糖与不同载体蛋白结合获得的结合物的免疫原性;

[0073] 图4:9V型荚膜多糖与不同载体蛋白结合获得的结合物的免疫原性;

[0074] 图5:不同载体蛋白13价结合疫苗免疫原性的比较,其中,图中每个血清型从左到右的顺序依次为样品1、样品2、样品3、样品4、样品5;

[0075] 图6:15价肺炎球菌结合疫苗免疫原性的研究,其中,图中每个血清型从左到右的顺序依次为样品1、样品2、样品3、样品4、样品5;

[0076] 图7:13价肺炎结合疫苗免疫原性结果,其中,图中每个血清型从左到右的顺序依次为样品1、样品2、样品3、样品4、样品5。

## 具体实施方式

[0077] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的部分实施例,而不是全部。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都

属于本发明保护的范畴。

[0078] 实施例1

[0079] 一、不同载体蛋白制备结合物分子量差别

[0080] 选择不同血清型的肺炎荚膜多糖,分别与CRM197和TT进行偶联,多糖和蛋白的偶联方法采用行业内常用的实验方法—CDAP或者还原胺法缀合化学反应(具体参见专利W095/08348),结合物纯化后分别检测分子量的大小,结果见表1。

[0081] 表1不同载体结合物分子量大小

	CRM197 结合物	分子量大小 (KD)	TT 载体结合物	分子量大小 (KD)
	SP1-CRM197	35	SP1-TT	62
	SP3-CRM197	40	SP3-TT	65
	SP4-CRM197	35	SP4-TT	50
	SP5-CRM197	31	SP5-TT	55
	SP6B-CRM197	50	SP6B-TT	55
[0082]	SP6A-CRM197	42	SP6A-TT	71
	SP7F-CRM197	38	SP7F-TT	67
	SP9V-CRM197	55	SP9V-TT	65
	SP14-CRM197	43	SP14-TT	70
	SP18C-CRM197	41	SP18C-TT	70
	SP19A-CRM197	50	SP19A-TT	55
	SP19F-CRM197	37	SP19F-TT	65
[0083]	SP23F-CRM197	45	SP23F-TT	50

[0084] 备注:结合物分子量大小以KD<0.35的回收率来表示

[0085] 结果表明,相同血清型,不同载体蛋白的结合物分子量有所不同,通常状况下以TT作为载体蛋白的分子量高于以CRM197作为载体蛋白的分子量。SP6B、19A和23F结合物以TT作为载体时分子量高于CRM197,但是差异不明显。5、6A、7F、14和19F以TT作为载体时分子量明显高于CRM197。

[0086] 二、13价/15价肺炎结合疫苗制剂配方

[0087] 本发明中所述的13价或者15价肺炎结合疫苗,每剂的抗原含量特点如下,第一,SP6B的抗原含量高于其他血清型,一般高2倍以上。第二,除SP6B之外,其余血清型的抗原含

量在一定范围内波动,但是抗原剂量都低于SP6B,第三,除SP6B之外,其余血清型抗原含量可以选择相同的剂量。肺炎球菌结合疫苗抗原剂量1、2、3见表2-4。

[0088] 表2 13价/15价肺炎球菌结合疫苗抗原剂量1

[0089]	血清型	抗原含量	优先剂量
	SP6B	2—10 $\mu$ g/剂	4.4 $\mu$ g/剂
	除SP6B之外的其余血清型	1—5 $\mu$ g/剂	2.2 $\mu$ g/剂

[0090] 表3 13价/15价肺炎球菌结合疫苗抗原剂量2

[0091]	血清型	抗原含量	优先剂量
	SP6B	2—10 $\mu$ g/剂	4.4 $\mu$ g/剂
	除SP6B之外以CRM197作载体的血清型	1—6 $\mu$ g/剂	3 $\mu$ g/剂
	除SP6B之外以TT/HID作载体的血清型	1—5 $\mu$ g/剂	2 $\mu$ g/剂

[0092] 表4 13价/15价肺炎球菌结合疫苗抗原剂量3

[0093]	血清型	抗原含量	优先剂量
	SP6B	2—10 $\mu$ g/剂	4.4 $\mu$ g/剂
	除 SP6B 之外以 CRM197 作载体的血清型	1—5 $\mu$ g/剂	2.2 $\mu$ g/剂

[0094]	除 SP6B 之外以 TT/HID 作载体的血清型	1—5 $\mu$ g/剂	2.2 $\mu$ g/剂
--------	---------------------------	---------------	---------------

[0095] 三、不同载体蛋白结合物免疫原性差异

[0096] 选择不同血清型的肺炎荚膜多糖,分别与CRM197/TT/DT/HID进行偶联,多糖和蛋白的偶联方法采用行业内常用的实验方法—CDAP或者还原胺法缀合化学反应(具体参见专利W095/08348),将结合物纯化后免疫小鼠,测定其免疫原性。

[0097] 基于肺炎荚膜多糖免疫原性的研究结果,将不同血清型的肺炎荚膜多糖分为2类,其一为适合以CRM197作为载体蛋白的。其二,适合以TT/DT/HID作为蛋白载体的。每一类选择2个血清型,偶联不同的载体蛋白,进行免疫原性的研究,供试品的信息见表5。

[0098] 表5供试品信息汇总表

[0099]	供试品	血清型+载体蛋白	剂量
	组1	SP5+CRM197/TT/DT/HID	每剂含多糖2.2 $\mu$ g
	组2	SP7F+CRM197/TT/DT/HID	每剂含多糖2.2 $\mu$ g
	组3	SP6B+CRM197/TT/DT/HID	每剂含多糖4.4 $\mu$ g
	组4	SP9V+CRM197/TT/DT/HID	每剂含多糖2.2 $\mu$ g

[0100] 表5中,4组供试品免疫小鼠后测定血清中的抗体滴度,结果见图1-4。不同载体蛋白结合物免疫原性结果表明,以TT作为载体蛋白结合物免疫原性最强,以DT作为载体蛋白结合物免疫原性最弱,CRM197和HID作为载体蛋白结合物免疫原性相差不大。

[0101] 实施例2

[0102] 一、不同载体13价肺炎结合疫苗的免疫原性

[0103] 荚膜多糖和载体蛋白偶联的实验方法与实施例1相同,制备不同载体的13价肺炎

球菌结合物(表6),并在小鼠模型中测定免疫原性(见图5)。

[0104] 表6 13价结合物载体蛋白信息汇总

[0105]	供试品	载体蛋白	抗原含量(每剂,以多糖计)	备注
[0106]	样品 1	载体蛋白为 TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血清型 2.2 $\mu$ g	所有的血清型都偶联到 TT 载体
	样品 2	载体蛋白为 CRM197	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血清型 2.2 $\mu$ g	所有的血清型都偶联到 CRM197 载体
	样品 3	载体蛋白为 HID	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血清型 2.2 $\mu$ g	所有的血清型都偶联到 HID 载体
	样品 4	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 TT 的血清型为: SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F, 其余血清型偶联到 CRM197
	样品 5	载体蛋白为 CRM197, HID	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 HID 的血清型为: SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F, 其余血清型偶联到 CRM197

[0107] 备注:所有的样品,相同血清型多糖抗原含量一样

[0108] 从图5可以看出,有些血清型的免疫原性和载体蛋白的相关性不大,比如SP1、3、18C,但是部分血清型的免疫原性和载体蛋白的相关性很大。整体上,样品4和样品5的免疫原性整体优于样品1—3。

[0109] 总之,采用双载体的结合疫苗,降低了不同血清型之间的免疫干扰,其免疫原性整体上优于采用单一载体的结合疫苗。

[0110] 二、不同载体15价肺炎结合疫苗的免疫原性

[0111] 荚膜多糖和载体蛋白偶联的实验方法与实施例1相同,制备不同载体的15价肺炎结合物(表7),并在小鼠模型中测定免疫原性(图6)。

[0112] 表7 15价结合物载体蛋白汇总

[0113]	供试品	载体蛋白	抗原含量(每剂,以多糖计)	备注
	样品 1	载体蛋白为 TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外,其余血	所有的血清型都偶联到 TT

		清型 2.2 $\mu$ g	载体
	样品 2	载体蛋白为 CRM197	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g 所有的血清型都偶联到 CRM197 载体
	样品 3	载体蛋白为 HID	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g 所有的血清型都偶联到 HID 载体
[0114]	样品 4	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g 偶联 TT 的血清型为: SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F, 其余血清型偶联到 CRM197
	样品 5	载体蛋白为 CRM197, HID	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g 偶联 HID 的血清型为: SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F, 其余血清型偶联到 CRM197

[0115] 从图6可以看出, SP1、3、18C血清型的免疫原性和载体蛋白的相关性不大, 其他血清型的免疫原性和载体蛋白的相关性很大。整体上, 样品4和样品5的免疫原性整体优于样品1—3。

[0116] 结果表明, 采用双载体的结合疫苗, 降低了不同血清型之间的免疫干扰, 其免疫原性整体上优于采用单一载体的结合疫苗。

[0117] 实施例3

[0118] 一、新型13价肺炎结合疫苗免疫原性比较

[0119] 荚膜多糖和载体蛋白偶联的实验方法与实施例1相同, 制备包含不同数量的双载体结合疫苗。所有的肺炎血清型分为2类, 一类以CRM197作为载体蛋白, 另一类以TT/HID作为载体蛋白的血清型中, 选择其中一个 (SP7F或者SP19F), 两个 (SP7F和SP19F), 以及全部 (SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F) 偶联TT或者HID, 样品信息见表8, 免疫小鼠进行免疫原性的研究 (见图7)。

[0120] 表8新型13价结合疫苗

供试品	载体蛋白	抗原含量(每剂,以多糖计)	备注
样品 1	载体蛋白为 CRM197	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g	所有的血清型偶联到 CRM197
样品 2	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 TT 的血清型为: SP7F, 剩余血清型偶联 CRM197
样品 3	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 TT 的血清型为: SP19F, 剩余血清型偶联 CRM197
样品 4	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 TT 的血清型为: SP19F, SP7F, 剩余血清型偶联 CRM197
样品 5	载体蛋白为 CRM197, TT	除 SP6B 4.4 $\mu$ g 之外, 其余血清型 2.2 $\mu$ g	偶联 TT 的血清型为: SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F, 剩余血清型偶联 CRM197

[0121] 备注:所有的样品,相同血清型多糖抗原含量一样,偶联HID载体蛋白的样品分类同TT

[0122] 从图7可以看出,样品5 (SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F偶联到TT或者HID载体) 和样品4 (SP19F, SP7F偶联到TT或者HID载体) 的免疫原性整体上强于只以CRM197做载体 (样品1), 或者12个血清型以CRM197做载体 (样品2和3), 另外一个血清型以TT/HID蛋白做载体的肺炎结合疫苗。

[0123] 该研究结果表明,SP1, SP4, SP5, SP19F, SP7F中至少两个血清型 (SP19F, SP7F) 偶联到TT或者HID载体,才能维持13价肺炎结合疫苗所有血清型强有力的免疫原性。

[0124] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0125] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

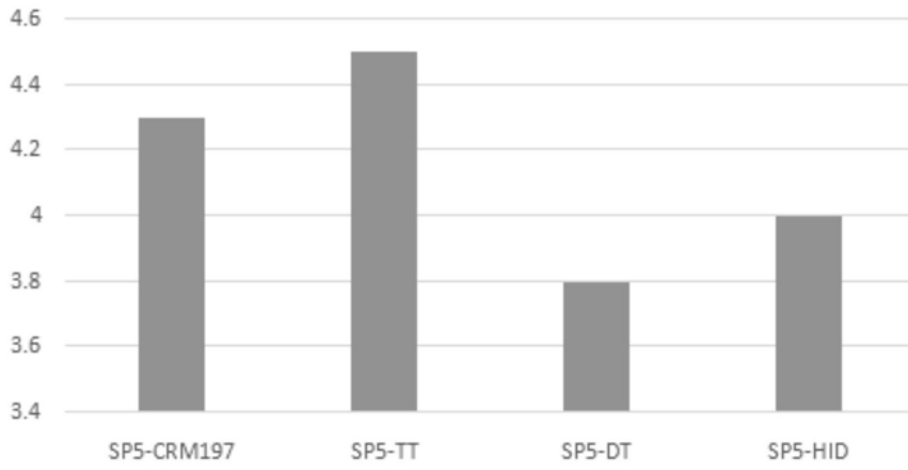


图1

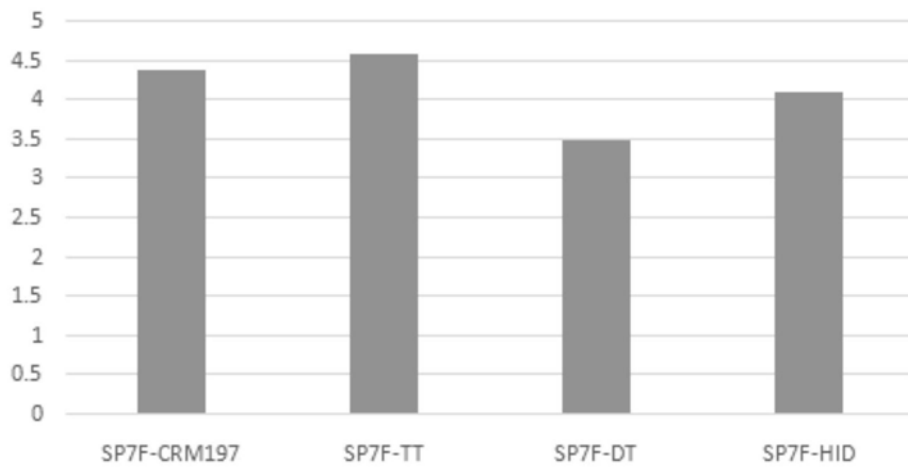


图2

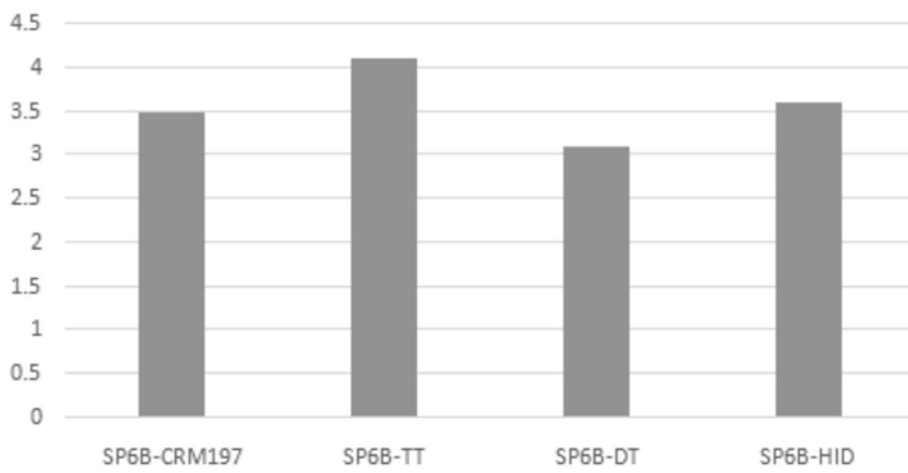


图3

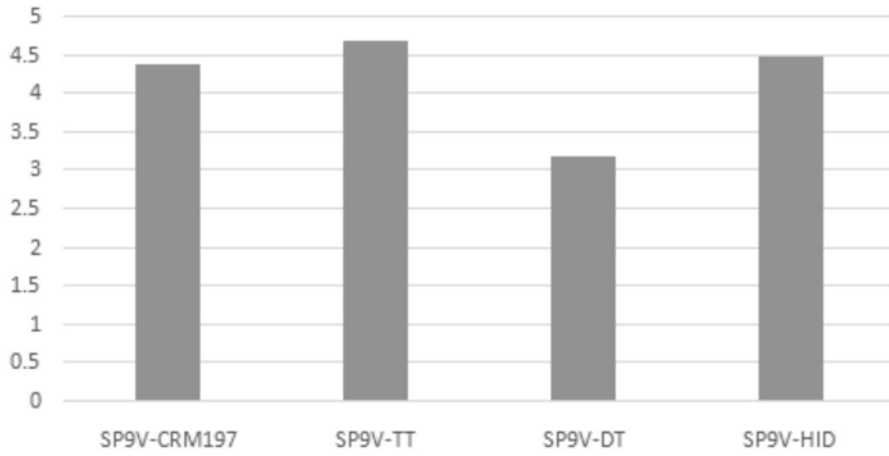


图4

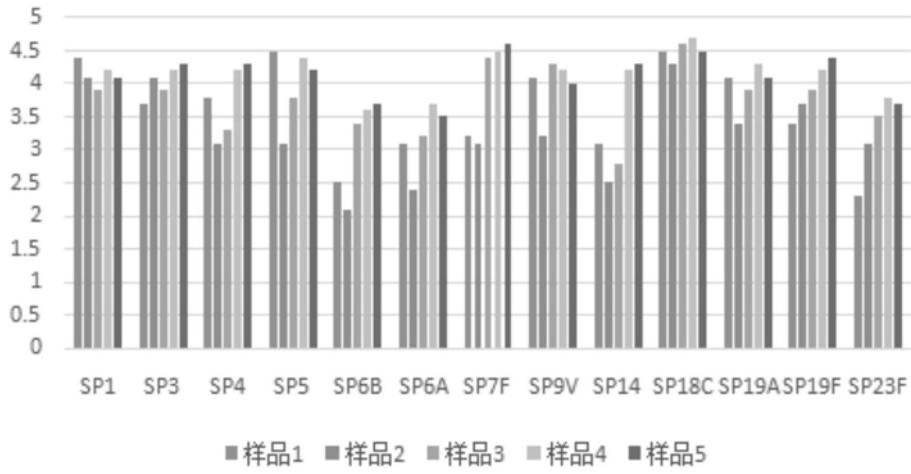


图5

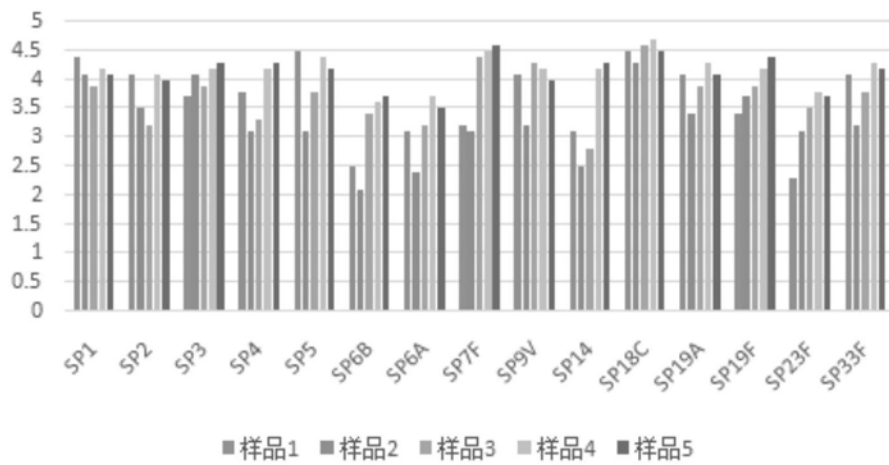


图6



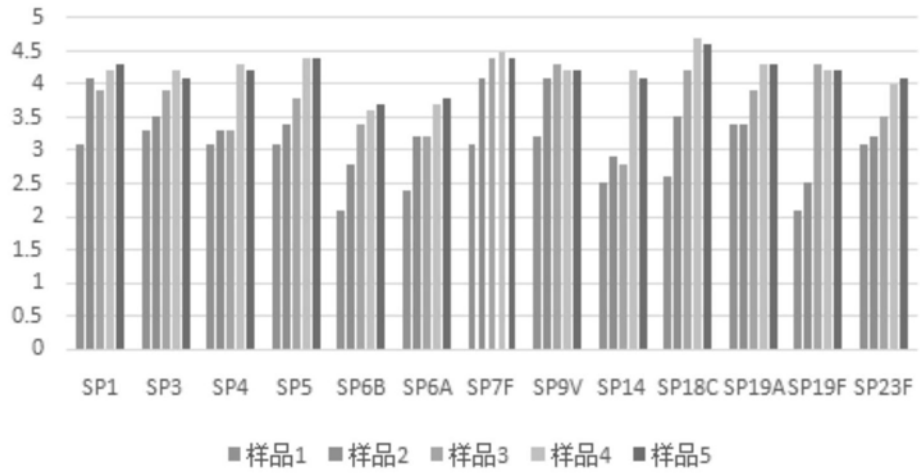


图7