



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110859957 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911153915.5

(22)申请日 2015.01.15

(30)优先权数据

61/929,547 2014.01.21 US

(62)分案原申请数据

201580015008.8 2015.01.15

(71)申请人 辉瑞公司

地址 美国纽约

(72)发明人 D·库珀 E·A·埃米尼 J·谷

M·韩 K·U·扬森

R·K·凯因森 J-H·金

A·K·普拉萨德 M·W·普赖德

W·J·沃森 Y-Y·杨

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 区斌

(51)Int.Cl.

A61K 39/385(2006.01)

A61K 39/09(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书106页

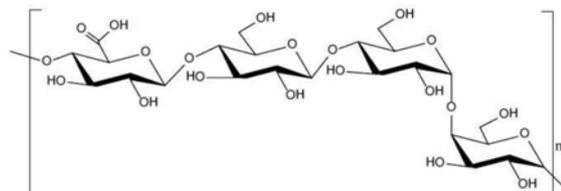
序列表9页 附图16页

(54)发明名称

包含缀合荚膜糖抗原的免疫原性组合物及其用途

(57)摘要

本发明涉及包含缀合的肺炎链球菌荚膜糖抗原(糖缀合物)的新的免疫原性组合物以及其用途。本发明的免疫原性组合物通常将会包含至少一种来自肺炎链球菌血清型的糖缀合物,其中所述肺炎链球菌血清型是Pneumovax、Synflorix和/或Pneumovax 13中未发现的。本发明还涉及使用所述新的免疫原性组合物,针对肺炎球菌感染而对人类对象进行疫苗接种,特别是婴儿和老人。



MW (H⁺) = 662.553 C₂₄H₃₈O₂₁

MW (Na⁺) = 684.534 C₂₄H₃₇O₂₁Na₁

1. 免疫原性组合物,其包含来自肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)血清型15B的糖缀合物。
2. 权利要求1的免疫原性组合物,其包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物、和至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物。
3. 权利要求1的免疫原性组合物,其包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物、和至少一种来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物。
4. 权利要求1-3中任一项的免疫原性组合物,其还包含来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F和23F的糖缀合物。
5. 权利要求1-4中任一项的免疫原性组合物,其还包含来自肺炎链球菌血清型1、5和7F的糖缀合物。
6. 权利要求1-5中任一项的免疫原性组合物,其还包含来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物。
7. 权利要求1-6中任一项的免疫原性组合物,其还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物。
8. 权利要求1-7中任一项的免疫原性组合物,其是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20-价肺炎球菌缀合物的组合物。
9. 权利要求1-7中任一项的免疫原性组合物,其是20-价肺炎球菌缀合物的组合物。
10. 权利要求1-9中任一项的免疫原性组合物,其中所述糖缀合物独立地缀合至CRM₁₉₇。
11. 权利要求1-9中任一项的免疫原性组合物,其中全部糖缀合物独立地缀合至CRM₁₉₇。
12. 权利要求4-9中任一项的免疫原性组合物,其中所述来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD。
13. 权利要求4-9或12中任一项的免疫原性组合物,其中来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT。
14. 权利要求4-9或12-13中任一项的免疫原性组合物,其中来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。
15. 权利要求1-14中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物具有10000至16000Kda的分子量。
16. 权利要求1-15中任一项的免疫原性组合物,其中血清型15B糖缀合物中血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.5至3。
17. 权利要求1-16中任一项的免疫原性组合物,其中血清型15B糖缀合物中血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.7至0.9。
18. 权利要求1-17中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物包含相较于血清型15B荚膜多糖的总量低于大约50%的游离血清型15B荚膜多糖。
19. 权利要求1-18中任一项的免疫原性组合物,其中至少40%的血清型15B糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。
20. 权利要求1-19中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物包含每mM

血清型15B荚膜多糖至少0.6mM乙酸酯/盐。

21. 权利要求1-20中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6。

22. 权利要求1-21中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6。

23. 权利要求1-22中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物包含每mM血清型15B荚膜多糖至少0.7mM甘油。

24. 权利要求1-23中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B的糖缀合物的缀合度为2至15。

25. 权利要求1-24中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物包含具有100Kda至350Kda的分子量的糖。

26. 权利要求1-25中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物的载体蛋白选自自由以下组成的组:DT(白喉毒素)、TT(破伤风类毒素)、CRM₁₉₇、其它DT突变体、PD(流感嗜血杆菌蛋白D)、或者其免疫学功能等价物。

27. 权利要求1-26中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物的载体蛋白为CRM₁₉₇。

28. 权利要求1-27中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型15B糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

29. 权利要求2-28中任一项的免疫原性组合物,其中所述血清型22F糖缀合物具有1000kDa至12,500kDa的分子量,并且包含来自肺炎链球菌血清型22F的分离的荚膜多糖和载体蛋白,所述多糖对所述载体蛋白的比例(w/w)为0.4至2,并且其中所述血清型22F糖缀合物包含每mM血清型22F荚膜多糖至少0.6mM乙酸酯/盐。

30. 权利要求1-29中任一项的免疫原性组合物,其中每个剂量对于每种特定的糖缀合物包含大约1.0μg、大约1.2μg、大约1.4μg、大约1.6μg、大约1.8μg、大约2.0μg、大约2.2μg、大约2.4μg、大约2.6μg、大约2.8μg、大约3.0μg、大约3.2μg、大约3.4μg、大约3.6μg、大约3.8μg、大约4.0μg、大约4.2μg、大约4.4μg、大约4.6μg、大约4.8μg、大约5.0μg、大约5.2μg、大约5.4μg、大约5.6μg、大约5.8μg、或大约6.0μg的多糖。

31. 权利要求1-29中任一项的免疫原性组合物,其中每个剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和/或33F的每种糖缀合物,若存在时包含大约1.5μg至大约3.0μg的多糖;以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物,若存在时包含大约3.0μg至大约6.0μg的多糖。

32. 权利要求1-31中任一项的免疫原性组合物,其中每个剂量包含10μg至150μg的载体蛋白。

33. 权利要求1-32中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物还包含至少一种佐剂。

34. 权利要求1-32中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物还包含至少一种选自自由以下所组成的组的佐剂:磷酸铝、硫酸铝、和氢氧化铝。

35. 权利要求1-34中任一项的免疫原性组合物,其包含缓冲液。
36. 权利要求35的免疫原性组合物,其中所述缓冲液为终浓度大约5mM的琥珀酸盐。
37. 权利要求1-36中任一项的免疫原性组合物,其包含盐。
38. 权利要求37的免疫原性组合物,其包含150mM的氯化钠。
39. 权利要求1-38中任一项的免疫原性组合物,其包含表面活性剂。
40. 权利要求39的免疫原性组合物,其中所述表面活性剂为聚山梨醇酯80。
41. 权利要求40的免疫原性组合物,其中所述制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、或0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。
42. 权利要求1-41中任一项的免疫原性组合物,其具有5.8至6.0的pH。
43. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,其用作疫苗。
44. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,其用于在对象中预防、治疗或缓解细菌感染、疾病或病征的方法。
45. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,用于通过经全身性或粘膜途径施用所述免疫原性组合物来防护或治疗易受肺炎球菌感染的人的方法。
46. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,其当施用于对象时能够诱导抗体的形成,所述抗体以标准ELISA测定测量能够结合肺炎链球菌血清型15B和15C。
47. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,其当施用至对象时能够诱导抗体的形成,所述抗体能够在调理吞噬测定中杀伤肺炎链球菌血清型15B和15C。
48. 权利要求1-42中任一项的免疫原性组合物,其用于保护对象不受肺炎链球菌感染的方法、和/或预防肺炎链球菌感染的方法、和/或降低与肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作的方法、和/或保护对象不受肺炎链球菌血清型15B和/或15C感染的方法、和/或预防肺炎链球菌血清型15B和/或15C感染的方法、和/或降低与肺炎链球菌血清型15B和/或15C引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作的方法。

包含缀合荚膜糖抗原的免疫原性组合物及其用途

[0001] 本申请为申请日为2015年1月15日、申请号为201580015008.8、发明名称为“包含缀合荚膜糖抗原的免疫原性组合物及其用途”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及新的包含缀合荚膜糖抗原(糖缀合物)的免疫原性组合物及其用途。本发明的免疫原性组合物通常将包含糖缀合物,其中所述糖源自肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的血清型。本发明还涉及使用所述新的免疫原性组合物,针对肺炎链球菌感染而对人类对象进行疫苗接种,特别是婴儿和老人。

[0003] 发明背景

[0004] 由肺炎链球菌引起的感染是全世界发病和死亡的主要起因。肺炎、发热菌血症和脑膜炎是侵入性肺炎链球菌疾病的最常见的表现,而呼吸道内细菌的扩散可导致中耳感染、鼻窦炎或复发性支气管炎。与侵入性疾病相比,非侵入性的表现通常没那么严重,但是却更常见得多。

[0005] 在欧洲和美洲,肺炎链球菌肺炎是最常见的社区获得性细菌性肺炎,据估算每年在每100,000成年人中影响大约100人。发热菌血症和脑膜炎的相应数字分别为每100,000人15-19人和每100,000人1-2人。一或多种这些表现的风险在婴儿中和老人、以及任何年龄的免疫受损的人中要高得多。即使是在经济发达地区,侵入性肺炎链球菌疾病带来高死亡率;对于患有肺炎链球菌肺炎的成人死亡率平均为10%-20%,而其在高风险群体中可以超过50%。肺炎目前是世界上肺炎链球菌死亡最常见的起因。

[0006] 肺炎链球菌疾病的病原物,肺炎链球菌(肺炎球菌),是革兰氏阳性包囊球菌,被多糖荚膜所包围。此荚膜成分的差别使得可以从血清学上区分大约91种荚膜类型,其中一些常常与肺炎链球菌疾病相关,而其它的则很少。侵入性肺炎链球菌感染包括肺炎、脑膜炎和发热菌血症;常见的非侵入性表现中有中耳炎、鼻窦炎和支气管炎。

[0007] 肺炎链球菌缀合物疫苗(PCVs)是用于针对肺炎链球菌(*S. pneumoniae*,肺炎球菌)所引起的疾病进行保护的肺炎链球菌疫苗。目前全球市场上有三种PCV疫苗可用:PREVNAR[®](在一些国家称作Prevenar)(七价疫苗)、SYNFLORIX[®](十价疫苗)和PREVNAR 13[®](十三价疫苗)。

[0008] 近来对于基本抗生素广泛分布的微生物抗性的发展以及免疫受损人群数目的增加凸显了对于具有更广泛保护作用的肺炎链球菌疫苗的需求。

[0009] 具体而言,有需要对肺炎链球菌疾病覆盖剩余的未实现医疗需求进行应对,其中所述未实现医疗需求是由于PREVNAR 13[®]中未存在的血清型以及血清型随着时间替换的潜在可能。在PREVNAR 13[®]中的13种之外的引起疾病的具体血清型会随着地区和人群而有变化,并且可以由于获得抗生素抗性、肺炎链球菌疫苗的引入、以及未知来源的长期趋势而随着时间变化。对于能够用于针对额外的肺炎链球菌血清型而在人类中且特别是在2岁以下的儿童中诱导免疫应答的免疫原性组合物是有需求的。

[0010] 本发明的新免疫原性组合物的目标是针对PREVNAR 13[®]中未发现的肺炎链球菌血清型而提供适宜的保护。在一方面,本发明的免疫原性组合物的目标是针对PREVNAR[®](七价疫苗)、SYNFLORIX[®]和/或PREVNAR13[®]中未发现的肺炎链球菌血清型而提供适宜的保护,同时又保持针对目前所述疫苗能够覆盖的血清型的免疫应答。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及免疫原性组合物,其包含选自以下的至少一种糖缀合物:来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物、来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物、来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物、来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物、来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物、来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物、和来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物。

[0013] 在一方面,本发明提供了免疫原性组合物,其包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物、和至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物。

[0014] 在另一方面本发明提供了免疫原性组合物,其包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物、至少一种来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物、和至少一种来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物。

[0015] 在一方面上述免疫原性组合物还包含来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F、和23F的糖缀合物。

[0016] 在另一方面上述免疫原性组合物还包含来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物。

[0017] 在另一方面上述免疫原性组合物还包含来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物。

[0018] 在另一方面上述免疫原性组合物还包含来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物。

[0019] 在另一方面上述免疫原性组合物还包含来自肺炎链球菌血清型2、9N、17F、20和/或15C的糖缀合物。

[0020] 在一方面,上述免疫原性组合物不包含来自肺炎链球菌血清型9N、9A和/或9L的荚膜糖。

[0021] 在一方面,上述免疫原性组合物是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一方面,上述免疫原性组合物是7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25-价肺炎球菌缀合物的组合物。

[0022] 在一方面,所述糖缀合物独立地缀合至载体蛋白,所述载体蛋白选自以下所组成的组:DT(白喉毒素)、TT(破伤风类毒素)、CRM₁₉₇、其它DT突变体、PD(流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)蛋白D)、或者其或者其免疫学功能等价物

[0023] 在一方面,本发明提供了填充有本文所定义的任何免疫原性组合物的容器。

[0024] 在一方面,本发明提供了本文所定义的任何免疫原性组合物用作药物,特别是用作疫苗。

[0025] 在一方面,本发明提供了在对象中预防、治疗或缓解与肺炎链球菌相关的感染、疾

病或病症的方法,其包括向对象施用免疫学有效量的本文所定义的任何免疫原性组合物。

[0026] 附图简述

[0027] 图1:显示了肺炎链球菌血清型8 (Pn-8) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0028] 图2:显示了肺炎链球菌血清型10A (Pn-10A) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0029] 图3:显示了肺炎链球菌血清型11A (Pn-11A) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0030] 图4:显示了肺炎链球菌血清型12F (Pn-12F) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0031] 图5:显示了肺炎链球菌血清型15B (Pn-15B) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0032] 图6:显示了肺炎链球菌血清型22F (Pn-22F) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0033] 图7:显示了肺炎链球菌血清型33F (Pn-33F) 荚膜多糖的重复多糖结构。

[0034] 图8:显示了可用于Pn-33F糖缀合物的制备的活化 (A) 和缀合 (B) 方法的代表性方法流程图。

[0035] 图9:显示了改变TEMPO/NCS氧化反应中NCS的量而对DO的作用。

[0036] 图10:显示了Pn-12F糖缀合物稳定性的评估。

[0037] 图11:交叉功能OPA反应。在OPA中,评估了来自接种了13价肺炎球菌缀合物疫苗的成人的59种血清的子集 (US研究6115A1-004;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00427895) 中针对血清型9V、9A、9L、和9N的功能性抗体的存在。具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的样品的百分比在每组之上标出。几何平均效价 (GMT) 在X轴中于每组之下列出。

[0038] 图12:66种匹配的之前/之后血清的交叉功能OPA反应。在OPA中,评估了来自接种了13价肺炎球菌缀合物疫苗的成人的匹配的疫苗接种前和疫苗接种后血清组的66种血清的子集 (研究6115A1-3005;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572) 中针对血清型9V、9A、9L、和9N的功能性抗体的存在。具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的样品的百分比在每组之上标出。几何平均效价 (GMT) 在X轴中于每组之下列出。

[0039] 图13:免疫前和免疫后的反向累积分布曲线 (RCDC) -肺炎球菌血清型9V (Pn9V)。

[0040] 来自疫苗接种了13价肺炎球菌疫苗的匹配的疫苗接种之前和之后血清组 (N=66) 的血清型9V的OPA反向累积分布曲线 (研究6115A1-3005;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572)。该图代表了具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的血清的百分比。

[0041] 图14:免疫前和免疫后的反向累积分布曲线 (RCDC) -肺炎球菌血清型9A (Pn9A)。

[0042] 来自疫苗接种了13价肺炎球菌疫苗的匹配的疫苗接种之前和之后血清组 (N=66) 的血清型9A的OPA反向累积分布曲线 (研究6115A1-3005;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572)。该图代表了具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的血清的百分比。

[0043] 图15:免疫前和免疫后的反向累积分布曲线 (RCDC) -肺炎球菌血清型9L (Pn9L)。

[0044] 来自疫苗接种了13价肺炎球菌疫苗的匹配的疫苗接种之前和之后血清组 (N=66) 的血清型9L的OPA反向累积分布曲线 (研究6115A1-3005;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572)。该图代表了具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的血清的百分比。

[0045] 图16:免疫前和免疫后的反向累积分布曲线 (RCDC) -肺炎球菌血清型9N (Pn9N)。

[0046] 来自疫苗接种了13价肺炎球菌疫苗的匹配的疫苗接种之前和之后血清组 (N=66) 的血清型9N的OPA反向累积分布曲线 (研究6115A1-3005;ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572)。该图代表了具有OPA阳性效价 (即 $\geq 1:8$) 的血清的百分比。

[0047] 发明详述

[0048] 1. 本发明的免疫原性组合物

[0049] 本发明的免疫原性组合物通常将包含缀合荚膜糖抗原(也称作糖缀合物),其中所述糖源自肺炎链球菌的血清型。

[0050] 优选地,肺炎链球菌荚膜糖的数目范围可以是8种不同的血清型(或者“v”,价)至20种不同的血清型(20v)。在一个实施方案中有8种不同的血清型。在一个实施方案中有9种不同的血清型。在一个实施方案中有10种不同的血清型。在一个实施方案中有11种不同的血清型。在一个实施方案中有12种不同的血清型。在一个实施方案中有13种不同血清型。在一个实施方案中有14种不同的血清型。在一个实施方案中有15种不同的血清型。在一个实施方案中有16种不同的血清型。在一实施方案中有17种不同的血清型。在一实施方案中有18种不同的血清型。在一实施方案中有19种不同的血清型。在一实施方案中有20种不同的血清型。所述荚膜糖缀合至载体蛋白以形成下文所述的糖缀合物。

[0051] 如果组合物中2种或更多种糖的蛋白载体是相同的,那么所述糖可以缀合至蛋白载体的相同分子(载体分子上缀合有2个或更多个不同的糖)[参见例如W02004/083251]。

[0052] 但是在优选的实施方案中,所述糖各自独立地地缀合至不同的蛋白载体分子(每分子的蛋白载体仅仅缀合有一种类型的糖)。在所述实施方案中,所述荚膜糖被称作是独立地缀合至载体蛋白。

[0053] 对于本发明的目的,术语“糖缀合物”表示共价连接至载体蛋白的荚膜糖。在一个实施方案中,荚膜糖直接连接至载体蛋白。在第二个实施方案中,细菌糖通过间隔物/接头连接至蛋白。

[0054] 1.1 本发明的载体蛋白

[0055] 本发明糖缀合物的一种成分是糖缀合至其上的载体蛋白。术语“蛋白载体”或“载体蛋白”或“载体”在本文中可互换使用。载体蛋白应当顺应标准缀合过程。

[0056] 在优选的实施方案中,糖缀合物的载体蛋白选自由以下组成的组:DT(白喉毒素)、TT(破伤风类毒素)或TT的片段C、CRM₁₉₇(白喉毒素的非毒性但却具有免疫原性的等价变体)、其它DT突变体(如CRM176、CRM228、CRM45(Uchida等人(1973) J. Biol. Chem. 218:3838-3844)、CRM9、CRM102、CRM103或CRM107;以及Nicholls和Youle在Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc. (1992)中描述的其它突变;Glu-148缺失或突变为Asp、Gln或Ser和/或Ala 158缺失或突变为GIy以及美国专利号4,709,017和4,950,740中公开的其它突变;残基Lys 516、Lys 526、Phe 530和/或Lys 534的至少一个或多个的突变以及美国专利号5,917,017和6,455,673中公开的其它突变;或者美国专利号5,843,711中公开的片段,肺炎球菌的肺炎球菌溶血素(ply)(Kuo等人(1995) Infect Immun 63:2706-2713)包括以某方式去毒的ply,例如dPLY-GMBS(WO 2004/081515, WO 2006/032499)或dPLY-formol、PhtX、包括PhtA、PhtB、PhtD、PhtE(PhtA、PhtB、PhtD或PhtE的序列在WO 00/37105和WO 00/39299中有公开)以及Pht蛋白的融合物,例如PhtDE融合物、PhtBE融合物、Pht A-E(WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC(脑膜炎球菌外膜蛋白),其常提取自脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)血清组B(EP0372501), PorB(来自脑膜炎双球菌(*N. meningitidis*)), PD(流感嗜血杆菌蛋白D;参见例如, EP0594610B), 或者其免疫学功能等价物,合成肽(EP0378881, EP0427347),热休克蛋白(WO 93/17712, WO 94/03208),百日咳蛋白(WO 98/58668, EP0471177),细胞因子,淋巴因子,生长因子或激素(WO

91/01146), 包含多个人类CD4+T细胞表位(来自各种病原体来源的抗原)的人造蛋白(Falugi等人(2001) Eur J Immunol 31:3816-3824)如N19蛋白(Baraldoi等人(2004) Infect Immun 72:4884-4887)肺炎球菌表面蛋白PspA(WO 02/091998), 铁摄取蛋白(WO 01/72337), 难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)的毒素A和毒素B(WO 00/61761), 转铁蛋白结合蛋白, 肺炎球菌粘附蛋白(PsaA), 重组绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素A(特别是其非毒性突变体(如在谷氨酸553处有取代的外毒素A(Douglas等人(1987) J. Bacteriol. 169(11):4967-4971))。其它蛋白, 如卵白蛋白、钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或结核菌素(PPD)的纯化的蛋白衍生物也可以用作载体蛋白。其它适宜的载体蛋白包括失活的细菌毒素如霍乱类毒素(例如, WO 2004/083251中描述的)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)LT、大肠杆菌ST、和来自绿脓假单胞菌的外毒素A。

[0057] 在优选的实施方案中, 糖缀合物的载体蛋白独立地选自以下组成的组: TT、DT、DT突变体(如CRM₁₉₇)、流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)蛋白D、PhtX、PhtD、PhtDE融合物(特别是WO 01/98334和WO 03/054007中描述的那些)、经去毒的肺炎球菌溶血素、PorB、N19蛋白、PspA、OMPc、难辨梭状芽孢杆菌(*C. difficile*)的毒素A和B以及PsaA。

[0058] 在一实施方案中, 本发明糖缀合物的载体蛋白是DT(白喉类毒素)。在另一实施方案中, 本发明糖缀合物的载体蛋白是TT(破伤风类毒素)。

[0059] 在另一实施方案中, 本发明糖缀合物的载体蛋白是PD(流感嗜血杆菌蛋白D; 参见例如, EP0594610 B)。

[0060] 在优选的实施方案中, 本发明的荚膜糖缀合至CRM₁₉₇蛋白。所述CRM₁₉₇蛋白是白喉毒素的非毒性形式, 但是免疫学上与白喉毒素不可区分。CRM₁₉₇是由经非产毒素噬菌体 β 197^{tox-}(通过产毒素 β -棒状噬菌体的亚硝基胍诱变创建的)感染的白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)产生的(Uchida等人(1971) Nature New Biology 233:8-11)。CRM₁₉₇蛋白具有与白喉毒素相同的分子量但是与它的差异在于结构基因中单个碱基的改变(鸟嘌呤变为腺嘌呤)。此单个碱基的改变在成熟蛋白中引起氨基酸取代(用谷氨酸取代甘氨酸)并消除白喉毒素的毒性。CRM₁₉₇蛋白对于糖而言是安全且有效的T-细胞依赖性载体。关于CRM₁₉₇及其产生的进一步的细节可以在例如美国专利号5,614,382中找到。

[0061] 在一实施方案中, 本发明的荚膜糖缀合至CRM₁₉₇蛋白或者CRM₁₉₇的A链(参见CN103495161)。在一实施方案中, 本发明的荚膜糖缀合至经遗传重组大肠杆菌表达而获得的CRM₁₉₇的A链(参见CN103495161)。在一实施方案中, 本发明的荚膜糖全都缀合至CRM₁₉₇。在一实施方案中, 本发明的荚膜糖全部都缀合至CRM₁₉₇的A链。

[0062] 因此, 在常见的实施方案中, 本发明的糖缀合物包含CRM₁₉₇作为载体蛋白, 其中所述荚膜多糖共价连接至CRM₁₉₇。

[0063] 1.2 本发明的荚膜糖

[0064] 遍及本说明书的术语“糖”可以是指多糖或寡糖并且包括二者。在常见的实施方案中, 所述糖是多糖, 特别是肺炎链球菌荚膜多糖。

[0065] 荚膜多糖是通过本领域技术人员已知的标准技术制备的。

[0066] 在本发明中, 可以从, 例如血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的肺炎链球菌来制备荚膜多糖。通常通过在培养基中(例如在基于大豆的培养基中)培养肺炎链球菌血清型来产生荚膜多糖, 继而从细菌培养物中制备

多糖。用于制备本发明糖缀合物中所使用的各多糖的肺炎链球菌的菌株可以得自己建立的培养物收集或者临床样本。

[0067] 生物体(每种肺炎链球菌血清型)的群体常常从种子小瓶规模放大至种子瓶并通过一个或多个体积增加的种子发酵罐传代直至达到生产规模的发酵体积。在生长循环结束时将细胞裂解并接着收获裂解液用于下游(纯化)的加工(参见例如WO 2006/110381、WO 2008/118752、和美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2008/0102498和2008/0286838)。

[0068] 各多糖通常是通过离心、沉淀、超滤、和/或柱层析来进行纯化(参见例如WO 2006/110352和WO 2008/118752)。

[0069] 纯化的多糖可以被活化(例如,化学活化)以使得它们能够反应(例如,与eTEC间隔物)并继而掺入到本发明糖缀合物中,如本文进一步描述的。

[0070] 肺炎链球菌荚膜多糖包含重复寡糖单元(可含有达8个糖残基)。

[0071] 在一实施方案中,本发明的荚膜糖可以是一个寡糖单元或者短于天然长度的糖链的重复寡糖单元。在一实施方案中,本发明的荚膜糖是相关血清型的一个重复寡糖单元。

[0072] 在一实施方案中,本发明的荚膜糖可以是寡糖。寡糖具有低数目的重复单元(通常5-15个重复单元)并且通常源自合成或者是源自多糖的水解。

[0073] 但是优选地,本发明的所有荚膜糖以及本发明的免疫原性组合物中的所有荚膜糖是多糖。高分子量荚膜多糖能够诱导某些抗体免疫应答(由于存在于抗原表面的表位)。对于本发明的缀合物、组合物和方法,优选进行高分子量荚膜多糖的分离和纯化。

[0074] 在一些实施方案中,纯化的多糖在缀合前具有10kDa至4,000kDa的分子量。在其它此类实施方案中,所述多糖具有50kDa至4,000kDa的分子量。在另外的此类实施方案中,所述多糖具有如下分子量:50kDa至3,500kDa;50kDa至3,000kDa;50kDa至2,500kDa;50kDa至2,000kDa;50kDa至1,750kDa;50kDa至1,500kDa;50kDa至1,250kDa;50kDa至1,000kDa;50kDa至750kDa;50kDa至500kDa;100kDa至4,000kDa;100kDa至3,500kDa;100kDa至3,000kDa;100kDa至2,500kDa;100kDa至2,000kDa;100kDa至2,000kDa;100kDa至1,750kDa;100kDa至1,500kDa;100kDa至1,250kDa;100kDa至1,000kDa;100kDa至750kDa;100kDa至500kDa;200kDa至4,000kDa;200kDa至3,500kDa;200kDa至3,000kDa;200kDa至2,500kDa;200kDa至2,000kDa;200kDa至2,000kDa;200kDa至1,750kDa;200kDa至1,500kDa;200kDa至1,250kDa;200kDa至1,000kDa;200kDa至750kDa;或者200kDa至500kDa。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0075] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术(sizing technique)。可以使用机械或化学改变大小。可以用乙酸进行化学水解。可以用高压均质剪切来进行机械。上文提到的分子量范围是指缀合之前(例如,活化之前)的纯化多糖。

[0076] 在优选的实施方案中,纯化的多糖,是来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F或33F的肺炎链球菌的荚膜多糖,其中所述荚膜多糖具有落入上文所述分子量范围之内分子量。

[0077] 如本文所用,术语多糖的或者载体蛋白-多糖缀合物的“分子量”是指通过大小排阻层析(SEC)组合多角度激光光散射检测器(MALLS)来计算的分子量。

[0078] 在一些实施方案中,本发明的来自血清型9V、18C、11A、15B、22F和/或33F的肺炎球菌糖是O-乙酰化的。在一些实施方案中,本发明的来自血清型9V、11A、15B、22F和/或33F的肺炎球菌糖是O-乙酰化的。

[0079] 本文所描述的纯化的多糖经化学活化,以便使糖能够与载体蛋白反应。这些肺炎球菌缀合物通过分别的过程制备并如本文所述配制到单一剂量的制剂中。

[0080] 1.2.1来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的肺炎球菌多糖

[0081] 可以通过本领域技术人员已知的标准技术制备来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜糖(参见例如WO 2006/110381)。可以通过使每种肺炎链球菌血清型在培养基中生长来产生荚膜多糖;在生长循环结束时将细胞水解并接着收获裂解液用于下游(纯化)的加工。各多糖通常是通过离心、沉淀、超滤、和/或柱层析来进行纯化(参见例如WO 2006/110352和WO 2008/118752)。可以如本文进一步描述的那样对纯化的多糖进行进一步的加工以制备本发明的糖缀合物。

[0082] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和/或23F的纯化的多糖在缀合之前具有10kDa至4,000kDa的分子量。在其它此类实施方案中,所述多糖具有50kDa至4,000kDa的分子量;50kDa至3,000kDa或者50kDa至2,000kDa的分子量。

[0083] 在另外的此类实施方案中,所述多糖具有50kDa至3,500kDa的分子量;50kDa至3,000kDa的分子量;50kDa至2,500kDa的分子量;50kDa至2,000kDa;50kDa至1,750kDa的分子量;50kDa至1,500kDa的分子量;50kDa至1,250kDa的分子量;50kDa至1,000kDa的分子量;50kDa至750kDa的分子量;50kDa至500kDa的分子量;100kDa至4,000kDa的分子量;100kDa至3,500kDa的分子量;100kDa至3,000kDa的分子量;100kDa至2,500kDa的分子量;100kDa至2,000kDa的分子量;100kDa至1,750kDa的分子量;100kDa至1,500kDa的分子量;100kDa至1,250kDa的分子量;100kDa至1,000kDa的分子量;100kDa至750kDa的分子量;100kDa至500kDa的分子量;200kDa至4,000kDa的分子量;200kDa至3,500kDa的分子量;200kDa至3,000kDa的分子量;200kDa至2,500kDa的分子量;200kDa至2,000kDa的分子量;200kDa至1,750kDa的分子量;200kDa至1,500kDa的分子量;200kDa至1,250kDa的分子量;200kDa至1,000kDa的分子量;200kDa至750kDa;或者200kDa至500kDa的分子量。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0084] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0085] 在一些实施方案中,本发明来自血清型9V和/或18C的肺炎球菌糖是O-乙酰化的。在一些实施方案中,本发明来自血清型血清型9V的肺炎球菌糖是O-乙酰化的并且本发明来自血清型血清型18C的肺炎球菌糖是脱-O-乙酰化的。

[0086] 1.2.2肺炎球菌多糖血清型8

[0087] 血清型8的多糖重复单元由线性四糖单元组成,其中有一个葡萄糖醛酸(GlcpA)、两个吡喃葡萄糖(Glcp)和一个吡喃半乳糖(Galp)(Jones等人(1957)The Journal of the American Chemical Society.79(11):2787-2793)。所有四个单糖经1,4-键连接,如图1所

示。

[0088] 血清型8糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。另外,它们可以用合成方案来产生。

[0089] 血清型8肺炎链球菌菌株可得自己建立的培养物收集(如例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention,Atlanta,GA))或者临床样本。

[0090] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型8的纯化多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至1,000kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:70kDa至900kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至800kDa。

[0091] 在另外的实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至600kDa;100kDa至500kDa;100kDa至400kDa;150kDa至600kDa;150kDa至500kDa;150kDa至400kDa;200kDa至600kDa;200kDa至500kDa;200kDa至400kDa;250kDa至600;250kDa至500kDa;250kDa至400kDa;250kDa至350kDa;300kDa至600kDa;300kDa至500kDa;300kDa至400kDa;400kDa至600kDa;500kDa至600kDa;以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0092] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0093] 1.2.3肺炎球菌多糖血清型10A

[0094] 血清型10A的纯化多糖多糖重复单元由分枝的六糖重复单元组成,其中有两个呋喃半乳糖(Gal_f)、三个吡喃半乳糖(Gal_p)、一个N-乙酰半乳糖胺(Gal_pNAc)和骨架磷酸核糖醇(Jones,C.(2005) Carbohydrate Research 269 (1) :175-181)。在β-Gal_pNAc部分有两个分枝单糖(β-3-Gal_p和β-6-Gal_f),如图2所示。

[0095] 血清型10A糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。另外,它们可以用合成方案来产生。

[0096] 血清型10A肺炎链球菌菌株可得自己建立的培养物收集(如例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention,Atlanta,GA))或者临床样本。

[0097] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型10A的纯化的多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至1,000kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:70kDa至900kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至800kDa。

[0098] 在另外的实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至600kDa;100kDa至500kDa;100kDa至400kDa;150kDa至600kDa;150kDa至500kDa;150kDa至400kDa;200kDa至600kDa;200kDa至500kDa;200kDa至400kDa;250kDa至600kDa;250kDa至500kDa;250kDa至400kDa;250kDa至350kDa;300kDa至600kDa;300kDa至500kDa;300kDa至400kDa;400kDa至

600kDa;500kDa至600kDa;以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0099] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0100] 1.2.4肺炎球菌多糖血清型11A

[0101] 血清型11A的纯化多糖多糖重复单元由线性四糖骨架(两个吡喃半乳糖(Gal_p)和两个吡喃葡萄糖(Glc_p))和悬垂的磷酸甘油组成(Richards等人(1988) Adv.Exp.Med.Biol.228:595-597),如图3所示。所述多糖是在多个位置O-乙酰化的,并且基于文献中报道的数据(Calix等人(2011) J Bacteriol.193(19):5271-5278),11A多糖中O-乙酰化的总量是为大约每个多糖重复单元2.6个O-酰基基团。

[0102] 血清型11A糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。另外,它们可以用合成方案来产生。

[0103] 血清型11A肺炎链球菌菌株可得自己建立的培养物收集(例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention,Atlanta,GA))或者临床样本。

[0104] 通过从肺炎链球菌水解物纯化血清型11A多糖以及任选地将纯化的多糖改变大小而获得的分离的血清型11A荚膜多糖,可以通过不同的属性来进行表征,包括例如分子量(MW)以及每mM所述血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐的mM数。

[0105] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型11A的纯化多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至1,000kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:70kDa至900kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至800kDa。

[0106] 在另外的实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至600kDa;100kDa至500kDa;100kDa至400kDa;100kDa至300kDa;100kDa至200kDa;150kDa至600kDa;150kDa至500kDa;150kDa至400kDa;150kDa至300kDa;150kDa至200kDa;200kDa至600kDa;200kDa至500kDa;200kDa至400kDa;250kDa至600kDa;250kDa至500kDa;250kDa至400kDa;250kDa至350kDa;300kDa至600kDa;300kDa至500kDa;300kDa至400kDa;400kDa至600kDa;500kDa至600kDa;以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0107] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0108] 在一实施方案中,通过高压均质化来减小纯化的血清型11A多糖的大小。高压均质化通过将加工流泵压穿过尺寸足够小的流径而实现高剪切速率。通过使用更大的应用均质化压力而提高剪切速率,而可以通过使原料流重循环经过均质器而提高暴露时间。

[0109] 所述高压均质化过程特别适宜用于减小纯化的血清型11A多糖的大小,而又保留该多糖的结构特征,如O-乙酰基基团的存在。

[0110] 纯化的、分离的或活化的血清型11A荚膜多糖中或者血清型11A多糖-载体蛋白缀合物中O-乙酰基的存在表示为每mM的所述多糖乙酸酯/盐的mM数或者表示为每个多糖重复单元O-乙酰基基团的数目。

[0111] 在优选的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型11A的纯化多糖对于每 μmol 的所述血清型11A荚膜多糖具有至少0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4或1.6 μmol 的乙酸酯/盐。

[0112] 1.2.5肺炎球菌多糖血清型12F

[0113] 血清型12F的纯化多糖多糖重复单元由线性三糖骨架组成(一个N-乙酰基岩藻糖胺(Fuc_pNAc)、一个N-乙酰半乳糖胺(Gal_pNAc)、和一个N-乙酰基甘露糖醛酸(Man_pNAcA)),其具有两个分枝:悬垂的 α -吡喃半乳糖(Gal_p)连接在 Fuc_pNAc 的C3以及 α - Glc_p -(1 \rightarrow 2)- α - Glc_p 二糖分枝连接在 Man_pNAcA 的C3(Leontein等人(1983) Carbohydrate Research 114(2): 257-266.),如图4所示。

[0114] 血清型12F肺炎链球菌菌株可得自己建立的培养物收集(如例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA))或者临床样本。

[0115] 来自肺炎链球菌血清型12F的荚膜糖可通过本领域技术人员已知的标准技术来制备。通常通过使每种肺炎链球菌血清型在培养基中生长来生产荚膜多糖(例如,在基于大豆的培养基中),继而从细菌培养物制备多糖。生物体(肺炎链球菌血清型12F)的群体常常从种子小瓶规模放大至种子瓶并通过一个或多个体积增加的种子发酵罐传代直至达到生产规模的发酵体积。在生长循环结束时将细胞裂解并接着收获裂解液用于下游(纯化)的加工(参见例如WO 2006/110381和WO 2008/118752,美国专利申请公开号2006/0228380,2006/0228381,2008/0102498和US2008/0286838)。多糖通常是通过离心、沉淀、超滤、和/或柱层析来进行纯化(参见例如WO 2006/110352和WO 2008/118752)。。

[0116] 来自血清型12F的纯化的多糖可以被活化(例如,化学活化)以使得它们能够反应并继而掺入到本发明糖缀合物中,如本文进一步描述的。

[0117] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型12F的纯化多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至1,000kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至300kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:70kDa至300kDa。在另外的实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量: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;以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0118] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0119] 1.2.6肺炎球菌多糖血清型15B

[0120] 如图5所示,血清型15B的纯化多糖多糖重复单元由分枝的三糖骨架(一个N-乙酰

基葡萄糖胺 (Glc_pNAc)、一个吡喃半乳糖 (Gal_p)、和一个吡喃葡萄糖 (Glc_p) 与连接至 Glc_pNAc 的 C4 羟基的 αGal_p-βGal_p 二糖分枝组成。磷酸甘油连接至所述二糖分枝中 βGal_p 残基的 C3 羟基 (Jones 等人 (2005) Carbohydrate Research 340 (3) :403-409)。来自血清型 15C 血清型的荚膜多糖具有与血清型 15B 相同的骨架结构但却缺少 O-乙酰化。

[0121] 血清型 15B 多糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌 (参见例如美国专利申请公开号 2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和 2008/0102498 以及 WO 2008/118752 中公开的方法)。它们可以用本领域技术人员已知的合成方案来产生。

[0122] 血清型 15B 肺炎链球菌菌株可得自以建立的培养物收集 (如例如 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA USA) (例如, 保藏菌株号 ATCC10354) 或者链球菌参考实验室 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA)) 或者来自临床样本。

[0123] 细菌细胞在培养基中生长, 优选在基于大豆的培养基。在生产肺炎链球菌血清型 15B 荚膜多糖的细菌细胞的发酵之后, 将细菌细胞裂解以产生细胞裂解物。继而可以使用本领域已知的纯化技术从细胞裂解物分离血清型 15B 的多糖, 包括使用离心、深度过滤、沉淀、超滤、用活性炭处理、渗滤和/或柱层析 (参见, 例如, 美国专利申请公开号 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 以及 2008/0102498 和 WO 2008/118752)。纯化的血清型 15B 荚膜多糖继而可用于制备免疫原性缀合物。

[0124] 通过从肺炎链球菌水解物纯化血清型 15B 多糖以及任选地将纯化的多糖改变大小而获得的分离的血清型 15B 荚膜多糖, 可以通过不同的参数来进行表征, 包括例如分子量 (MW)、每 mM 所述血清型 15B 荚膜多糖的乙酸酯/盐的 mM 数以及每 mM 所述血清型 15B 荚膜多糖的甘油的 mM 数。

[0125] 优选地, 为了产生具有有利的过滤性特征和/或产量的血清型 15B 缀合物, 在缀合至载体蛋白之前将多糖大小改变为目标分子量的范围。有利的是, 纯化的血清型 15B 多糖的大小被减小而又保留该多糖的关键结构特征如例如 O-乙酰基基团的存在。优选地, 纯化的血清型 15B 多糖的大小是通过机械均质化来减小的。

[0126] 在优选的实施方案中, 通过高压均质化来减小纯化的血清型 15B 多糖的大小。高压均质化通过将加工流泵压穿过尺寸足够小的流径而实现高剪切速率。通过使用更大的应用均质化压力而提高剪切速率, 而可以通过使原料流重循环经过均质器而提高暴露时间。

[0127] 所述高压均质化过程特别适宜用于减小纯化的血清型 15B 多糖的大小, 而又保留该多糖的结构特征, 如 O-乙酰基基团的存在。

[0128] 在优选的实施方案中, 所述分离的血清型 15B 荚膜多糖具有如下的分子量: 5kDa 至 500kDa、50kDa 至 500kDa、50kDa 至 450kDa、100kDa 至 400kDa、以及 100kDa 至 350kDa。在优选的实施方案中, 所述分离的血清型 15B 荚膜多糖具有 100kDa 至 350kDa 的分子量。在优选的实施方案中, 所述分离的血清型 15B 荚膜多糖具有 100kDa 至 300kDa 的分子量。在优选的实施方案中, 所述分离的血清型 15B 荚膜多糖具有 150kDa 至 300kDa 的分子量。在优选的实施方案中, 所述分离的血清型 15B 荚膜多糖具有 150kDa 至 350kDa 的分子量。在另外的实施方案中, 所述荚膜多糖具有如下分子量: 100kDa 至 500kDa; 100kDa 至 400kDa; 100kDa 至 300kDa; 100kDa 至 200kDa; 150kDa 至 500kDa; 150kDa 至 400kDa; 150kDa 至 300kDa; 150kDa 至 200kDa; 200kDa 至

500kDa; 200kDa至400kDa; 250kDa至500kDa; 250kDa至400kDa; 250kDa至350kDa; 300kDa至500kDa; 300kDa至400kDa; 以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0129] 血清型15B多糖是O-乙酰化的并且O-乙酰化总量是每个多糖重复单元大约0.8-0.9个O-乙酰基基团。多糖的O-乙酰化的度可以通过本领域已知的任何方法来确定,例如,通过质子NMR(参见例如Lemercinier等人(1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones等人(2002) J.Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247; WO 2005/033148和WO 00/56357)。另外常用的方法在Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261中有描述。优选地,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0130] 纯化的、分离的或活化的血清型15B荚膜多糖中或者血清型15B多糖-载体蛋白缀合物中O-乙酰基的存在表示为以及每mM所述多糖的乙酸酯/盐的mM数、或者表示为每个多糖重复单元O-乙酰基基团的数目。

[0131] 在优选的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型15B的纯化多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7mM的乙酸酯/盐。

[0132] 磷酸甘油侧链的存在(在通过用氢氟酸(HF)处理多糖而使其释放之后)是通过使用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)测量甘油而确定的。纯化的、分离的或活化的血清型15B多糖中或者血清型15B多糖-载体蛋白缀合物中存在的甘油表示为每mM血清型15B多糖的甘油的mM数。

[0133] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8mM的甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6或0.7mM的甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.7mM的甘油。

[0134] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100kDa至350kDa的分子量以及每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐。

[0135] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100kDa至350kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。

[0136] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至300kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐。

[0137] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至300kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。

[0138] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至350kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐。

[0139] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至350kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。

[0140] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖对于每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐以及至少0.6mM的甘油。

[0141] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有100kDa至350kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐和至少0.6mM的甘油。

[0142] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至300kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐和至少0.6mM的甘油。

[0143] 在优选的实施方案中,所述分离的血清型15B荚膜多糖具有150kDa至350kDa的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐和至少0.6mM的甘油。

[0144] 1.2.7肺炎球菌多糖血清型22F

[0145] 如图6所示,血清型22F的纯化多糖多糖重复单元由分枝的五糖骨架(一个葡萄糖醛酸(Glc_pA)、一个吡喃葡萄糖(Glc_p)、一个呋喃半乳糖(Gal_f)和两个吡喃鼠李糖(Rha_p)与连接至βRha_p的C3羟基的αGlc_p分枝组成(Richards等人(1989) Canadian Journal of Chemistry 67 (6):1038-1050)。多糖重复单元中βRha_p残基大约80%的C2羟基基团是O-乙酰化的。

[0146] 血清型22F多糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。另外,它们可以用合成方案来产生。

[0147] 血清型22F肺炎链球菌菌株可得自以建立的培养物收集(如例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention,Atlanta,GA))或者临床样本。

[0148] 通过从肺炎链球菌水解物纯化血清型22F多糖以及任选地将纯化的多糖改变大小而获得的分离的血清型22F荚膜多糖,可以通过不同的参数来进行表征,包括例如分子量(MW)以及每mM所述血清型22F荚膜多糖的乙酸酯/盐的mM数。

[0149] 优选地,为了产生具有有利的过滤性特征和/或产量的血清型22F缀合物,在缀合至载体蛋白之前将多糖大小改变为目标分子量的范围。有利的是,纯化的血清型22F多糖的大小被减小而又保留该多糖的关键结构特征如例如O-乙酰基基团的存在。优选地,纯化的血清型22F多糖的大小是通过机械均质化来减小的。

[0150] 在优选的实施方案中,通过高压均质化将纯化的多糖的大小减小。高压均质化通过将加工流泵压穿过尺寸足够小的流径而实现高剪切速率。通过使用更大的应用均质化压力而提高剪切速率,而可以通过使原料流重循环经过均质器而提高暴露时间。

[0151] 所述高压均质化过程特别适宜用于减小纯化的血清型22F多糖的大小,而又保留该多糖的结构特征,如O-乙酰基基团的存在。

[0152] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型22F的纯化多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在一个实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:50kDa至1,000kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:70kDa至900kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至800kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:200kDa至600kDa。在另一实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:400kDa至

700kDa。

[0153] 在另外的实施方案中,所述荚膜多糖具有如下分子量:100kDa至1,000kDa;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300kDa;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;500kDa至600kDa;以及类似的期望分子量范围。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0154] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如上文所述,22F多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0155] 多糖的O-乙酰化的度可以通过本领域已知的任何方法来确定,例如,通过质子NMR(Lemercinier等人(1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones等人(2002) J.Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247;WO 2005/033148和WO 00/56357)。另外常用的方法在Hestrin,S.(1949) J.Biol.Chem.180:249-261中有描述。优选地,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0156] 纯化的、分离的或活化的血清型22F荚膜多糖中或者血清型22F多糖-载体蛋白缀合物中O-乙酰基的存在表示为每mM的所述多糖乙酸酯/盐的mM数或者表示为每个多糖重复单元O-乙酰基基团的数目。

[0157] 在优选的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型22F的纯化多糖对于每 μmol 的所述血清型22F荚膜多糖具有至少0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4或1.6 μmol 的乙酸酯/盐。

[0158] 1.2.8肺炎链球菌多糖血清型33F

[0159] 如图7所示,血清型33F的纯化多糖多糖重复单元由分枝的五糖骨架(两个吡喃半乳糖(Gal_p)、两个呋喃半乳糖(Gal_f)和一个吡喃葡萄糖(Glc_p)与连接至骨架内 αGal_p 残基的C2羟基基团的末端 αGal_p 组成(Lemercinier等人(2006) Carbohydrate Research 341(1):68-74.)。文献中有报道骨架3- $\beta\text{-Gal}_f$ 残基的C2羟基基团是O-乙酰化的。

[0160] 血清型33F多糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。另外,它们可以用合成方案来产生。

[0161] 血清型33F肺炎链球菌菌株可得自以建立的培养物收集(如例如链球菌参考实验室(Centers for Disease Control and Prevention,Atlanta,GA))或者临床样本。

[0162] 来自血清型33F的纯化的多糖可以被活化(例如,化学活化)以使得它们能够反应并继而掺入到本发明糖缀合物中,如本文进一步描述的。

[0163] 通过从肺炎链球菌水解物纯化血清型33F多糖以及任选地将纯化的多糖改变大小

而获得的分离的血清型33F荚膜多糖,可以通过不同的参数来进行表征,包括例如分子量以及每mM所述血清型33F荚膜多糖的乙酸酯/盐的mM数。

[0164] 在一些实施方案中,来自肺炎链球菌血清型33F的纯化多糖在缀合前具有10kDa至2,000kDa的分子量。在其它此类实施方案中所述糖具有50kDa至2,000kDa的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50kDa至1,750kDa;50kDa至1,500kDa;50kDa至1,250kDa;50kDa至1,000kDa;50kDa至750kDa;50kDa至500kDa;100kDa至2,000kDa;100kDa至1,750kDa;100kDa至1,500kDa;100kDa至1,250kDa;100kDa至1,000kDa;100kDa至750kDa;100kDa至500kDa;200kDa至2,000kDa;200kDa至1,750kDa;200kDa至1,500kDa;200kDa至1,250kDa;200kDa至1,000kDa;200kDa至750kDa;或者200kDa至500kDa。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0165] 多糖在正常纯化过程中大小可以稍微减小。另外,如本文所述,多糖可以在缀合前经历改变大小的技术。上文提到的分子量范围是指在缀合前(例如,活化之前)在最终的改变大小步骤之后的纯化多糖。

[0166] 纯化的、分离的或活化的血清型33F荚膜多糖中或者血清型33F多糖-载体蛋白缀合物中O-乙酰基的存在表示为每mM的所述多糖乙酸酯/盐的mM数或者表示为每个多糖重复单元O-乙酰基基团的数目。

[0167] 在优选的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型33F的纯化多糖对于每 μmol 的所述血清型33F荚膜多糖具有至少0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4或1.6 μmol 的乙酸酯/盐。

[0168] 1.3本发明糖缀合物

[0169] 纯化的糖经化学活化以使得该糖(也即,活化的糖)能够与载体蛋白反应。一旦活化,每种荚膜糖分别缀合至载体蛋白以形成糖缀合物。在一个实施方案中,每种荚膜糖缀合至相同的载体蛋白。糖的化学活化以及随后缀合至载体蛋白可以通过本文公开的活化和缀合方法来完成。

[0170] 1.3.1来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的糖缀合物

[0171] 来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜多糖通过本领域技术人员已知的标准技术来制备(参见例如WO 2006/110381、WO 2008/118752、WO 2006/110352,以及美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2008/0102498和2008/0286838)。

[0172] 在一实施方案中,将所述多糖用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化以形成氰酸酯。继而将该活化的多糖直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白(优选CRM₁₉₇)上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脒胺或半脒胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用N-[γ -马来酰亚胺丁基氧]丁二酰亚胺酯(GMBS))或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、N-琥珀酰亚胺溴乙酸酯(SBA;SIB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘代乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、硫代琥珀酰亚胺基(4-碘代乙酰基)氨基苯甲酸酯(sulfo-SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)或者琥珀酰亚胺基3-[溴乙酰胺]丙酸酯(SBAP))。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载

体蛋白(例如,CRM₁₉₇)。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0173] 其它用于缀合的适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降莰烷(norborane)、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S--NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与1,1'-羰二咪唑(CDI)反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0174] 在优选的实施方案中,至少一种来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜多糖通过还原胺化缀合至载体蛋白(如美国专利申请公开号2006/0228380、2007/0231340、2007/0184071和2007/0184072、WO 2006/110381、WO 2008/079653、和WO 2008/143709中所述的)。在优选的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜多糖全部都是通过还原胺化缀合至载体蛋白的。

[0175] 还原胺化涉及两个步骤:(1)多糖的氧化,(2)所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。在氧化之前,所述多糖任选是经水解的。可以使用机械或化学水解。可以用乙酸来进行化学水解。氧化步骤可以涉及与高碘酸盐反应。对于本发明的目的,术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸;该术语也包括偏高碘酸盐(IO_4^-)和正高碘酸盐(IO_6^{5-})以及各种高碘酸的盐(例如,高碘酸钠和高碘酸钾)。

[0176] 在一实施方案中,来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F或23F的荚膜多糖在偏高碘酸盐的存在下被氧化,优选是在高碘酸钠(NaIO_4)的存在下氧化。在另一实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜多糖在正高碘酸盐的存在下被氧化,优选是在高碘酸的存在下氧化。

[0177] 在多糖的氧化步骤之后,该多糖被认为是活化的且在下文被称作“活化的多糖”。所述活化的多糖和所述载体蛋白可以是经过单独(分离冻干)或一起(共冻干)冻干(冷冻干燥)的。在一个实施方案中,所述活化的多糖和所述载体蛋白是共冻干的。在另一实施方案中,所述活化的多糖和所述载体蛋白是单独冻干的。

[0178] 在一个实施方案中,所述冷冻干燥在非还原糖的存在下进行,可能的非还原糖包括蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。

[0179] 缀合方法的第二个步骤是所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物(所谓的还原胺化),其中使用还原剂。适宜的还原剂包括氰基硼氢化物,如氰基硼氢化钠、硼烷吡啶、或硼氢化物交换树脂。在一个实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。

[0180] 在一实施方案中,在水溶剂中进行还原反应,在另一实施方案中,在非质子溶剂(aprotic solvent)中进行所述反应。在一实施方案中,在DMSO(二甲基亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行所述还原反应。所述DMSO或DMF溶剂可用于将冻干的所述活化的多糖和载体蛋白复原。

[0181] 在还原反应结束时,缀合物中可能留有未反应的醛基,可以用适宜的封端剂来将这些封端(封端)。在一个实施方案中,此封端剂是硼氢化钠(NaBH_4)。在缀合(还原以及任选

的封端)之后,可将糖缀合物纯化。糖缀合物可以通过渗滤和/或离子交换层析和/或大小排阻层析来进行纯化。在一实施方案中,通过渗滤或离子交换层析或大小排阻层析来纯化所述糖缀合物。在一个实施方案中,所述糖缀合物经无菌过滤。

[0182] 在一些实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型9V和/或18C的糖缀合物含糖,所述糖具有如下的0-乙酰化度:10%至100%、20%至100%、30%至100%、40%至100%、50%至100%、60%至100%、70%至100%、75%至100%、80%至100%、90%至100%、50%至90%、60%至90%、70%至90%或者80%至90%。在其它实施方案中,0-乙酰化的度为 $\geq 10\%$ 、 $\geq 20\%$ 、 $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、或 $\geq 90\%$ 、或者约100%。

[0183] 在一些实施方案中,本发明的所述来自肺炎链球菌血清型9V和/或18C的糖缀合物是0-乙酰化的。在一些实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型9V的糖缀合物是0-乙酰化的而来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物是脱-0-乙酰化的。

[0184] 1.3.2来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物

[0185] 在一实施方案中,所述血清型22F糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脒胺或半脒胺以给出硫脲化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0186] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苡烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S--NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0187] 在优选的实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物是使用还原胺化来制备的。还原胺化涉及两个步骤:(1)多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性,(2)所述活化的多糖和载体蛋白(例如CRM₁₉₇)的还原以产生缀合物。

[0188] 优选地,在氧化前,将所述血清型22F的多糖改变大小至目标分子量(MW)的范围。有利的是,纯化的血清型22F多糖的大小被减小而又保留该多糖的关键结构特征如例如0-乙酰基基团的存在。优选地,纯化的血清型22F多糖的大小是通过机械均质化来减小的(参见上文1.2.7节)。

[0189] 在一实施方案中,通过包括以下步骤的方法将血清型多糖活化(氧化):

[0190] (a) 将分离的血清型22F多糖与氧化剂反应;

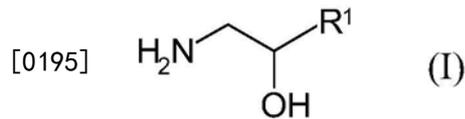
[0191] (b) 通过添加猝灭剂使氧化反应猝灭,导致了活化的血清型22F多糖。

[0192] 在优选的实施方案中,所述氧化剂是高碘酸盐。对于本发明的目的,术语“高碘酸

盐”包括高碘酸盐和高碘酸；该术语也包括偏高碘酸盐 (IO_4^-) 和正高碘酸盐 (IO_6^{5-}) 以及各种高碘酸的盐 (例如, 高碘酸钠和高碘酸钾)。在优选的实施方案中, 所述氧化剂是高碘酸钠。在优选的实施方案中, 用于氧化血清型22F多糖的高碘酸盐是偏高碘酸盐。在优选的实施方案中用于氧化血清型22F多糖的高碘酸盐是偏高碘酸钠。

[0193] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂选自邻位二醇、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、或磷酸。

[0194] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是式 (I) 的1,2-氨基醇:



[0196] 其中 R^1 选自H、甲基、乙基、丙基、或异丙基。

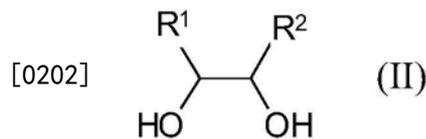
[0197] 在一个实施方案中, 猝灭剂选自亚硫酸的钠盐和钾盐、硫酸氢盐、连二亚硫酸盐、偏亚硫酸氢盐、硫代硫酸盐、亚磷酸盐、次磷酸盐、或磷酸。

[0198] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是氨基酸。在此类实施方案中, 所述氨基酸可以选自所述氨基酸可以选自丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、和组氨酸。

[0199] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是亚硫酸盐如硫酸氢盐、连二亚硫酸盐、偏亚硫酸氢盐、硫代硫酸盐。

[0200] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是包含两个邻位羟基 (邻位二醇) 的化合物, 也即两个羟基共价连接至两个临近的碳原子。

[0201] 优选地, 所述猝灭剂是式 (II) 的化合物:



[0203] 其中 R^1 和 R^2 彼此独立地选自H、甲基、乙基、丙基、或异丙基。

[0204] 在优选的实施方案中, 所述猝灭剂是甘油、乙二醇、1,2-丙二醇、1,2-丁二醇或2,3-丁二醇、或者抗坏血酸。在优选的实施方案中, 所述猝灭剂是2,3-丁二醇。

[0205] 在优选的实施方案中, 所述分离的血清型22F多糖由包括以下步骤的方法活化:

[0206] (a) 将血清型22F多糖与高碘酸盐反应;

[0207] (b) 通过加入2,3-丁二醇而使氧化反应猝灭, 导致活化的血清型22F多糖。

[0208] 在多糖的氧化步骤之后, 该多糖被认为是活化的且在下文被称作“活化的多糖”。

[0209] 在优选的实施方案中, 所述活化的血清型22F多糖经纯化。所述活化的血清型22F多糖根据本领域技术人员已知的方法来纯化如凝胶渗透层析 (GPC)、透析或超滤/渗滤。例如, 所述活化的22F多糖通过浓缩以及用超滤装置渗滤来进行纯化。

[0210] 在优选的实施方案中, 活化的血清型22F多糖的氧化度为2至30、2至25、2至20、2至15、2至10、2至5、5至30、5至25、5至20、5至15、5至10、10至30、10至25、10至20、10至15、15至30、15至25、15至20、20至30、或20至25。在优选的实施方案中, 活化的血清型22F多糖的氧化度为2至10、4至8、4至6、6至8、6至12、8至14、9至11、10至16、12至16、14至18、16至20、16至

18、18至22、或18至20。

[0211] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有如下的分子量:25kDa至1,000kDa、100kDa至1,000kDa、300kDa至800kDa、300kDa至700kDa、300kDa至600kDa、400kDa至1,000kDa、400kDa至800kDa、400kDa至700kDa、或400kDa至600kDa。在一实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有300kDa至800kDa的分子量。在一实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有400kDa至600kDa的分子量。在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有400kDa至600kDa的分子量以及10至25、10至20、12至20之间或14至18之间的氧化度。在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有400kDa至600kDa的分子量以及10至20之间的氧化度。

[0212] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖每mM的血清型22F多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、或0.7、或约0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖每mM的血清型22F多糖包含至少0.5、0.6、或0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖每mM的血清型22F多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖每mM的血清型22F多糖包含至少0.7mM的乙酸酯/盐。

[0213] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有400kDa至800kDa的分子量以及每mM的血清型22F多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。

[0214] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型22F多糖具有400kDa至800kDa的分子量、12至20之间的氧化度以及每mM的血清型22F多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。

[0215] 所述活化的多糖和/或所述载体蛋白可以是经过单独冻干(分离冻干)或一起(共冻干)冻干(冷冻干燥)的。

[0216] 在一实施方案中,所述活化的血清型22F多糖是冻干的,任选在糖的存在下。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。在一个实施方案中,所述冻干的活化多糖继而与包含载体蛋白的溶液混合。

[0217] 在另一实施方案中,所述活化的多糖和所述载体蛋白是经过共冻干的。在此类实施方案中,所述活化的血清型22F多糖与载体蛋白混合并任选在糖的存在下冻干。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。所述共冻干的多糖和载体蛋白继而可以在溶液中重悬并与还原剂反应。

[0218] 缀合方法的第二个步骤是所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物(还原胺化),其中使用还原剂。

[0219] 所述活化的血清型22F多糖可通过包括以下步骤的方法缀合至载体蛋白:

[0220] (c) 将所述活化的血清型22F多糖于载体蛋白混合;和

[0221] (d) 将所述混合的活化血清型22F多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型22F多糖-载体蛋白缀合物。

[0222] 在一实施方案中,在水溶剂中进行还原反应,在另一实施方案中,在非质子溶剂中进行所述反应。在一实施方案中,在DMSO(二甲基亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行所述还原反应。所述DMSO或DMF溶剂可用于将冻干的所述活化的多糖和载体蛋白复原。

[0223] 活化的血清型22F多糖与蛋白载体通过在二甲基亚砷(DMSO)中的还原胺化而缀合,其适宜于保存所述多糖的O-乙酰基含量,例如,相较于多糖的O-乙酰化水平可显著降低的水相中的还原胺化。因此在优选的实施方案中,步骤(c)和步骤(d)在DMSO中进行。

[0224] 在一实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、硼氢化钠或硼氢化锌,其中存在Bronsted或Lewis酸、氨硼烷如硼烷吡啶、2-甲基吡啶硼烷、2,6-乙硼烷-甲醇、二甲基氨硼烷、t-BuMeⁱPrN-BH₃、苄胺-BH₃或5-乙基-2-甲基硼烷吡啶(PEMB)。在优选的实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。

[0225] 在还原反应结束时,缀合物中可能留有未反应的醛基,可以用适宜的封端剂来将这些封端。在一个实施方案中,此封端剂是硼氢化钠(NaBH₄)。

[0226] 在血清型22F多糖缀合至载体蛋白之后,该缀合物可以通过本领域技术人员已知的多种技术来进行纯化(对多糖-蛋白缀合物的量进行富集)。这些技术包括透析、浓缩/渗滤操作、切向流过滤沉淀/洗脱、柱层析(DEAE或疏水相互作用层析)、和深度过滤。

[0227] 在一些实施方案中,本发明的血清型22F糖缀合物包含具有10kDa至2,000kDa的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50kDa至1,000kDa的分子量。在其它此类实施方案中所述糖具有70kDa至900kDa的分子量。在其它此类实施方案中所述糖具有100kDa至800kDa的分子量。在其它此类实施方案中所述糖具有200kDa至600kDa的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:100kDa至1,000kDa;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300kDa;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1000kDa;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;500kDa至600kDa。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。在一些此类实施方案中,所述血清型22F糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0228] 在一些实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物具有如下的分子量:400kDa至15,000kDa;500kDa至10,000kDa;2,000kDa至10,000kDa;3,000kDa至8,000kDa;或者3,000kDa至5,000kDa。在其它实施方案中,所述血清型22F糖缀合物具有500kDa至10,000kDa的分子量。在其它实施方案中,所述血清型22F糖缀合物具有1,000kDa至8,000kDa的分子量。在其它的实施方案中,所述血清型22F糖缀合物具有2,000kDa至8,000kDa的分子量或者3,000kDa至7,000kDa的分子量。在另外的实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物具有如下的分子量:200kDa至20,000kDa;200kDa至15,000kDa;200kDa至10,000kDa;200kDa至7,500kDa;200kDa至5,000kDa;200kDa至3,000kDa;200kDa至1,000kDa;500kDa至20,000kDa;500kDa至15,000kDa;500kDa至12,500kDa;500kDa至10,000kDa;500kDa至7,500kDa;500kDa至6,000kDa;500kDa至5,000kDa;500kDa至4,000kDa;500kDa至3,000kDa;500kDa至2,000kDa;500kDa至1,500kDa;500kDa至1,000kDa;750kDa至20,000kDa;750kDa至15,000kDa;750kDa至12,500kDa;750kDa至10,000kDa;750kDa至7,500kDa;750kDa至6,000kDa;750kDa

至5,000kDa;750kDa至4,000kDa;750kDa至3,000kDa;750kDa至2,000kDa;750kDa至1,500kDa;1,000kDa至15,000kDa;1,000kDa至12,500kDa;1,000kDa至10,000kDa;1,000kDa至7,500kDa;1,000kDa至6,000kDa;1,000kDa至5,000kDa;1,000kDa至4,000kDa;1,000kDa至2,500kDa;2,000kDa至15,000kDa;2,000kDa至12,500kDa;2,000kDa至10,000kDa;2,000kDa至7,500kDa;2,000kDa至6,000kDa;2,000kDa至5,000kDa;2,000kDa至4,000kDa;或者2,000kDa至3,000kDa。

[0229] 在另外的实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物具有如下的分子量:3,000kDa至20,000kDa;3,000kDa至15,000kDa;3,000kDa至10,000kDa;3,000kDa至7,500kDa;3,000kDa至5,000kDa;4,000kDa至20,000kDa;4,000kDa至15,000kDa;4,000kDa至12,500kDa;4,000kDa至10,000kDa;4,000kDa至7,500kDa;4,000kDa至6,000kDa;或者4,000kDa至5,000kDa。

[0230] 在另外的实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物具有如下的分子量:5,000kDa至20,000kDa;5,000kDa至15,000kDa;5,000kDa至10,000kDa;5,000kDa至7,500kDa;6,000kDa至20,000kDa;6,000kDa至15,000kDa;6,000kDa至12,500kDa;6,000kDa至10,000kDa;或者6,000kDa至7,500kDa。

[0231] 糖缀合物的分子量是通过SEC-MALLS测量的。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0232] 在优选的实施方案中,本发明的血清型22F的糖缀合物其每mM的血清型22F多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、或0.7、或约0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型22F多糖包含至少0.5、0.6、或0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型22F多糖包含至少0.6mM乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型22F多糖包含至少0.7mM乙酸酯/盐。

[0233] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。

[0234] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型22F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。

[0235] 对本发明的血清型22F的糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。载体蛋白赖氨酸修饰(由于与多糖的共价键)的证据,可以通过使用本领域技术人员已知的常规方法进行的氨基酸分析来获得。缀合导致回收的赖氨酸残基的数目与用于产生缀合物材料的CRM₁₉₇蛋白起始材料相比降低。在优选的实施方案中,本发明血清型22F的糖缀合物

的缀合度为2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中，本发明血清型22F的糖缀合物的缀合度为大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14、或大约15。在优选的实施方案中，本发明血清型22F的糖缀合物的缀合度为4至7。在一些此类实施方案中，所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0236] 本发明的血清型22F的糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在一些实施方案中，所述糖缀合物中血清型22F多糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.5至3.0(例如，大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9、或大约3.0)。在其它实施方案中，糖对载体蛋白的比例(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。在另外的实施方案中，糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.8至1.2。在优选的实施方案中，所述缀合物中血清型22F荚膜多糖对载体蛋白的比例为0.9至1.1。在一些此类实施方案中，所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0237] 本发明的血清型22F糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0238] 在优选的实施方案中，所述血清型22F糖缀合物包含相较于血清型22F多糖的总量低于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、或15%的游离血清型22F多糖。在优选的实施方案中，所述血清型22F糖缀合物包含相较于血清型22F多糖的总量低于大约40%的游离血清型22F多糖。在优选的实施方案中，所述血清型22F糖缀合物包含相较于血清型22F多糖的总量低于大约25%的游离血清型22F多糖。在优选的实施方案中，所述血清型22F糖缀合物包含相较于血清型22F多糖的总量低于大约20%的游离血清型22F多糖。在优选的实施方案中，所述血清型22F糖缀合物包含相较于血清型22F多糖的总量低于大约15%的游离血清型22F多糖。

[0239] 血清型22F糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子量大小分布。在重力自流进料柱中使用大小排阻层析(SEC)来描述缀合物的分子大小分布。大分子从介质洗脱物中的孔排出比小分子要快速得多。级分收集器(fraction collector)被用于手机柱洗脱物。通过糖测定法对级分进行比色分析测试。为了确定 K_d ，将柱进行校准以建立分子完全排出的级分(V_0)，($K_d=0$)，以及代表最大滞留的级分(V_i)，($K_d=1$)。达到指定样品属性的级分(V_e)通过表达式 $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ 而与 K_d 相关。

[0240] 在优选的实施方案中，至少30%的血清型22F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中，至少40%的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中，至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的血清型22F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中，至少60%的血清型22F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中，50%至80%的血清型22F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中，65%至80%的血清型22F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

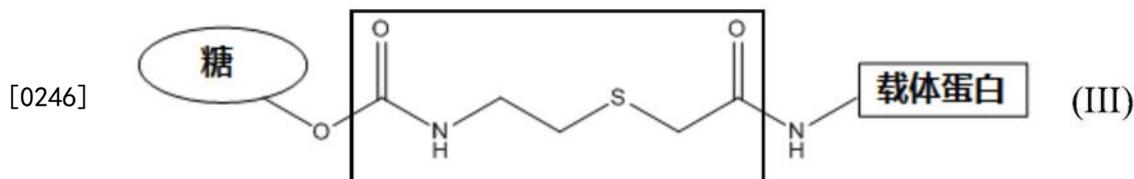
[0241] 1.3.3来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物

[0242] 在一实施方案中,血清型33F糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脒胺或半脒胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰胺、SIB、SlAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0243] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苄烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0244] 在某些实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物是使用还原胺化来制备的。在此种实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物可用还原胺化在水相(RAC/水)中制备。水相中的还原胺化已经成功的应用于产生肺炎球菌缀合物疫苗(参见,例如,WO 2006/110381)。但优选地,当使用还原胺化时,经在DMSO(RAC/DMSO)中的还原胺化来制备血清型33F糖缀合物。考虑到使用RAC/水方法时与保持O-乙酰基功能性相关的挑战,优选在DMSO中的还原胺化。RAC/DMSO已被成功应用于生产肺炎球菌缀合物疫苗(参见,例如,WO 2006/110381)。

[0245] 在优选的实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物用eTEC缀合来制备(下文称作“血清型33F eTEC连接的糖缀合物”),如实施例1、2和3以及WO 2014/027302中所描述的。所述33F糖缀合物包含通过一或多个eTEC间隔物而共价缀合至载体蛋白的糖,其中所述糖通过氨基甲酸酯键共价缀合至eTEC间隔物,并且其中所述载体蛋白通过酰胺键共价缀合至eTEC间隔物。所述eTEC连接的本发明糖缀合物可以由通式(III)表示:



[0247] 其中构成eTEC间隔物的原子被包含在中间的框中。

[0248] 所述eTEC间隔物包括7个线性原子(即, $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$)并在糖和载体蛋白之间提供稳定的硫醚键和酰胺键。eTEC连接的糖缀合物的合成涉及糖的活化的羟基基团与硫代烷基胺试剂(例如,脒胺或半脒氨酸胺或其盐)的氨基基团反应,使糖形成氨基甲酸酯键以提供硫醇化的糖。通过与还原剂的反应而实现了一或多个游离巯基基团的产生,以提供活化的硫醇化糖。活化的硫醇化糖的游离巯基基团与活化的载体蛋白(在含有胺的残基上具有一或多个 α -卤乙酰胺基团)的反应,产生了硫醚键以形成缀合物,其中所述载体蛋

白通过酰胺键而附着至eTEC间隔物。

[0249] 在本发明血清型33F糖缀合物中,所述糖可以是多糖或寡糖。所述载体蛋白可选自本文所描述的或者本领域技术人员已知的任何适合的载体。在常见的实施方案中,所述糖是多糖。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一些此类实施方案中,所述eTEC连接的糖缀合物包含肺炎链球菌血清型33F荚膜多糖。

[0250] 在特别优选的实施方案中,所述eTEC连接的糖缀合物包含Pn-33F荚膜多糖,其通过eTEC间隔物共价缀合至CRM₁₉₇(血清型33F eTEC连接的糖缀合物)。

[0251] 在一些实施方案中,本发明血清型33F的糖缀合物包含具有10Kda至2,000Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50Kda至2,000Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有50Kda至1,750Kda的分子量;50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;100Kda至2,000Kda;100Kda至1,750Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,750Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0252] 在一些实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物具有50Kda至20,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型33F糖缀合物具有500Kda至10,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型33F糖缀合物具有200Kda至10,000Kda的分子量。在其它的实施方案中,血清型33F糖缀合物具有1,000Kda至3,000Kda的分子量。

[0253] 在另外的实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物具有如下分子量:200Kda至20,000Kda;200Kda至15,000Kda;200Kda至10,000Kda;200Kda至7,500Kda;200Kda至5,000Kda;200Kda至3,000Kda;200Kda至1,000Kda;500Kda至20,000Kda;500Kda至15,000Kda;500Kda至12,500Kda;500Kda至10,000Kda;500Kda至7,500Kda;500Kda至6,000Kda;500Kda至5,000Kda;500Kda至4,000Kda;500Kda至3,000Kda;500Kda至2,000Kda;500Kda至1,500Kda;500Kda至1,000Kda;750Kda至20,000Kda;750Kda至15,000Kda;750Kda至12,500Kda;750Kda至10,000Kda;750Kda至7,500Kda;750Kda至6,000Kda;750Kda至5,000Kda;750Kda至4,000Kda;750Kda至3,000Kda;750Kda至2,000Kda;750Kda至1,500Kda;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至12,500Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,000Kda至6,000Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至2,500Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;2,000Kda至3,000Kda;3,000Kda至20,000Kda;3,000Kda至15,000Kda;3,000Kda至12,500Kda;3,000Kda至10,000Kda;3,000Kda至9,000Kda;3,000Kda至8,000Kda;3,000Kda至7,000Kda;3,000Kda至6,000Kda;3,000Kda至5,000Kda;或者3,000Kda至4,000Kda。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0254] 对本发明的血清型33F的糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。

[0255] 在优选的实施方案中,本发明血清型33F的糖缀合物的缀合度为2至20、4至16、2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至

15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中,本发明血清型33F的糖缀合物的缀合度为大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14、大约15、大约16、大约17、大约18、大约19、或大约20。在优选的实施方案中,本发明血清型33F的糖缀合物的缀合度为4至16。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0256] 在优选的实施方案中,所述载体蛋白包含CRM₁₉₇,其含有39个赖氨酸残基。在一些此类实施方案中,所述CRM₁₉₇在39个共价连接至糖的赖氨酸残基中可包含4至16个赖氨酸残基。表述此参数的另一种方式是大约10%至大约41%的CRM₁₉₇赖氨酸共价连接至糖。在另一个此种实施方案中,所述CRM₁₉₇在39个共价连接至糖的赖氨酸残基中可包含2至20个赖氨酸残基。表述此参数的另一种方式是大约5%至大约50%的CRM₁₉₇赖氨酸共价连接至糖。在一些实施方案中,所述CRM₁₉₇在39个共价连接至糖的赖氨酸残基中可包含大约4个、大约5个、大约6个、大约7个、大约8个、大约9个、大约10个、大约11个、大约12个、大约13个、大约14个、大约15个、或大约16个赖氨酸残基。

[0257] 在常见的实施方案中,所述载体蛋白通过载体蛋白上赖氨酸残基的一或多个ε-氨基基团的酰胺键而共价缀合至eTEC间隔物。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白包含2至20个共价缀合至糖的赖氨酸残基。在其它此类实施方案中,所述载体蛋白包含4至16个共价缀合至糖的赖氨酸残基。

[0258] 本发明血清型33F糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在一些实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.2至4.0(例如,大约0.2、大约0.3、大约0.4、大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9、大约3.0、大约3.1、大约3.2、大约3.3、大约3.4、大约3.5、大约3.6、大约3.7、大约3.8、大约3.9或大约4.0)。在其它实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为1.0至2.5。在另外的实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.4至1.7。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0259] 糖链附着至载体蛋白上赖氨酸的频率是表征本发明血清型33F糖缀合物的另一个参数。例如,在一些实施方案中,所述多糖的每4个糖重复单元就会出现载体蛋白和多糖之间的至少一个共价键。在另一实施方案中,所述多糖的每10个糖重复单元就会出现至少一次载体蛋白和多糖之间的共价键。在另一实施方案中,所述多糖的每15个糖重复单元就会出现至少一次载体蛋白和多糖之间的共价键。在另外的实施方案中,所述多糖的每25个糖重复单元就会出现至少一次载体蛋白和多糖之间的共价键。

[0260] 在常见的实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇并且所述多糖的每4、10、15或25个糖重复单元就会出现至少一次CRM₁₉₇和多糖之间的经eTEC间隔物的共价键。

[0261] 在其它实施方案中,所述缀合物每5至10个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每2至7个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每3至8个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每4至9个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每6至11个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每7至12个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每8至13个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键;每9至14个糖重复单元就包含载体蛋白

和糖之间至少一个共价键；每10至15个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每2至6个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每3至7个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每4至8个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每6至10个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每7至11个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每8至12个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每9至13个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每10至14个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每10至20个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键；每4至25个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键，或者每2至25个糖重复单元就包含载体蛋白和糖之间至少一个共价键。在常见的实施方案中，所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0262] 在另一实施方案中，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个糖重复单元就会出现至少一个载体蛋白和糖之间的键。在一实施方案中，所述载体蛋白为CRM₁₉₇。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0263] 缀合期间的重要考虑是发展条件以允许保留各成分的可能敏感的非糖取代官能团，如O-酰基、磷酸酯或甘油磷酸酯侧链(可形成部分糖表位)。

[0264] 在一个实施方案中，本发明血清型33F糖缀合物包含具有10%至100%的O-乙酰化度的糖。在一些此类实施方案中，所述糖具有50%至100%的O-乙酰化度。在其它此类实施方案中所述糖具有75%至100%的O-乙酰化度75%至100%。在另外的实施方案中所述糖具有大于或等于70% ($\geq 70\%$) 的O-乙酰化度。

[0265] 在优选的实施方案中，本发明血清型33F糖缀合物包含每mM血清型33F荚膜多糖至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中，所述糖缀合物包含每mM血清型33F荚膜多糖至少0.5、0.6、或0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中，所述糖缀合物包含每mM血清型33F荚膜多糖至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中，所述糖缀合物包含每mM血清型33F荚膜多糖至少0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中，通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0266] 在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。

[0267] 在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中，糖缀合物中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型33F多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。

[0268] 本发明的血清型33F糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但

却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0269] 在一些实施方案中,本发明血清型33F糖缀合物包含相较于血清型33F多糖的总量低于50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、或5%的游离血清型33F多糖。优选地,血清型33F的糖缀合物包含低于15%的游离糖、更优选低于10%的游离糖、以及更优选低于5%的游离糖。在优选的实施方案中,所述血清型33F糖缀合物包含相较于血清型33F多糖的总量低于大约25%的游离血清型33F多糖。在优选的实施方案中,所述血清型33F糖缀合物包含相较于血清型33F多糖的总量低于大约20%的游离血清型33F多糖。在优选的实施方案中,所述血清型33F糖缀合物包含相较于血清型33F多糖的总量低于大约15%的游离血清型33F多糖。

[0270] 在某些优选的实施方案中,本发明提供了血清型33F糖缀合物,其具有以下一或多种特征(单独或组合):所述多糖具有50Kda至2,000Kda的分子量;所述糖缀合物具有500Kda至10,000Kda的分子量;所述载体蛋白包含2至20个共价连接至糖的赖氨酸残基;所述糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.2至4.0;所述糖缀合物多糖的每4、10、15或25个糖重复单元就包含至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键;所述糖具有75%至100%的O-乙酰化度;所述缀合物相对于总多糖包含低于大约15%的游离多糖;所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0271] 所述血清型33F糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子量大小分布,如上文所述。

[0272] 在一实施方案中,至少15%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在一实施方案中,至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、或90%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。

[0273] 在优选的实施方案中,至少35%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,至少60%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,至少70%的本发明血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。

[0274] 在优选的实施方案中,40%至90%的血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,50%至90%的血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,65%至80%的血清型33F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。

[0275] 1.3.4来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物

[0276] 在一实施方案中,血清型15B糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脒胺或半脒胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学

经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0277] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苡烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头，其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成（参见Bethell等人（1979）J.Biol.Chem.254:2572-2574；Hearn等人（1981）J.Chromatogr.218:509-518）随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0278] 在优选的实施方案中，本发明的血清型15B的糖缀合物是使用还原胺化来制备的。还原胺化涉及两个步骤：（1）多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性，（2）所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。

[0279] 优选地，在氧化前，将所述血清型15B的多糖改变大小至目标分子量（MW）的范围。有利的是，纯化的血清型15B多糖的大小被减小而又保留该多糖的关键结构特征如例如O-乙酰基基团的存在。优选地，纯化的血清型15B多糖的大小是通过机械均质化来减小的（参见上文1.2.6节）。

[0280] 氧化步骤可涉及与高碘酸盐反应。对于本发明的目的，术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸；该术语也包括偏高碘酸盐（ IO_4^- ）和正高碘酸盐（ IO_6^{5-} ）以及各种高碘酸的盐（例如，高碘酸钠和高碘酸钾）。在优选的实施方案中用于氧化血清型15B荚膜多糖的高碘酸盐是偏高碘酸盐。在优选的实施方案中用于氧化血清型15B荚膜多糖的高碘酸盐是偏高碘酸钠。

[0281] 在优选的实施方案中，所述多糖与0.01至10.0、0.05至5.0、0.1至1.0、0.5至1.0、0.7至0.8、0.05至0.5、0.1至0.3摩尔当量（molar equivalent）的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.15摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.25摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.5摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.6摩尔当量的氧化剂反应。在优选的实施方案中，所述多糖与大约0.7摩尔当量的氧化剂反应。

[0282] 在优选的实施方案中，反应持续时间为1小时至50小时、10小时至30小时、15小时至20小时、15小时至17小时、或大约16小时。

[0283] 在优选的实施方案中，反应的温度保持在15°C至45°C、15°C至30°C、20°C至25°C。在优选的实施方案中，反应的温度保持在大约23°C。

[0284] 在优选的实施方案中，氧化反应在选自以下的缓冲液中进行：磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉)乙磺酸（MES）、或Bis-Tris。在优选的实施方案中，所述缓冲液是磷酸钾。

[0285] 在优选的实施方案中，所述缓冲液具有如下浓度：1mM至500mM、1mM至300mM、或50mM至200mM。在优选的实施方案中，所述缓冲液具有大约100mM的浓度。

[0286] 在优选的实施方案中，氧化反应在如下的pH进行：4.0至8.0、5.0至7.0、或5.5至6.5。在优选的实施方案中，pH为大约6.0。

[0287] 在优选的实施方案中,通过将0.5mg/mL至5mg/mL的分离的血清型15B荚膜多糖与0.2-0.3摩尔当量的高碘酸盐在20°C至25°C的温度反应而获得所述活化的血清型15B荚膜多糖。

[0288] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖经纯化。所述活化的血清型15B荚膜多糖根据本领域技术人员已知的方法来纯化,如凝胶渗透层析(GPC)、透析或超滤/渗滤。例如,所述活化的荚膜多糖通过浓缩以及用超滤装置渗滤来进行纯化。

[0289] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B的荚膜多糖的氧化度为2至20、2至15、2至10、2至5、5至20、5至15、5至10、10至20、10至15、或15至20。在优选的实施方案中活化的血清型15B的荚膜多糖的氧化度为2至10、4至8、4至6、6至8、6至12、8至12、9至11、10至16、12至16、14至18、16至20、16至18、或18至20。

[0290] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有如下的分子量:5Kda至500Kda、50Kda至500Kda、50Kda至450Kda、100Kda至400Kda、100Kda至350Kda。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至350Kda的分子量。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至300Kda的分子量。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至250Kda的分子量。

[0291] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.5、0.6、或0.7mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.7mM的乙酸酯/盐。

[0292] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或0.8mM的甘油。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.5、0.6、或0.7mM的甘油。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.6mM的甘油。在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.7mM的甘油。

[0293] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至250Kda的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐。

[0294] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至250Kda的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。

[0295] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖包含每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.6mM乙酸酯/盐以及每mM的所述血清型15B荚膜多糖至少0.6mM的甘油。

[0296] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖具有100Kda至250Kda的分子量以使每mM的所述血清型15B荚膜多糖每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的醋酸酯/盐以及每mM的所述血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。

[0297] 在一实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖经过冻干,任选是在糖的存在下。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。所述冻干的活化荚膜多糖

继而与包含载体蛋白的溶液混合。

[0298] 在另一实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白混合并任选在糖的存在下冻干。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。所述共冻干的多糖和载体蛋白继而可以在溶液中重悬并与还原剂反应。

[0299] 所述活化的血清型15B荚膜多糖可通过包含以下步骤的方法缀合至载体蛋白:

[0300] (a) 将所述活化的血清型15B荚膜多糖与载体蛋白混合,和

[0301] (b) 将所述混合的活化血清型15B荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型15B荚膜多糖-载体蛋白缀合物。

[0302] 活化的血清型15B荚膜多糖与蛋白载体通过在二甲基亚砜(DMSO)中的还原胺化而缀合,其适宜于保存所述多糖的O-乙酰基含量,例如,相较于多糖的O-乙酰化水平可显著降低的水相中的还原胺化。在优选的实施方案中,步骤(a)和步骤(b)在DMSO中进行。

[0303] 在优选的实施方案中,步骤(a)包括将冻干的血清型15B荚膜多糖溶解在包含载体蛋白和DMSO的溶液中。在优选的实施方案中,步骤(a)包括将共冻干的血清型15B荚膜多糖和载体蛋白溶于DMSO中。

[0304] 当在水成溶液中进行步骤(a)和(b)时,步骤(a)和(b)是在缓冲液中进行的,优选选自PBS、MES、HEPES、Bis-tris、ADA、PIPES、MOPSO、BES、MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Bicine、或HEPB,于6.0至8.5、7.0至8.0、或7.0至7.5的pH。在优选的实施方案中,所述缓冲液为PBS。在优选的实施方案中,所述pH为大约7.3。

[0305] 在优选的实施方案中,步骤(b)中活化的血清型15B的荚膜多糖的浓度为0.1mg/mL至10mg/mL、0.5mg/mL至5mg/mL、或0.5mg/mL至2mg/mL。在优选的实施方案中,步骤(b)中活化的血清型15B的荚膜多糖的浓度为大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0mg/mL。

[0306] 在优选的实施方案中,活化的血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的初始输入比例(重量对重量)为5:1至0.1:1、2:1至0.1:1、2:1至1:1、1.5:1至1:1、0.1:1至1:1、0.3:1至1:1、或0.6:1至1:1。

[0307] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的初始输入比例为大约0.6:1至1:1。在另一优选实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的初始输入比例为大约0.6:1至1.5:1。此种初始输入比例特别适宜于在糖缀合物中获得低水平的游离多糖。

[0308] 在优选的实施方案中,所述活化的血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的初始输入比例为大约0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1或2:1。

[0309] 在一实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、硼氢化钠或硼氢化锌,其中存在Bronsted或Lewis酸、氨硼烷如硼烷吡啶、2-甲基吡啶硼烷、2,6-乙硼烷-甲醇、二甲基氨硼烷、t-BuMeiPrN-BH₃、苄胺-BH₃或5-乙基-2-甲基硼烷吡啶(PEMB)。在优选的实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。在优选的实施方案中,所述还原剂是2-甲基吡啶硼烷钠。

[0310] 在优选的实施方案中,步骤(b)中使用的还原剂的量为大约0.1至10.0摩尔当量、0.5至5.0摩尔当量、或1.0至2.0摩尔当量。在优选的实施方案中,步骤(b)中使用的还原剂的量为大约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、或2.0摩尔当量。

[0311] 在优选的实施方案中,步骤(b)的持续时间为1小时至60小时、10小时至50小时、40小时至50小时、或42小时至46小时。在优选的实施方案中,步骤(b)的持续时间为大约44小时。

[0312] 在优选的实施方案中,步骤(b)中的反应的温度保持在10°C至40°C、15°C至30°C、或20°C至26°C。在优选的实施方案中,步骤(b)中的反应的温度保持在大约23°C。

[0313] 在优选的实施方案中,用于制备包含共价连接至载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的糖缀合物的方法,还包括通过添加NaBH₄而将未反应的醛封端的步骤(步骤(c))。

[0314] 在优选的实施方案中,步骤(c)中使用的NaBH₄的量为0.1至10摩尔当量、0.5至5.0摩尔当量、或1.0至3.0摩尔当量。在优选的实施方案中,步骤(c)中使用的NaBH₄的量为大约2摩尔当量。

[0315] 在优选的实施方案中,步骤(c)的持续时间为0.1小时至10小时、0.5小时至5小时、或2小时至4小时。在优选的实施方案中,步骤(c)的持续时间为大约3小时。

[0316] 在优选的实施方案中,步骤(c)中的反应的温度保持在15°C至45°C、15°C至30°C、或20°C至26°C。在优选的实施方案中,步骤(c)中的反应的温度保持在大约23°C。

[0317] 在优选的实施方案中,缀合步骤的产率超过50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、或90%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤b)的产率超过60%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤b)的产率超过70%。产率为缀合物中血清型15B多糖的量x100)/缀合步骤中使用的活化的多糖的量。

[0318] 在优选的实施方案中,用于制备包含共价连接至载体蛋白的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的糖缀合物的方法包括以下步骤:

[0319] (a) 通过高压均质化将纯化的血清型15B多糖改变大小;

[0320] (b) 将改变大小的血清型15B多糖与氧化剂反应;

[0321] (c) 将所述活化的血清型15B多糖于载体蛋白混合;

[0322] (d) 将所述混合的活化血清型15B多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型15B多糖-载体蛋白缀合物;和

[0323] (e) 通过添加NaBH₄而将未反应的醛封端(猝灭)。

[0324] 在优选的实施方案中,上述方法的缀合步骤(步骤d)的产率超过50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、或90%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤d)的产率超过60%。在优选的实施方案中,缀合步骤(步骤d)的产率超过70%。产率为缀合物中血清型15B多糖的量x100)/缀合步骤中使用的活化的多糖的量。

[0325] 在血清型15B荚膜多糖缀合至载体蛋白之后,可以通过许多本领域技术人员已知的技术来纯化多糖-蛋白缀合物(对多糖-蛋白缀合物的量进行富集)。这些技术包括透析、浓缩/渗滤操作、切向流过滤、沉淀/洗脱、柱层析(DEAE或疏水相互作用层析)、和深度过滤。

[0326] 在一实施方案中,所述载体蛋白如1.1节所定义。在一实施方案中,所述载体蛋白选自自由以下组成的组:DT(白喉毒素),TT(破伤风类毒素),CRM₁₉₇、其它DT突变体、PD(流感嗜

血杆菌蛋白D)、或者其免疫学功能等价物。在一实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0327] 在一些实施方案中,本发明的血清型15B糖缀合物缀合至载体蛋白(例如,CRM₁₉₇)并且包含具有5Kda至1,500Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中,所述糖具有10Kda至1,500Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;50Kda至250Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;100Kda至250Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda;或者200Kda至400Kda。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。在一些实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有50Kda至20,000Kda的分子量。在一些实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有1,000Kda至20,000Kda的分子量。在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有如下的分子量:3,000Kda至20,000Kda、5,000Kda至10,000Kda、5,000Kda至20,000Kda、8,000Kda至20,000Kda、8,000Kda至16,000Kda或者10,000Kda至16,000Kda。

[0328] 在另外的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有如下分子量:大约1,000Kda、大约1,500Kda、大约2,000Kda、大约2,500Kda、大约3,000Kda、大约3,500Kda、大约4,000Kda、大约4,500Kda、大约5,000Kda、大约5,500Kda、大约6,000Kda、大约6,500Kda、大约7,000Kda、大约7,500Kda、大约8,000Kda、大约8,500Kda、大约9,000Kda、大约9,500Kda、大约10,000Kda、大约10,500Kda、大约11,000Kda、大约11,500Kda、大约12,000Kda、大约12,500Kda、大约13,000Kda、大约13,500Kda、大约14,000Kda、大约14,500Kda、大约15,000Kda、大约15,500Kda、大约16,000Kda、大约16,500Kda、大约17,000Kda、大约17,500Kda、大约18,000Kda、大约18,500Kda、大约19,000Kda、大约19,500Kda、或大约20,000Kda。

[0329] 在另外的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有1,000Kda至20,000Kda的分子量;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至3,000Kda;2,000Kda至20,000Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;或者2,000Kda至3,000Kda。

[0330] 在另外的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有如下的分子量:3,000Kda至20,000Kda;3,000Kda至15,000Kda;3,000Kda至10,000Kda;3,000Kda至7,500Kda;3,000Kda至5,000Kda;3,000Kda至4,000Kda;4,000Kda至20,000Kda;4,000Kda至15,000Kda;4,000Kda至12,500Kda;4,000Kda至10,000Kda;4,000Kda至7,500Kda;4,000Kda至6,000Kda;或4,000Kda至5,000Kda。

[0331] 在另外的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物具有如下的分子量:5,000Kda至20,000Kda;5,000Kda至15,000Kda;5,000Kda至10,000Kda;5,000Kda至7,500Kda;6,000Kda至20,000Kda;6,000Kda至15,000Kda;6,000Kda至12,500Kda;6,000Kda至10,000Kda;或6,000Kda至7,500Kda。

[0332] 糖缀合物的分子量是通过SEC-MALLS测量的。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。在一实施方案中,所述血清型15B糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0333] 本发明的血清型15B的糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在优选的实施方案中,血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例(重量对重量)为0.5至3.0(例如,大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9或大约3.0)。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例为0.4至2。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例为0.5至2.0、0.5至1.5、0.5至1.0、1.0至1.5、1.0至2.0。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型15B荚膜多糖对载体蛋白的比例为0.7至0.9。

[0334] 本发明的血清型15B糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0335] 在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物包含相较于血清型15B荚膜多糖的总量低于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、或15%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中本发明的血清型15B的糖缀合物包含相较于血清型15B荚膜多糖的总量低于大约25%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中本发明的血清型15B的糖缀合物包含相较于血清型15B荚膜多糖的总量低于大约20%的游离血清型15B荚膜多糖。在优选的实施方案中本发明的血清型15B的糖缀合物包含相较于血清型15B荚膜多糖的总量低于大约15%的游离血清型15B荚膜多糖。

[0336] 所述血清型15B糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子大小分布,如上文所述。

[0337] 在优选的实施方案中,至少20%的本发明的血清型15B的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少30%的免疫原性缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少40%的本发明的血清型15B的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的血清型15B本发明糖缀合物具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%的本发明的血清型15B的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少70%的本发明的血清型15B的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0338] 在优选的实施方案中,40%至90%的血清型15B糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,50%至90%的血清型15B糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,65%至80%的血清型15B糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0339] 在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或0.8mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6、或0.7的mM乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.7的mM乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0340] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。在优选的实施方案中,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0341] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型15B荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。在优选的实施方案中,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0342] 在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或0.8mM的甘油。在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.5、0.6、或0.7mM的甘油。在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的甘油。在优选的实施方案中,本发明的血清型15B的糖缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.7mM的甘油。

[0343] 对本发明的血清型15B的糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。载体蛋白赖氨酸修饰(由于与多糖的共价键)的证据,可以通过使用本领域技术人员已知的常规方法进行的氨基酸分析来获得。缀合导致回收的赖氨酸残基的数目与用于产生缀合物材料的CRM₁₉₇蛋白起始材料相比降低。

[0344] 在优选的实施方案中,本发明血清型15B的糖缀合物的缀合度为2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中,本发明血清型15B的糖缀合物的缀合度为大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14、或大约15。在优选的实施方案中,本发明血清型15B的糖缀合物的缀合度为2至5。

[0345] 1.3.5来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物

[0346] 在本发明的来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物中,所述糖选自多糖和寡糖组成的组,而所述载体蛋白选自本文描述的或本领域技术人员已知的任何适宜的载体。在一些优选的实施方案中,所述糖是来自血清型12F肺炎链球菌的多糖。

[0347] 在一实施方案中,来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物是使用CDAP制备的。用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)将所述多糖活化以形成氰酸酯。所述活化的多糖继而直接地或经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白(优选CRM₁₉₇)上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脞胺或半脞胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙

酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白(例如,CRM₁₉₇)。

[0348] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苕烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号W0 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0349] 在一实施方案中,血清型12F肺炎链球菌的荚膜多糖通过还原胺化缀合至载体蛋白。还原胺化涉及两个步骤:(1)多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性,(2)所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。

[0350] 在氧化之前,所述血清型12F多糖任选是经水解的(改变大小)。可以使用机械或化学水解。可以用乙酸来进行化学水解。

[0351] 在一实施方案中,所述氧化剂是高碘酸盐。术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸(参见下文)。

[0352] 在优选的实施方案中,所述氧化剂是2,2,6,6-四甲基-1-吡啶基氧(TEMPO)自由基和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)作为共氧化剂。在此种实施方案中,使用2,2,6,6-四甲基-1-吡啶基氧(TEMPO)自由基来将糖的伯醇氧化成醛并使用N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)作为共氧化剂(下文称作“TEMPO/NCS氧化”)而制备所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物,如实施例7中和W0 2014/097099中所描述的。因此在一方面,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物可通过包括以下步骤的方法来获得:a)将12F糖与2,2,6,6-四甲基-1-吡啶基氧(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水溶剂中反应,以产生活化的糖;和b)将所述活化的糖与包含一或多个胺基团的载体蛋白反应(下文称作“TEMPO/NCS-还原胺化”)。在一方面,通过所述方法获得来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物。在一实施方案中,活化的12F糖的氧化度范围是从1至50、从1至40、从1至30、从1至20、从1至10、从1至5、从3至40、从3至30、从3至20、从3至10、从4至40、从4至30、从4至20、从4至10、从5至30、从5至25、从5至20、从5至10、从6至50、从6至40、从6至30、从6至20、从6至15、从6至14、从6至13、从6至12、从6至11、从6至10、从7至40、从7至30、从7至20、从7至15、从7至14、从7至13、从7至12、从7至11、从7至10、从8至40、从8至30、从8至20、从8至15、从8至14、从8至13、从8至13、从8至12、从8至11、从8至10、从9至40、从9至30、从9至20、从9至15、从10至40、从10至30、从10至20、或从10至15。在另外的方面,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。优选地,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0353] 在一实施方案中,在步骤a)之前,将12F糖水解成分子量范围从100Kda至400Kda。例如,在一方面,分子量范围是从100Kda至350Kda、从100Kda至300Kda、从100Kda至250Kda、从100Kda至200Kda、从100Kda至150Kda、从200Kda至400Kda、从200Kda至350Kda、从200Kda

至300Kda、从200Kda至250Kda、从300Kda至400Kda、或者从300Kda至350Kda。

[0354] 在另外的方面,所述方法还包括在步骤b)之前纯化所述活化的多糖。在另外的方面,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NaCNBH₃。在另外的方面,所述方法还包括在添加NaCNBH₃之后添加NaBH₄的步骤。在另外的方面,所述方法包括在添加NaBH₄之后纯化的步骤。

[0355] 在另一方面,本公开提供了可以通过上文所公开的方法生产的或者获得的来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物。例如,在一方面本公开提供了来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物,其包含缀合至载体蛋白的糖,可以通过包括以下步骤的方法生产的或者获得:a)将糖与2,2,6,6-四甲基-1-呱啶基氧(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)在水溶剂中反应以产生活化的糖;和b)将所述活化的糖于包含一或多个胺基团的载体蛋白反应。

[0356] 在一个实施方案中,本发明来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物具有大约50Kda至大约20,000Kda的分子量。在另一实施方案中,所述糖缀合物具有大约200Kda至大约10,000Kda的分子量。在另一实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物具有大约500Kda至大约5,000Kda的分子量。在一个实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物具有大约1,000Kda至大约3,000Kda的分子量。在其它实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物具有如下分子量:大约600Kda至大约2,800Kda;大约700Kda至大约2,700Kda;大约1,000Kda至大约2,000Kda;大约1,800Kda至大约2,500Kda;大约1,100Kda至大约2,200Kda;大约1,900Kda至大约2,700Kda;大约1,200Kda至大约2,400Kda;大约1,700Kda至大约2,600Kda;大约1,300Kda至大约2,600Kda;大约1,600Kda至大约3,000Kda。

[0357] 在另外的实施方案中,本发明的血清型12F的糖缀合物具有如下分子量:1,000Kda至20,000Kda;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至3,000Kda;2,000Kda至20,000Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;或者2,000Kda至3,000Kda。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0358] 对本发明的血清型12F的糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。

[0359] 在优选的实施方案中,本发明的血清型12F的糖缀合物的缀合度为2至20、4至16、4至15、2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中,本发明的血清型12F的糖缀合物的缀合度为大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14、大约15、大约16、大约17、大约18、大约19或大约20。

[0360] 缀合至糖的载体蛋白中赖氨酸残基的数目也可表示为摩尔比例。例如,在糖缀合物(其中CRM₁₉₇的4至15个赖氨酸残基共价连接至糖)中,糖缀合物中缀合的赖氨酸对CRM₁₉₇的摩尔比例为大约10:1至大约40:1。在免疫原性组合物(其中CRM₁₉₇的2至20个赖氨酸残基共价连接至糖)中,糖缀合物中缀合的赖氨酸对CRM₁₉₇的摩尔比例为大约5:1至大约50:1。在一个实施方案中,在本发明的来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物中,缀合的赖氨酸对载

体蛋白的摩尔比例为大约10:1至大约25:1。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一些实施方案中,所述CRM₁₉₇可包含39个共价连接至糖的赖氨酸残基中的大约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、或16个赖氨酸残基。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0361] 在一个实施方案中,在来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.2至4(例如,大约0.2、大约0.3、大约0.4、大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9、大约3.0、大约3.1、大约3.2、大约3.3、大约3.4、大约3.5、大约3.6、大约3.7、大约3.8、大约3.9或大约4.0)。在另一实施方案中,在来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为1.1至1.7。在其它实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.8至1.8(例如,大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7或大约1.8)。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0362] 糖链附着至载体蛋白上赖氨酸的频率是表征本公开的血清型12F糖缀合物的另一个参数。例如,在一个实施方案中,多糖的每100个糖重复单元有至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在一个实施方案中,多糖的每50个糖重复单元有至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在一个实施方案中,多糖的每25个糖重复单元有至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另一实施方案中,多糖的每4个糖重复单元出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另一实施方案中,多糖的每10个糖重复单元出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另外的实施方案中,多糖的每15个糖重复单元出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在常见的实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇多糖的每4、10、15或25个个糖重复单元就会出现至少一个CRM₁₉₇与多糖之间的共价键。

[0363] 在其它实施方案中,对于每5至10个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每2至7个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每3至8个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每4至9个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每6至11个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每7至12个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每8至13个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每9至14个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每10至15个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每2至6个糖重复单元,对于每3至7个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每4至8个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每6至10个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每7至11个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每8至12个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每9至13个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每10至14个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对

于每10至20个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键;对于每4至25个糖重复单元或者对于每2至25个糖重复单元,缀合物就包含至少一个载体蛋白和糖之间的共价键。在常见的实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0364] 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,就出现至少一个CRM₁₉₇与糖之间的键。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0365] 在一个实施方案中,本发明的来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物在多糖的每25个糖重复单元就包含至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另一实施方案中,在多糖的每4个糖重复单元就出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另一实施方案中,在多糖的每10个糖重复单元就出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在另外的实施方案中,在多糖的每15个糖重复单元就出现至少一个载体蛋白和多糖之间的共价键。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0366] 本发明的血清型12F糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0367] 在一些实施方案中,本发明的血清型12F的糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、或5%的游离血清型12F多糖。在一个实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约50%的游离血清型12F多糖。在一个实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约45%的游离血清型12F多糖。在另一实施方案中,所述糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约30%的游离血清型12F多糖。在另一实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约20%的游离血清型12F多糖。在另外的实施方案中,所述糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约10%的游离血清型12F多糖。在另一实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物包含相较于血清型12F多糖的总量低于大约5%的游离血清型12F多糖。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0368] 在一些实施方案中,本发明血清型12F糖缀合物包含具有10Kda至2,000Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50Kda至2,000Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50Kda至1,750Kda;50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;100Kda至2,000Kda;100Kda至1,750Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,750Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda;或者200Kda至400Kda。在一些此类实施方案中,血清型12F糖缀合物通过TEMPO/NCS-还原胺化缀合至载体蛋白。

[0369] 所述血清型12F糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子量大小分布,如上文所述。

[0370] 在优选的实施方案中,至少35%的本发明的血清型12F的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的K_d。在优选的实施方案中,至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、

70%、75%、80%、或85%的本发明的血清型12F的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%的本发明的血清型12F的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少70%的本发明的血清型12F的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0371] 在优选的实施方案中,40%至90%的血清型12F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,50%至90%的血清型12F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,65%至80%的血清型12F糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0372] 1.3.6来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物

[0373] 在一实施方案中,血清型10A糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脎胺或半脎胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0374] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苧烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S--NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0375] 在优选的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物是使用还原胺化来制备的。还原胺化涉及两个步骤:(1)多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性,(2)所述活化多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。

[0376] 在氧化之前,所述血清型10A多糖任选是经水解的(改变大小)。可以使用机械或化学水解。可以用乙酸来进行化学水解。

[0377] 在一实施方案中,通过包括以下步骤的防腐将血清型多糖活化(氧化):

[0378] (a) 将分离的血清型10A多糖与氧化剂反应;

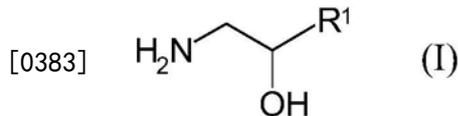
[0379] (b) 通过添加猝灭剂使氧化反应猝灭,导致了活化的血清型10A多糖。

[0380] 在优选的实施方案中,所述氧化剂为高碘酸盐。对于本发明的目的,术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸,该术语也包括偏高碘酸盐(IO_4^-)和正高碘酸盐(IO_6^{5-})以及各种高碘酸的盐(例如,高碘酸钠和高碘酸钾)。在优选的实施方案中,所述氧化剂是高碘酸钠。在优选的实施方案中,用于氧化血清型10A多糖的高碘酸盐是偏高碘酸盐。在优选的实施方案中用于氧化血清型10A多糖的高碘酸盐是偏高碘酸钠。

[0381] 在一个实施方案中,所述猝灭剂选自邻位二醇,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、或磷酸。

[0382] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是式 (I) 的 1,2-氨基醇:



[0384] 其中R¹选自H、甲基、乙基、丙基、或异丙基。

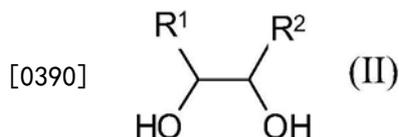
[0385] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂选自亚硫酸的钠盐和钾盐、硫酸氢盐、连二亚硫酸盐、偏亚硫酸氢盐、硫代硫酸盐、亚磷酸盐、次磷酸盐、或磷酸。

[0386] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是氨基酸。在此类实施方案中, 所述氨基酸可以选自所述氨基酸可以选自丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、和组氨酸。

[0387] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是亚硫酸盐如硫酸氢盐, 连二亚硫酸盐, 偏亚硫酸氢盐, 硫代硫酸盐。

[0388] 在一个实施方案中, 所述猝灭剂是包含两个邻位羟基(邻位二醇)的化合物, 也即两个羟基共价连接至两个临近的碳原子。

[0389] 优选地, 所述猝灭剂是式 (II) 的化合物:



[0391] 其中R¹和R²彼此独立地选自H、甲基、乙基、丙基、或异丙基。

[0392] 在优选的实施方案中, 所述猝灭剂是甘油、乙二醇、1,2-丙二醇、1,2-丁二醇或2,3-丁二醇、或者抗坏血酸。在优选的实施方案中, 所述猝灭剂是2,3-丁二醇。

[0393] 在优选的实施方案中, 分离的血清型10A多糖通过包括以下步骤的方法活化:

[0394] (a) 将分离的血清型10A多糖与高碘酸盐反应;

[0395] (b) 通过加入2,3-丁二醇使氧化反应猝灭, 导致活化的血清型10A多糖。

[0396] 在多糖的氧化步骤之后, 所述多糖被认为是活化的并且在下文中称作“活化的多糖”。

[0397] 在优选的实施方案中, 所述活化的血清型10A多糖经过纯化。所述活化的血清型10A多糖根据本领域技术人员已知的方法来纯化, 如凝胶渗透层析(GPC)、透析或超滤/渗滤。例如, 所述活化的10A多糖通过浓缩以及用超滤装置渗滤来进行纯化。

[0398] 在优选的实施方案中活化的血清型10A多糖的氧化度为2至30、2至25、2至20、2至15、2至10、2至5、5至30、5至25、5至20、5至15、5至10、10至30、10至25、10至20、10至15、15至30、15至25、15至20、20至30或20至25。在优选的实施方案中, 活化的血清型10A多糖的氧化度为2至10、4至8、4至6、6至8、6至12、8至14、9至11、10至16、12至16、14至18、16至20、16至18、18至22、或18至20。

[0399] 在优选的实施方案中, 所述活化的血清型10A多糖具有如下的分子量: 50Kda至400Kda、50Kda至350Kda、50Kda至300Kda、50Kda至250Kda、50Kda至200Kda、100Kda至300Kda、100Kda至250Kda、或100Kda至200Kda。在优选的实施方案中, 所述活化的血清型10A

多糖具有50Kda至300Kda的分子量。在优选的实施方案中,所述活化的血清型10A多糖具有100Kda至200Kda的分子量。在优选的实施方案中,所述活化的血清型10A多糖具有100Kda至200Kda的分子量以及5至20、5至15、8至14、8至12、或9至11的氧化度。在优选的实施方案中,所述活化的血清型10A多糖具有100Kda至200Kda的分子量以及9至11的氧化度。

[0400] 所述活化的多糖和/或所述载体蛋白可以是经过单独(分离冻干)或一起(共冻干)冻干(冷冻干燥)的。

[0401] 在一实施方案中,所述活化的血清型10A多糖经过冻干,任选是在糖的存在下。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。在一个实施方案中,所述冻干的活化多糖继而与包含载体蛋白的溶液混合。

[0402] 在另一实施方案中,所述活化的多糖和所述载体蛋白是经过共冻干的。在此类实施方案中,所述活化的血清型10A多糖与载体蛋白混合并任选在糖的存在下冻干。在优选的实施方案中,所述糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。在优选的实施方案中,所述糖是蔗糖。所述共冻干的多糖和载体蛋白继而可以在溶液中重悬并与还原剂反应。

[0403] 缀合方法的第二个步骤是所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物(还原胺化),其中使用还原剂。

[0404] 活化的血清型10A多糖可通过包含以下步骤的方法缀合至载体蛋白:

[0405] (c) 将所述活化的血清型10A多糖于载体蛋白混合;和

[0406] (d) 将所述混合的活化血清型10A多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成血清型10A多糖-载体蛋白缀合物。

[0407] 在一实施方案中,在水溶剂中进行还原反应,在另一实施方案中,在非质子溶剂中进行所述反应。在一实施方案中,在DMSO(二甲基亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行所述还原反应。所述DMSO或DMF溶剂可用于将冻干的所述活化的多糖和载体蛋白复原。

[0408] 在一实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、硼氢化钠或硼氢化锌,其中存在Bronsted或Lewis酸、氨硼烷如硼烷吡啶、2-甲基吡啶硼烷、2,6-乙硼烷-甲醇、二甲基氨硼烷、t-BuMeiPrN-BH₃、苄胺-BH₃或5-乙基-2-甲基硼烷吡啶(PEMB)。在优选的实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。

[0409] 在还原反应结束时,缀合物中可能留有未反应的醛基,可以用适宜的封端剂来将这些封端。在一个实施方案中,此封端剂是硼氢化钠(NaBH₄)。

[0410] 在血清型10A多糖缀合至载体蛋白之后,该缀合物可以通过本领域技术人员已知的多种技术来进行纯化(对多糖-蛋白缀合物的量进行富集)。这些技术包括透析、浓缩/渗滤操作、切向流过滤沉淀/洗脱、柱层析(DEAE或疏水相互作用层析)、和深度过滤。

[0411] 在一些实施方案中,本发明的血清型10A糖缀合物包含具有10Kda至2,000Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50Kda至2,000Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50Kda至1,750Kda;50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;100Kda至2,000Kda;100Kda至1,750Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,750Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,

250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda;或者200Kda至400Kda。在一些此类实施方案中,血清型10A糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0412] 在一些实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有50Kda至20,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型10A糖缀合物具有50Kda至15,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:500Kda至15,000Kda;500Kda至10,000Kda;2,000Kda至10,000Kda;或者3,000Kda至8,000Kda。在其它实施方案中,血清型10A糖缀合物具有1,000Kda至10,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型10A糖缀合物具有1000Kda至8,000Kda的分子量。在其它的实施方案中,所述血清型10A糖缀合物具有2,000Kda至8,000Kda或3,000Kda至7,000Kda的分子量。在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:200Kda至20,000Kda;200Kda至15,000Kda;200Kda至10,000Kda;200Kda至7,500Kda;200Kda至5,000Kda;200Kda至3,000Kda;200Kda至1,000Kda;500Kda至20,000Kda;500Kda至15,000Kda;500Kda至12,500Kda;500Kda至10,000Kda;500Kda至7,500Kda;500Kda至6,000Kda;500Kda至5,000Kda;500Kda至4,000Kda;500Kda至3,000Kda;500Kda至2,000Kda;500Kda至1,500Kda;500Kda至1,000Kda;750Kda至20,000Kda;750Kda至15,000Kda;750Kda至12,500Kda;750Kda至10,000Kda;750Kda至7,500Kda;750Kda至6,000Kda;750Kda至5,000Kda;750Kda至4,000Kda;750Kda至3,000Kda;750Kda至2,000Kda;750Kda至1,500Kda;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至12,500Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,000Kda至6,000Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至2,500Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;或者2,000Kda至3,000Kda。

[0413] 在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:3,000Kda至20,000Kda;3,000Kda至15,000Kda;3,000Kda至10,000Kda;3,000Kda至7,500Kda;3,000Kda至5,000Kda;4,000Kda至20,000Kda;4,000Kda至15,000Kda;4,000Kda至12,500Kda;4,000Kda至10,000Kda;4,000Kda至7,500Kda;4,000Kda至6,000Kda;或者4,000Kda至5,000Kda。在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:5,000Kda至20,000Kda;5,000Kda至15,000Kda;5,000Kda至10,000Kda或5,000Kda至7,500Kda。在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:6,000Kda至20,000Kda;6,000Kda至15,000Kda;6,000Kda至10,000Kda或6,000Kda至7,500Kda。在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:7,000Kda至20,000Kda;7,000Kda至15,000Kda;7,000Kda至10,000Kda或7,000Kda至8,000Kda。在另外的实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物具有如下的分子量:8,000Kda至20,000Kda;8,000Kda至15,000Kda;或者8,000Kda至10,000Kda。

[0414] 任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。糖缀合物的分子量是通过SEC-MALLS测量的。

[0415] 对本发明血清型10A糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。载体蛋白赖氨酸修饰(由于与多糖的共价键)的证据,可以通过使用本领域技术人员已知的常规方法进行的氨基酸分析来获得。缀合导致回收的赖氨酸残基的数目与用于产生缀合物

材料的CRM₁₉₇蛋白起始材料相比降低。

[0416] 在优选的实施方案中,本发明的血清型10A的糖缀合物的缀合度为2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在优选的实施方案中,本发明的血清型10A的糖缀合物的缀合度为6至8。在优选的实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0417] 本发明血清型10A糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在一些实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.5至3.0(例如,大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9或大约3.0)。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型10A糖对载体蛋白为0.5至2.0、0.5至1.5、0.5至1.0、1.0至1.5或1.0至2.0。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型10A多糖对载体蛋白的比例为0.8至1.4。在优选的实施方案中,所述缀合物中血清型10A荚膜多糖对载体蛋白的比例为0.8至1.2(例如,大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、或大约1.2)。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0418] 本发明的血清型10A糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0419] 在一些实施方案中,本发明血清型10A糖缀合物相对于10A糖的总量,包含低于大约50%的游离糖、低于大约45%的游离糖、低于大约40%的游离糖、低于大约35%的游离糖、低于大约30%的游离糖、低于大约25%的游离糖、低于大约20%的游离糖、低于大约15%的游离糖、低于大约10%的游离糖、或低于大约5%的游离糖。优选地,血清型10A糖缀合物包含低于15%的游离糖、更优选低于10%的游离糖、更以及优选低于5%的游离糖。

[0420] 血清型10A糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子大小分布,如上文所述。

[0421] 在优选的实施方案中,至少30%的本发明血清型10A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少40%的本发明血清型10A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的本发明血清型10A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%的血清型10A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,50%至80%的本发明血清型10A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0422] 1.3.7来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物

[0423] 在一实施方案中,血清型11A糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脒胺或半脒胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学

经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0424] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苄烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头，其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成（参见Bethell等人（1979）J. Biol. Chem. 254:2572-2574；Hearn等人（1981）J. Chromatogr. 218:509-518）随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0425] 在优选的实施方案中，本发明血清型11A糖缀合物是使用还原胺化来制备的。还原胺化涉及两个步骤：（1）多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性，（2）活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。

[0426] 在氧化之前，所述血清型11A多糖任选是经水解的以降低其粘性。可以使用机械或化学水解。可以用乙酸来进行化学水解。可以使用高压均质剪切来进行机械大小改变。

[0427] 氧化步骤可涉及与高碘酸盐反应。对于本发明的目的，术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸；该术语也包括偏高碘酸盐（ IO_4^- ）和正高碘酸盐（ IO_6^{5-} ）以及各种高碘酸的盐（例如，高碘酸钠和高碘酸钾）。在一实施方案中，所述来自肺炎链球菌血清型11A的荚膜多糖在偏高碘酸盐的存在下被氧化，优选是在高碘酸钠（ NaIO_4 ）的存在下。在另一实施方案中，所述来自血清型11A的荚膜多糖在正高碘酸盐的存在下被氧化，优选是在高碘酸的存在下。

[0428] 在多糖的氧化步骤之后，该多糖被认为是活化的且在下文被称作“活化的多糖”。所述活化的多糖可以是纯化的以及经冻干（冷冻干燥）的。

[0429] 所述活化的多糖和所述载体蛋白可以是经过单独（分离冻干）或一起（共冻干）冻干（冷冻干燥）的。在一个实施方案中所述活化的多糖和所述载体蛋白是共冻干的。在另一实施方案中，所述活化的多糖和所述载体蛋白是单独冻干的。

[0430] 在一个实施方案中，所述冷冻干燥在非还原糖的存在下进行，可能的非还原糖包括蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。

[0431] 缀合方法的第二个步骤是所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物（还原胺化），其中使用还原剂。适宜的还原剂包括氰基硼氢化物，如氰基硼氢化钠、硼烷吡啶、或硼氢化物交换树脂。在一个实施方案中，所述还原剂是氰基硼氢化钠。

[0432] 在一实施方案中，在水溶剂中进行还原反应，在另一实施方案中，在非质子溶剂中进行所述反应。在一实施方案中，在DMSO（二甲基亚砜）或DMF（二甲基甲酰胺）溶剂中进行所述还原反应。所述DMSO或DMF溶剂可用于将冻干的所述活化的多糖和载体蛋白复原。

[0433] 在一个实施方案中，在还原反应中使用0.1至3.0、0.15至2.0、0.2至2.0、或0.5至1.5摩尔当量的氰基硼氢化钠。在一个实施方案中，在还原反应中使用大约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.9或3.0摩尔当量的氰基硼氢化钠。

[0434] 在一个实施方案中，所述还原剂是三乙酰氧基硼氢化钠，在另外的实施方案中，在还原反应中使用1.0至6.0摩尔当量的三乙酰氧基硼氢化钠、2.0至5.0摩尔当量的三乙酰氧

基硼氢化钠、或大约3.0摩尔当量的三乙酰氧基硼氢化钠。

[0435] 在还原反应结束时,缀合物中可能留有未反应的醛基,可以用适宜的封端剂来将这些封端。在一个实施方案中,此封端剂是硼氢化钠(NaBH₄)。在一实施方案中,通过将还原反应与0.5至5.0摩尔当量的NaBH₄混合而实现封端,例如大约1、1.5、2、2.5或3摩尔当量的NaBH₄。

[0436] 在缀合(还原以及任选的封端)之后,可将糖缀合物纯化。糖缀合物可以通过渗滤和/或离子交换层析和/或大小排阻层析来进行纯化。在一实施方案中,通过渗滤或离子交换层析或大小排阻层析来纯化所述糖缀合物。

[0437] 在一个实施方案中,所述糖缀合物经无菌过滤。

[0438] 在一些实施方案中,本发明的血清型11A糖缀合物缀合至载体蛋白(例如,CRM₁₉₇),并且包含具有10Kda至2,000Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50Kda至2,000Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50Kda至1,750Kda;50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;50Kda至400Kda;50Kda至300Kda;50Kda至200Kda;50Kda至100Kda;100Kda至2,000Kda;100Kda至1,750Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;100Kda至400Kda;100Kda至300Kda;100Kda至200Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,750Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda;200Kda至400Kda或200Kda至300Kda。

[0439] 在一些实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物具有50Kda至20,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型11A糖缀合物具有50Kda至15,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型11A糖缀合物具有500Kda至10,000Kda的分子量。在其它的实施方案中,血清型11A糖缀合物具有200Kda至10,000Kda的分子量。在其它的实施方案中,血清型11A糖缀合物具有1,000Kda至8,000Kda或2,000Kda至8,000Kda的分子量。

[0440] 在另外的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物具有如下的分子量:200Kda至20,000Kda;200Kda至17,500Kda;200Kda至15,000Kda;200Kda至10,000Kda;200Kda至7,500Kda;200Kda至5,000Kda;200Kda至3,000Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,000Kda;500Kda至20,000Kda;500Kda至17,500Kda;500Kda至15,000Kda;500Kda至12,500Kda;500Kda至10,000Kda;500Kda至7,500Kda;500Kda至6,000Kda;500Kda至5,000Kda;500Kda至4,000Kda;500Kda至3,000Kda;500Kda至2,000Kda;500Kda至1,500Kda;500Kda至1,000Kda;700Kda至20,000Kda;700Kda至17,500Kda;700Kda至15,000Kda;700Kda至12,500Kda;700Kda至10,000Kda;700Kda至7,500Kda;700Kda至6,000Kda;700Kda至5,000Kda;700Kda至4,500Kda;700Kda至4,000Kda;700Kda至3,500Kda;700Kda至3,000Kda;700Kda至2,000Kda;700Kda至1,500Kda;1,000Kda至20,000Kda;1,000Kda至17,500Kda;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至12,500Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,000Kda至6,000Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至2,500Kda;2,000Kda至20,000Kda;2,000Kda至17,500Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;或者2,000Kda至3,000Kda。

[0441] 在另外的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物具有如下的分子量:3,000Kda至

20,000Kda;3,000Kda至17,500Kda;3,000Kda至15,000Kda;3,000Kda至10,000Kda;3,000Kda至7,500Kda;3,000Kda至5,000Kda;4,000Kda至20,000Kda;4,000Kda至17,500Kda;4,000Kda至15,000Kda;4,000Kda至12,500Kda;4,000Kda至10,000Kda;4,000Kda至7,500Kda;4,000Kda至6,000Kda;或者4,000Kda至5,000Kda。在另外的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物具有如下的分子量:5,000Kda至20,000Kda;5,000Kda至17,500Kda;5,000Kda至15,000Kda;5,000Kda至10,000Kda或5,000Kda至7,500Kda。

[0442] 在一实施方案中,所述血清型11A糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0443] 在优选的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.3、0.5、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、3.4、3.8、4.2、4.6或5mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少1.8、2.2或2.6mM的乙酸酯/盐。在一实施方案中,所述糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐。在优选的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、3.4、3.8、4.2或4.6mM的乙酸酯/盐以及低于大约5mM的乙酸酯/盐。在一实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、或3.0mM的乙酸酯/盐以及低于大约3.4mM的乙酸酯/盐。在一实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、或3.0mM的乙酸酯/盐以及低于大约3.3mM的乙酸酯/盐。任何上述数字都视为本公开的实施方案。

[0444] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述分离的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。在优选的实施方案中,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0445] 在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.7。在优选的实施方案中,糖缀合物中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数与所述活化的多糖中每mM血清型11A荚膜多糖的乙酸酯/盐mM数之间的比例为至少0.9。在优选的实施方案中,通过离子HPLC分析确定O-乙酰基基团的存在。

[0446] 在优选的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0mM的甘油。在优选的实施方案中,血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.2、0.3、或0.4mM的甘油。在优选的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9mM的甘油以及低于大约1.0mM的甘油。在优选的实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物其每mM的血清型11A多糖包含至少0.3、0.4、0.5、0.6、或0.7mM的甘油以及低于大约0.8mM的甘油。任何上述数字都视为本公开的实施方案。

[0447] 对本发明血清型11A糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。

[0448] 载体蛋白赖氨酸修饰(由于与多糖的共价键)的证据,可以通过使用本领域技术人员已知的常规方法进行的氨基酸分析来获得。缀合导致回收的赖氨酸残基的数目与用于产生缀合物材料的CRM₁₉₇蛋白起始材料相比降低。

[0449] 在优选的实施方案中,本发明的血清型11A的糖缀合物的缀合度为1至15、1至13、1至10、1至8、1至6、1至5、1至4、2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中,本发明的血清型11A的糖缀合物的缀合度为大约1、大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14或大约15。在优选的实施方案中,本发明的血清型11A的糖缀合物的缀合度为1至6或2至5。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0450] 本发明血清型11A糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在一些实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.2至4(例如,大约0.2、大约0.3、大约0.4、大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9、大约3.0、大约3.1、大约3.2、大约3.3、大约3.4、大约3.5、大约3.6、大约3.7、大约3.8、大约3.9或大约4.0)。在其它实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.7至2.5、0.8至2.0、0.7至2.0、0.8至1.5、0.7至1.5、0.7至1.4、0.8至1.4、0.7至1.45、或0.8至1.45。在另外的实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.8至1.6(例如,大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5或大约1.6)。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一实施方案中,所述血清型11A糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0451] 本发明的血清型11A糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0452] 在一些实施方案中,本发明血清型11A糖缀合物包含相较于血清型11A荚膜多糖的总量低于大约50%的游离血清型11A荚膜多糖、低于大约45%的游离糖、低于大约40%的游离糖、低于大约35%的游离糖、低于大约30%的游离糖、低于大约25%的游离糖、低于大约20%的游离糖、低于大约15%的游离糖、低于大约10%的游离糖、或低于大约5%的游离血清型11A荚膜多糖。优选地,血清型11A的糖缀合物包含低于15%的游离糖、更优选低于10%的游离糖、以及更优选低于5%的游离糖。

[0453] 血清型11A糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子量大小分布,如上文所述。

[0454] 在优选的实施方案中,至少30%的本发明血清型11A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的本发明血清型11A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%的本发明血清型11A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少65%的本发明血清型11A糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0455] 1.3.8来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物

[0456] 在一实施方案中,血清型8糖缀合物是通过用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯而获得的。该活化的多糖可直接或者经间隔物(接头)基团偶联至载体蛋白上的氨基基团。例如,所述间隔物可以是脲胺或半脲胺以给出硫醇化的多糖,其可以经硫醚键而偶联至载体,所述硫醚键是通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白反应后获得的(例如使用GMBS)或者与卤代乙酰化的载体蛋白反应后获得的(例如使用碘乙酰亚胺、SIB、SIAB、sulfo-SIAB、SIA或者SBAP)。优选地,所述氰酸酯(任选由CDAP化学制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联并且氨基衍生的糖用碳化二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学经蛋白载体上的羧基而缀合至载体蛋白。此类缀合物在例如WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中有描述。

[0457] 其它适宜技术使用碳化二亚胺、酰肼、活性酯、降苄烷、对硝基苯甲酸、N-羟基丁二酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多在国际专利申请公开号WO 98/42721中有描述。缀合中可涉及羰基接头,其可通过糖的自由羟基与CDI反应而形成(参见Bethell等人(1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574;Hearn等人(1981) J. Chromatogr. 218:509-518)随后是与蛋白反应形成氨基甲酸酯键。这可以涉及将异头端还原成伯羟基、任选的对伯羟基的保护/去保护、伯羟基与CDI反应形成氨基甲酸酯中间体、以及CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白上的氨基基团偶联。

[0458] 在优选的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物是使用还原胺化来制备的。还原胺化涉及两个步骤:(1)多糖的氧化以从个体六糖单元中的邻位二醇产生醛的功能性,(2)所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物。

[0459] 在氧化之前,所述血清型8多糖任选是经水解的以降低其粘性。可以使用机械或化学水解。可以用乙酸来进行化学水解。

[0460] 氧化步骤可涉及与高碘酸盐反应。对于本发明的目的,术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸;该术语也包括偏高碘酸盐(IO_4^-)和正高碘酸盐(IO_6^{5-})以及各种高碘酸的盐(例如,高碘酸钠和高碘酸钾)。在一实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型8的荚膜多糖在偏高碘酸盐的存在下被氧化,优选是在高碘酸钠(NaIO_4)的存在下。在另一实施方案中,所述来自血清型8的荚膜多糖在正高碘酸盐的存在下被氧化,优选是在高碘酸的存在下。

[0461] 在多糖的氧化步骤之后,该多糖被认为是活化的且在下文被称作“活化的多糖”。所述活化的多糖可以是纯化的以及经冻干(冷冻干燥)的。

[0462] 所述活化的多糖和所述载体蛋白可以是经过单独(分离冻干)或一起(共冻干)冻干(冷冻干燥)的。在一个实施方案中所述活化的多糖和所述载体蛋白是经过共冻干的。在另一实施方案中,所述活化的多糖和所述载体蛋白是独立冻干的。

[0463] 在一个实施方案中,所述冻干是在非还原性糖的存在下发生的,可能的非还原糖包括蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露醇、乳糖醇和异麦芽糖醇。

[0464] 缀合方法的第二个步骤是所述活化的多糖与载体蛋白的还原以形成缀合物(还原胺化),其中使用还原剂。适宜的还原剂包括氰基硼氢化物,如氰基硼氢化钠、硼烷吡啶、或硼氢化物交换树脂。在一个实施方案中,所述还原剂是氰基硼氢化钠。

[0465] 在一实施方案中,在水溶剂中进行还原反应,在另一实施方案中,在非质子溶剂中进行所述反应。在一实施方案中,在DMSO(二甲基亚砷)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行所

述还原反应。所述DMSO或DMF溶剂可用于将冻干的所述活化的多糖和载体蛋白复原。

[0466] 在一个实施方案中,还原反应中使用了0.1至3.0、0.15至2.0、0.2至1.0、或0.25至0.5摩尔当量的氰基硼氢化钠。在一个实施方案中,还原反应中使用了大约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.9、或3.0摩尔当量的氰基硼氢化钠。

[0467] 在一个实施方案中,所述还原剂是三乙酰氧基硼氢化钠。在另一实施方案中,还原反应中使用了1.0至6.0摩尔当量的三乙酰氧基硼氢化钠、2.0至5.0摩尔当量的三乙酰氧基硼氢化钠或大约3.0摩尔当量的三乙酰氧基硼氢化钠。

[0468] 在还原反应结束时,缀合物中可能留有未反应的醛基,可以用适宜的封端剂来将这些封端。在一个实施方案中,此封端剂是硼氢化钠(NaBH_4)。在一实施方案中,通过将还原反应与0.5至5.0摩尔当量的 NaBH_4 混合而实现封端,例如大约1.0、1.5、2.0、2.5或3.0摩尔当量的 NaBH_4 。

[0469] 在缀合(还原以及任选的封端)之后,可将糖缀合物纯化。糖缀合物可以通过渗滤和/或离子交换层析和/或大小排阻层析来进行纯化。在一实施方案中,通过渗滤或离子交换层析或大小排阻层析来纯化所述糖缀合物。

[0470] 在一个实施方案中,所述糖缀合物经无菌过滤。

[0471] 在一些实施方案中,本发明的血清型8糖缀合物缀合至载体蛋白(例如, CRM_{197}),并且包含具有10Kda至2,000Kda的分子量的糖。在其它此类实施方案中所述糖具有50Kda至2,000Kda的分子量。在另外的此类实施方案中所述糖具有如下的分子量:50Kda至1,750Kda;50Kda至1,500Kda;50Kda至1,250Kda;50Kda至1,000Kda;50Kda至750Kda;50Kda至500Kda;100Kda至2,000Kda;100Kda至1,750Kda;100Kda至1,500Kda;100Kda至1,250Kda;100Kda至1,000Kda;100Kda至750Kda;100Kda至500Kda;200Kda至2,000Kda;200Kda至1,750Kda;200Kda至1,500Kda;200Kda至1,250Kda;200Kda至1,000Kda;200Kda至750Kda;或者200Kda至500Kda;或者200Kda至400Kda。在一实施方案中,所述血清型8糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0472] 在一些实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有50Kda至20,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型8糖缀合物具有50Kda至15,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型8糖缀合物具有500Kda至10,000Kda的分子量。在其它实施方案中,血清型8糖缀合物具有200Kda至10,000Kda的分子量。在其它的实施方案中,所述血清型8糖缀合物具有1,000Kda至8,000Kda或2,000Kda至8,000Kda的分子量。

[0473] 在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:200Kda至20,000Kda;200Kda至15,000Kda;200Kda至10,000Kda;200Kda至7,500Kda;200Kda至5,000Kda;200Kda至3,000Kda;200Kda至1,000Kda;500Kda至20,000Kda;500Kda至15,000Kda;500Kda至12,500Kda;500Kda至10,000Kda;500Kda至7,500Kda;500Kda至6,000Kda;500Kda至5,000Kda;500Kda至4,000Kda;500Kda至3,000Kda;500Kda至2,000Kda;500Kda至1,500Kda;500Kda至1,000Kda;750Kda至20,000Kda;750Kda至15,000Kda;750Kda至12,500Kda;750Kda至10,000Kda;750Kda至7,500Kda;750Kda至6,000Kda;750Kda至5,000Kda;750Kda至4,000Kda;750Kda至3,000Kda;750Kda至2,000Kda;750Kda至1,500Kda;1,000Kda至15,000Kda;1,000Kda至12,500Kda;1,000Kda至10,000Kda;1,000Kda至7,500Kda;1,

000Kda至6,000Kda;1,000Kda至5,000Kda;1,000Kda至4,000Kda;1,000Kda至2,500Kda;2,000Kda至15,000Kda;2,000Kda至12,500Kda;2,000Kda至10,000Kda;2,000Kda至7,500Kda;2,000Kda至6,000Kda;2,000Kda至5,000Kda;2,000Kda至4,000Kda;或者2,000Kda至3,000Kda。

[0474] 在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:3,000Kda至20,000Kda;3,000Kda至15,000Kda;3,000Kda至10,000Kda;3,000Kda至7,500Kda;3,000Kda至5,000Kda;4,000Kda至20,000Kda;4,000Kda至15,000Kda;4,000Kda至12,500Kda;4,000Kda至10,000Kda;4,000Kda至7,500Kda;4,000Kda至6,000Kda;或者4,000Kda至5,000Kda。在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:5,000Kda至20,000Kda;5,000Kda至15,000Kda;5,000Kda至10,000Kda或5,000Kda至7,500Kda。在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:6,000Kda至20,000Kda;6,000Kda至15,000Kda;6,000Kda至10,000Kda或6,000Kda至7,500Kda。

[0475] 在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:7,000Kda至20,000Kda;7,000Kda至15,000Kda;7,000Kda至10,000Kda或7,000Kda至8,000Kda。在另外的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物具有如下的分子量:8,000Kda至20,000Kda;8,000Kda至15,000Kda;或者8,000Kda至10,000Kda。

[0476] 在一实施方案中,所述血清型8糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0477] 对本发明的血清型8的糖缀合物进行表征的另一个方式是,通过载体蛋白(例如CRM₁₉₇)中与糖缀合的赖氨酸残基的数目,其可以表征为缀合赖氨酸残基的范围(缀合度)。

[0478] 载体蛋白赖氨酸修饰(由于与多糖的共价键)的证据,可以通过使用本领域技术人员已知的常规方法进行的氨基酸分析来获得。在常见的实施方案中,所述载体蛋白通过载体蛋白上赖氨酸残基的一或多个ε-氨基基团的酰胺键而共价缀合至活的多糖。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白包含2至20个共价缀合至糖的赖氨酸残基。在其它此类实施方案中,所述载体蛋白包含4至16个或6-14个共价缀合至糖的赖氨酸残基。

[0479] 在优选的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物的缀合度为2至20、2至15、2至13、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、3至15、3至13、3至10、3至8、3至6、3至5、3至4、5至15、5至10、8至15、8至12、10至15、或者10至12。在一实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物的缀合度为大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11、大约12、大约13、大约14或大约15。在优选的实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物的缀合度为4至16或6至14。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0480] 在优选的实施方案中,所述载体蛋白包含CRM₁₉₇,其含有39个赖氨酸残基。在一些此类实施方案中,所述CRM₁₉₇可包含39个共价连接至糖的赖氨酸残基中的4至16或6至14个赖氨酸残基。表述此参数的另一方式是,大约10%至大约41%、或大约15%至大约36%的CRM₁₉₇赖氨酸共价连接至糖。在另一个此种实施方案中,所述CRM₁₉₇可包含39个共价连接至糖的赖氨酸残基中的2至20个赖氨酸残基。表述此参数的另一方式是,大约5%至大约50%的CRM₁₉₇赖氨酸共价连接至糖。在一些此类实施方案中,所述CRM₁₉₇可包含39个共价连接至糖的赖氨酸残基中的大约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、或16个赖氨酸残基。

[0481] 本发明的血清型8的糖缀合物还可以通过糖对载体蛋白的比例(重量/重量)来进行表征。在一些实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.2至4.0(例如,大约0.2、大约

0.3、大约0.4、大约0.5、大约0.6、大约0.7、大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4、大约1.5、大约1.6、大约1.7、大约1.8、大约1.9、大约2.0、大约2.1、大约2.2、大约2.3、大约2.4、大约2.5、大约2.6、大约2.7、大约2.8、大约2.9、大约3.0、大约3.1、大约3.2、大约3.3、大约3.4、大约3.5、大约3.6、大约3.7、大约3.8、大约3.9或大约4.0)。在其它实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.7至2.5。在另外的实施方案中,糖对载体蛋白的比例(w/w)为0.8至1.5(例如,大约0.8、大约0.9、大约1.0、大约1.1、大约1.2、大约1.3、大约1.4或大约1.5)。在一些此类实施方案中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。在一实施方案中,所述血清型8糖缀合物是使用还原胺化来制备的。

[0482] 本发明的血清型8糖缀合物和免疫原性组合物可含有未共价缀合至载体蛋白但却存在于糖缀合物组合物中的游离糖。该游离糖可非共价地与糖缀合物相关联(也即非共价地结合至、吸附至、或包埋至糖缀合物)。

[0483] 在一些实施方案中,本发明的血清型8的糖缀合物相对于血清型8糖的总量,包含低于大约50%的游离糖、低于大约45%的游离糖、低于大约40%的游离糖、低于大约35%的游离糖、低于大约30%的游离糖、低于大约25%的游离糖、低于大约20%的游离糖、低于大约15%的游离糖、低于大约10%的游离糖、或低于大约5%的游离糖。优选地,血清型8糖缀合物包含低于15%的游离糖、更优选低于10%的游离糖、以及更优选低于5%的游离糖。

[0484] 所述血清型8糖缀合物也可以通过其分子大小分布(K_d)来进行表征。大小排阻层析介质(CL-4B)可用于确定缀合物的相对分子量大小分布。在重力自流进料柱中使用大小排阻层析(SEC)来描述缀合物的分子大小分布。大分子从介质洗脱物中的孔排出比小分子要快速得多。级分收集器被用于手机柱洗脱物。通过糖测定法对级分进行比色分析测试。为了确定 K_d ,将柱进行校准以建立分子完全排出的级分(V_0), ($K_d=0$), 以及代表最大滞留的级分(V_i), ($K_d=1$)。达到指定样品属性的级分(V_e)通过表达式 $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ 而与 K_d 相关。

[0485] 在优选的实施方案中,至少40%的本发明的血清型8的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、或85%的本发明的血清型8的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少60%的本发明的血清型8的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,至少70%的本发明的血清型8的糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0486] 在优选的实施方案中,40%至90%的血清型8糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,50%至90%的血清型8糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。在优选的实施方案中,65%至80%的血清型8糖缀合物在CL-4B柱中具有低于或等于0.3的 K_d 。

[0487] 1.4本发明糖缀合物的组合

[0488] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含本文公开的任意糖缀合物。

[0489] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种选自以下组的糖缀合物:来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)、来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物(如上文1.3.2节的糖缀合物)、来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物(如上文1.3.3节的糖缀合物)、来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物(如上文1.3.5节的

糖缀合物)、来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物(如上文1.3.6节的糖缀合物)、来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物(如上文1.3.7节的糖缀合物)、和来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物(如上文1.3.8节的糖缀合物)。

[0490] 在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物,如上文1.3.4节的糖缀合物。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物,如上文1.3.2节中所公开的那些。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物,如上文1.3.3节所公开的那些。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物,如上文1.3.5节所公开的那些。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物,如上文1.3.6节所公开的那些。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物,如上文1.3.7节所公开的那些。在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物,如上文1.3.8节所公开的那些。

[0491] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个选自以下组的两种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:15B和22F、15B和33F、15B和12F、15B和10A、15B和11A、15B和8、22F和33F、22F和12F、22F和10A、22F和11A、22F和8、33F和12F、33F和10A、33F和11A、33F和8、12F和10A、12F和11A、12F和8、10A和11A、10A和8,和11A和8。

[0492] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个以下的三种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:

[0493] 15B和22F和33F、

[0494] 15B和22F和12F、

[0495] 15B和22F和10A、

[0496] 15B和22F和11A、

[0497] 15B和22F和8、

[0498] 15B和33F和12F、

[0499] 15B和33F和10A、

[0500] 15B和33F和11A、

[0501] 15B和33F和8、

[0502] 15B和12F和10A、

[0503] 15B和12F和11A、

[0504] 15B和12F和8、

[0505] 15B和10A和11A、

[0506] 15B和10A和8、

[0507] 15B和11A和8、

[0508] 22F和33F和12F、

[0509] 22F和33F和10A、

[0510] 22F和33F和11A、

[0511] 22F和33F和8、

[0512] 22F和12F和10A、

- [0513] 22F和12F和11A、
- [0514] 22F和12F和8、
- [0515] 22F和10A和11A、
- [0516] 22F和10A和8、
- [0517] 22F和11A和8、
- [0518] 33F和12F和10A、
- [0519] 33F和12F和11A、
- [0520] 33F和12F和8、
- [0521] 33F和10A和11A、
- [0522] 33F和10A和8、
- [0523] 33F和11A和8、
- [0524] 12F和10A和11A、
- [0525] 12F和10A和8、
- [0526] 12F和11A和8或
- [0527] 10A和11A和8。
- [0528] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个以下的四种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:
- [0529] 15B和22F和33F和12F、
- [0530] 15B和22F和33F和10A、
- [0531] 15B和22F和33F和11A、
- [0532] 15B和22F和33F和8、
- [0533] 15B和22F和12F和10A、
- [0534] 15B和22F和12F和11A、
- [0535] 15B和22F和12F和8、
- [0536] 15B和22F和10A和11A、
- [0537] 15B和22F和10A和8、
- [0538] 15B和22F和11A和8、
- [0539] 15B和33F和12F和10A、
- [0540] 15B和33F和12F和11A、
- [0541] 15B和33F和12F和8、
- [0542] 15B和33F和10A和11A、
- [0543] 15B和33F和10A和8、
- [0544] 15B和33F和11A和8、
- [0545] 15B和12F和10A和11A、
- [0546] 15B和12F和10A和8、
- [0547] 15B和12F和11A和8、
- [0548] 15B和10A和11A和8、
- [0549] 22F和33F和12F和10A、
- [0550] 22F和33F和12F和11A、

- [0551] 22F和33F和12F和8、
- [0552] 22F和33F和10A和11A、
- [0553] 22F和33F和10A和8、
- [0554] 22F和33F和11A和8、
- [0555] 22F和12F和10A和11A、
- [0556] 22F和12F和10A和8、
- [0557] 22F和12F和11A和8、
- [0558] 22F和10A和11A和8、
- [0559] 33F和12F和10A和11A、
- [0560] 33F和12F和10A和8、
- [0561] 33F和12F和11A和8、
- [0562] 33F和10A和11A和8或
- [0563] 12F和10A和11A和8。
- [0564] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个以下的五种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:
- [0565] 15B和22F和33F和12F和10A、
- [0566] 15B和22F和33F和12F和11A、
- [0567] 15B和22F和33F和12F和8、
- [0568] 15B和22F和33F和10A和11A、
- [0569] 15B和22F和33F和10A和8、
- [0570] 15B和22F和33F和11A和8、
- [0571] 15B和22F和12F和10A和11A、
- [0572] 15B和22F和12F和10A和8、
- [0573] 15B和22F和12F和11A和8、
- [0574] 15B和22F和10A和11A和8、
- [0575] 15B和33F和12F和10A和11A、
- [0576] 15B和33F和12F和10A和8、
- [0577] 15B和33F和12F和11A和8、
- [0578] 15B和33F和10A和11A和8、
- [0579] 15B和12F和10A和11A和8、
- [0580] 22F和33F和12F和10A和11A、
- [0581] 22F和33F和12F和10A和8、
- [0582] 22F和33F和12F和11A和8、
- [0583] 22F和33F和10A和11A和8、
- [0584] 22F和12F和10A和11A和8或
- [0585] 33F和12F和10A和11A和8。
- [0586] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个以下的六种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:
- [0587] 15B和22F和33F和12F和10A和11A、

- [0588] 15B和22F和33F和12F和10A和8、
- [0589] 15B和22F和33F和12F和11A和8、
- [0590] 15B和22F和33F和10A和11A和8、
- [0591] 15B和22F和12F和10A和11A和8、
- [0592] 15B和33F和12F和10A和11A和8或
- [0593] 22F和33F和12F和10A和11A和8。
- [0594] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含每个以下的七种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:15B和22F和33F和12F和10A和11A和8。
- [0595] 在一实施方案中,本节所定义的任何免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型15B、22F、33F、12F、10A、11A和/或8的糖缀合物,都如上文1.3.2至1.3.8节所公开的。
- [0596] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物另外还包含来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F、和23F的糖缀合物(如上文1.3.1节的糖缀合物)。
- [0597] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物另外还包含来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物(如上文1.3.1节的糖缀合物)。
- [0598] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物另外还包含来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物(如上文1.3.1节的糖缀合物)。
- [0599] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物另外还包含来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物(如上文1.3.1节的糖缀合物)。
- [0600] 优选地,上述免疫原性组合物的所有糖缀合物都独立地缀合至载体蛋白。
- [0601] 在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F、和23F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。
- [0602] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的所有糖缀合物都独立地缀合至CRM₁₉₇。
- [0603] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物都独立地缀合至PD。
- [0604] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT。
- [0605] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀

合物缀合至DT。

[0606] 在一实施方案中,任意上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD,来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT,以及来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。

[0607] 在一实施方案中,上述免疫原性组合物包含8至20种不同的肺炎链球菌血清型。在一个实施方案中,上述免疫原性组合物包含来自12、13、14、15、16、17、18、19或20种不同血清型的糖缀合物。在一个实施方案中,上述免疫原性组合物包含来自16或20种不同血清型的糖缀合物。

[0608] 在一实施方案中,上述免疫原性组合物是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是14、15、16、17、18、或19-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是16-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是19-价肺炎球菌缀合物的组合物。

[0609] 1. 在一实施方案中本发明的免疫原性组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物,如上文1.3.4节中所公开糖缀合物。

[0610] 2. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物,如上文1.3.2节中所公开的那些。

[0611] 3. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1或2点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物,如上文1.3.3节中所公开的那些。

[0612] 4. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2或3点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物,如上文1.3.5节中所公开的那些。

[0613] 5. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3或4点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物,如上文1.3.6节中所公开的那些。

[0614] 6. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4或5点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物,如上文1.3.7节中所公开的那些。

[0615] 7. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4、5或6点之外,还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物,如上文1.3.8节中所公开的那些。

[0616] 8. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4、5、6或7点之外,还包含来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F和23F的糖缀合物,如上文1.3.1节的糖缀合物。

[0617] 9. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4、5、6、7或8点之外,还包含来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物,如上文1.3.1节的糖缀合物。

[0618] 10. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4、5、6、7、8或9点之外,还包含来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物,如上文1.3.1节的糖缀合物。

[0619] 11. 在另一实施方案中,本发明的免疫原性组合物在上述的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10点之外,还包含来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物,如上文1.3.1节的糖缀合物。

[0620] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。

[0621] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自肺炎链球菌血清型1、4、5、

6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。

[0622] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的缀合肺炎链球菌糖。

[0623] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自血清型1、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的缀合肺炎链球菌糖。

[0624] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物的糖缀合物由以下组成:来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物的糖缀合物由以下组成:来自血清型1、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物的糖缀合物由以下组成:来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物的糖缀合物由以下组成:来自1、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物。

[0625] 优选地,本发明的免疫原性组合物的所有糖缀合物(例如上述1-11的任何一点)都独立地缀合至载体蛋白。

[0626] 在一实施方案中,上述8-11任何点的来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD。

[0627] 在一实施方案中,上述8-11任何点的来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT。

[0628] 在一实施方案中,上述8-11任何点的来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。

[0629] 在上述8-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD,来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT以及来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。

[0630] 在上述1-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型22F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述2-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型33F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述3-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述4-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型12F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述5-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型10A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述6-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型11A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述7-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型8的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述8-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19F、和23F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述9-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述10-11任何点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在上述第11点的实施方案中,来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。

[0631] 在一实施方案中,上述1-11点的免疫原性组合物的糖缀合物独立地缀合至CRM₁₉₇。

[0632] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含12-20种不同的肺炎链球菌血清型。在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自12、13、14、15、16、17、18、19、或

20种不同血清型的糖缀合物。在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含来自16或20种不同血清型的糖缀合物。

[0633] 在一实施方案中,上述1至11点的所述免疫原性组合物是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述1至11点的所述免疫原性组合物是15、16、17、18、或19-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述1至11点的所述免疫原性组合物是16-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述1至11点的所述免疫原性组合物是19-价肺炎球菌缀合物的组合物。

[0634] 在荚膜多糖缀合至载体蛋白之后,通过各种技术将糖缀合物纯化(对多糖-蛋白缀合物的量进行富集)。这些技术包括浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱、柱层析、和深度过滤(参见例如美国专利申请公开号2007/0184072或W02008/079653)。在个体糖缀合物被纯化以后,将它们混合以配制本发明的免疫原性组合物。

[0635] 1.5本发明糖缀合物的另外的组合

[0636] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型9V的糖缀合物。

[0637] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个选自以下组的两种肺炎链球菌血清型中的至少一种糖缀合物:9V和4、9V和6B、9V和14、9V和18C、9V和19F、9V和23F。

[0638] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的七种肺炎链球菌血清型中的至少一种糖缀合物:9V、4、6B、14、18C、19F和23F。

[0639] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的八种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:

[0640] 9V和1和4和6B和14和18C和19F和23F、

[0641] 9V和4和5和6B和14和18C和19F和23F、或者

[0642] 9V和4和6B和7F和14和18C和19F和23F。

[0643] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的十种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:9V、1、5、4、6B、7F、14、18C、19F和23F。

[0644] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的十一种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:

[0645] 9V和1和4和5和6A和6B和7F和14和18C和19F和23F或者

[0646] 9V和1和4和5和6B和7F和14和18C和19A和19F和23F。

[0647] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的十二种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:9V、1、4、5、6A、6B、7F、14、18C、19A、19F、和23F。

[0648] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,包含每个以下的十三种肺炎链球菌血清型的至少一种糖缀合物:9V、1、3、4、5、6A、6B、7F、14、18C、19A、19F、和23F。

[0649] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,另外还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型2的糖缀合物。

[0650] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,另外还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型17F的糖缀合物。

[0651] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,另外还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型20的糖缀合物。

[0652] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,另外还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15C的糖缀合物。

[0653] 在上述1.4节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,另外还包含至少一种来自肺炎链球菌血清型9N的糖缀合物。

[0654] 优选地,上述免疫原性组合物的所有糖缀合物都独立地缀合至载体蛋白。

[0655] 在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型9V的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型4、6B、14、18C、19F、和23F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型1、5、和7F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型6A和19A的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型3的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型2的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型17F的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型20的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型15C的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。在任何上述免疫原性组合物的实施方案中,所述来自肺炎链球菌血清型9N的糖缀合物缀合至CRM₁₉₇。

[0656] 在一实施方案中,上述免疫原性组合物的糖缀合物全都是独立地缀合至CRM₁₉₇。

[0657] 在另一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型9V的糖缀合物独立地缀合至PD。

[0658] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD。

[0659] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT。

[0660] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。

[0661] 在一实施方案中,任何上述免疫原性组合物的来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6B、7F、9V、14和/或23F的糖缀合物独立地缀合至PD,来自肺炎链球菌血清型18C的糖缀合物缀合至TT以及来自肺炎链球菌血清型19F的糖缀合物缀合至DT。

[0662] 在一实施方案中,上述免疫原性组合物包含7至25中不同的肺炎链球菌血清型。在一个实施方案中,上述免疫原性组合物包含来自7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25种不同血清型的糖缀合物。在一个实施方案中,上述免疫原性组合物包含来自16或20种不同血清型的糖缀合物。

[0663] 在一实施方案中,上述免疫原性组合物是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是14、15、16、17、18、或19-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是16-价肺炎球菌缀合物的组合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是19-价肺炎球菌缀合物的组

合物。在一实施方案中,上述免疫原性组合物是20-价肺炎球菌缀合物的组合物。

[0664] 在荚膜多糖缀合至载体蛋白之后,通过各种技术将糖缀合物纯化(对多糖-蛋白缀合物的量进行富集)。这些技术包括浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱、柱层析、和深度过滤(参见例如美国专利申请公开号2007/0184072或W02008/079653。在个体糖缀合物被纯化以后,将它们混合以配制本发明的免疫原性组合物。

[0665] 1.6本发明糖缀合物的特定组合

[0666] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9N的荚膜糖。

[0667] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9A的荚膜糖。

[0668] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9L的荚膜糖。

[0669] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9N和9A的荚膜糖。

[0670] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9N和9L的荚膜糖。

[0671] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9A和9L的荚膜糖。

[0672] 在上述1.4或1.5节中定义的任何免疫原性组合物的实施方案中,不包含来自肺炎链球菌血清型9N、9A和9L的荚膜糖。

[0673] 2.免疫原性组合物的剂量

[0674] 每个剂量中糖缀合物的量选择为这样的量,其在典型的疫苗接种者中诱导免疫保护应答而没有显著的不良副作用。此量将会根据所使用的是哪种具体免疫原以及其如何呈现而产生改变。

[0675] 2.1糖缀合物的量

[0676] 免疫原性组合物中特定糖缀合物的量可基于该缀合物(缀合的和未缀合的)的总多糖而进行计算。例如,具有20%游离多糖的糖缀合物在100 μ g的多糖剂量中,将具有大约80 μ g的缀合多糖和大约20 μ g的未缀合多糖。糖缀合物的量可根据肺炎球菌血清型而改变。糖的浓度可通过糖醛酸测定来确定。

[0677] 免疫原性组合物中不同多糖成分的“免疫原性量”可以有偏差,且各自可包含大约1 μ g、大约2 μ g、大约3 μ g、大约4 μ g、大约5 μ g、大约6 μ g、大约7 μ g、大约8 μ g、大约9 μ g、大约10 μ g、大约15 μ g、大约20 μ g、大约30 μ g、大约40 μ g、大约50 μ g、大约60 μ g、大约70 μ g、大约80 μ g、大约90 μ g、或大约100 μ g的任何特定多糖抗原。

[0678] 一般而言,每个剂量对于给定的血清型将包含0.1 μ g至100 μ g的多糖、特别是0.5 μ g至20 μ g、更特别是1.0 μ g至10 μ g、以及更特别是2.0 μ g至5.0 μ g。任意上述范围内的任何整数都被认为是本公开的实施方案。

[0679] 在一实施方案中,每剂量对于每种特定糖缀合物包含大约1.0 μ g、大约1.2 μ g、大约1.4 μ g、大约1.6 μ g、大约1.8 μ g、大约2.0 μ g、大约2.2 μ g、大约2.4 μ g、大约2.6 μ g、大约2.8 μ g、大约3.0 μ g、大约3.2 μ g、大约3.4 μ g、大约3.6 μ g、大约3.8 μ g、大约4.0 μ g、大约4.2 μ g、大约4.4

μg、大约4.6μg、大约4.8μg、大约5.0μg、大约5.2μg、大约5.4μg、大约5.6μg、大约5.8μg、或大约6.0μg的多糖。

[0680] 在一实施方案中,对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和/或33F的糖缀合物,每剂量包含大约1.1μg、大约1.2μg、大约1.3μg、大约1.4μg、大约1.5μg、大约1.6μg、大约1.7μg、大约1.8μg、大约1.9μg、大约2.0μg、大约2.1μg、大约2.2μg、大约2.3μg、大约2.4μg、大约2.5μg、大约2.6μg、大约2.7μg、大约2.8μg、大约2.9μg、或大约3.0μg的多糖。

[0681] 在一实施方案中,对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和/或33F的糖缀合物,每剂量包含大约1.1μg、大约1.2μg、大约1.3μg、大约1.4μg、大约1.5μg、大约1.6μg、大约1.7μg、大约1.8μg、大约1.9μg、大约2.0μg、大约2.1μg、大约2.2μg、大约2.3μg、大约2.4μg、大约2.5μg、大约2.6μg、大约2.7μg、大约2.8μg、大约2.9μg、或大约3.0μg的多糖。

[0682] 在一实施方案中,对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物,每剂量包含大约2.0μg、大约2.2μg、大约2.4μg、大约2.6μg、大约2.8μg、大约3.0μg、大约3.2μg、大约3.4μg、大约3.6μg、大约3.8μg、大约4.0μg、大约4.2μg、大约4.4μg、大约4.6μg、大约4.8μg、大约5.0、大约5.2μg、大约5.4μg、大约5.6μg、大约5.8μg、或大约6.0μg的多糖。

[0683] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约1.5μg至大约3.0μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约3.0μg至大约6.0μg的多糖。

[0684] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.0μg至大约2.5μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.0μg至大约4.8μg的多糖。

[0685] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.2μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.4μg的多糖。

[0686] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约1.5μg至大约3.0μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约3μg至大约6μg的多糖。

[0687] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.0μg至大约2.5μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.0μg至大约4.8μg的多糖。

[0688] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.2μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.4μg的多糖。

[0689] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约1.5μg至大约3.0μg的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约3.0μg至大约6.0μg的多糖。

糖。

[0690] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.0 μ g至大约2.5 μ g的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.0 μ g至大约4.8 μ g的多糖。

[0691] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.2 μ g的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.4 μ g的多糖。

[0692] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约1.5 μ g至大约3.0 μ g的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约3.0 μ g至大约6.0 μ g的多糖。

[0693] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的每种糖缀合物包含大约2.0 μ g至大约2.5 μ g的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.0 μ g至大约4.8 μ g的多糖。

[0694] 在一实施方案中,每剂量对于来自肺炎链球菌血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物包含大约2.2 μ g的多糖,以及对于来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物包含大约4.4 μ g的多糖。

[0695] 2.2载体的量

[0696] 一般而言,每个剂量将包含10 μ g至150 μ g的载体蛋白、特别是15 μ g至100 μ g的载体蛋白、更特别是25 μ g至75 μ g的载体蛋白、以及更特别是40 μ g至60 μ g的载体蛋白。在一实施方案中,所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0697] 在一实施方案中,每剂量包含大约25 μ g、大约26 μ g、大约27 μ g、大约28 μ g、大约29 μ g、大约30 μ g、大约31 μ g、大约32 μ g、大约33 μ g、大约34 μ g、大约35 μ g、大约36 μ g、大约37 μ g、大约38 μ g、大约39 μ g、大约40 μ g、大约41 μ g、大约42 μ g、大约43 μ g、大约44 μ g、大约45 μ g、大约46 μ g、大约47 μ g、大约48 μ g、大约49 μ g、大约50 μ g、大约51 μ g、大约52 μ g、大约53 μ g、大约54 μ g、大约55 μ g、大约56 μ g、大约57 μ g、大约58 μ g、大约59 μ g、大约60 μ g、大约61 μ g、大约62 μ g、大约63 μ g、大约64 μ g、大约65 μ g、大约66 μ g、大约67 μ g、大约68 μ g、大约69 μ g、大约70 μ g、大约71 μ g、大约72 μ g、大约73 μ g、大约74 μ g、或大约75 μ g的载体蛋白。在一实施方案中,所述载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0698] 3. 另外的抗原

[0699] 本发明的免疫原性组合物包含缀合的肺炎链球菌糖抗原(糖缀合物)。它们还可以包括来自其它病原体的抗原,特别是来自细菌和/或病毒。优选的另外的抗原选自:白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)、百日咳抗原(P)其通常是非细胞的(Pa)、乙肝病毒(HBV)表面抗原(HBsAg)、甲肝病毒(HAV)抗原、缀合的流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) b型荚膜糖(Hib)、灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗(IPV)。

[0700] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含D-T-Pa。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含D-T-Pa-Hib, D-T-Pa-IPV or D-T-Pa-HBsAg。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含D-T-Pa-HBsAg-IPV or D-T-Pa-HBsAg-Hib。在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib。

[0701] 百日咳抗原:百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)引起百日咳。疫苗中的百日咳抗原是细胞的(完整细胞,灭活的百日咳杆菌细胞的形式)或非细胞的。细胞百日咳抗原的制备有很好的记载(例如,其可通过对百日咳杆菌的I期培养物进行热失活而获得)。然而,本发明优选使用非细胞抗原。当使用非细胞抗原时,优选使用一种、两种或(优选)三种以下的抗原:(1)经去毒的百日咳毒素(百日咳类毒素,或PT);(2)丝状血凝素(FHA);(3)百日咳杆菌粘附素(也已知为69千道尔顿的外膜蛋白)。FHA和百日咳杆菌粘附素在根据本发明使用之前可以用甲醛处理。PT优选通过用甲醛和/或戊二醛处理而经去毒。非细胞百日咳抗原优选被吸附至一或多种铝盐佐剂上。作为选择,它们可以未吸附的状态来添加。当添加百日咳杆菌粘附素时,其优选已经吸附至氢氧化铝佐剂上。PT和FHA可以被吸附至氢氧化铝或者磷酸铝佐剂上。最优选将PT、FHA和百日咳杆菌粘附素全都吸附至氢氧化铝。

[0702] 灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗:脊髓灰质炎病毒引起脊髓灰质炎。本发明优选的实施方案使用IPV,而不是用口服脊髓灰质炎病毒疫苗。在施用于患者之前,脊髓灰质炎病毒必须经过失活,而这可以通过用甲醛处理来实现。脊髓灰质炎可由三种类型的脊髓灰质炎病毒中的一种所引起。该三种类型是类似的并且引起相同的症状,但是它们在抗原上是不同的并且被一种类型感染并不会保护不受其它类型的感染。因此在本发明中优选使用三种脊髓灰质炎病毒抗原:1型脊髓灰质炎病毒(例如,Mahoney株)、2型脊髓灰质炎病毒(例如,MEF-1株)、和3型脊髓灰质炎病毒(例如,Saukett株)。该病毒优选经过单独培养、纯化、和灭活,继而再组合来提供大量的三价混合物用于本发明。

[0703] 白喉类毒素:白喉棒状杆菌引起白喉。白喉毒素可以经过处理(例如,使用福尔马林或甲醛),以去除毒性而又保留在注射后诱导特异性抗毒素抗体的能力。这些白喉类毒素用于白喉疫苗。优选的白喉类毒素是通过甲醛处理而制备的那些。可以通过使白喉棒状杆菌在生长培养基中生长,随后再用甲醛处理、超滤以及沉淀来获得白喉类毒素。经类毒素化的材料可以继而通过包括除菌过滤和/或透析的方法来进行处理。优选将白喉类毒素吸附至氢氧化铝佐剂上。

[0704] 破伤风类毒素:破伤风梭状芽孢杆菌(*Clostridium tetani*)引起破伤风。破伤风毒素可以经过处理以提供保护性的类毒素。该类毒素用于破伤风疫苗。优选的破伤风类毒素是通过甲醛处理而制备的那些。可以通过使破伤风梭状芽孢杆菌在生长培养基中生长,随后再通过甲醛处理、超滤和沉淀来获得破伤风类毒素。继而可以通过包括除菌过滤和/或透析的方法处理所述材料。

[0705] 甲肝病毒抗原:甲肝病毒(HAV)是引起病毒性肝炎的一种已知物质。优选的HAV组分是基于灭活的病毒,并且灭活可以通过福尔马林处理来实现。

[0706] 乙肝病毒(HBV)是引起病毒性肝炎的一种已知物质。衣壳的主要组分是已知为HBV表面抗原的蛋白(或者更常见为HBsAg),其通常是具有~24Kda的分子量的226-氨基酸的多肽。所存现存的乙肝疫苗都含有HBsAg,并且当此抗原被施用至正常疫苗接种者时,其刺激防止HBV感染的抗-HBsAg抗体的产生。

[0707] 对于疫苗制备,已经以两种方式制备了HBsAg:从慢性乙肝载体的血浆中纯化特定形式的抗原或者通过重组DNA方法表达蛋白(例如,在酵母细胞中重组表达)。与天然HBsAg(也即血浆纯化的产物)不同,酵母表达的HBsAg通常是非糖基化的,并且这是用于本发明的最优选的HBsAg形式。

[0708] 缀合的流感嗜血杆菌b型抗原:流感嗜血杆菌b型(Hib)引起细菌脑膜炎。Hib疫苗通常是基于荚膜糖抗原,其制备已有很好的文献记载。Hib糖可缀合至载体蛋白以便增强其免疫原性,特别是在儿童中。典型的载体蛋白有破伤风类毒素、白喉类毒素、CRM₁₉₇、流感嗜血杆菌蛋白D、以及来自血清组B脑膜炎球菌的外膜蛋白复合物。缀合物的糖部分可以包含全长磷酸多核糖基核糖醇(PRP,如从Hib细菌制备的)、和/或全长PRP的片段。Hib缀合物可以吸附至或不吸附至铝盐佐剂。

[0709] 在一实施方案中,本发明免疫原性组合物还包含缀合的脑膜炎双球菌血清组Y荚膜糖(MenY)、和/或缀合的脑膜炎双球菌血清组C荚膜糖(MenC)。

[0710] 在一实施方案中本发明免疫原性组合物还包含缀合的脑膜炎双球菌血清组A荚膜糖(MenA)、缀合的脑膜炎双球菌血清组W135荚膜糖(MenW135)、缀合的脑膜炎双球菌血清组Y荚膜糖(MenY)、和/或缀合的脑膜炎双球菌血清组C荚膜糖(MenC)。

[0711] 在一实施方案中本发明免疫原性组合物还包含缀合的脑膜炎双球菌血清组W135荚膜糖(MenW135)、缀合的脑膜炎双球菌血清组Y荚膜糖(MenY)、和/或缀合的脑膜炎双球菌血清组C荚膜糖(MenC)。

[0712] 4. 佐剂

[0713] 在一些实施方案中,本文公开的免疫原性组合物还可以包含至少一种、两种或三种佐剂。术语“佐剂”是指增强对抗原的免疫应答的化合物或者混合物。抗原可以主要作为递送系统、主要作为免疫调节剂、或者同时拥有这两种强特征。适宜的佐剂包括适用于哺乳动物包括人类的那些。

[0714] 可用于人类的适宜递送系统类型佐剂的已知实例包括但不限于:铝(例如,磷酸铝、硫酸铝或氢氧化铝)、磷酸钙、脂质体、水包油乳剂如MF59(4.3%w/v角鲨烯,0.5%w/v聚山梨醇酯80(Tween 80),0.5%w/v山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85))、油包水乳剂如Montanide、和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒子或纳米粒子。

[0715] 在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物包含铝盐(铝)作为佐剂(例如,磷酸铝、硫酸铝或氢氧化铝)。在优选的实施方案中,本文公开的免疫原性组合物包含磷酸铝或氢氧化铝作为佐剂。在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物包含0.1mg/mL至1mg/mL或者0.2mg/mL至0.3mg/mL的磷酸铝形式的元素铝。在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物包含大约0.25mg/mL的磷酸铝形式的元素铝。

[0716] 可用于人类的适宜免疫调节类型的佐剂的已知实例包括但不限于,来自Aquilla树的树皮的皂苷提取物(QS21、Quil A),TLR4激动剂如MPL(单磷酸脂质A),3DMPL(3-O-去乙酰基的MPL)或GLA-AQ,LT/CT突变体,细胞因子如各种白细胞介素(例如,IL-2、IL-12)或GM-CSF,以及类似的。

[0717] 可用于人类的适宜免疫调节类型佐剂的已知实例(具有递送和免疫调节特征)包括但不限于,ISCOMS(参见,例如,Sjölander等人(1998)J.Leukocyte Biol.64:713;WO 90/03184,WO 96/11711,WO 00/48630,WO 98/36772,WO 00/41720,WO 2006/134423和WO 2007/026190)或者GLA-EM,其是TLR4激动剂和水包油乳剂的组合。

[0718] 对于兽医应用(包括但不限于动物实验),可以使用弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)、Emulsigen、N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称作nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙

氨酰-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,称作MTP-PE)、和RIBI,其含有提取自细菌的三种组分:单磷酸脂质A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS,在2%角鲨烯/Tween 80乳剂中)。

[0719] 用于增强本文所公开的肺炎球菌疫苗的效果的另外的示例性佐剂包括但不限于:(1)水包油乳剂制剂(有或没有其它具体的免疫刺激剂如胞壁酰肽(参见下文)或细菌细胞壁组分),如例如(a)SAF,含有10%的角鲨烯、0.4%的Tween 80、5%的普兰尼克-封闭的聚合物L121,和thr-MDP(经微流化成亚微米乳剂或经涡旋以产生较大颗粒大小的乳剂),和(b)RIBI™佐剂系统(RAS),(Ribi Immunochem,Hamilton,MT)含有2%的角鲨烯,0.2%的Tween 80,以及一或多种细菌细胞壁组分如单磷酸脂质A(MPL),海藻糖二霉菌酸酯(TDM),和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+CWS(DETOX™);(2)皂苷佐剂,如可以使用QS21,STIMULON™(Cambridge Bioscience,Worcester,MA),ABISCO®(Isconova,Sweden),或ISCOMATRIX®(Commonwealth Serum Laboratories,Australia),或则由其所产生的颗粒如ISCOM(免疫刺激复合物),所述ISCOMS可缺少额外的去污剂(例如,WO 00/07621);(3)弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA);(4)细胞因子,如白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12(例如,WO 99/44636)),干扰素(例如, γ 干扰素),巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),肿瘤坏死因子(TNF),等;(5)单磷酸脂质A(MPL)或者3-O-去乙酰基的MPL(3dMPL)(参见,例如,GB-2220221、EP0689454),任选当与肺炎球菌糖一起使用时基本上缺乏铝(参见,例如,WO 00/56358);(6)3dMPL与例如QS21和/或水包油乳剂的组合(参见,例如,EP0835318,EP0735898,EP0761231);(7)聚氧乙烯醚或者聚氧乙烯酯(参见,例如,WO 99/52549);(8)聚氧乙烯山梨糖酯表面活性剂组合辛苯昔醇(例如,WO 01/21207)或者聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂组合至少一种额外的非离子表面活性剂如辛苯昔醇(例如,WO 01/21152);(9)皂苷和免疫刺激性寡核苷酸(例如,CpG寡核苷酸)(例如,WO 00/62800);(10)免疫刺激剂和金属盐颗粒(参见,例如,WO 00/23105);(11)皂苷和水包油乳剂(例如,WO 99/11241);(12)皂苷(例如,QS21)+3dMPL+IM2(任选+固醇)(例如,WO 98/57659);(13)作为免疫刺激剂增强组合物效力的其它物质。胞壁酰肽包括N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-25乙酰基-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸酰氧基)-乙胺MTP-PE),等等。

[0720] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含CpG寡核苷酸作为佐剂。本文所用的CpG寡核苷酸是指免疫刺激性CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN),因而这些术语可互换使用除非另有说明。免疫刺激CpG寡脱氧核苷酸含有一或多种免疫刺激性CpG基序,其是未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸,任选在某些优选的碱基环境中。CpG免疫刺激性基序的甲基化状态一般是指二核苷酸中的胞嘧啶残基。含有至少一种未甲基化CpG二核苷酸的免疫刺激性寡核苷酸是这样的寡核苷酸,其含有5'未甲基化的胞嘧啶通过磷酸键连接至3'鸟嘌呤,并且其通过结合至Toll样受体9(TLR-9)而活化免疫系统。在另一实施方案中,所述免疫刺激性寡核苷酸可含有一或多种甲基化的CpG二核苷酸,其将会通过TLR9而活化免疫系统但却不如未甲基化的CpG基序那么强。CpG免疫刺激性寡核苷酸可以包含一或多个回文结构(其依次可包含CpG二核苷酸)。CpG寡核苷酸已经在很多已授权的专利中、已公开的

专利申请中、以及其它出版物中有描述,包括美国专利号6,194,388;6,207,646;6,214,806;6,218,371;6,239,116;和6,339,068。

[0721] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含WO 2010/125480的第3页22行至第12页36行中所描述的任何CpG寡核苷酸。

[0722] 已经鉴别了不同类的CpG免疫刺激性寡核苷酸。这些被称作A、B、C和P类,并且在WO 2010/125480的第3页22行至第12页36行中有更详细的描述。本发明的方法涉及使用这些不同类的CpG免疫刺激性寡核苷酸。

[0723] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含A类CpG寡核苷酸。优选本发明的“A类”CpG寡核苷酸具有如下核酸序列:5' GGGGACGACGTCGTGGGGGG 3' (SEQ ID NO:1)。A类寡核苷酸的一些非限制性实例包括:5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO:2);其中“*”指代硫代磷酸酯键以及“_”指代磷酸二酯键。

[0724] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含B类CpG寡核苷酸。在一个实施方案中,用于本发明的CpG寡核苷酸是至少由下式所表示的B类CpG寡核苷酸:5' X₁X₂CGX₃X₄ 3',其中X₁、X₂、X₃、和X₄是核苷酸。在一个实施方案中,X₂是腺嘌呤、鸟嘌呤、或胸腺嘧啶。在另一实施方案中,X₃是胞嘧啶、腺嘌呤、或胸腺嘧啶。

[0725] 本发明的B类CpG寡核苷酸序列是在上文广泛描述的以及在WO 96/02555、WO 98/18810和美国专利号6,194,388;6,207,646;6,214,806;6,218,371;6,239,116和6,339,068中公开的那些。示例性的序列包括但不限于这些申请和专利共公开的那些。

[0726] 在一实施方案中,本发明的“B类”CpG寡核苷酸具有以下核酸序列:

[0727] 5' TCGTCGTTTTTCGGTCTTTT 3' (SEQ ID NO:3)、或

[0728] 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO:4)、或

[0729] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO:5)、或

[0730] 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO:6)、或

[0731] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO:7)。

[0732] 在任何这些序列中,所有的键可以全都是硫代磷酸酯键。在另一实施方案中,在任何这些序列中,一或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间从而产生半软的CpG寡核苷酸。在任何这些序列中,乙基-尿苷或者卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包括但不限于溴-尿苷或碘-尿苷取代。

[0733] B类寡核苷酸的一些非限制性实例包括:

[0734] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO:8)、或

[0735] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO:9)、或

[0736] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO:10)、或

[0737] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO:11)、或

[0738] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO:12)。

[0739] 其中“*”代表硫代磷酸酯键。

[0740] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含C类CpG寡核苷酸。在一实施方案中,本发明的“C类”CpG寡核苷酸具有以下的核酸序列:

[0741] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:13)、或

[0742] 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:14)、或

[0743] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:15)、或

[0744] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:16)、或

[0745] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:17)、或

[0746] 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:18)、或

[0747] 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:19)、或

[0748] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:20)、或

[0749] 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:21)、或

[0750] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:22)、或

[0751] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:23)、或

[0752] 5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (SEQ ID NO:24)、或

[0753] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO:25)。

[0754] 在任何这些序列中,所有的键可以都是硫代磷酸酯键。在另一实施方案中,在任何这些序列中,一或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间从而产生半软的CpG寡核苷酸。

[0755] C类寡核苷酸的一些非限制性实例包括:

[0756] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:26)、或

[0757] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:27)、或

[0758] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:28)、或

[0759] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:29)、或

[0760] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:30)、或

[0761] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:31)、或

[0762] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:32)、或

[0763] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:33)、或

[0764] 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:34)、或

[0765] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:35)、或

[0766] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:36)、或

[0767] 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:37)、

[0768] 或

[0769] 5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3' (SEQ ID NO:38)。

[0770] 其中“*”是指硫代磷酸酯键以及“_”指代磷酸二酯键。

[0771] 在任何这些序列中,乙基-尿苷或者卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包括但不限于溴-尿苷或碘-尿苷取代。

[0772] 在本发明的实施方案中,本文所公开的免疫原性组合物包含P类CpG寡核苷酸。在一实施方案中,用于本发明的CpG寡核苷酸是P类CpG寡核苷酸,其含有5'TLR活化结构域和至少两个回文结构区,一个回文结构区是长度至少6个核苷酸的5'回文结构区并且连接至至少长度至少8个核苷酸的3'回文结构区(直接连接或者通过间隔物连接),其中该寡核苷酸包括至少一个YpR二核苷酸。在一实施方案中,所述寡核苷酸不是T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:27)。在一个实施方案中,所述P类CpG寡核苷酸包括至少一个未甲基化的CpG二核苷酸。在另一实施方案中,所述TLR活化结构域是TCG、TTCG、

TTTCG、TYpR、TTYpR、TTTYpR、UCG、UUCG、UUUCG、TTT、或TTTT。在另一实施方案中,所述TLR活化结构域是在5'回文结构区内的。在另一实施方案中,所述TLR活化结构域是在5'端紧接着5'回文结构区的。

[0773] 在一实施方案中,本发明的“P类”CpG寡核苷酸具有以下核酸序列:5' TCGTCGACGATCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:39)。

[0774] 在所述序列中,所有的键可以全都是硫代磷酸酯键。在另一实施方案中,一或多个键可以是磷酸二酯,优选在CpG基序的“C”和“G”之间从而产生半软的CpG寡核苷酸。在任何这些序列中,乙基-尿苷或者卤素可以取代5'T;卤素取代的实例包括但不限于溴-尿苷或碘-尿苷取代。

[0775] P类寡核苷酸的非限制性实例包括:

[0776] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:40)。

[0777] 其中“*”是指硫代磷酸酯键而“-”指代磷酸二酯键。

[0778] 在一个实施方案中,所述寡核苷酸包括至少一个硫代磷酸酯键。在另一实施方案中,寡核苷酸的所有的核苷酸之间的键都是硫代磷酸酯键。在另一实施方案中,所述寡核苷酸包括至少一个类磷酸二酯键。在另一实施方案中,所述类磷酸二酯键是磷酸二酯键。在另一实施方案中,亲酯基团缀合至所述寡核苷酸。在一个实施方案中,所述亲酯基团是胆固醇。

[0779] 在一实施方案中,本文公开的CpG寡核苷酸的所有核苷酸之间的键都是磷酸二酯键(“软”寡核苷酸,如WO 2007/026190中所公开的)。在另一实施方案中,本发明的CpG寡核苷酸赋予对降解的抗性(例如,经稳定)。“经稳定的寡核苷酸”是指对于体内降解(例如,经核酸外切酶或核酸内切酶的降解)相对有抗性的寡核苷酸。可以通过骨架修饰来实现核酸的稳定。具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸提供最大的活性以及防止寡核苷酸被细胞内核酸外切酶或核酸内切酶所降解。

[0780] 所述免疫刺激性寡核苷酸可具有嵌合骨架,其具有磷酸二酯和硫代磷酸酯键的组合。对于本发明的目的,嵌合骨架是指经部分稳定的骨架,其中至少一个核苷酸之间的键是磷酸二酯或者类磷酸二酯,并且其中至少另一个核苷酸之间的键经稳定的核苷酸之间的键,其中所述至少一个磷酸二酯或类磷酸二酯键和所述至少一个经稳定的键是不同的。当所述磷酸二酯键优选位于CpG基序之内时,此类分子称作“半软”,如WO 2007/026190中所述。

[0781] 其它经修饰的寡核苷酸包括磷酸二酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、和/或对-乙氧基键的组合。

[0782] 可以如WO 2007/026190中所述合成混合的骨架修饰的ODN。

[0783] 所述CpG寡核苷酸的大小(也即沿寡核苷酸长度中核苷酸残基的数目)也可以有助于寡核苷酸的刺活化性。为了促进细胞的摄入,本发明的CpG寡核苷酸优选具有6个核苷酸残基的最小长度。任何超过6个核苷酸的寡核苷酸大小(即使数千kb长)在存在足够的免疫刺激性基序时都能够诱导免疫应答,因为较长的寡核苷酸在细胞内降解。在某些实施方案中,所述CpG寡核苷酸长度为6至100个核苷酸,优选长度为8至30个核苷酸。在重要的实施方案中,本发明的核酸和寡核苷酸不是质粒或者表达载体。

[0784] 在一实施方案中,本文公开的CpG寡核苷酸包含取代或者修饰,如WO 2007/026190

的134至147段中所描述的碱基和/或糖中。

[0785] 在一实施方案中,本发明的CpG寡核苷酸是经化学修饰的。化学修饰的实例是本领域技术人员已知的并且在例如Uhlmann等人(1990) Chem. Rev. 90:543; S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke等人(1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; 和Hunziker等人(1995) Mod. Synth. Methods 7:331-417中有描述。本发明的寡核苷酸可具有一个或多个修饰,其中每个修饰位于特定的磷酸二酯核苷酸间的桥处和/或位于特定的 β -D-核糖单元处和/或位于特定的天然核苷酸碱基位置处(相较于由天然DNA或RNA组成的相同序列的寡核苷酸)。

[0786] 在本发明的一些实施方案中,含有CpG的核酸可以根据本领域技术人员已知的方法简单地与免疫原性载体混合(参见,例如,WO 03/024480)。

[0787] 在本发明特定的实施方案中,本文公开的任何免疫原性组合物包含2 μ g至100mg的CpG寡核苷酸、优选0.1mg至50mg的CpG寡核苷酸、优选0.2mg至10mg的CpG寡核苷酸、优选0.3mg至5mg CpG的寡核苷酸、优选0.3mg至5mg CpG寡核苷酸、更优选0.5至2mg的CpG寡核苷酸、更优选0.75至1.5mg的CpG寡核苷酸。在优选的实施方案中,本文公开的任何免疫原性组合物包含大约1mg的CpG寡核苷酸。

[0788] 5. 制剂

[0789] 本发明的免疫原性组合物可以配制为液体的形式(也即溶液或者悬液)或者冻干的形式。液体制剂可以有利地直接从其包装的形式来施用,并因而对于注射很理想,无需在水介质中进行重构(如本发明冻干的组合物所需要的那样)。

[0790] 本发明免疫原性组合物的制剂可以使用本领域已知的方法来实现。例如,各肺炎球菌缀合物可以与生理学可接受的载剂配制以制备组合物。此类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)和右旋糖溶液。

[0791] 本公开提供了这样的免疫原性组合物,其包含本文公开的糖缀合物的任何组合以及药物可接受的赋形剂、载体、或稀释剂。

[0792] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物是液体的形式,优选是水成液体的形式。

[0793] 本公开的免疫原性组合物可以包括以下的一或多种:缓冲液、盐、二价阳离子、非离子去污剂、冷冻防护剂如糖、和抗氧化剂如自由基清洁剂或螯合剂、或者其任意多元组合。

[0794] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含缓冲液。在一实施方案中,所述缓冲液具有大约3.5至大约7.5的pKa。在一些实施方案中,所述缓冲液是磷酸盐、琥珀酸盐、组氨酸或柠檬酸盐。在某些实施方案中,所述缓冲液是终浓度1mM至10mM的琥珀酸盐。在一个特定的实施方案中,琥珀酸盐缓冲液的终浓度为大约5mM。

[0795] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含盐。在一些实施方案中,所述盐选自以下组:氯化镁、氯化钾、氯化钠以及其组合。在一个特定的实施方案中,所述盐是氯化钠。在一个特定的实施方案中,本发明免疫原性组合物包含150mM的氯化钠。

[0796] 在一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含表面活性剂。在一实施方案中,所述表面活性剂选自以下组:聚山梨醇酯20(TWEENTM20)、聚山梨醇酯40(TWEENTM40)、聚山梨醇酯60(TWEENTM60)、聚山梨醇酯65(TWEENTM65)、聚山梨醇酯80(TWEENTM80)、聚山梨醇酯85

(TWEEN™85)、TRITON™ N-101、TRITON™ X-100、辛苯昔醇40、壬苯聚醇-9、三乙醇胺、三乙醇胺多肽油酸脂、聚氧乙烯-660羟基硬脂酸酯(PEG-15, Solutol H 15)、聚氧乙烯-35-蓖麻醇酸酯(CREMOPHOR® EL), 大豆卵磷脂和泊洛沙姆。在一个特定的实施方案中, 所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。在一些所述实施方案中, 制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为至少0.0001%至10%重量比重量(w/w)聚山梨醇酯80。在一些所述实施方案中, 制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为至少0.001%至1%重量比重量(w/w)聚山梨醇酯80。在一些所述实施方案中, 制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为至少0.01%至1%重量比重量(w/w)聚山梨醇酯80。在其它实施方案中, 制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、或0.1% (w/w) 聚山梨醇酯80。在另一实施方案中, 制剂中聚山梨醇酯80的终浓度为1% (w/w) 聚山梨醇酯80。

[0797] 在某些实施方案中, 本发明的免疫原性组合物具有5.5至7.5的pH、更优选5.6至7.0的pH、更优选5.8至6.0的pH。

[0798] 在一个实施方案中, 本发明提供了容器, 其中填充有本文所公开的任何免疫原性组合物。在一个实施方案中, 所述容器选自以下组: 小瓶、注射器、烧瓶、发酵器、生物反应器、袋、罐、安瓿、盒和一次性笔。在某些实施方案中, 所述容器经硅化。

[0799] 在一实施方案中, 本发明的容器由玻璃、金属(例如, 钢、不锈钢、铝等)和/或聚合物(例如, 热塑塑料、弹性体、热塑弹性体)制成。在一实施方案中, 本发明的容器由玻璃制成。

[0800] 在一个实施方案中, 本发明提供了填充有本文公开的任何免疫原性组合物的注射器。在某些实施方案中, 所述注射器经硅化和/或由玻璃制成。

[0801] 本发明的免疫原性组合物用于注射的典型剂量具有0.1mL至2mL的体积、更优选0.2mL至1mL、更优选大约0.5mL的体积。

[0802] 因此上述所定义的容器或注射填充有0.1mL至2mL的体积、更优选0.2mL至1mL、更优选大约0.5mL体积的本文所定义的任何免疫原性组合物。

[0803] 6. 本发明免疫原性组合物的用途

[0804] 在一实施方案中, 本文公开的免疫原性组合物被用于药物用途。

[0805] 如本文所描述的免疫原性组合物可用于各种治疗或预防方法, 以用于预防、治疗或缓解对象中的细菌感染、疾病或病征。具体而言, 本文所述的免疫原性组合物可用于预防、治疗或缓解对象中的肺炎链球菌感染、疾病或病征。

[0806] 因而在一方面, 本发明提供了用于在对象在预防、治疗或缓解与肺炎链球菌相关的感染、疾病或病征的方法, 其包括向所述对象施用免疫学有效量的本发明的免疫原性组合物。

[0807] 在一些此类实施方案中, 所述感染、疾病或病征选自以下组: 肺炎、鼻窦炎、中耳炎、急性中耳炎、脑膜炎、菌血症、脓毒症、脓胸、结膜炎、骨髓炎、脓性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、乳突炎、蜂窝织炎、软组织感染和脑脓肿。

[0808] 在一实施方案中, 本发明提供了在对象中诱导针对肺炎链球菌的免疫应答的方法, 包括向所述对象施用免疫学有效量的本发明的免疫原性组合物。

[0809] 在一实施方案中, 本文公开的免疫原性组合物被用作疫苗。在此类实施方案中, 如本文所描述的免疫原性组合物可用于预防肺炎链球菌对象中的感染。因而在一方面, 本发

明提供了在对象中预防肺炎链球菌感染的方法,包括向对象施用免疫学有效量的本发明的免疫原性组合物。在一些此类实施方案中,所述感染选自以下组:肺炎、鼻窦炎、中耳炎、急性中耳炎、脑膜炎、菌血症、脓毒症、脓胸、结膜炎、骨髓炎、脓性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、乳突炎、蜂窝织炎、软组织感染和脑脓肿。在一方面,所要疫苗接种的对象是哺乳动物,如人、猫、绵羊、猪、马、牛或狗。

[0810] 在一方面,本文公开的免疫原性组合物用于在对象中预防、治疗或缓解与肺炎链球菌相关的感染、疾病或病征。在一些此类实施方案中,所述感染、疾病或病征选自以下组:肺炎、鼻窦炎、中耳炎、急性中耳炎、脑膜炎、菌血症、脓毒症、脓胸、结膜炎、骨髓炎、脓性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、乳突炎、蜂窝织炎、软组织感染和脑脓肿。

[0811] 在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物被用作疫苗。在此类实施方案中,如本文所描述的免疫原性组合物可用于预防肺炎链球菌对象中的感染。因而在一方面,本文公开的免疫原性组合物用于在对象中预防肺炎链球菌感染的方法。在一些此类实施方案中,所述感染选自以下组:肺炎、鼻窦炎、中耳炎、急性中耳炎、脑膜炎、菌血症、脓毒症、脓胸、结膜炎、骨髓炎、脓性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心包炎、乳突炎、蜂窝织炎、软组织感染和脑脓肿。在一方面,所要疫苗接种的对象是哺乳动物,如人类、猫、绵羊、猪、马、牛或狗。

[0812] 本发明的免疫原性组合物可用于保护或者治疗易受肺炎球菌感染的人,其中是通过经全身性或粘膜途径施用免疫原性组合物的手段。在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物是通过肌肉内、腹膜内、皮内或皮下途径施用的。在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物是通过肌肉内、腹膜内、皮内或皮下注射施用的。在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物是通过肌肉内或皮下注射来施用的。

[0813] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,能够诱导抗体的形成,所述抗体能够结合肺炎链球菌血清型15B、15A和/或15C(以标准ELISA测定测量)。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,能够诱导抗体的形成,所述抗体能够结合肺炎链球菌血清型15B和15C(以标准ELISA测定测量)。

[0814] 在ELISA(酶联免疫吸附)方法中,已吸附至固体支持物上的多糖诱导来自经疫苗接种对象的血清的抗体。使用酶缀合的次级检测抗体来检测所结合的抗体。

[0815] 在一实施方案中,所述标准ELISA测定是标准化的(WHO)ELISA测定,如WHO在“Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG(Pn PS ELISA)”(可通过<http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>获取;获取于2014年3月31日)中所定义的。

[0816] 所述ELISA测量人类血清中存在的类型特异性IgG抗肺炎链球菌荚膜多糖(PS)抗体。当人类血清的稀释被加入到类型特异性的荚膜PS-涂敷的微量滴定平板时,特异于该荚膜PS的抗体结合至微量滴定平板。使用山羊抗人IgG碱性磷酸酶所标记的抗体(随后是对-硝基苯磷酸酯底物)来检测结合至平板的抗体。带色终产物的光密度与血清中存在的抗荚膜PS抗体的量成比例。

[0817] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物能够在人类中引出IgG抗体,所述IgG抗体

能够以至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度结合肺炎链球菌血清型15B多糖(以ELISA测定测量)。

[0818] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物能够在人类中引出IgG抗体,所述IgG抗体能够以至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度结合肺炎链球菌血清型15C多糖(以ELISA测定测量)。

[0819] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物能够在人类中引出IgG抗体,所述IgG抗体能够以至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4或0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度结合肺炎链球菌血清型15B和15C多糖(以ELISA测定测量)。

[0820] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,能够诱导抗体的形成,所述抗体在本文公开的调理吞噬测定中(如实施例12的OPA测定)能够杀伤肺炎链球菌血清型15B。

[0821] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当在本文公开的OPA测定中进行测试时(如实施例12的OPA测定),具有比未缀合的天然肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖所获得的OPA效价要更高的OPA效价。

[0822] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,能够诱导抗体的形成,所述抗体在本文公开的调理吞噬测定中(如实施例12的OPA测定)能够杀伤肺炎链球菌血清型15C。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当在本文公开的OPA测定中进行测试时(如实施例12的OPA测定),具有比未缀合的天然肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖所获得的OPA效价要更高的OPA效价。

[0823] 所述肺炎球菌调理吞噬测定(OPA),其测量在功能性抗体和补体的存在下吞噬效应细胞对肺炎链球菌细胞的杀伤,而被认为是评价肺炎球菌疫苗效果的重要替代。

[0824] 可以通过将肺炎链球菌细胞、热灭活的待测人血清、分化的HL-60细胞(巨噬细胞)以及外源补体来源(例如,幼兔补体)一起温育来进行调理吞噬测定(OPA)。调理吞噬在温育期间进行并且包被有抗体和补体的细菌细胞经调理吞噬而被杀伤。逃避了调理吞噬的存活细菌的集落形成单位(cfu)是通过将测定混合物铺板确定的。所述OPA效价定义为相对于无测试血清的对照孔导致细菌计数有50%降低的倒数稀释。所述OPA效价是从涵盖50%杀伤截断值的两个稀释内推出来的。

[0825] 在这些杀伤类型的OPA中,1:8或更高的终末点效价被视为阳性结果。

[0826] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,能够在至少50%的对象中引起针对肺炎链球菌血清型15B的至少1:8的效价(经调理吞噬杀伤测定(OPA)确定)。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,能够在至少60%、70%、80%、90%、或至少3%的对象中引起针对肺炎

链球菌血清型15B的至少1:8的效价(经调理吞噬杀伤测定(OPA)确定)。

[0827] 在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,能够在至少50%的对象中引起针对肺炎链球菌血清型15C的至少1:8的效价(经调理吞噬杀伤测定(OPA)确定)。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,能够在至少60%、70%、80%、90%、或至少95%的对象中引起针对肺炎链球菌血清型15C的至少1:8的效价(经调理吞噬杀伤测定(OPA)确定)。

[0828] 在另外的方面,本公开提供了在对象中治疗或预防与肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C相关的肺炎链球菌感染、疾病或病征的方法,所述方法包括以下步骤:施用治疗或预防有效量的本公开的任何免疫原性组合物,所述组合物包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,诱导抗体的形成,所述抗体能够结合至肺炎链球菌血清型15B、15A和/或15C。在一实施方案中,包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的免疫原性组合物,当施用至对象时,诱导抗体的形成,所述抗体在本文公开的调理吞噬测定中(如实施例12的OPA测定)能够杀伤肺炎链球菌血清型15B、15C和/或15A。

[0829] 本公开的一个实施方案提供了保护对象以防受肺炎链球菌血清型15C感染的方法、或者预防肺炎链球菌血清型15C感染的方法、或者降低与肺炎链球菌血清型15C引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作的方法,所述方法包括向对象施用免疫原性量含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的任何本公开的免疫原性组合物。本公开的一个实施方案提供了用于在对象中治疗或预防与肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)相关的肺炎链球菌感染、疾病或病征的方法,所述方法包括以下步骤:向所述对象施用治疗或预防有效量包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的任何本公开的免疫原性组合物。另一实施方案提供了在对象中治疗或预防与肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)相关的肺炎链球菌感染、疾病或病征的方法,所述方法包括从包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的任何本公开的免疫原性组合物产生多克隆或单克隆抗体制备物,并施用所述抗体制备物赋予对象被动免疫。

[0830] 在一个实施方案中,本公开涉及包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的任何免疫原性组合物用于制备药物的用途,所述药物用于保护对象不受肺炎链球菌感染、和/或预防肺炎链球菌感染、和/或降低与肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作、和/或保护对象不受肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)的感染、和/或预防肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)的感染、和/或降低与肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作。

[0831] 在一个实施方案中,本公开涉及包含至少一种来自肺炎链球菌血清型15B的糖缀

合物(如上文1.3.4节的糖缀合物)的本公开的任何免疫原性组合物的用途,所述用途是用于保护对象不受肺炎链球菌感染、和/或预防肺炎链球菌感染、和/或降低与肺炎链球菌引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作、和/或保护对象不受肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)的感染、和/或预防肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)的感染、和/或降低与肺炎链球菌血清型15A、15B和/或15C(优选15B和/或15C、更优选15B)引起的感染相关的至少一种症状的严重性或者延缓其发作。

[0832] 7. 要用本发明免疫原性组合物治疗的对象

[0833] 如本文所公开的,如本文所描述的免疫原性组合物可用于各种治疗或预防方法以用来预防、治疗或缓解对象中的细菌感染、疾病或病症。

[0834] 在优选的实施方案中,所述对象是人。在最优选的实施方案中,所述对象是新生的(也即年龄小于3个月)、婴儿(也即年龄3个月至1岁)、或者幼儿(也即年龄1岁至4岁)。

[0835] 在一实施方案中,本文公开的免疫原性组合物被用作疫苗。

[0836] 在此种实施方案中,要进行疫苗接种的对象年龄可以小于1岁。例如,要进行疫苗接种的对象年龄可以是大约1、大约2、大约3、大约4、大约5、大约6、大约7、大约8、大约9、大约10、大约11或大约12个月大。在一实施方案中,要进行疫苗接种的对象年龄是大约2、大约4或大约6个月大。在另一实施方案中,要进行疫苗接种的对象年龄可以低于2岁。例如要进行疫苗接种的对象年龄可以是大约12至大约15个月大。在某些情形中,仅需要少至一个剂量的本发明的免疫原性组合物,但是在一些情况下,可以提供第二个、第三个或第四个剂量(参见下文第8节)。

[0837] 在本发明的实施方案中,要进行疫苗接种的对象50岁或更老的人类成人、更优选55岁或更老的人类成人。在一实施方案中,要进行疫苗接种的对象是65岁或更老的人类成人、70岁或更老的人类成人、75岁或更老的人类成人、或者80岁或更老的人类成人。

[0838] 在一实施方案中,要进行疫苗接种的对象是免疫受损个体,特别是人类。免疫受损个体一般定义为这样的人,其展现出对感染性物质的攻击产生正常体液或细胞防护的能力减弱或降低。

[0839] 在本发明的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象患有这样的疾病或病症,其削弱免疫系统并导致不足以防护或治疗肺炎球菌疾病的抗体应答。

[0840] 在一实施方案中,所述疾病是原发性免疫缺陷病症。优选地,所述原发性免疫缺陷病症选自以下组:组合T-细胞和B-细胞免疫缺陷、抗体缺陷、定义明确的综合征、免疫失调疾病、巨噬细胞病症、先天性免疫缺陷、自身炎症性病症、和补体缺陷。在一实施方案中,所述原发性免疫缺陷病症选自W0 2010/125480的24页11行至25页19行中所公开的那个。

[0841] 在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象患有选自以下组的疾病:HIV感染、获得性免疫缺乏综合征(AIDS)、癌症、慢性心或肺病、充血性心力衰竭、糖尿病、慢性肝脏疾病、酗酒、肝硬化、脊髓液泄露、心肌病、慢性支气管炎、肺气肿、慢性梗阻性肺病(COPD)、脾失调(如镰状细胞病)、脾功能缺乏(无脾)、血液恶性肿瘤、白血病、多发性骨髓瘤、何杰金病、淋巴瘤、肾衰竭、肾病综合征和哮喘。

[0842] 在本发明实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象患有营养不良。

[0843] 在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象在接受药物或者治

疗(降低机体对感染的抗性)。在一实施方案中,所述药物选自WO 2010/125480的26页33行至26页4行。

[0844] 在本发明特定实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象是吸烟者。

[0845] 在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象具有低于 5×10^9 个细胞/升、或低于 4×10^9 个细胞/升、或低于 3×10^9 个细胞/升、或低于 2×10^9 个细胞/升、或低于 1×10^9 个细胞/升、或低于 0.5×10^9 个细胞/升、或低于 0.3×10^9 个细胞/升、或低于 0.1×10^9 个细胞/升的白血细胞计数(白血球计数)。

[0846] 白血细胞计数(白血球计数):血液中白血细胞(WBC)的数目。所述WBC通常是作为CBC(全部血球计数)的一部分进行测量的。白血细胞是血液中与感染作斗争的细胞并且与已知为红血球的红色(携氧)血细胞不同。由不同类型的白血细胞,包括嗜中性白细胞(多形核白细胞;PMN)、杆状核粒细胞(稍微未成熟的嗜中性白细胞)、T-型淋巴细胞(T-细胞)、B-型淋巴细胞(B-细胞)、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞。所有类型的白血细胞在白血细胞计数中都有体现。白血细胞计数的正常范围通常在每立方毫米血液4,300至10,800个细胞之间。这也可以称作白血球计数并且表示为 $4.3-10.8 \times 10^9$ 个细胞/升的国际单位。

[0847] 在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象患有嗜中性白细胞减少症。在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象具有低于 2×10^9 个细胞/升、或低于 1×10^9 个细胞/升、或低于 0.5×10^9 个细胞/升、或低于 0.1×10^9 个细胞/升、或低于 0.05×10^9 个细胞/升的嗜中性白细胞计数。

[0848] 低白血细胞计数或者说“嗜中性白细胞减少症”是这样的病征,其特征在于循环血液中异常低水平的嗜中性白细胞。嗜中性白细胞是辅助预防感染以及与感染作斗争的具体种类的白血细胞。癌症患者经历嗜中性白细胞减少症的最常见原因是化疗的副作用。化疗诱导的嗜中性白细胞减少症增加了患者感染的风险并使癌症治疗中断。

[0849] 在本发明特定的实施方案中,要进行疫苗接种的免疫受损对象具有低于 $500/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数、或者低于 $300/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数、或者低于 $200/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数、或者低于 $100/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数、低于 $75/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数、或者低于 $50/\text{mm}^3$ 的CD4+细胞计数。

[0850] CD4细胞测试通常报道为 mm^3 中细胞的数目。正常的CD4计数在500至1,600之间,而CD8计数在375至1,100之间。CD4计数在具有HIV的人中显著降低。

[0851] 在本发明的实施方案中,本文公开的任何免疫受损对象是人类男性或者人类女性。

[0852] 8. 方案

[0853] 在某些情形中,只需要少至一个剂量的本发明的免疫原性组合物,但是在某些情况下,如较强免疫缺陷的病征,则可以提供第二个、第三个、或第四个剂量。在初始疫苗接种之后,对象可接受一次或若干次充分间隔的加强免疫。

[0854] 在一实施方案中,本发明免疫原性组合物进行疫苗接种的日程为单次剂量。在特定实施方案中,所述单次剂量日程是用于年龄至少2岁的健康人。

[0855] 在一实施方案中,本发明免疫原性组合物进行疫苗接种的日程为多剂量方案。在特定的实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的2个剂量(由大约1个月至大约2个月的间隔所分开)。在特定的实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的2个

剂量(由大约1个月的间隔所分开),或者一系列的2个剂量(由大约2个月的间隔所分开)。

[0856] 在另一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的3个剂量(由大约1个月至大约2个月的间隔所分开)。在另一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的3个剂量(由大约1个月的间隔所分开),或者一系列的3个剂量(由大约2个月的间隔所分开)。

[0857] 在另一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的3个剂量(由大约1个月至大约2个月的间隔所分开),随后是在第一个剂量之后的大约10个月至大约13个月的第四个剂量。在另一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的3个剂量(由大约1个月的间隔所分开),随后是在第一个剂量之后的大约10个月至大约13个月的第四个剂量;或者一系列的3个剂量(由大约2个月的间隔所分开),随后是在第一个剂量之后的大约10个月至大约13个月的第四个剂量。

[0858] 在一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:在年龄的第一年至少一个剂量(例如,1个、2个、或3个剂量),随后是至少一个幼儿剂量。

[0859] 在一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的2个或3个剂量(由大约1个月至大约2个月的间隔所分开)(剂量之间例如28-56天),从年龄2个月大开始,随后是在年龄12-18个月大的幼儿剂量。在一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的3个剂量(由大约1个月至大约2个月的间隔所分开)(剂量之间例如28-56天),从年龄2个月大开始,随后是在年龄12-15个月大的幼儿剂量。在另一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:一系列的2个剂量(由大约2个月的间隔所分开),从年龄2个月大开始,随后是在年龄12-18个月大的幼儿剂量。

[0860] 在一实施方案中,所述多剂量方案由以下所组成:在年龄2、4、6、和12-15个月大时的4-剂量的系列疫苗。

[0861] 在一实施方案中,在第0天提供首剂量并在大约2至大约24周的间隔范围提供一或多次加强剂量,优选4-8周的剂量间隔。

[0862] 在一实施方案中,在第0天提供首剂量以及在大约3个月后提供加强。

[0863] 如本文所用,术语“大约”是指在数值的统计学有意义范围内,如所提到的浓度范围、时间范围、分子量、温度或pH。此种范围是在一定数量级之内,通常是给定数值或范围的20%之内、更通常是在10%之内、以及更通常是在5%之内、或1%之内。有时,此种范围可以在实验误差之内,所述实验误差在用于测量和/或确定给定数值和范围的标准方法中是常见的。术语“大约”所涵盖的允许差异将取决于在研究的特定体系,并且是本领域技术人员能够轻易确定的。在本身请中无论何时提到范围,该范围内的每个整数也都被视为是本公开的实施方案。

[0864] 本文的术语“包含”、“包括”以及“含有”任选是可以用来在每个实例中分别替换术语“基本上由……组成”、“由……组成”。

[0865] 本专利说明书中引用的所有参考文献或专利申请援引加入本文。

[0866] 本发明通过所附的实施例来进行说明。下文的实施例是使用标准技术来进行的,其对于本领域技术人员而言是熟知的以及常规的,除非是另有细节描述。实施例是用于说明,而非对本发明进行限制。

实施例

[0867] 实施例1:制备eTEC连接的糖缀合物的一般方法

[0868] 糖的活化以及用脘氨二盐酸盐硫醇化

[0869] 在无水二甲基亚砜(DMSO)中重溶糖。该溶液的通过Karl Fischer (KF) 分析来确定该容易的水分含量并对其进行调节以达到0.1%至0.4% (通常0.2%) 的水分含量。

[0870] 为了起始活化,在DMSO中以100mg/mL的浓度新鲜制备了1,1'-羰基-二-1,2,4-三唑(CDT) 或1,1'-羰二咪唑(CDI) 的溶液。用各种量的CDT/CDI (1-10摩尔当量) 来活化糖,并使该反应在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行1小时。活化水平可以通过HPLC确定。脘氨二盐酸盐是在无水DMSO中以50mg/mL的浓度新鲜制备的。所述活化的糖与1摩尔当量(mol. eq.) 的脘氨二盐酸盐反应。或者,所述活化的糖与1摩尔当量的盐酸半脘胺反应。使硫醇化反应在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行 21 ± 2 小时,以产生硫醇化的糖。硫醇化水平通过CDT/CDI的添加量来确定。

[0871] 通过添加100mM的四硼酸钠(pH 9.0) 溶液来使活化反应溶液中残余的CDT/CDI猝灭。进行计算以确定所添加的四硼酸盐的量并将最终的水分含量调节为达到总水分的1-2%。

[0872] 活化的硫醇化糖的还原和纯化

[0873] 通过添加预冷却的0.9% 盐水中的5mM的琥珀酸钠(pH 6.0) 来将硫醇化的糖反应混合物稀释,并经 $5\mu\text{m}$ 的过滤器过滤。用40倍通过体积(diavolume) 的WFI来进行硫醇化糖的渗滤。在用10% 体积的0.1M磷酸钠缓冲液(pH 6.0) 稀释之后,向滞留物添加1-5摩尔当量的三(2-羧乙基) 膦(TCEP) 溶液。使此还原反应在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 进行 20 ± 2 小时。活化的硫醇化糖的纯化优选是通过用预冷却的10mM磷酸二氢钠(pH 4.3) 超滤/渗滤来进行。或者,硫醇化的糖是通过标准大小排阻层析(SEC) 程序或者或离子交换层析方法来纯化的。取活化的硫醇化糖滞留物试样来确定糖浓度和硫醇含量(Ellman) 测定。

[0874] 活化的硫醇化糖的备选还原和纯化

[0875] 作为上述纯化过程的备选,活化的硫醇化糖也可如下进行纯化。

[0876] 将5-10摩尔当量的三(2-羧乙基) 膦(TCEP) 溶液添加至硫醇化的糖反应混合物,并在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行 3 ± 1 小时。通过添加预冷却的0.9% 盐水中的5mM的琥珀酸钠(pH 6.0) 来将所述反应混合物稀释,并经 $5\mu\text{m}$ 的过滤器过滤。用40倍通过体积10mM磷酸二氢钠(pH 4.3) 来进行硫醇化糖的渗滤。取活化的硫醇化糖滞留物的试样来确定糖浓度和硫醇含量(Ellman) 测定。

[0877] 溴乙酰化的载体蛋白的活化和纯化

[0878] 通过与溴乙酰剂如溴乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(BAANS)、溴化溴乙酰、或其它适宜试剂反应来将载体蛋白的自由氨基溴乙酰化。

[0879] 在活化前,首先将载体蛋白(在0.1M磷酸钠中,pH 8.0 ± 0.2) 保存在 $8 \pm 3^\circ\text{C}$, 大约pH 7。将溴乙酸的N-羟基琥珀酰亚胺酯(BAANS) 作为二甲基亚砜(DMSO) 原液(20mg/mL) 以0.25-0.5BAANS:蛋白(w/w) 的比率添加至蛋白溶液。在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 将反应轻柔混合30-60分钟。纯化所得的溴乙酰化的(activated) 蛋白,例如,通过使用10Kda的MWC0膜以10mM磷酸盐(pH 7.0) 缓冲液进行的超滤/渗滤来纯化。纯化之后,通过Lowry蛋白测定评估溴乙酰化的载体蛋白的蛋白浓度。

[0880] 通过离子交换液相层析联合抑制型电导检测(离子层析) 由总溴测定法确定活化

的程度。在测定法样品准备中将所述活化的溴乙酰化蛋白上结合的溴从蛋白上切下,并与可存在的任何游离溴一起进行定量。通过在碱性2-巯基乙醇中加热样品而将蛋白上任何残留的共价结合的溴转化为离子溴从而将其释放。

[0881] 溴乙酰化的CRM₁₉₇的活化和纯化

[0882] 用10mM磷酸盐缓冲0.9%NaCl pH 7 (PBS) 将CRM₁₉₇稀释至5mg/mL,继而用1M原液制备了0.1M NaHCO₃,pH 7.0。使用20mg/mL DMSO的BAANS原液以1:0.35 (w:w) 的CRM₁₉₇:BAANS比例添加了BAANS。将反应混合物在3°C至11°C之间温育30分钟至1小时,继而使用10K MWC膜和10mM磷酸钠/0.9%NaCl,pH 7.0通过超滤/渗滤来纯化。通过Lowry测定法将纯化的活化CRM₁₉₇进行测定来确定蛋白浓度,并继而用PBS稀释至5mg/mL。将蔗糖加至5%wt/vol作为低温防护剂并将所述活化的蛋白冷冻冰储存在-25°C直至用于缀合。

[0883] CRM₁₉₇的赖氨酸残基的溴乙酰化是非常一致的,导致39个可用赖氨酸中15-25个赖氨酸的活化。该反应产生了高产率的活化蛋白。

[0884] 活化的硫醇化糖缀合至溴乙酰化的载体蛋白

[0885] 在开始缀合反应之前,将反应容器预先冷却至5°C。随后添加了溴乙酰化的载体蛋白和活化的硫醇化糖,并以150-200rpm的搅拌速度混合。糖/蛋白的输入比例为0.9±0.1。用1M NaOH溶液将反应pH调节为8.0±0.1。使缀合反应在5°C进行20±2小时。

[0886] 残基反应官能团的封端

[0887] 通过与2摩尔当量的N-乙酰基-L-半胱氨酸(作为封端试剂)在5°C反应3小时而使载体蛋白上未反应的溴乙酰化残基猝灭。通过与4摩尔当量的碘乙酰胺(IAA)在5°C反应20小时而将残余的游离巯基封端。

[0888] eTEC连接的糖缀合物的纯化

[0889] 将缀合反应(IAA封端之后的)混合物经0.45μm过滤器过滤。针对5mM的琥珀酸盐-0.9%盐水,pH 6.0来进行糖缀合物的超滤/渗滤。继而将糖缀合物滞留物经0.2μm过滤器过滤。取糖缀合物的试样用于测定。剩余的糖缀合物储存在5°C。

[0890] 实施例2:Pn-33F eTEC缀合物的制备

[0891] 活化方法

[0892] Pn33F多糖的活化

[0893] 将Pn-33F多糖与500mM的1,2,4-三唑(WFI中)混合,以获得10克的三唑(每克多糖)。在干冰-乙醇浴中将混合物外壳冷冻(shell-frozen),并继而冻干至干燥。将冻干的33F多糖在无水二甲基亚砷(DMSO)中重溶。通过Karl Fischer (KF)分析确定了该冻干的33F/DMSO溶液的水分含量。通过将WFI添加至33F/DMSO溶液将该水分含量调节为达到0.2%的水分含量。

[0894] 为了起始活化,在DMSO溶液中将1,1'-羰基-二-1,2,4-三唑(CDT)新鲜制备为100mg/mL。在硫醇化步骤之前用各种量的CDT活化Pn33F多糖。CDT活化在23±2°C进行1小时。通过HPLC(A220/A205)来确定活化水平。加入四硼酸钠(100mM,pH 9.0)溶液来将活化反应溶液中的任何残余CDT猝灭。进行计算以确定所添加的四硼酸盐的量,并使最终的水分含量为总水分的1.2%。使反应在23±2°C进行1小时。

[0895] 活化的Pn-33F多糖的硫醇化

[0896] 在无水DMSO中新鲜制备了胱胺-二盐酸盐,并将1摩尔当量的胱胺二盐酸盐添加至

所述活化的多糖反应溶液。使反应在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行 21 ± 3 小时。通过添加至预冷却的5mM琥珀酸钠(0.9%盐水中, pH 6.0)中而将硫醇化的糖溶液稀释十倍。经稀释的反应溶液通过 $5\mu\text{m}$ 过滤器进行过滤。用100K MWC0超滤膜盒进行硫醇化Pn-33F多糖的渗滤(使用注射用水(WFI))。

[0897] 活化的硫醇化Pn-33F多糖的还原和纯化

[0898] 在用10%体积的0.1M磷酸钠缓冲液, pH 6.0稀释后, 向滞留物添加了三(2-羧乙基)膦(TCEP)的溶液(5摩尔当量)。使此还原反应在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行 2 ± 1 小时。用100K MWC0超滤膜盒进行硫醇化33F多糖的渗滤。针对预冷却的10mM磷酸钠, pH 4.3进行渗滤。取硫醇化的33F多糖滞留物用于糖浓度和硫醇(Ellman)测定法。

[0899] 活化的硫醇化Pn-33F多糖的另外的还原和纯化

[0900] 作为上文所述纯化过程的替代, 33F活化的硫醇化糖也如下进行纯化。

[0901] 向硫醇化的糖反应混合物加入了三(2-羧乙基)膦(TCEP)的溶液(5摩尔当量), 并使其在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 进行 3 ± 1 小时。继而通过加入预冷却的5mM琥珀酸钠(0.9%盐水中, pH 6.0)而将反应混合物稀释了五倍, 并通过 $5\mu\text{m}$ 过滤器过滤。使用40倍通过体积的预冷却的10mM磷酸二氢钠(pH 4.3)以100K MWC0超滤膜盒来进行硫醇化的糖的渗滤。取硫醇化33F多糖滞留物用于糖浓度和硫醇(Ellman)测定法。活化过程的流程图在图8(A)中给出。

[0902] 缀合过程

[0903] 硫醇化的Pn33F多糖缀合至溴乙酰化的CRM₁₉₇

[0904] 通过溴乙酰化分别将CRM₁₉₇载体蛋白活化, 如实施例1中所述, 并继而与所述活化的Pn-33F多糖反应以进行缀合反应。在开始缀合反应之前, 将反应容器预冷却至 5°C 。在反应器中将溴乙酰化的CRM₁₉₇和硫醇化的33F多糖混合(150-200rpm的搅拌速度)。糖/蛋白的输入比例为 0.9 ± 0.1 。将反应pH调节为8.0-9.0。使缀合反应在 5°C 进行 20 ± 2 小时。

[0905] 溴乙酰化的CRM₁₉₇和硫醇化的Pn33F多糖上反应基团的封端

[0906] CRM₁₉₇蛋白上未反应的溴乙酰化残基通过与2摩尔当量的N-乙酰基-L-半胱氨酸在 5°C 反应3小时而进行封端, 随后是通过与碘乙酰胺(IAA)在 5°C 反应20小时而将硫醇化的33F-多糖的任何残余游离巯基封端。

[0907] eTEC-连接的Pn-33F糖缀合物的纯化

[0908] 经 $0.45\mu\text{m}$ 或 $5\mu\text{m}$ 过滤器来过滤缀合溶液。以300K MWC0超滤膜盒进行33F糖缀合物的渗滤。针对5mM琥珀酸盐-0.9%盐水, pH 6.0进行渗滤。继而经 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器将Pn-33F糖缀合物300K滞留物过滤, 并储存在 5°C 。缀合过程的流程图在图8(B)中给出。

[0909] 结果

[0910] 若干批次Pn-33F eTEC糖缀合物的反应参数和表征数据在表1中示出。以胱氨二盐酸盐CDT活化-硫醇化产生了具有63%至90%糖产率和<1%至13%的游离糖的糖缀合物。

[0911] 表1. Pn33F eTEC缀合物的实验参数和表征数据

缀合物批次	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
活化水平 (硫醇的 mol 数/ 多糖的 mol 数)	0.21	0.13	0.164	0.103	0.183	0.22	0.19
活化水平(%硫醇)	21	13	16.4	10.3	18.3	22	19
糖/蛋白(输入)比例	0.75	1.0	0.75	1.0	1.0	0.75	0.80
糖产率 (%)	69%	63%	71%	63%	69%	82%	90%
糖/蛋白比例	1.3	1.7	1.2	1.9	1.6	1.1	1.5
游离糖	12.9%	7.7%	4.4%	7.2%	7.3%	< 4%	< 4%
通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14.4/0	13.4/0	6.8/1.9	2.7/0.6	5.9/0.6	8.2/0	11.4/0.6
%Kd (≤ 0.3)	N/A	85%	88%	75%	68%	67%	76%
乙酰化水平 (乙酰的 mol 数/多糖的 mol 数)	0.89	1.16	0.99	0.85	0.81	0.85	1.01

[0913] N/A=不可提供

[0914] Pn-33F eTEC糖缀合物(至CRM197)的OPA效价

[0915] 在标准条件下确定了小鼠中Pn-33F的OPA效价(类似于下文对于10A和22F缀合物所描述的OPA过程)。在四周和七周的OPA效价(GMT, 95%CI)于表2中示出,证明了血清型33F Pn糖缀合物在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。

[0916] 表2. Pn-33F OPA效价(GMT, 95%CI)

33F Pn缀合物	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
第4周	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
第7周	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

[0918] 实施例3: 另外的Pn-33F eTEC缀合物的制备

[0919] 使用实施例2中描述的方法产生了另外的Pn-33F eTEC缀合物。这些另外批次的Pn-33F eTEC糖缀合物的反应参数和表征数据在表3中给出。

[0920] 表3. 另外的Pn33F eTEC缀合物的实验参数和表征数据

缀合物批次	33F-8 H	33F-9I	33F-1 0J	33F-1 1K	33F-1 2L	33F-1 3M	33F-1 4N	33F-1 5O	33F-1 6P
活化水平 (硫醇的 mol 数/多糖的 mol 数)	0.22	0.11	0.11	0.13	0.14	0.13	0.06	0.13	0.11
糖/蛋白(输入)比例	0.75	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
糖产率 (%)	78%	88%	89%	67%	69%	86%	81%	91%	88%
糖/蛋白比例	1.0	2.2	2.1	1.4	1.4	1.4	2.2	1.9	1.9
游离糖	< 1%	6.8%	5.9%	2.3%	3.6%	LOQ	8.2%	3.6%	6.6%
通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/ CMC	6.6/ LOQ	14.2/ 2.1	15.4/ 2.1	5.5/ 1	5.4/ 1.1	NA/ LOQ	1.7/ 1.2	4.1/ 2.2	2.2/ 1.2
%Kd (≤ 0.3)	69%	N/A	N/A	N/A	N/A	88%	87%	87%	85%
乙酰化水平(乙酰 mol 数/多糖 mol 数)	0.86	0.93	0.87	1.01	0.99	0.71	0.78	0.8	0.82

[0922] LOQ=定量极限;N/A=不可提供

[0923] 如上文以及表3中所述,使用上文的eTEC缀合获得了若干Pn-33F缀合物。eTEC化学使得可以制备具有高产率、低%的游离糖和高缀合度(缀合的赖氨酸)的缀合物。另外,使用eTEC缀合方法可以保持超过80%的乙酰基功能性。

[0924] 实施例4:Pn-33F eTEC糖缀合物稳定性的评估:%游离糖趋势

[0925] 将缀合物批次33F-2B的试样(参见表1)分配至聚丙烯管中并分别储存在4°C、25°C、和37°C,以及监测%游离糖的趋势。数据(%的游离糖)显示在表4中。如此表中所示,%游离糖没有显著的变化。

[0926] 表4.在4°C、25°C和37°C Pn-33F eTEC糖缀合物的%游离糖稳定性

Lot#	游离糖(%)						
	时间						
[0927] 33F-2B	0	1wk	3wk	1M	2M	3M	6M
	4°C						
	7.7	N/A	8.3	N/A	9.7	11.2	13
	25°C						
	7.7	N/A	10.8	N/A	11.8	N/A	N/A
	37°C						
	7.7	12.1	N/A	13.4	N/A	N/A	N/A

[0928] wk=周;M=月;N/A=不可提供

[0929] 另一缀合物批次(批次33F-3C)的加速稳定性也在37°C进行了达1个月。如表5中所示,%游离糖在37°C下1个月没有显著的变化。

[0930] 表5.Pn-33F eTEC糖缀合物在37°C的%游离糖稳定性

Lot#	游离糖(%)				
	时间				
[0931] 33F-3C	0	1天	1wk	2wk	1M
	37°C				
	4.4	5.9	6.4	7.1	7.2

[0932] 为了进一步确定eTEC缀合物的稳定性,将储存在4°C的另外缀合物批次(33F-3C和33F-5E(参见表1))监测了大约一年,以监测%游离糖的潜在趋势。如表6中所示,对于储存在4°C的缀合物长达大约一年的延长时间里%的游离糖水平没有显著的变化。

[0933] 表6.Pn-33F eTEC糖缀合物在4°C的%游离糖稳定性结果

Lot#	游离糖(%)					
	时间					
[0934]	0	3M	4M	12M	14M	
	4°C					
	33F-3C	4.4	N/A	5.3	N/A	7.6
	33F-5E	7.3	6.3	N/A	7.4	N/A

[0935] M=月;N/A=不可提供

[0936] 在各个温度监测的游离糖趋势(实时的以及加速的)证明了由33F eTEC化学产生的血清型33F缀合物稳定且没有可注意到的降解。

[0937] 实施例5:Pn-8至CRM₁₉₇缀合物的制备

[0938] Pn-8 RAC/DMSO糖缀合物的制备

[0939] 将冷冻的多糖解冻并转移至反应容器。将2M乙酸和WFI (注射用水) 添加至多糖溶液, 以实现约2.5g/L的最终多糖浓度以及0.2M的乙酸浓度。

[0940] 多糖的水解

[0941] 天然多糖在活化之前是经化学水解的。将经吸湿的多糖溶液加热至70°C, 并继而保持在此温度3.5小时。

[0942] 多糖的氧化

[0943] 通过添加高碘酸钠溶液起始了多糖的氧化并将反应在23°C保持进行20小时。

[0944] 活化的多糖的纯化

[0945] 通过超滤盒将所述活化的多糖浓缩。针对20倍通过体积的WFI进行了渗滤。

[0946] 冻干

[0947] 将所述活化的多糖与蔗糖混合成每克活化多糖25克蔗糖的比例。将含有所述活化的糖和蔗糖的瓶子在乙醇中外壳冷冻并冻干。

[0948] 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇并封端

[0949] 在DMSO中将冻干的活化多糖重溶为2mg/mL。将DMSO添加至冻干CRM₁₉₇进行重溶。将重溶的CRM₁₉₇添加至重溶的活化多糖。继而通过将氰基硼氢化钠添加至反应混合物来起始缀合, 并在23°C温育24小时。通过添加2MEq的硼氢化钠来将缀合反应终止。此封端反应在23°C进行3小时。

[0950] 缀合物的纯化

[0951] 继而将缀合物溶液稀释至5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH 6.0) 中, 过滤, 用300K纤维素膜浓缩至2-4g/L, 并针对5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH6.0) 进行了第一阶段的渗滤。通过用5mM琥珀酸盐-0.9%盐水, pH 6.0缓冲液渗滤来完成最终的纯化步骤。在完成渗滤之后, 通过0.22µm过滤器将纯化的缀合物转移至收集罐。

[0952] 单价散装 (bulk) 缀合物的稀释

[0953] 用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水 (pH 6) 将缀合物进一步稀释, 至0.5mg/mL的目标糖浓度。进行最终的0.22µm过滤步骤, 以制备用于制剂的单价散装缀合物 (MBC) 产物。

[0954] 使用上文所述方法通过改变不同的参数 (例如, 糖-蛋白输入比例、反应浓度和氰基硼氢化钠的Meq) 获得了若干缀合物。代表性的CRM₁₉₇ Pn-8糖缀合物的表征在表7中给出。

[0955] 表7. Pn8-CRM₁₉₇缀合物的表征

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
通过 MALLS 的活化糖 MW (Kda)	267	270	352	65	233	340	113	250	230
糖/蛋白比例	0.81	0.84	0.5	2.7	1.15	1.0	0.81	0.64	0.42
通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	12200	8670	3460	3379	4748	4255	5470	9924	6787

[0957] 在标准条件下在小鼠中确定了血清型8-CRM₁₉₇缀合物在小鼠中的调理吞噬活性 (OPA) 效价 (类似于下文所描述的用于10A和22F缀合物的OPA过程)。四周不同剂量的OPA效

价(几何平均效价(GMT),95%置信区间(CI))在表8和9(两个分别的实验)中示出,证明血清型8缀合物(实施例1-9;也参见表7中这些缀合物的表征数据)在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。

[0958] 如表8中所示,显示出血清型8缀合物具有显著更高的抗体效价(与具有不佳抗体效价的对照未缀合多糖相比)。

[0959] 表8. 血清型8-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

样品编号	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
1	17 (10, 30)	88 (47, 165)	1344 (896, 2016)
2	7 (4, 11)	184 (87, 387)	1934 (1313, 2847)
3	4 (4, 4)	17 (9, 30)	779 (345, 1757)
4	5 (4, 7)	74 (41, 136)	558 (311, 1001)
未缀合的 PS			13 (3, 55)

[0961] 表9. 血清型8-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

样品编号	OPA GMT (95% CI)	
	0.001 μ g	0.01 μ g
5	8 (5, 12)	322 (208, 498)
6	12 (8, 19)	264 (129, 537)
7	12 (7, 21)	521 (366, 743)
8	19 (10, 38)	404 (238, 687)
9	33 (14, 80)	686 (380, 1237)
2	13 (7, 23)	177 (94, 336)

[0963] 由上文还原胺化过程制备的缀合物所产生的整体数据证明了,其可以制备具有良好缀合产率、低%游离糖以及良好稳定性的缀合物。另外,所制备的缀合物在鼠免疫原性模型中引出了良好的OPA效价。

[0964] 实施例6: 血清型10A多糖-CRM₁₉₇缀合物的制备

[0965] 分离的肺炎链球菌血清型10A多糖的制备

[0966] 血清型10A荚膜多糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程而直接得自细菌(参见例如美国专利申请公开号2006/0228380、2006/0228381、2007/0184071、2007/0184072、2007/0231340、和2008/0102498以及WO 2008/118752中公开的方法)。肺炎链球菌血清型10A在种子瓶中生长,并继而被转移至种子发酵罐。一旦达到目标光密度,将细胞转移至生产发酵罐。通过添加N-月桂酰肌氨酸将发酵液灭活并通过超滤和渗滤来纯化。

[0967] 分离的肺炎链球菌血清型10A荚膜多糖的氧化

[0968] 将计算的体积的0.1M磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 和注射用水 (WFI) 添加至多糖溶液, 以实现2.5g/L的最终多糖浓度以及25mM磷酸钾缓冲液的最终浓度 (如果所需的pH被调节至大约6.0)。继而将稀释的多糖冷却至5°C。通过添加0.25摩尔当量 (MEq) 的高碘酸钠溶液来起始氧化。氧化反应时间为在5°C大约4小时。用1MEq的2,3-丁二醇在5°C连续搅拌1-2小时来使氧化反应猝灭。

[0969] 在达到反应时间之后,使用30K MWC0 Millipore超滤盒将所述活化的多糖浓缩。继而针对20倍的通过体积的WFI进行渗滤。将纯化的活化多糖储存在5°C。通过 (i) SEC-MALLS的分子量和 (ii) 氧化度等等来对纯化的活化多糖进行了表征。

[0970] 活化的肺炎链球菌血清型10A多糖于CRM197的缀合

[0971] 缀合过程由以下步骤组成:

[0972] a. 与蔗糖赋形剂混合,并冻干;

[0973] b. 冻干多糖和CRM197的重溶;

[0974] c. 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇并封端;和

[0975] d. 缀合物的纯化

[0976] a. 与蔗糖混合以每克活化的多糖25g蔗糖的比例将所述活化的多糖与蔗糖混合。继而将该瓶混合的混合物冻干。在冻干之后,将含有冻干的活化多糖的瓶储存在-20°C。

[0977] b. 冻干的活化多糖和CRM₁₉₇蛋白的重溶

[0978] 将冻干的活化多糖在无水二甲基亚砷 (DMSO) 中重溶。在多糖完全溶解后,将相同量的DMSO添加至计算好的CRM₁₉₇进行重溶。

[0979] c. 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇并封端

[0980] 在缀合反应器中将重溶的CRM₁₉₇ (DMSO中) 添加至重溶的活化多糖。最终的多糖浓度为1g/L。通过添加1.2MEq的氰基硼氢化钠至反应混合物来进行缀合。将反应在23°C温育24小时。通过添加2MEq的硼氢化钠来完成缀合反应的终止。封端反应在23°C温育3小时。

[0981] 通过添加2MEq的硼氢化钠来完成缀合反应的终止。此封端反应在23°C进行3小时。

[0982] d. 缀合物的纯化

[0983] 继而将缀合物溶液稀释至5× (体积) 冷却的5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH 6.0), 并使用5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH6.0) 进行20×的渗滤。在起始的渗滤完成后,将缀合物滞留物转移穿过0.22μm的过滤器。用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水 (pH 6) 将缀合物进一步稀释,并在最终的0.22μm过滤步骤后将其储存在2-8°C。

[0984] 使用上文所述方法通过改变不同的参数 (例如,糖-蛋白输入比例、反应浓度和氰基硼氢化钠的Meq) 获得了若干缀合物。由上文所述化学使得产生了血清型10A缀合物,在各个温度监测的游离糖趋势 (实时的以及加速的) 证明了其稳定且没有可注意的降解。代表性的CRM₁₉₇ Pn-10A糖缀合物的表征在表10中给出。

[0985] 表10. Pn-10A-CRM₁₉₇缀合物的表征

[0986]

缀合物编号	1	2	3	4	5	6
DO	12.2	19.5	5.2	10.3	10.8	10.5
活化的糖MW, Kda	191	240	80	170	170	170
输入比例	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1

%产率	56	28.5	65	82	73	66
%游离糖	6.8	10.0	6.7	6.8	6.4	9.7
缀合物MW, Kda	3838	5810	4630	4034	3463	5540
糖/蛋白比例	0.82	0.88	0.85	1.1	1.2	1.0
Lys修饰AAA	7.4	3.7	13.1	6.9	6.7	6.1

[0987] 在标准条件下确定了血清型10A-CRM197缀合物在小鼠中的调理吞噬活性(OPA)效价。在第0周经皮下途径用0.001 μ g、0.01 μ g、或0.1 μ g的测试缀合物来免疫多组30只6-7周大的雌性Swiss Webster小鼠。在第3周用相同剂量的缀合物对小鼠进行加强免疫,并在第4周取血。在第4周血清样品上进行了血清型特异性OPA。

[0988] 调理吞噬活性(OPA)测定法用于测量特异于肺炎链球菌血清型10A的鼠血清中的功能性抗体。将测试血清设定于测定反应中,其中测量荚膜多糖特异性的免疫球蛋白调理细菌、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌的能力。所述OPA效价定义为导致细菌计数相对于无测试血清的对照孔降低50%的稀释的倒数。所述OPA效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[0989] OPA过程是基于Hu等人(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295中所述的方法,外加以下修改。测试血清经2.5倍系列稀释并被加入到微量滴定测定平板。活的血清型10A目标菌株被添加至孔并将平板在37 $^{\circ}$ C摇动30分钟。将分化的HL-60细胞(巨噬细胞)和幼兔血清(3-4周大, PEL-FREEZ[®], 12.5%终浓度)添加至孔,并将平板在37 $^{\circ}$ C摇动60分钟。为了使反应终止,将80 μ L的0.9%NaCl添加至所有孔,混合,并将10 μ L的试样转移至含有200 μ L水的MULTISCREEN[®] HTS HV过滤器平板(MILLIPORE[®])的孔中。将液体在真空下过滤穿过平板,并将150 μ L的HYSOY[®]培养基添加至每个孔并过滤。继而将过滤平板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂温育过夜并接着与Destain溶液混合(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。接着将平板用考马斯亮蓝染色并脱色一次。将菌落显像并在Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT[®] Analyzer上计数。将原始菌落计数用于作杀伤曲线并计算OPA效价。

[0990] 四周不同剂量的OPA效价(几何平均效价(GMT) 95%置信区间(CI))在表11中示出,证明了血清型10A缀合物(实施例1-3;也参见表10中这些缀合物的表征数据)在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。如表11中所示,显示出血清型10A缀合物与对照未缀合多糖相比(具有不良的OPA应答),具有显著更高的OPA效价。

[0991] 表11. 血清型10A-CRM197缀合物的免疫原性

样品编号	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
1	858 (556, 1324)	1015 (610, 1691)	4461 (3065, 6494)
2	1411 (737, 2703)	796 (460, 1378)	2873 (1768, 4842)
3	322 (180, 574)	1062 (528, 2135)	2618 (1415, 4842)
未缀合的 PS			602 (193, 1882)

[0992]

[0993] 实施例7:Pn血清型-12F使用TEMPO/NCS的缀合

[0994] 为了改善血清型12F-CRM₁₉₇糖缀合物的稳定性,探索了另外的化学,其中使用2,2,6,6-四甲基-1-吡啶基氧自由基(TEMPO)和N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)作为共氧化剂,来将伯醇氧化成醛基。GC/MS分析显示氧化的位点与高碘酸盐-介导的氧化不同。在TEMPO-NCS氧化的情形中, 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4)。如本文进一步详细描述,TEMPO以催化量使用(≤ 0.1 摩尔当量)并且通过改变所使用的NCS的量来实现期望的氧化度(DO)。随后获得了若干缀合物并进行了表征。总的来说,血清型12F糖缀合物的产生在若干个阶段进行,如下:

[0995] a) 血清型12F多糖水解为分子量50Kda至500Kda

[0996] b) 用TEMPO/NCS活化血清型12F多糖;

[0997] c) 纯化所述活化的多糖;

[0998] d) 将活化的血清型12F缀合至CRM₁₉₇蛋白;和

[0999] e) 纯化血清型12F-CRM₁₉₇缀合物。

[1000] 血清型12F的水解和氧化

[1001] 多糖的水解通常在酸性条件下加热进行,以获得在期望范围100Kda至350Kda内的平均分子量。典型的实验描述如下。

[1002] 水解

[1003] 将血清型12F多糖溶液添加至封套的反应容器。向其中加入所需体积的0.30M乙酸和注射用水(WFI)以保持 ~ 0.1 M的乙酸浓度。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提高至 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 。将反应混合物在 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 搅拌90-120分钟。将反应混合物冷却至 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 并通过加入1M NaOH溶液来进行中和(pH 7.0)。通过针对WFI使用30K MWC膜超滤/渗滤来将经水解的多糖纯化。将溶液经 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤并储存在2至 8°C 直至氧化。通过SEC-MALLS来分析经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。

[1004] 部分氧化

[1005] 在一个实验中,使用微射流匀浆机通过压力匀浆来对血清型12F多糖进行机械调整大小,以将分子量降低至大约100Kda至500Kda。将经调整大小的多糖以 4.0mg/mL 的浓度添加至反应容器,并与碳酸氢盐/碳酸盐缓冲液($0.5\text{M NaHCO}_3/0.05\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液,pH 8.6)以1:1v/v的比例混合。向经过搅拌的混合物加入 $\leq 0.1\text{mol}$ 当量的TEMPO。通过加入 0.6 至 1.0mol 当量的NCS来起始反应。将反应混合物在室温搅拌2小时,之后通过渗滤(其中以WFI使用30K超滤膜)纯化所述活化的多糖。收集纯化的多糖并通过醛(使用3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脎(MBTH)测定)和多糖(使用蒽酮测定)的定量测量,来确定氧化度(DO)。

[1006] 在另一实验里,所述血清型12F多糖经水解以将分子量降低至大约100Kda至500Kda的分子量。将血清型12F多糖添加至反应容器并与 $0.5\text{M NaHCO}_3/0.05\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液(pH 8.6)以1:1v/v的比例混合。向经过搅拌的混合物加入 $0.6-1.0$ 摩尔当量的NCS(溶于WFI)。通过加入大约 0.1 摩尔当量TEMPO(溶于WFI)来起始活化。将反应混合物在室温搅拌2小时,之后通过渗滤(其中以WFI使用30K超滤膜)纯化所述活化的多糖。将纯化的活化的多糖经 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器过滤并储存在 4°C 待用。

[1007] 在pH 6.5、7.0、7.5和8.0的磷酸钠缓冲液中也成功地进行了TEMPO/NCS介导的氧

化。在一些活化实验中,使用伯醇如正丙醇来使试剂猝灭,以避免糖过度氧化。在另一组实验中,经化学水解的多糖经直接氧化,而没有超滤/渗滤纯化步骤。

[1008] 血清型12F经氧化的多糖的缀合

[1009] 在一个实验中,将所述纯化的经氧化的血清型12F多糖添加至反应容器,随后添加0.5M磷酸钠缓冲液(pH 6.5)至0.1M的最终缓冲液浓度。向此溶液加入此前冻干的CRM₁₉₇并彻底混合以获得均质化的溶液。用稀释的HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。随后加入1.5摩尔当量NaCNBH₃。将反应混合物在室温(23°C)搅拌24小时以及在37°C搅拌2.5天。继而用1X0.9%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“封端”。封端反应时间为3小时。

[1010] 在另一实验里,经纯化的活化的血清型12F添加至反应容器,随后添加0.5M磷酸钠缓冲液(pH 6.5)至0.1M的最终缓冲液浓度。向此溶液加入此前冻干的CRM₁₉₇并彻底混合以获得均质化的溶液。用稀释的HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。随后加入3摩尔当量的NaCNBH₃。将反应混合物在23°C搅拌24小时以及在37°C搅拌48小时。继而用1X 0.9%盐水稀释反应混合物并搅拌,用1摩尔当量的硼氢化钠NaBH₄将未反应的醛基“封端”。封端反应时间为3小时。

[1011] 在另一实验里,将经纯化的活化的血清型12F添加至反应容器并与CRM₁₉₇溶液混合。将混合物冻干并将粉末溶解在0.1M的磷酸钠缓冲液(pH 6.8)中达到5mg/mL的最终糖浓度。如果需要的话,用稀释的HCl或1N NaOH溶液将pH调节至6.8。随后加入3摩尔当量的NaCNBH₃。将反应混合物在23°C搅拌24小时以及在37°C搅拌48小时。继而用1X 0.9%盐水稀释反应混合物,用1摩尔当量的硼氢化钠NaBH₄将未反应的醛基“封端”。封端反应时间为3小时。

[1012] 缀合物纯化

[1013] 用5μm过滤器将封端的反应混合物过滤,并继而用100K MWC0超滤膜进行纯化。首先用10mM琥珀酸盐/0.9%盐水,pH 6.0缓冲液将缀合物渗滤。继而将纯化的缀合物经0.45/0.22μm过滤器过滤,以获得散装缀合物。

[1014] 氧化程度

[1015] 使用TEMPO/NCS体系实现了血清型12F多糖中伯醇的成功氧化。通过调节NCS共氧化剂的量,而将经水解的血清型12F多糖氧化至变化的氧化度(DO)水平。通过变化NCS的量而对DO的影响(使用不同的多糖批次和分子量)在图9中示出。通常氧化反应在2小时内完成,因为2小时后DO没有观察到显著的变化。

[1016] 使用TEMPO/NCS氧化的多糖生成并表征了若干血清型12F缀合物。结果总结于表12。

[1017] 表12.肺炎球菌血清型12F-CRM₁₉₇缀合物

[1018]	缀合物批次	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
	氧化时间 (hr)	2	2	4	2	2	2
	氧化度 (DO)	12.0	6.0	9.6	12.0	11.5	11.5
	%活化的糖产率	80	71	70	89	86	86
	通过 MALLS 的活化糖的 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/蛋白比例	1.2	0.9	1.0	1.1	1.4	0.9
	%的游离糖	24	10	17	20	23	14
	通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

[1019] 实施例8: Pn-血清型12F-CRM₁₉₇缀合物使用TEMPO/NCS氧化方法的免疫原性

[1020] 在标准条件下确定了小鼠中血清型12F-CRM₁₉₇缀合物的调理吞噬活性(OPA)效价。第4周和第7周的OPA效价(几何平均效价(GMT) 95%置信区间(CI))在表13中示出,证明了血清型12F-CRM₁₉₇缀合物(批次12F-97B;也参见表12中此缀合物的表征数据)在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。由TEMPO-NCS所产生的缀合物比高碘酸盐氧化所产生的对照缀合物(171B)更具有免疫原性。

[1021] 表13. 血清型12F-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

[1022]	缀合物样品/剂量	0.001μg	0.01μg	0.1μg
	高碘酸盐氧化(171B)对照	4	16	172
	TEMPO/NCS氧化(12F-97B)	40	417	880

[1023] 实施例9: Pn-12F糖缀合物稳定性的评估

[1024] 由高碘酸盐氧化产生的缀合物对比由TEMPO/NCS氧化产生的缀合物(在25°C)的稳定性比较(参见图10),证明了由Pn-12F多糖的氧化产生的缀合物相对更稳定。如图10中所示,由Pn-12F多糖的高碘酸盐氧化(25°C)所产生的糖缀合物中观察到游离糖随着时间而增加。相反,用Pn-12F多糖的TEMPO/NCS氧化所制备的糖缀合物,在类似条件下游离糖没有显示出明显的趋势。

[1025] 实施例10: 血清型15B多糖-CRM₁₉₇缀合物的制备

[1026] 分离的肺炎链球菌血清型15B多糖的制备

[1027] 血清型15B荚膜多糖可以使用本领域技术人员已知的分离过程直接从细菌获得。使肺炎链球菌血清型15B在种子瓶中生长,并继而转移至种子发酵罐。一旦达到了目标光密度,将细胞转移至生产发酵罐。通过加入N-月桂酰肌氨酸将发酵液灭活并通过超滤和渗滤来纯化。

[1028] 使用PANDA2K[®]匀浆机(GEA Niro Soavi, Parma, Italy)通过高压均质化来将纯化的肺炎链球菌血清型15B多糖改变大小,以产生分离的肺炎链球菌血清型15B多糖。

[1029] 优选地,由上述方法获得的分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖,其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐,并且具有50Kda至500Kda、优选150Kda至350Kda的分子量。

[1030] 分离的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的氧化

[1031] 通过顺次加入计算好的量的500mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)和WFI,以给出2.0g/L的最终多糖浓度,从而在100mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中进行多糖的氧化。如果需要的话,将反应pH调节至大约pH 6.0。在pH调节之后,将反应温度调节至23°C。通过添加大约0.25摩尔当量高碘酸钠来起始氧化。氧化反应在23°C大约16小时期间进行。

[1032] 用10K MWC0超滤盒进行所述活化的多糖浓缩和渗滤。针对20倍的通过体积的WFI进行渗滤。继而将纯化的活化多糖储存在5°C。通过(i)由比色测定确定的糖浓度;(ii)由比色测定确定的醛浓度;(iii)氧化度(iv)由SEC-MALLS确定的分子量和(v)O-乙酰基和甘油的存在等来对纯化的活化多糖进行了表征。

[1033] SEC-MALLS被用于确定多糖的以及多糖-蛋白质缀合物的分子量。SEC用于通过流体力学体积来分离多糖。折射率(RI)和多角度激光光散射(MALLS)检测器被用于确定分子量。当光与物质相互作用时,其会散射并且散射的光的量与物质的浓度、 dn/dc 的平方(比折射率增长)、以及摩尔质量相关。基于从MALLS探测器读取的散射光信号以及来自RI探测器的浓度信号计算分子量的测定。

[1034] 所述活化的多糖的氧化度($DO = \text{糖重复单元的摩尔数} / \text{醛的摩尔数}$)如下进行测定:

[1035] 糖重复单元的摩尔数通过各种比色方法来确定,例如使用蒽酮法。首先通过硫酸和热的作用而使多糖断裂成单糖。蒽酮试剂与六糖反应以形成黄绿色的复合物,其光吸收通过分光光度计在625nm读取。在该测定的范围内,光吸收与所存在的六糖的量直接成比例。

[1036] 使用MBTH比色法,也同时确定了醛的摩尔数。MBTH测定涉及醛基(来自给定样品)与3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒(MBTH测定试剂)反应而形成嗪化合物。过量的3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒氧化形成活性阳离子。活性阳离子与嗪反应形成蓝色发色团。所形成的发色团继而在650nm进行分光光度计读数。

[1037] 优选地,由上述方法获得的所述活化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖,其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸酯/盐,并且具有50Kda至500Kda、优选150Kda至350Kda的分子量。

[1038] 活化的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖与CRM197的缀合

[1039] 缀合过程由以下步骤组成:

[1040] a) 与蔗糖赋形剂混合并冻干;

[1041] b) 冻干的活化多糖和CRM₁₉₇的重溶;

[1042] c) 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇并封端;和

[1043] d) 缀合物的纯化

[1044] a) 与蔗糖赋形剂混合,并冻干

[1045] 所述活化的多糖以每克活化的多糖25克蔗糖的比例与蔗糖混合。继而将该瓶混合的混合物冻干。冻干之后,将含有冻干的活化多糖的瓶储存在-20°C。将计算好的量的CRM₁₉₇蛋白分别外壳冷冻并冻干。冻干的CRM₁₉₇储存在-20°C。

[1046] b) 冻干的活化多糖和CRM₁₉₇蛋白的重溶

[1047] 将冻干的活化多糖在无水二甲基亚砜(DMSO)中重溶。在完成多糖的溶解之后,将

等量的无水DMSO添加至冻干的CRM₁₉₇进行重溶。

[1048] c) 缀合和封端

[1049] 重溶的活化多糖与重溶的CRM₁₉₇在反应容器中组合(输入比例0.8:1),随后彻底混合以获得清澈的溶液(在与氰基硼氢化钠缀合之前)。反应溶液中的最终多糖浓度为大约1g/L。通过加入1.0-1.5MEq的氰基硼氢化钠至反应混合物来起始缀合,并将其在23℃温育40-48小时。通过加入2MEq的硼氢化钠(NaBH₄)以将未反应的醛基封端来使缀合反应终止。此封端反应在23℃持续3小时。

[1050] d) 缀合物的纯化

[1051] 用冷却的5mM琥珀酸盐-0.9%盐水(pH 6.0)将缀合物溶液稀释为1:10,以备用于通过使用100-300K MWCO膜的切向流过滤进行纯化。将稀释的缀合物溶液穿过5μm过滤器,并使用5mM琥珀酸盐-0.9%盐水(pH 6.0)作为介质进行了渗滤。在完成渗滤之后,将缀合物滞留物转移穿过0.22μm过滤器。

[1052] 用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水(pH 6)将缀合物进一步稀释至大约0.5mg/mL的目标糖浓度。完成最终的0.22μm过滤步骤以获得糖缀合物。

[1053] 优选地,由上述方法获得的缀合物其每mM的血清型15B荚膜多糖包含至少0.6mM的乙酸盐/盐,并具有3,000Kda至20,000Kda的分子量以具有2至6的缀合度。

[1054] 实施例11:包含共价连接至CRM₁₉₇的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖的糖缀合物的表征

[1055] 通过实施例10的过程制备缀合物1。用类似的过程但是不同量的氧化剂制备了缀合物2和3。缀合物4通过类似的过程制备,除了其中纯化的血清型15B荚膜多糖未经大小调整并被活化为较低的DO(较高的氧化水平)并且缀合在水成介质中进行。缀合物5通过类似的过程制备,除了其中纯化的血清型15B荚膜多糖是通过化学水解进行大小调整的并且缀合在水成介质中进行。缀合物6和7通过类似的过程制备,除了其中纯化的血清型15B荚膜多糖未经大小调整。

[1056] 所获得的缀合物经表征并且结果总结于表14。

[1057] 表14.肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖-CRM₁₉₇缀合物

缀合物	1	2	3	4	5	6	7
多糖	大小调整的	大小调整的	大小调整的	天然的	水解的	天然的	天然的
O-乙酰基; 活化的多糖 (μmol 乙酸酯/ μmol poly)	0.69	0.69	0.69	1.01	0.66	0.76	N/A
溶剂介质	DMSO	DMSO	DMSO	水成	水成	DMSO	DMSO
活化的多糖DO	11.4	5.8	9.7	4.8	8.8	5	12
活化的多糖MW	196 Kda	218 Kda	235 Kda	435 Kda	270 Kda	431 Kda	460 Kda
产率(%)	87.2	64	63.7	96.2	78.8	24.2	26.2
糖/蛋白比例	0.68	0.65	0.71	1.22	1.29	0.9	1.5
游离糖(%)	< 5	< 5	6.1	18.1	14.2	8.8	18
缀合物MW, SEC-MALLS (Kda)	6190	7090	7937	1766	1029	6293	4466
O-乙酰化,缀合物(μmol 乙酸酯/ μmol poly)	0.68	0.7	0.68	0.61	0.44	0.85	N/A
< 0.3 Kd (%), SEC	N/A	73	N/A	N/A	62	N/A	N/A
缀合度 (AAA); 修饰的 Lys	3.7	3.9	4.1	N/A	3.4	N/A	N/A
缀合物中保留的 % O-乙酰基	99%	100%	99.5%	60%	67%	100%	N/A

[1058] N/A=不可提供

[1059] 通过使用氢氧化铝凝胶来结合蛋白以及共价结合的糖以进行离心去除的过程,测量游离多糖的百分比。将样品与磷酸盐缓冲氢氧化铝凝胶混合并离心。结合的糖与凝胶一起沉淀,而游离糖保留在上清中。通过适当的比色测定法来将所得的上清与对照样品进行定量,以确定游离糖的百分比,并确认充分地去除了蛋白以及回收了糖。

[1060] 对于氨基酸分析,首先使用6N盐酸(HCl)在真空和加热下(160°C 15分钟)水解,来将多糖-蛋白样品水解成其个体的组分如游离的氨基酸。在水解后,使用氨基酸分析仪来分析样品。个体氨基酸通过离子交换层析分离(使用温度和流速改变的柠檬酸钠缓冲液的梯度步骤)。分离之后,使用柱后茚三酮偶联检测系统来定量确定了每种氨基酸残基的量。在此系统中,在柱后反应器系统内将茚三酮与柱子洗脱物混合,并使混合物穿入光度计。茚三酮与洗脱的氨基酸的额反应产生了在大约570nm处吸收的紫色化合物。T此光吸收是所存在的 α -氨基的量的线性对应(函数),并且此反应提供了对具有 α -氨基的所有有机化合物的定量比色测定。在与亚氨基酸如脯氨酸和羟基脯氨酸(不具有游离的氨基)的反应中,生成亮黄色的化合物并且在440nm处监测。使用570nm和440nm波长的输出来计算每种氨基酸的峰面积。

[1061] 产率计算如下:(缀合物中多糖的量 \times 100)/活化的多糖的量。

[1062] 使用水成介质产生的缀合物(4和5)证明了O-乙酰基水平的显著降低。在DMSO溶剂中产生的缀合物(使用天然多糖无MW大小调整(6和7)),并未证明O-乙酰基水平的降低。然而,在很差的过滤能力特征之外,缀合物的产率很差。在DMSO中产生的缀合物(使用经高压均质化大小调整的多糖(1、2和3)),具有高产率以及较好的过滤能力特征(对O-乙酰基水平的显著保持)。这些缀合物也具有很低水平的游离多糖。

[1063] 实施例12:使用Pn-血清型15B-CRM₁₉₇缀合物的调理吞噬活性(OPA)测定

[1065] 本发明肺炎链球菌血清型15B缀合物的免疫原性可以使用下文所述的OPA测定来进行评估。

[1066] 在第0周经皮下途径用0.001 μ g、0.01 μ g、或0.1 μ g的测试缀合物来免疫多组30只6-7周大的雌性Swiss Webster小鼠。在第3周用相同剂量的缀合物对小鼠进行加强免疫,并在第4周取血。在第4周血清样品上进行了血清型特异性OPA

[1067] OPA用于测量特异于肺炎链球菌血清型15B的鼠血清中的功能性抗体。将测试血清设定于测定反应中,其中测量荚膜多糖特异性的免疫球蛋白调理细菌、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌的能力。所述OPA效价定义为导致细菌计数相对于无测试血清的对照孔降低50%的稀释的倒数。所述OPA效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1068] OPA过程是基于Hu等人(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2) :287-295中所述的方法,外加以下修改。测试血清经2.5倍系列稀释并被加入到微量滴定测定平板。活的血清型15B目标菌株被添加至孔并将平板在37 $^{\circ}$ C摇动30分钟。将分化的HL-60细胞(巨噬细胞)和幼兔血清(3-4周大, PEL-FREEZ[®], 6.25%终浓度)添加至孔,并将平板在37 $^{\circ}$ C摇动45分钟。为了使反应终止,将80 μ L的0.9%NaCl添加至所有孔,混合,并将10 μ L的试样转移至含有200 μ L水的 MULTISCREEN[®] HTS HV过滤器平板 (MILLIPORE[®]) 的孔中。将液体在真空下过滤穿过平板,并将150 μ L的 HYSOY[®]培养基添加至每个孔并过滤。继而将过滤平板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂温育过夜并接着与Destain溶液混合(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。接着将平板用考马斯亮蓝染色并脱色一次。将菌落显像并在Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT[®] Analyzer上计数。将原始菌落计数用于作杀伤曲线并计算OPA效价。

[1069] 缀合物1和2的免疫原性已根据上文提到的测定进行了测试。一个另外的缀合物以及未缀合的天然的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖(未缀合的PS)也在相同的测定中进行了测试:

[1070] 通过在水成溶液中的还原胺化将天然的(也即未经大小调整的)血清型15B荚膜多糖缀合至CRM197而制备了缀合物9。

[1071] 结果在表15中示出。

[1072] 表15. 使用血清型15B-CRM₁₉₇缀合物的动物测试的OPA效价

	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
[1073] 缀合物 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
缀合物 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
缀合物 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
未缀合的 PS	-	-	698 (466, 1045)

[1074] 如上表15中所示,当施用于小鼠时,缀合物1和2产生抗体,该抗体能够调理肺炎链

球菌血清型15B、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌。另外,虽然其分子量较低,它们还展现出与未经大小调整的缀合物9相比类似水平的免疫原性。

[1075] 实施例13:血清型22F多糖-CRM197缀合物的制备

[1076] 分离的肺炎链球菌血清型22F多糖的制备

[1077] 使肺炎链球菌血清型22F在种子瓶中生长,并继而转移至种子发酵罐。一旦达到了目标光密度,将细胞转移至生产发酵罐。通过加入N-月桂酰肌氨酸将发酵液灭活并通过超滤和渗滤来纯化。

[1078] 使用PANDA 2K[®]匀浆机(GEA Niro Soavi,Parma,Italy)通过高压均质化来将纯化的肺炎链球菌血清型22F多糖改变大小,以产生分离的肺炎链球菌血清型22F多糖。

[1079] 分离的肺炎链球菌血清型22F荚膜多糖的氧化

[1080] 通过顺次加入计算好的量的500mM磷酸钾缓冲液(pH 5.8)和WFI,以给出2.0g/L的最终多糖浓度,从而在100mM磷酸钾缓冲液(pH 5.8)中进行多糖的氧化。如果需要的话,将反应pH调节至大约pH 5.8。在pH调节之后,将反应温度降低至5℃。通过添加大约0.10摩尔当量(MEq)高碘酸钠来起始氧化。目标氧化反应时间为5℃16小时。

[1081] 用2,3-丁二醇的2MEq在5℃连续搅拌下1-2小时来使氧化反应猝灭。

[1082] 用100K MWC0超滤盒进行所述活化的多糖浓缩和渗滤。针对35倍的通过体积的WFI进行渗滤。继而将纯化的活化多糖储存在5℃。通过(i)由SEC-MALLS确定的分子量;(ii)O-乙酰基的存在;以及(iii)氧化度等来对纯化的活化多糖进行了表征。

[1083] SEC-MALLS被用于确定多糖的以及多糖-蛋白质缀合物的分子量。SEC用于通过流体学体积来分离多糖。折射率(RI)和多角度激光光散射(MALLS)检测器被用于确定分子量。当光与物质相互作用时,其会散射并且散射的光的量与物质的浓度、dn/dc的平方(比折射率增长)、以及摩尔质量相关。基于从MALLS探测器读取的散射光信号以及来自RI探测器的浓度信号计算分子量的测定。

[1084] 所述活化的多糖的氧化度(DO=糖重复单元的摩尔数/醛的摩尔数)如下进行测定:

[1085] 糖重复单元的摩尔数通过各种比色方法来确定,例如使用蒽酮法。首先通过硫酸和热的作用而使多糖断裂成单糖。蒽酮试剂与六糖反应以形成黄绿色的复合物,其光吸收通过分光光度计在625nm读取。在该测定的范围内,光吸收与所存在的六糖的量直接成比例。

[1086] 使用MBTH比色法,也同时确定了醛的摩尔数。MBTH测定涉及醛基(来自给定样品)与3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脞(MBTH测定试剂)反应而形成嗪化合物。过量的3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脞氧化形成活性阳离子。活性阳离子与嗪反应形成蓝色发色团。所形成的发色团继而在650nm进行分光光度计读数。

[1087] 活化的肺炎链球菌血清型22F多糖与CRM₁₉₇的缀合

[1088] 缀合过程由以下步骤组成:

[1089] a. 与蔗糖赋形剂混合,并冻干;

[1090] b. 冻干多糖和CRM₁₉₇的重溶;

[1091] c. 活化多糖缀合至CRM₁₉₇并封端;和

[1092] d. 缀合物的纯化

[1093] a. 与蔗糖混合并冻干

[1094] 所述活化的多糖以每克活化的多糖25克蔗糖的比例与蔗糖 (50% w/v在WFI中) 混合。继而将该瓶混合的混合物冻干。冻干之后, 将含有冻干的活化多糖的瓶储存在-20°C。将计算好的量的CRM₁₉₇蛋白 (目标S/P输入比例=1) 分别外壳冷冻并冻干。冻干的CRM₁₉₇储存在-20°C。

[1095] b. 冻干的活化多糖和CRM₁₉₇蛋白的重溶

[1096] 将冻干的活化多糖在无水二甲基亚砜 (DMSO) 中重溶。在完成多糖的溶解之后, 将等量的无水DMSO添加至冻干的CRM₁₉₇进行重溶。

[1097] c. 活化多糖缀合至CRM₁₉₇并封端

[1098] 重溶的CRM₁₉₇ (DMSO中) 在反应容器中与重溶的活化多糖与组合。反应溶液中的最终多糖浓度为1g/L。通过加入1.5MEq的氰基硼氢化钠至反应混合物来起始缀合, 并将反应在23°C温育20小时。通过加入2MEq的硼氢化钠以使缀合反应终止。此封端反应在23°C持续3小时。

[1099] d. 缀合物的纯化

[1100] 用冷却的5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH 6.0) 将缀合物溶液稀释为1:5, 以备用于通过使用100-300K MWC0膜的切向流过滤进行纯化, 并使用5mM琥珀酸盐-0.9%盐水 (pH 6.0) 作为介质进行了20×渗滤。在完成渗滤之后, 将缀合物滞留物进一步稀释、经0.22μm过滤器过滤并储存在2-8°C。

[1101] 使用上文所述方法通过改变不同的参数 (例如, 糖-蛋白输入比例、反应浓度和氰基硼氢化钠的Meq) 获得了若干缀合物。代表性的CRM₁₉₇ Pn-22F糖缀合物的表征在表16中给出。

[1102] 表16. 肺炎球菌血清型22F-CRM₁₉₇缀合物

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
氧化度 (D.O)	12.6	19.5	17.2	14.0	12.4	14.9	11.1	14.6	14.4	13.7
通过 MALLS 的活化糖的 MW (Kda)	540	697	864	92	866	631	614	639	709	416
缀合物结果										
糖/蛋白比例	0.75	0.87	2	0.8	0.8	0.4	1.9	0.8	0.65	1.0
O-Ac (%)	105	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
%的游离糖	<5	2	15.5	35	<5	<5	33	<5	<5	8
通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	2787	1668	2194	1419	5039	10450	1577	3911	3734	4453

[1103] N/A=不可提供

[1105] 最终缀合物中的%O-乙酰基 (保留的) 水平是从缀合物的O-乙酰基含量 (μmol的O-乙酰基/μmol的血清型22F糖重复单元) 相对于多糖的O-乙酰基含量 (μmol的O-乙酰基/μmol的血清型22F糖重复单元) 的比例来计算的。

[1106] 上文所获得的缀合物的免疫原性可以使用下文所述的调理吞噬测定 (OPA) 来进行评估。

[1107] 在第0周经皮下途径用0.001μg、0.005μg、或0.01μg的测试缀合物来免疫多组30只6-7周大的雌性Swiss Webster小鼠。在第3周用相同剂量的缀合物对小鼠进行加强免疫, 并在第4周取血。在第4周血清样品上进行了血清型特异性OPA。

[1108] 调理吞噬活性 (OPA) 测定法用于测量特异于肺炎链球菌血清型22F的鼠血清中的功能性抗体。将测试血清设定于测定反应中,其中测量荚膜多糖特异性的免疫球蛋白调理细菌、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌的能力。所述OPA效价定义为导致细菌计数相对于无测试血清的对照孔降低50%的稀释的倒数。所述OPA效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1109] OPA过程是基于Hu等人(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2) :287-295中所述的方法,外加以下修改。测试血清经2.5倍系列稀释并被加入到微量滴定测定平板。活的血清型22F目标菌株被添加至孔并将平板在25℃摇动30分钟。将分化的HL-60细胞(巨噬细胞)和幼兔血清(3-4周大, PEL-FREEZ[®], 12.5%终浓度)添加至孔,并将平板在37℃摇动45分钟。为了使反应终止,将80μL的0.9%NaCl添加至所有孔,混合,并将10μL的试样转移至含有200μL水的MULTISCREEN[®] HTS HV过滤器平板(MILLIPORE[®])的孔中。将液体在真空下过滤穿过平板,并将150μL的HYSOY[®]培养基添加至每个孔并过滤。继而将过滤平板在37℃, 5%CO₂温育过夜并接着与Destain溶液混合(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。接着将平板用考马斯亮蓝染色并脱色一次。将菌落显像并在Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT[®] Analyzer上计数。将原始菌落计数用于作杀伤曲线并计算OPA效价。

[1110] 血清型22F-CRM₁₉₇缀合物在鼠中的调理吞噬活性 (OPA) 效价如上文所述进行确定。四周不同剂量的OPA效价(几何平均效价(GMT) 95%置信区间(CI))在表17和18中示出(两个分别的实验),证明了血清型22F缀合物(批次1-7;也参见表16中这些缀合物的表征数据)在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。

[1111] 表17. 血清型22F-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

		OPA GMT (95% CI)		
样品编号		0.001 μg	0.005 μg	0.01 μg
[1112]	1	86 (45, 165)	597 (285, 1252)	2519 (1409, 4504)
	2	98 (51, 191)	782 (410, 1492)	2236 (1319, 3790)
	3	35 (18, 69)	250 (122, 512)	509 (273, 950)

[1113] 表18. 血清型22F-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

样品编号	OPA GMT (95% CI)	
	0.001 μg	0.01 μg
4	37 (18, 76)	3383 (1911, 5987)
5	45 (20, 103)	1773 (1072, 2931)
6	235 (108, 513)	4335 (3018, 6226)
7	10 (7,13)	252 (138, 457)

[1115] 实施例14:Pn-11A至CRM₁₉₇缀合物的制备

[1116] Pn-11A RAC糖缀合物的制备

[1117] 将冷冻的经大小调整的多糖(储存于脱离子水中或25mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中)在5°C解冻。

[1118] 多糖的氧化

[1119] 通过添加500mM的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)和WFI以给出2.0g/L的最终多糖浓度,从而在100mM的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中进行多糖氧化。氧化反应在23°C进行。通过添加高碘酸钠而起始氧化。搅拌速率范围为100-140rpm。

[1120] 活化的11A多糖的纯化

[1121] 在中进行所述活化的多糖的浓缩和渗滤。针对20倍通过体积的WFI进行渗滤。在0.22 μm 过滤后,将纯化的活化多糖储存在5°C。

[1122] 缀合方法描述

[1123] 所述缀合过程由以下步骤组成:

[1124] a. CRM₁₉₇蛋白的外壳冷冻以及冻干;

[1125] b. 所述活化的多糖和CRM₁₉₇的重溶;

[1126] c. 活化的多糖缀合至CRM₁₉₇;和

[1127] d. 缀合物的纯化和稀释

[1128] a. CRM₁₉₇蛋白的外壳冷冻以及冻干

[1129] CRM₁₉₇蛋白经外壳冷冻并冻干。

[1130] b. 活化的多糖和CRM₁₉₇蛋白的重溶

[1131] 活化的多糖溶液(~10g/L)被充入反应器中,随后加入计算好的量的0.5N磷酸钠缓冲液(pH 7.2)。经搅拌,添加冻干的CRM₁₉₇并将反应混合物搅拌2-4小时以便达到CRM₁₉₇的完全溶解。

[1132] c. 缀合和封端

[1133] 通过加入氰基硼氢化物而起始缀合。将反应混合物在23°C温育72-96小时。通过加入0.5X WFI以及随后2MEq的硼氢化钠来讲缀合反应终止。将此封端反应在23°C保持3-4小时。

[1134] d. 缀合物的稀释和初步纯化

[1135] 用0.15N磷酸钠缓冲液(pH 8.0)将缀合物溶液稀释为1:5(反应体积),以备用于通过切向流过滤(TFF)来纯化。在稀释器皿中将稀释的缀合物混合并接着穿过5 μm 的过滤器。

继而将经过滤的缀合物溶液浓缩至1-2g/L。进行了两步的渗滤过程。在第一步中,用30×(渗滤体积)的0.15N磷酸钠缓冲液(pH 8.0)进行TFF,随后是20×的5mM琥珀酸盐-0.9% NaCl (pH6.0)。在初始渗滤完成后,将缀合物滞留物转移穿过0.45μm过滤器至收集罐中。

[1136] 缀合物的最终渗滤

[1137] 最终的纯化步骤是以5mM琥珀酸盐-0.9%NaCl,pH 6.0介质由再生的纤维素膜20×渗滤。

[1138] 单价散装缀合物(MBC)的稀释

[1139] 用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水(pH 6)将缀合物进一步稀释至大约0.5mg/mL的目标糖浓度。完成最终的0.22μm过滤步骤以制备单价散装缀合物(MBC)产物用于制剂。

[1140] 使用上文所述方法通过改变不同的参数(例如,糖-蛋白输入比例、反应浓度和氰基硼氢化钠的Meq)获得了若干缀合物。代表性的CRM₁₉₇ Pn-11A糖缀合物的表征在表19中给出(批次1-5)。

[1141] 使用RAC/DMSO制备Pn-11A糖缀合物

[1142] 如上文所述制备并纯化氧化多糖(参见Pn-11A RAC糖缀合物的制备)。

[1143] 在DMSO中经还原胺化缀合(RAC/DMSO)。

[1144] 11A经RAC/DMSO缀合由以下步骤组成:

[1145] a. 与蔗糖混合、外壳冷冻并冻干;

[1146] b. 冻干多糖和CRM₁₉₇的重溶;

[1147] c. 活化多糖缀合至CRM₁₉₇;和

[1148] d. 缀合物的纯化和稀释。

[1149] a. 与蔗糖混合、外壳冷冻并冻干

[1150] 从大小调整的多糖制备的活化的多糖,以每克活化的多糖25克蔗糖的比例与蔗糖(50%w/v于WFI中)混合。将组分混合并继而将该瓶混合的混合物冻干。分别将CRM₁₉₇蛋白外壳冷冻并冻干。

[1151] b. 冻干的活化多糖和CRM₁₉₇蛋白的重溶

[1152] 冻干的活化多糖以2mg/mL的浓度在DMSO中重溶。在多糖完全溶解后,将DMSO添加至冻干的CRM₁₉₇用于重溶。

[1153] c. 缀合和封端

[1154] 重溶的CRM₁₉₇(DMSO中)在缀合反应容器与重溶的活化多糖组合。反应溶液中的最终多糖浓度为1g/L。通过将氰基硼氢化物添加至反应混合物来起始缀合,并在23°C温育22小时。通过添加2MEq的硼氢化钠来终止缀合反应。将此封端反应在23°C保持3-4小时。

[1155] d. 缀合物的纯化和稀释

[1156] 使用上文所述类似的方法来将缀合物溶液纯化和稀释。

[1157] 使用上文所述方法通过改变不同的参数(例如,糖-蛋白输入比例、反应浓度和氰基硼氢化钠的Meq)获得了若干缀合物。通过上文所述方法获得的代表性CRM₁₉₇ Pn-11A糖缀合物的表征在表19中给出(批次6-8)。

[1158] 表19.肺炎球菌血清型11A-CRM₁₉₇缀合物

批次	1	2	3	4	5	6	7	8
通过MALLS的活化糖的MW (Kda)	207	129	103	199	183	232	113	113
缀合物结果								
[1159] 糖/蛋白比例	1.24	1.09	1.32	1.47	1.31	1	0.78	0.68
乙酸酯(mol/mol PS)	2.72	2.89	2.72	3.2	3.13	N/A	N/A	N/A
甘油 (mol/mol PS)*	0.62	0.68	0.75	0.51	0.41	N/A	N/A	N/A
通过 SEC-MALLS 的 MW (Kda)	3224	837	623	827	994	12200	6543	15730

[1160] N/A=不可提供

[1161] *甘油由氢氟酸(HF)从多糖释放之后,通过高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)来定量

[1162] 由上文还原胺化过程制备的缀合物所产生的整体数据证明了,其可以制备具有良好缀合产率、低%游离糖以及良好稳定性的缀合物。

[1163] 上文所获得的缀合物的免疫原性可以使用下文所述的调理吞噬测定(OPA)来进行评估。

[1164] 在第0周经皮下途径用0.001 μ g、0.005 μ g、0.01 μ g、或0.1 μ g的测试缀合物来免疫多组30只6-7周大的雌性Swiss Webster小鼠。在第3周用相同剂量的缀合物对小鼠进行加强免疫,并在第4周取血。在第4周血清样品上进行了血清型特异性OPA。

[1165] 调理吞噬活性(OPA)测定法用于测量特异于肺炎链球菌血清型11A的鼠血清中的功能性抗体。将测试血清设定于测定反应中,其中测量荚膜多糖特异性的免疫球蛋白调理细菌、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌的能力。所述OPA效价定义为导致细菌计数相对于无测试血清的对照孔降低50%的稀释的倒数。所述OPA效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1166] OPA过程是基于Hu等人(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12(2):287-295中所述的方法,外加以下修改。测试血清经2.5倍系列稀释并被加入到微量滴定测定平板。活的血清型22F目标菌株被添加至孔并将平板在25 $^{\circ}$ C摇动30分钟。将分化的HL-60细胞(巨噬细胞)和幼兔血清(3-4周大, PEL-FREEZ[®], 12.5%终浓度)添加至孔,并将平板在37 $^{\circ}$ C摇动60分钟。为了使反应终止,将80 μ L的0.9%NaCl添加至所有孔,混合,并将10 μ L的试样转移至含有200 μ L水的MULTISCREEN[®] HTS HV过滤器平板(MILLIPORE[®])的孔中。将液体在真空下过滤穿过平板,并将150 μ L的HYSOY[®]培养基添加至每个孔并过滤。继而将过滤平板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂温育过夜并接着与Destain溶液混合(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。接着将平板用考马斯亮蓝染色并脱色一次。将菌落显像并在Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT[®] Analyzer上计数。将原始菌落计数用于作杀伤曲线并计算OPA效价。

[1167] 血清型11A-CRM₁₉₇缀合物在小鼠中的调理吞噬活性(OPA)效价如上文所述进行确定。四周不同剂量的OPA效价(几何平均效价(GMT) 95%置信区间(CI))在表20中示出,证明了血清型11A缀合物(批次2-4和8;也参见表19中这些缀合物的表征数据)在鼠免疫原性模型中引出了OPA效价。

[1168] 表20. 血清型11A-CRM₁₉₇缀合物的免疫原性

批次编号	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
2	326 (260, 408)	1391 (794, 2437)	4366 (3063, 6223)
3	389 (316, 478)	1113 (690, 1795)	5527 (3698, 8260)
4	192 (149, 248)	926 (661, 1298)	2800 (1975, 3970)
8	303 (224, 411)	1099 (624, 1935)	3861 (2629, 5669)

[1170] 实施例15:16-价肺炎球菌缀合物疫苗的制剂

[1171] 配制了16-价的缀合物组合物,其包含来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物(16vPnC),全都独立地缀合至CRM₁₉₇。

[1172] 来自血清型15B、22F和33F的肺炎链球菌糖缀合物如上文所公开的那样产生,而来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的肺炎链球菌糖缀合物如W0 2006/110381中公开的那样产生。

[1173] 基于批次体积和散装糖浓度计算了散装浓缩物所需的体积。通过添加所需体积的NaCl/琥珀酸盐缓冲液(pH 5.8)以获得琥珀酸盐5.0mM和150mM NaCl的最终目标缓冲液浓度,从而制备了所配制的散装疫苗。将最终浓度0.02%的聚山梨醇酯80添加至16种肺炎球菌缀合物。将制剂经0.2 μ m Millipore PES膜过滤,随后添加AlPO₄。将制剂混合以使得可以结合并且实现均质性。

[1174] 继而将制剂填充至玻璃注射器,以递送0.5mL的剂量体积。

[1175] 最终的剂量形式由以下组成(对于0.5mL的剂量):来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物(独立地缀合至CRM₁₉₇)每种2.2 μ g、来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物4.4 μ g、5mM琥珀酸盐缓冲液pH 5.8、0.02PS80、150mM NaCl和0.25mg/mL铝(作为AlPO₄)。对于0.5mL的剂量,CRM₁₉₇的含量为大约38 μ g。

[1176] 实施例16:20-价肺炎球菌缀合物疫苗的配制

[1177] 配制了20-价的缀合物组合物,其包含来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物(20vPnC),全都独立地缀合至CRM₁₉₇。

[1178] 来自血清型8、10A、11A、12F、15B、22F和33F的肺炎链球菌糖缀合物如上文所公开的那样产生,而来自血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的肺炎链球菌糖缀合物如W0 2006/110381中公开的那样产生。

[1179] 基于批次体积和散装糖浓度计算了散装浓缩物所需的体积。通过添加所需体积的NaCl/琥珀酸盐缓冲液(pH 5.8)以获得琥珀酸盐5.0mM和150mM NaCl的最终目标缓冲液浓度,从而制备了所配制的散装疫苗。将最终浓度0.02%的聚山梨醇酯80添加至20种肺炎球菌缀合物。将制剂经0.2 μ m Millipore PES膜过滤,随后添加AlPO₄。将制剂良好混合以使得缀合物可以结合铝。

[1180] 继而将制剂填充至玻璃注射器,以递送0.5mL的剂量体积。

[1181] 最终的剂量形式由以下组成(对于0.5mL的剂量):来自肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F和33F的糖缀合物(独立地缀合至CRM₁₉₇)每种2.2μg、来自肺炎链球菌血清型6B的糖缀合物4.4μg、5mM琥珀酸盐缓冲液pH 5.8、0.02PS80、150mM NaCl和0.25mg/mL铝(作为AlPO₄)。对于0.5mL的剂量,CRM₁₉₇的含量为大约46μg。

[1182] 实施例17:16-价免疫原性组合物的免疫原性

[1183] 在兔中评估了所述16-价免疫原性组合物(参见实施例15)的免疫原性,其中使用多重直接Luminex免疫测定(dLIA)来测量血清中的血清型特异性IgG浓度以及血清型特异性OPA。

[1184] 在第0周,以建议的人类临床剂量(2.2μg的缀合物,除了血清型6B为4.4μg外;外加0.1mg的铝作为AlPO₄)经肌肉内途径,免疫多组10只2.5kg至3.5kg的新西兰白兔。以相同剂量的缀合物疫苗在第2周对所述兔进行加强,并继而在第4周取血。对第0周和第4周的血清样品进行血清型特异性dLIA和OPA。

[1185] 为了将特异于每种肺炎球菌多糖(PnPS)的总多糖结合抗体(IgG)进行定量,在两个直接Luminex免疫测定(dLIA;13-重dLIA,PREVNAR13[®]血清型以及7-重dLIA,另外的血清型)中评估了兔血清。所述13-重测定测量特异于13-价肺炎球菌缀合物(PnC)疫苗中包括的13种血清型的抗-PnPS抗体(1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、和23F),而所述7-重测定测量针对另外的血清型(15B、22F、33F)的抗PnPS抗体。每种测定含有13种或7种波谱不同的磁微球(偶联至PnPS缀合物(PnPS-PLL缀合物:PnPS缀合至聚-L-赖氨酸))的组合。

[1186] 简言之,参考标准、对照和测试血清首先用两种Pn吸附剂进行预吸附;CWPS1(含有C-多糖的来自PnA的细胞壁多糖)和CWPS2(CWP来自非荚膜肺炎链球菌血清型2),以封闭非特异性抗体去结合PnPS包被的抗原。在预吸附之后,将PnPS-偶联的微球与适当稀释的参考标准血清、对照或兔测试血清温育。温育之后,将每种混合物洗涤并加入R-藻红蛋白-缀合的山羊抗-兔IgG次级抗体。用Bio-plex读数器测量荧光信号(表示为中位荧光强度(MFI)),并与所结合的PnPS-特异性IgG的量相关联。测试血清的数值报道为(Units/mL,U/mL)。

[1187] 如上文所述进行血清型特异性OPA。OPA效价是导致细菌集落形成单位(CFU)的数字与无血清对照(定义为背景CFU)相比降低50%的最高稀释的倒数。所述效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1188] 表21. 16vPnC总IgG浓度和OPA效价

血清型	总 IgG (Pn dLIA)				调理吞噬抗体 (OPA)			
	Wk0 GMC (µg/ml)	Wk4 GMC (µg/ml)	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 比例 Wk4: Wk0	Wk0 GMT	Wk4 GMT	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 比例 Wk4: Wk0
1	0.08	28	17 - 44	369	4	87	55 - 139	22
3	0.08	88	60 - 128	1062	4	214	151 - 304	54
4	0.08	30	14 - 67	402	4	934	551 - 1583	233
5	0.08	34	18 - 64	449	4	368	232 - 584	87
6A	0.03	46	15 - 142	1835	4	3026	1607 - 5696	756
6B	0.08	89	33 - 241	1182	4	6156	3043 - 12453	1539
[1189] 7F	0.01	50	31 - 78	3969	6	2917	2013 - 4227	528
9V	0.03	24	15 - 38	881	5	613	426 - 883	112
14	0.08	28	20 - 39	368	19	449	331 - 610	24
18C	0.05	79	45 - 139	1587	4	1847	1003 - 3401	462
19A	0.08	120	71 - 205	1605	4	1410	851 - 2336	352
19F	0.08	156	96 - 255	2083	4	3207	1783 - 5771	802
23F	0.05	33	13 - 84	668	4	997	487 - 2042	249
15B	0.05	54	40 - 71	1073	6	741	514 - 1069	116
22F	0.08	158	95 - 262	2103	5	1078	661 - 1756	211
33F	0.10	11	6 - 20	115	49	1337	829 - 2154	27

[1190] 缩写:GMC,几何平均浓度;CI,置信区间;LCI,下限置信区间;UCI,上限置信区间。

[1191] 结果显示出在以16vPnC两次免疫之后血清型特异性IgG和功能性OPA抗体应答的显著提高(表21)。血清IgG水平在基线之上提高了超过2-10g。类似地,引出了强功能性OPA抗体,其具有基线之上最少22倍的OPA GMT提高。免疫前血清(Wk 0)对于大多数的16v PnC血清型都显示了不可检测水平的PnPS-特异性IgG和功能性OPA抗体,只有血清型14和33F例外。这些血清型存在低水平的OPA效价,但是这些基线应答并未对疫苗接种后的抗体应答产生不利影响。

[1192] 实施例18:20-价免疫原性组合物的免疫原性

[1193] 在兔中评估了所述20-价免疫原性组合物(参见实施例16)的免疫原性,其中使用多重直接Luminex免疫测定(dLIA)来测量血清中的血清型特异性IgG浓度以及血清型特异性OPA。

[1194] 在第0周,以建议的人类临床剂量(2.2µg的缀合物,除了血清型6B为4.4µg外;外加0.1mg的铝作为AlPO₄)经肌肉内途径,免疫多组10只2.5kg至3.5kg的新西兰白兔。以相同剂量的缀合物疫苗在第2周对所述兔进行加强,并继而在第4周取血。对第0周和第4周的血清样品进行血清型特异性dLIA和OPA。

[1195] 为了将特异于每种肺炎球菌多糖(PnPS)的总多糖结合抗体(IgG)进行定量,在两个直接Luminex免疫测定(dLIA;13-重dLIA,PREVNAR 13[®]血清型以及7-重dLIA,另外的血清型)中评估了兔血清。所述13-重测定测量特异于13-价肺炎球菌缀合物(PnC)疫苗中包括的

13种血清型的抗-PnPS抗体(1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、和23F),而所述7-重测定测量针对另外的血清型(15B、22F、33F)的抗PnPS抗体。每种测定含有13种或7种波谱不同的磁微球(偶联至PnPS缀合物(PnPS-PLL缀合物:PnPS缀合至聚-L-赖氨酸))的组合。

[1196] 简言之,参考标准、对照和测试血清首先用两种Pn吸附剂进行预吸附;CWPS1(含有C-多糖的来自PnA的细胞壁多糖)和CWPS2(CWP来自非荚膜肺炎链球菌血清型2),以封闭非特异性抗体去结合PnPS包被的抗原。在预吸附之后,将PnPS-偶联的微球与适当稀释的参考标准血清、对照或兔测试血清温育。温育之后,将每种混合物洗涤并加入R-藻红蛋白-缀合的山羊抗-兔IgG次级抗体。用Bio-plex读数器测量荧光信号(表示为中位荧光强度(MFI)),并与所结合的PnPS-特异性IgG的量相关联。测试血清的数值报道为(Units/mL,U/mL)。

[1197] 如上文所述进行血清型特异性OPA。OPA效价是导致细菌集落形成单位(CFU)的数字与无血清对照(定义为背景CFU)相比降低50%的最高稀释的倒数。所述效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1198] 用20vPnC免疫的兔也证明了针对16v和20v制剂中共有的血清型以及针对另外四种血清型(8、10A、11A、和12F)的总IgG和功能性OPA抗体效价的显著提高(表22)。在两次免疫后诱导出了20种血清型中血清IgG水平 2-log 的提高。由疫苗所引出的OPA GMT至少在基线之上27倍。对于血清型14和33F,免疫前血清中低水平的OPA效价在20vPnC疫苗接种后也类似地观察到,但是仍未改变疫苗接种后抗体的强应答。

[1199] 所述16vPnC和20vPnC制剂引出了强体液应答,其既特异于肺炎球菌多糖又与细菌的功能性杀伤相关(参见表21和22)。总而言之,实施例17和18中所示的研究证明了16vPnC和20vPnC制剂的良好免疫原性。

[1200] 表22. 20vPnC总IgG浓度和OPA效价

血清型	总 IgG (Pn dLIA)				调理吞噬抗体 (OPA)			
	Wk0 GMC (µg/ml)	Wk4 GMC (µg/ml)	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 比例 Wk4: Wk0	Wk0 GMT	Wk4 GMT	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 比例 Wk4: Wk0
1	0.08	28	19 - 43	379	4	106	69 - 164	27
3	0.08	116	76 - 176	1542	4	286	193 - 425	72
4	0.08	62	39 - 97	821	4	1477	954 - 2287	369
5	0.08	49	33 - 71	648	4	509	350 - 742	127
6A	0.03	30	14 - 66	1209	4	3682	2743 - 4944	849
6B	0.08	58	36 - 94	775	4	4469	3002 - 6653	1117
7F	0.02	62	39 - 101	3681	6	3226	2226 - 4675	500
9V	0.05	30	19 - 48	644	6	956	634 - 1442	150
[1201] 14	0.08	34	20 - 60	457	12	506	348 - 736	42
18C	0.05	106	67 - 166	2115	4	1942	1263 - 2986	485
19A	0.08	112	73 - 171	1493	4	1580	1071 - 2332	395
19F	0.08	178	119 - 266	2372	4	3392	2085 - 5519	848
23F	0.05	48	23 - 103	960	4	1514	889 - 2577	378
15B	0.05	70	51 - 98	1410	6	1332	949 - 1869	210
22F	0.10	172	118 - 250	1811	5	1304	1000 - 1700	279
33F	0.12	14	10 - 20	120	54	1490	1117 - 1989	28
8	0.13	144	100 - 207	1149	4	1388	988 - 1949	333
10A	0.13	54	31 - 94	433	5	1129	732 - 1741	236
11A	0.13	178	125 - 254	1423	7	10483	6373 - 17241	1434
12F	0.08	31	15 - 63	408	4	828	608 - 1127	191

[1202] 缩写:GMC,几何平均浓度;CI,置信区间;LCI,下限置信区间;UCI,上限置信区间。

[1203] 实施例19:肺炎链球菌的血清组9内的交叉反应调理吞噬免疫应答的评估

[1204] 所述肺炎球菌调理吞噬测定 (OPA),其测量在功能性抗体和补体的存在下吞噬效应细胞对肺炎链球菌细胞的杀伤,而被认为是评价肺炎球菌疫苗效果的重要替代。

[1205] 材料与方法

[1206] 从疫苗接种了13-价肺炎球菌缀合物疫苗 (13v PnC) 的成人随机选择的免疫血清子集,在OPA测定法中测试了血清型9V、9A、9L和9N。所述血清分别收集自美国临床试验6115A1-004 (N=59,疫苗接种后)和6115A1-3005 (N=66,匹配的疫苗接种之前和之后)。

[1207] 研究6115A1-3005 (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00546572) 是3期、随机的、主动对照的、经修改的双盲试验,其用于评估Prevnar 13相较于23-价肺炎球菌多糖疫苗 (23vPS) 的稳定性、耐受性和免疫原性 (在研究登记前至少5年接受过1剂量的23vPS的70岁或者更老的流动老年人中) (参见:<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546572>;2014年3月31日登录)。

[1208] 研究6115A1-004 (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00427895) 是3期、随机

的、主动对照的、经修改的双盲试验,其用于评估13-价肺炎球菌缀合物疫苗(13vPnC)相较于23-价肺炎球菌多糖疫苗(23vPS)的稳定性、耐受性和免疫原性(在未接受23vPS的60至64岁的成人中)以及用于评估在未接受23vPS的18至59岁成人中的安全性、耐受性和免疫原性(参见:<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>;2014年3月31日登录)。

[1209] 这些研究中测试的13-价肺炎球菌缀合物疫苗(13vPnC)含有来肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、和23F的缀合物,独立地缀合至白喉交叉反应材料197(CRM₁₉₇)载体蛋白。

[1210] OPA用于测量人血清中针对肺炎链球菌血清型9V、9N、9A和/或9L的功能性抗体。将测试血清设定于测定反应中,其中测量荚膜多糖特异性的免疫球蛋白调理细菌、触发补体沉积、由此促进吞噬作用以及由巨噬细胞杀伤细菌的能力。所述OPA效价定义为导致细菌计数相对于无测试血清的对照孔降低50%的稀释的倒数。所述OPA效价是从涵盖此50%杀伤截断值的两个稀释推算的。

[1211] OPA过程是基于Hu等人(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12(2):287-295中所述的方法。测试热灭活的血清经2.5倍的系列稀释,再与目标细菌一起被添加至测定平板并在摇动中温育30分钟。继而将分化的HL-60细胞(巨噬细胞)和幼兔血清(3-4周大, PEL-FREEZ[®], Arkansas, 12.5%终浓度)以大约200:1的效应对目标比添加至孔,并在37℃摇动温育。为了使反应终止,将80μL的0.9%NaCl添加至所有孔,混合,并将10μL的试样转移至含有200μL水的MULTISCREEN[®] HTS HV过滤器平板(MILLIPORE[®])的孔中。将液体在真空下过滤穿过平板,并将150μL的HYSOY[®]培养基添加至每个孔并过滤。继而将过滤平板在37℃,5%CO₂温育过夜并接着与Destain溶液混合(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。接着将平板用考马斯亮蓝染色并脱色一次。将菌落显像并在Cellular Technology Limited(CTL)(Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT[®] Analyzer上计数。

[1212] 统计分析:计算了Pearson双尾相关。

[1213] 结果-9V、9A、9L和9N中的OPA反应

[1214] 在各个微集落调理吞噬测定(mcOPA)中,评估了来自以13vPnC针对血清型9A、9L和9N进行免疫的成人的免疫血清的交叉功能反应,以及对血清型9V的内源功能性应答。测试了从疫苗接种了13-价肺炎球菌缀合物疫苗(13v PnC)的成人随机选择的免疫血清子集。血清分别收集自美国临床试验6115A1-004(N=59,疫苗接种后)和6115A1-3005(N=66,匹配的疫苗接种之前和之后)。

[1215] 研究6115A1-004中的对象此前未接受任何肺炎球菌疫苗接种并接受了单一剂量的13vPnC作为研究方案的一部分。来自研究6115A1-004的免疫血清对所有血清组显示出相似百分比的应答,对于9V、9A、9L和9N分别是98.3%、98.3%、100%和93.2%(图11),支持来自6115A1-3005的结果(图12)。在血清型9V与9A之间(Pearson相关 $\rho=0.5456$, $p<0.0001$)或者与9L之间($\rho=0.7353$, $p<0.0001$)观察到相对良好的OPA效价关联,但与9N之间却不是($\rho=0.1217$, $p<0.3627$)。

[1216] 研究6115A1-3005中的对象在参与研究之前至少5年曾经接受过1个剂量的23vPS,并接受了单一剂量的13vPnC作为研究反感的一部分。对匹配的疫苗接种之前和之后血清组(N=66)(来自用13vPnC免疫的成人(研究6115A1-3005)),评估了OPA对血清型9V的内源应

答以及抗-9V抗体对血清型9A、9L和9N的交叉反应性。如图12中所示,在OPA测定中检测到了对9V(84%)、9A(66%)、9L(82%)和9N(86%)相对高的免疫性(百分比应答),这可能是由于他们此前曾用23vPS免疫,其包括来自血清型9V和9N的未缀合多糖。然而,在用13vPnC疫苗(其仅含有来自血清组9的血清型9V缀合物)接种后,所有四种血清型的百分比应答提高到了95%或更高。效价值的倍数提升在表23中示出并且在血清型之间类似,也表明交叉反应性。

[1217] 表23. 疫苗接种之前和之后匹配的OPA效价倍数提升,13vPnC

[1218]	OPA 效价							
	9V		9A		9L		9N	
	之前	之后	之前	之后	之前	之后	之前	之后
GMT	221	1323	41	308	165	706	322	693
倍数提升	5.9		7.5		4.2		2.1	

[1219] 对OPA效价分布的更全面的分析在图13-16中的反向累积分布曲线(RCDC)中示出。所述RCDC显示出疫苗接种后血清型特异性免疫应答的提高(对于血清型9V、9A、9L,以及程度较低的9N)。还使用Pearson相关分析了9V/9A、9V/9L、和9V/9N之间独立地匹配的效价倍数提升/样品的相关性。在血清型9V与9A之间(Pearson相关 $\rho=0.8720$, $p<0.0001$)或者与9N之间($\rho=0.5801$, $p<0.0001$)观察到效价倍数提升相对良好的相关,但是与9L之间程度较低($\rho=0.1804$, $p<0.1640$)。

[1220] 结论

[1221] 基于这些数据,所述13vPnC疫苗通过针对血清型9A、9L、和9N的额外的防护而可能提供更广泛的血清型覆盖。

[1222] 实施例20:血清型15B和血清型15C之间的交叉功能OPA反应

[1223] 肺炎球菌血清组15包括4种结构上相关的血清型:15A、15B、15C、和15F。血清型15B和15C通过基因分型技术不能区分并且具有相似的荚膜多糖(PS)构成,除了15B-PS是15C-PS的O-乙酰化变体。为了理解针对血清型15B的抗荚膜PS抗体是否在功能上与血清型15C交叉反应,用都含有免疫原性缀合物作为其配方一部分的16vPnC(参见实施例15)和20vPnC(参见实施例16)疫苗免疫10只兔子,所述免疫原性缀合物包含供价连接至CRM197的肺炎链球菌血清型15B荚膜多糖。在OPA测定中针对血清型15B和15C目标肺炎球菌菌株测试了疫苗接种之前和之后的血清。

[1224] 对于每组的10只兔子,在用血清型15B缀合物免疫之后100%都对血清型血清型15B具有OPA反应。对于这些相同的样品,100%也都对血清型15C具有OPA反应(表24和表25)。在15C OPA中的疫苗接种前血清中观测到低OPA效价。然而,疫苗接种后血清与疫苗接种前相比GMT OPA效价提高了超过10倍,证明了本发明的免疫原性缀合物能诱导抗体的形成,该抗体能够在OPA中杀伤血清型15B和15C肺炎链球菌。

[1225] 表24. 在用16vPnC疫苗接种之前和之后的兔子血清中针对血清型15B和15C菌株的OPA效价

[1226]

动物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

[1227] 表25. 在用20vPnC疫苗接种之前和之后的兔子血清中针对血清型15B和15C菌株的OPA效价

[1228]

动物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	3784	不能确定*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	不能确定*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	不能确定*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	不能确定*	527
10	4	616	不能确定*	545
GMT	4	1917	77	1515

[1229] *效价由于杀伤曲线不佳而不能确定

[1230] 说明书中提到的所有出版物和专利申请表示本发明所属领域技术人员的水平。所有出版物和专利申请援引加入本文,其程度上如同每个单个出版物或专利申请都具体地和独立地地表示援引加入。

[1231] 虽然出于清楚理解的目的,通过说明以及实例的方式对上述发明进行了某些细节描述,但是依然可以在所附权利要求的范围内实现一些改变和修改。

序列表

<110> 辉瑞公司
<120> 包含缀合荚膜糖抗原的免疫原性组合物及其用途
<130> PC72040A
<150> US 61/929,547
<151> 2014-01-21
<160> 40
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "A class" CpG oligonucleotide
<400> 1
ggggacgacg tcgtgggggg g 21
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "A class" CpG oligonucleotide
<400> 2
ggggacgacg tcgtgggggg g 21
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "B class" CpG oligonucleotide
<400> 3
tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "B class" CpG oligonucleotide

<400> 4
tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "B class" CpG oligonucleotide
<400> 5
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24
<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "B class" CpG oligonucleotide
<400> 6
tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt 24
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> "B class" CpG oligonucleotide
<400> 7
tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> B-Class oligonucleotide
<400> 8
tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> B-Class oligonucleotide
<400> 9
tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> B-Class oligonucleotide
<400> 10
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> B-Class oligonucleotide
<400> 11
tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt 24
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> B-Class oligonucleotide
<400> 12
tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 13
tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22
<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 14
tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 15
tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21
<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 16
tcggacgttc ggcgcgccg 19
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 17
tcgcgtcgtt cggcgcgccg 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 18
tcgacgttcg gcgcgcgccg 20
<210> 19
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 19
tcgacgttcg gcgcgccg 18
<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 20
tcgcgtcgtt cggcgccg 18
<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 21
tcgcgacgtt cggcgcgcg c g 22
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 22
tcgtcgtttt cggcgcgcg c g 22
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 23
tcgtcgtttt cggcgccgc c g 22
<210> 24
<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 24
tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C class CpG Oligonucleotide
<400> 25
tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23
<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotides
<400> 26
tcgcgtcggt cggcgcgcg cg 22
<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 27
tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 28
tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21
<210> 29

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 29
tcggacgttc ggcgcgccg 19
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 30
tcgcgtcgtt cggcgcgccg 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 31
tcgacgttcg gcgcgcgccg 20
<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 32
tcgacgttcg gcgcgccg 18
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 33
tcgcgtcgtt cggcgcgccg 18

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 34
tcgcgacggtt cggcgcgcgc cg 22
<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 35
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 36
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22
<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 37
tcgtcgtttt acggcgcctt gccg 24
<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> C-Class oligonucleotide
<400> 38

tcgtcgTTTT cggcgcgcgc cgt 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P class CpG oligonucleotide

<400> 39

tcgtcgacga tcggcgcgcgc ccg 23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

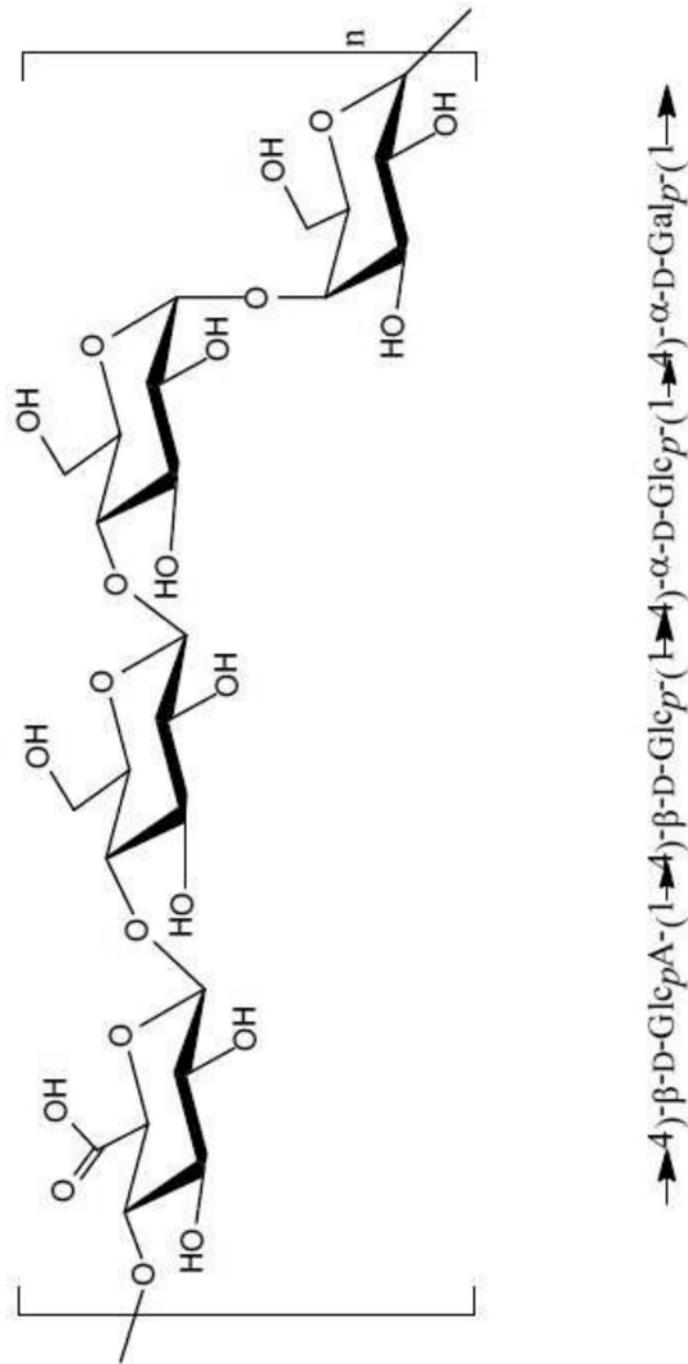
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P class CpG oligonucleotide

<400> 40

tcgtcgacga tcggcgcgcgc ccg 23



$MW (H^+) = 662.553 C_{24}H_{38}O_{21}$
 $MW (Na^+) = 684.534 C_{24}H_{37}O_{21}Na_1$

图1

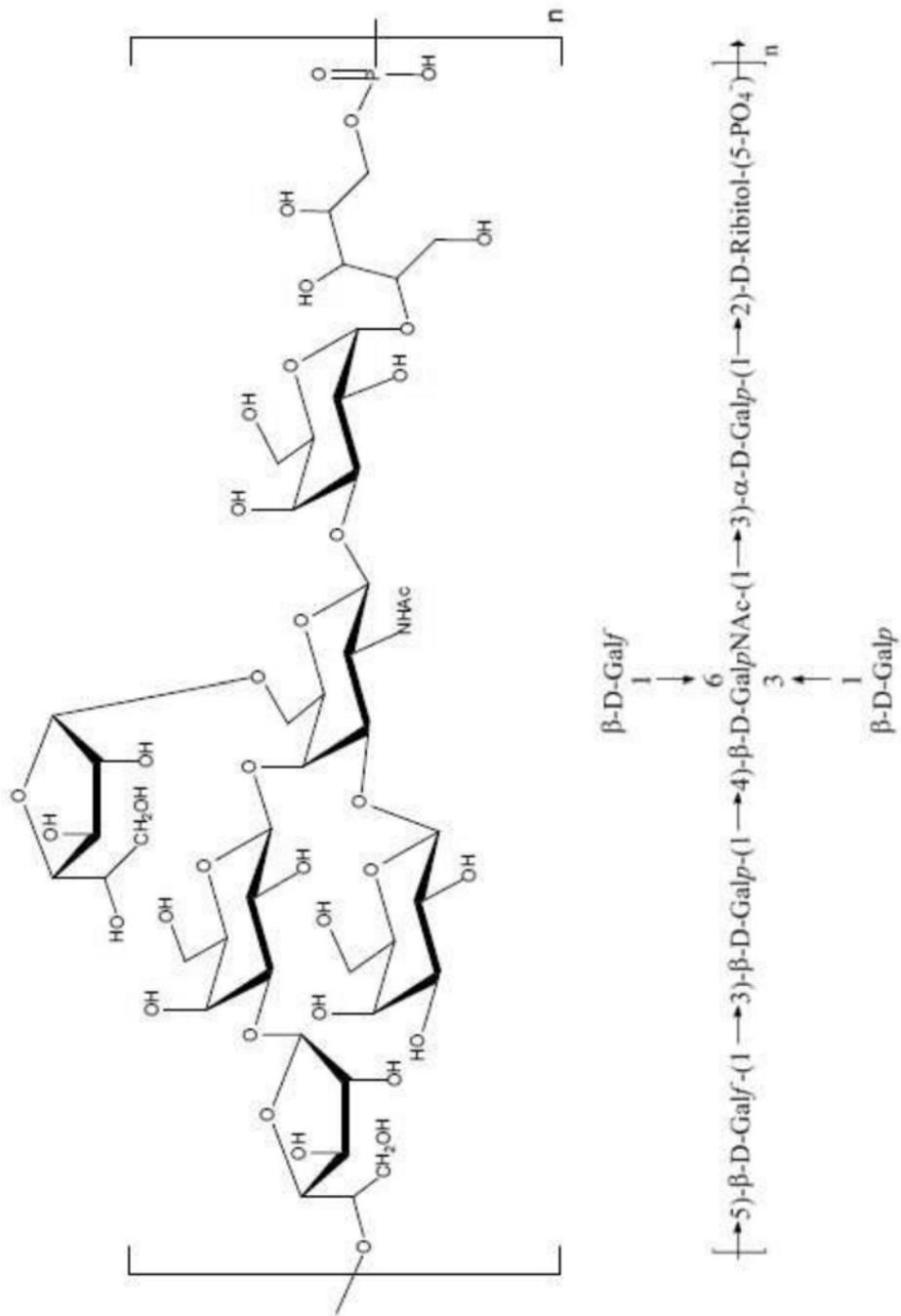


图2

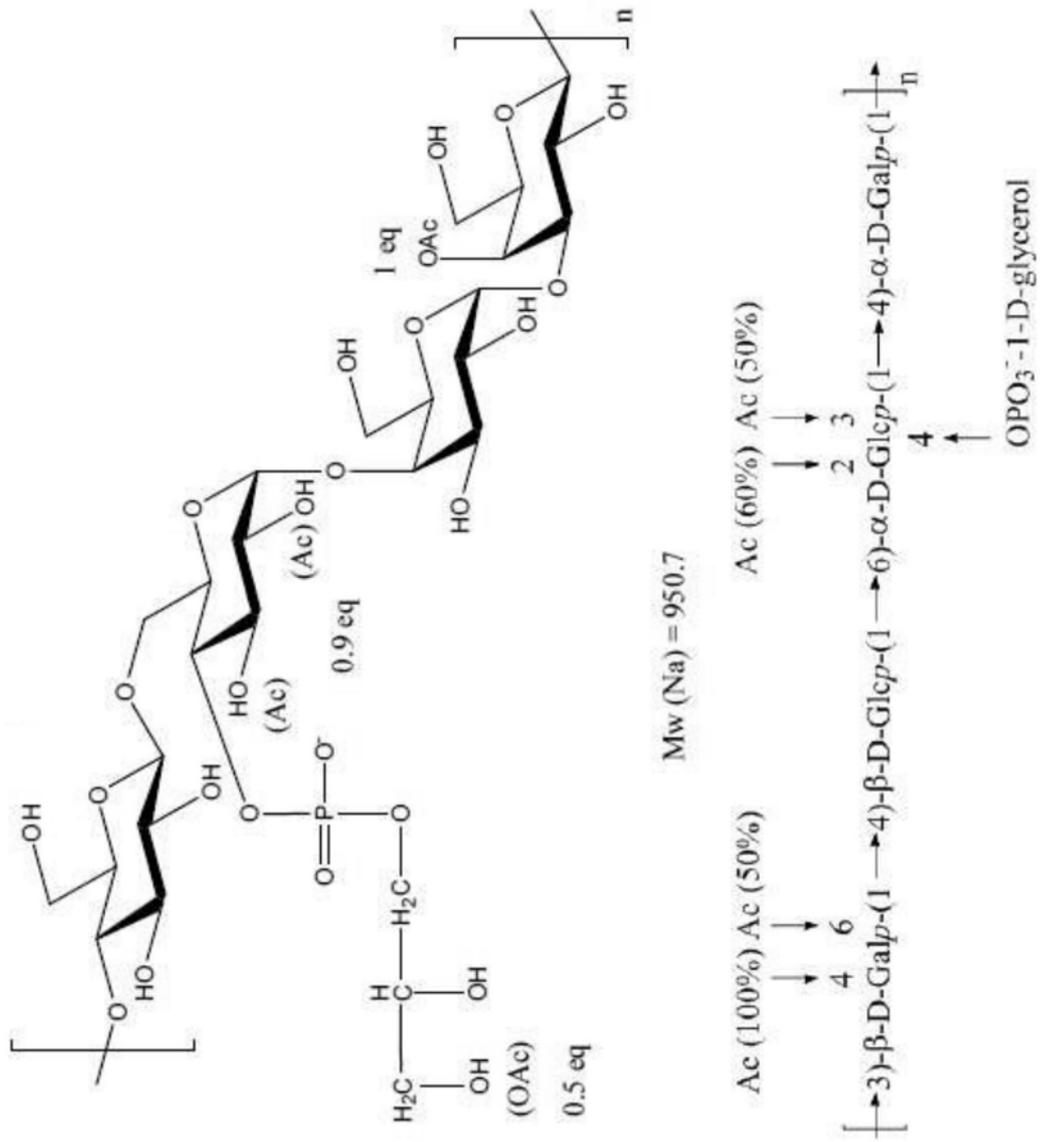


图3

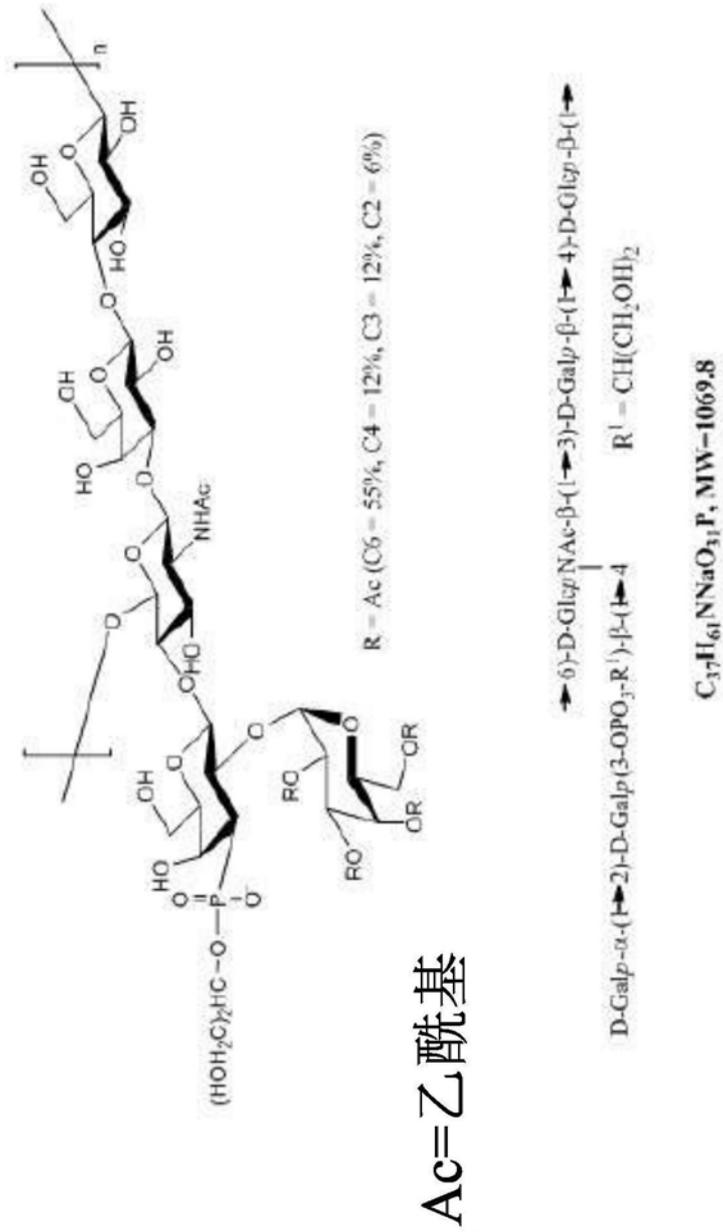


图5

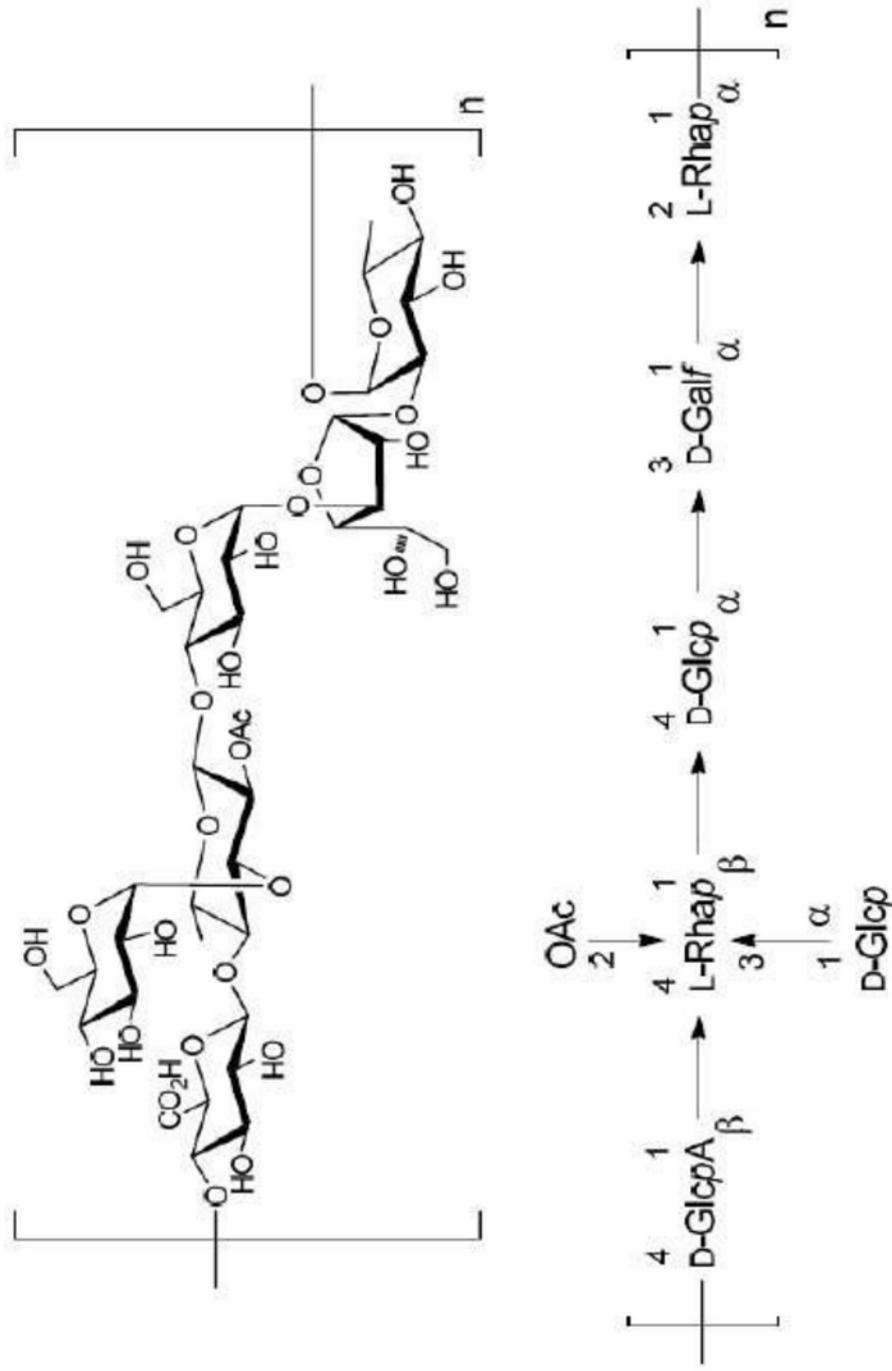


图6

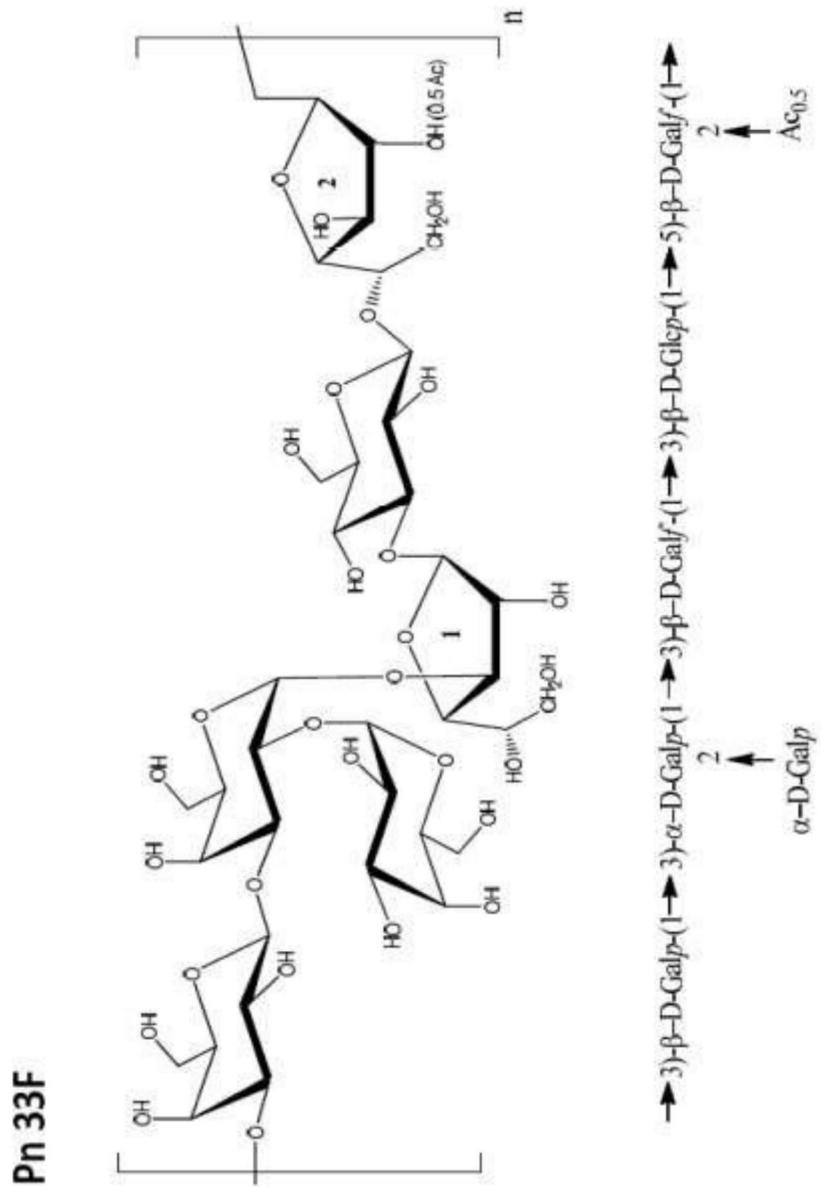


图7

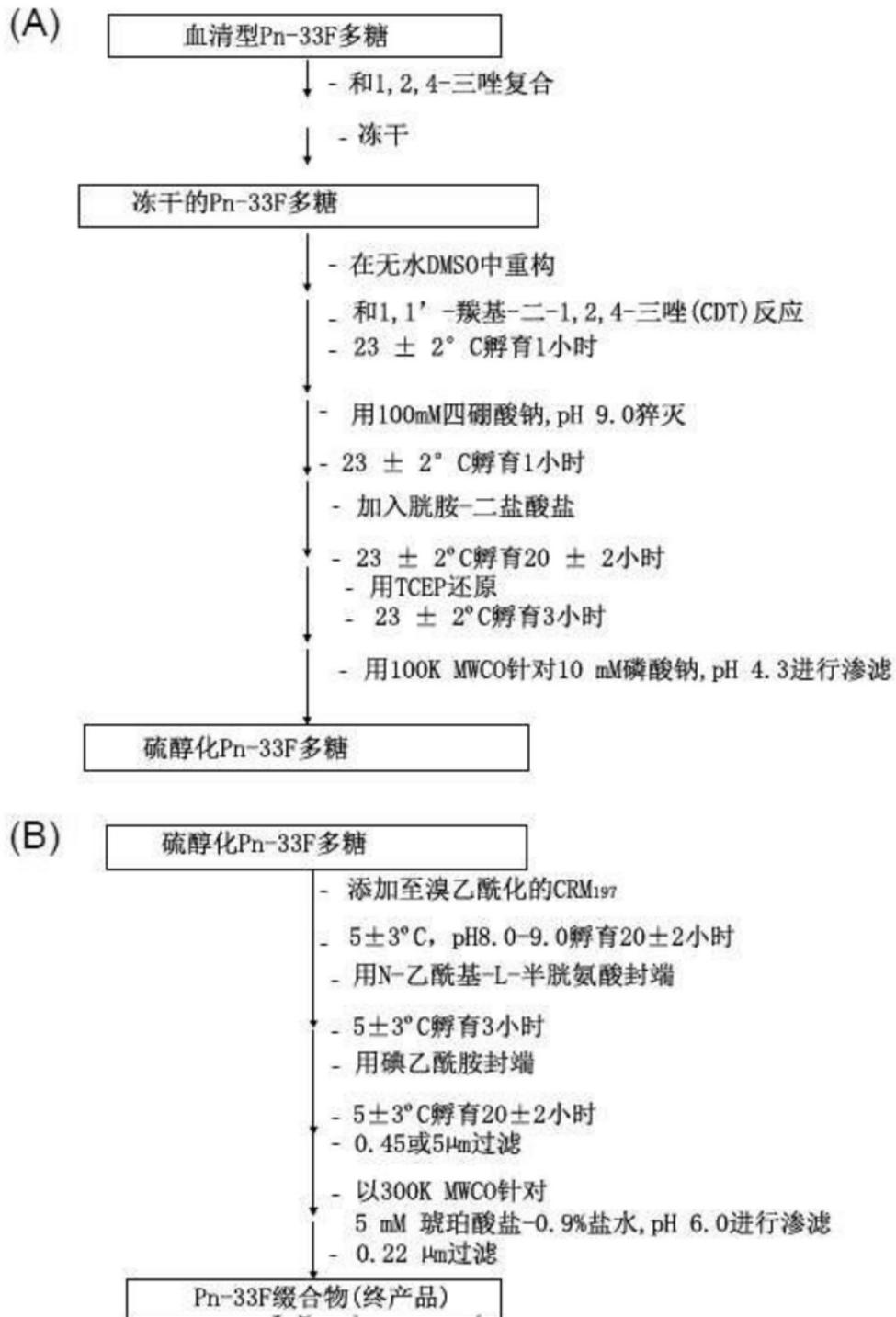


图8

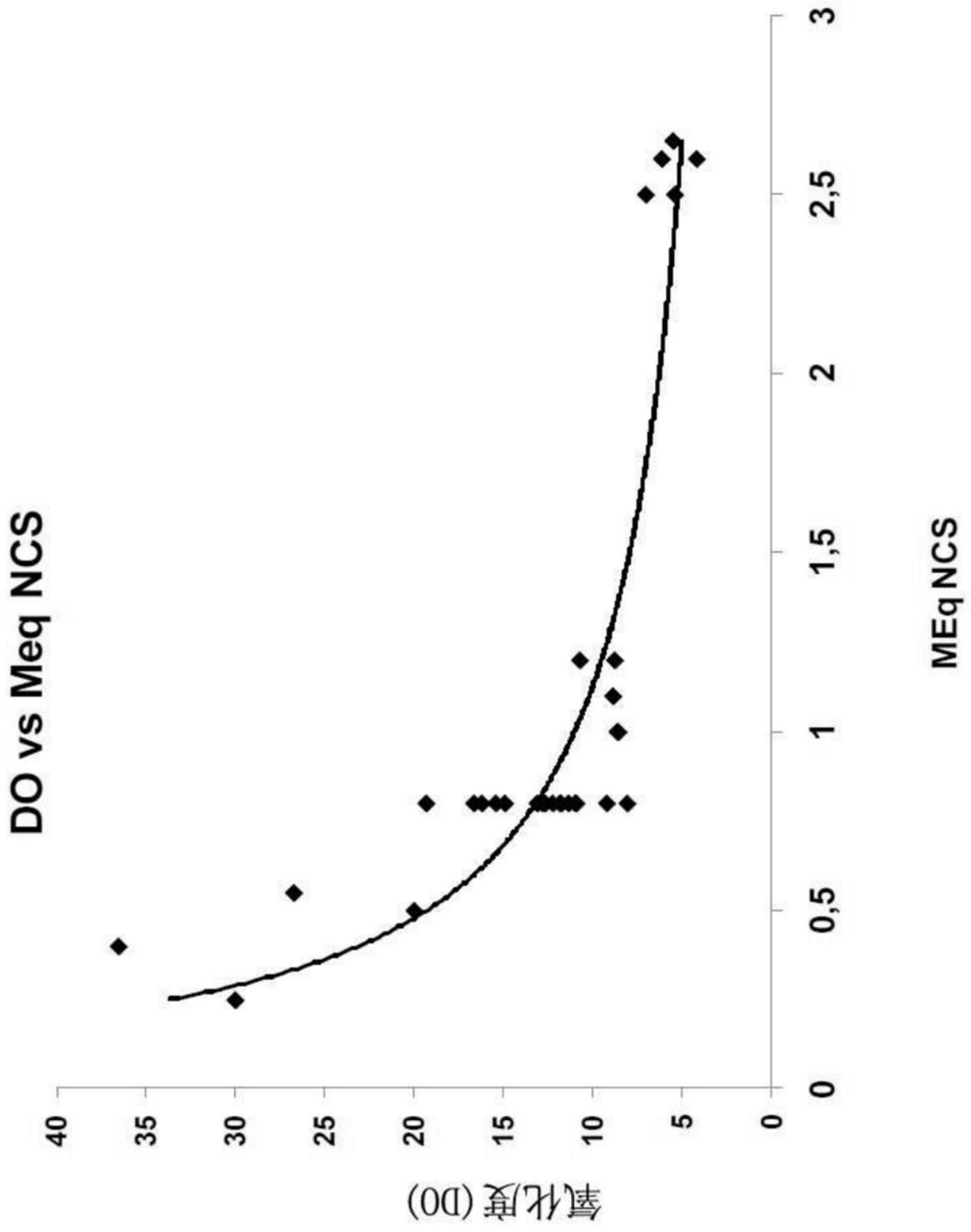


图9

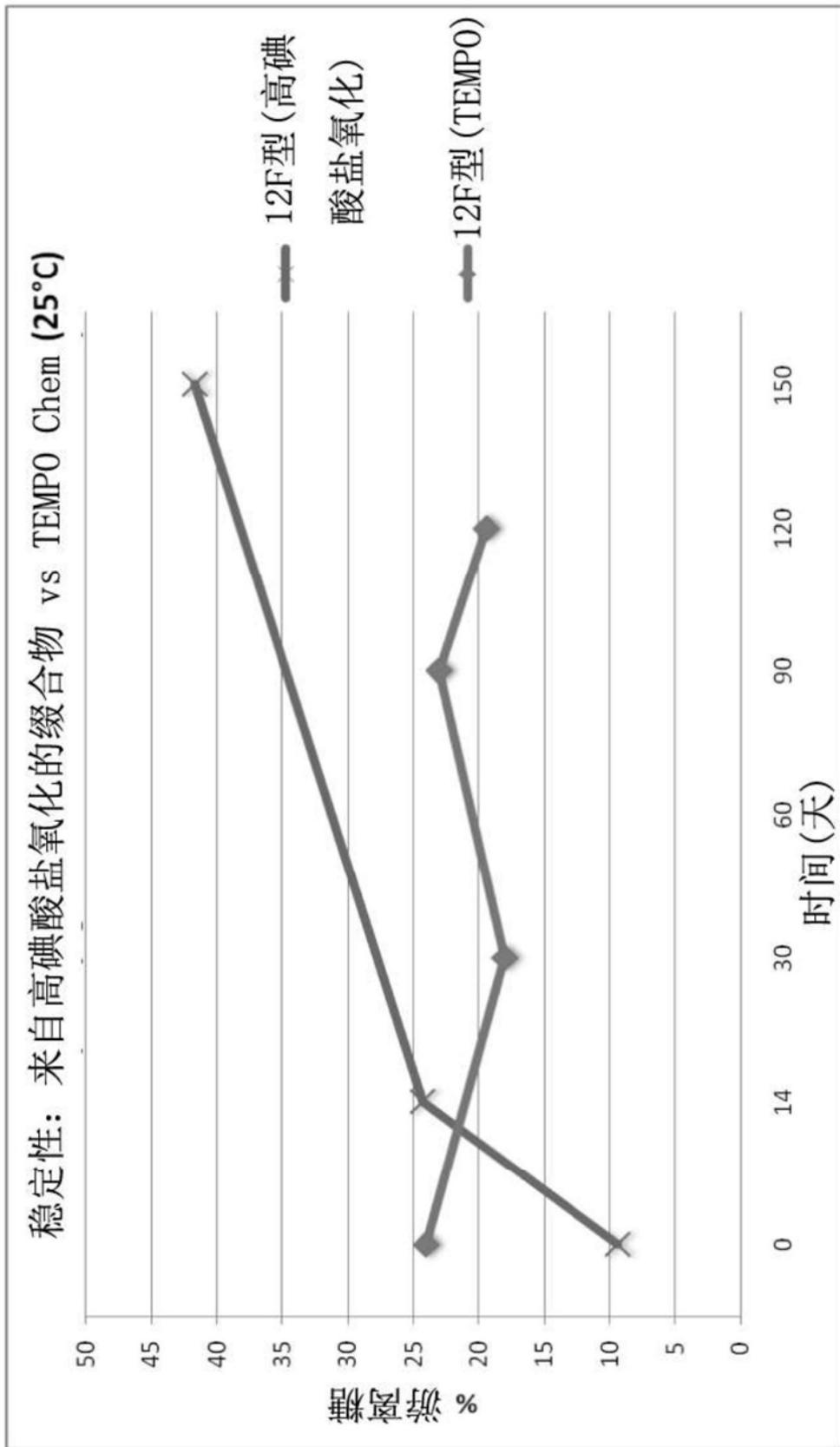


图10

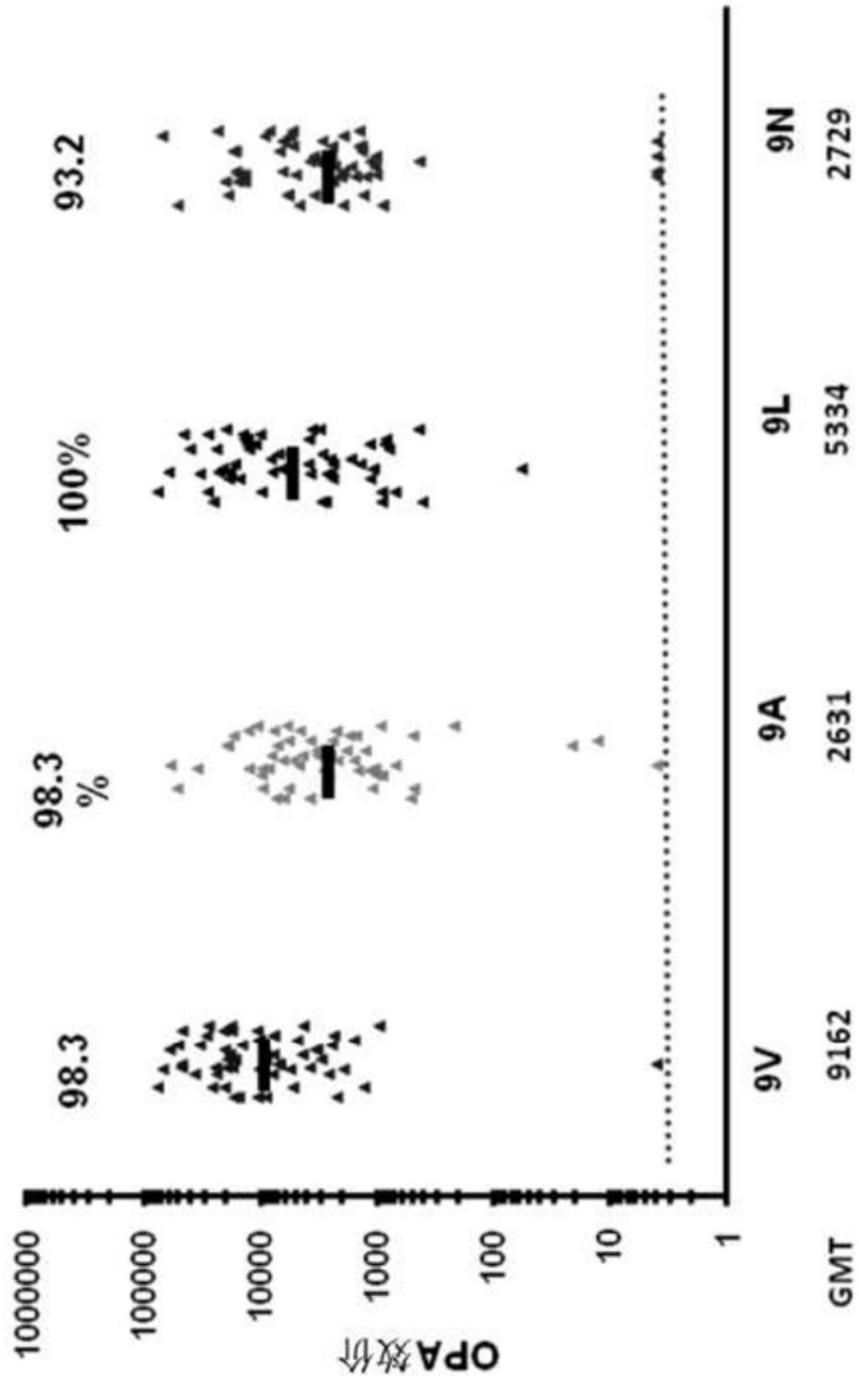


图11

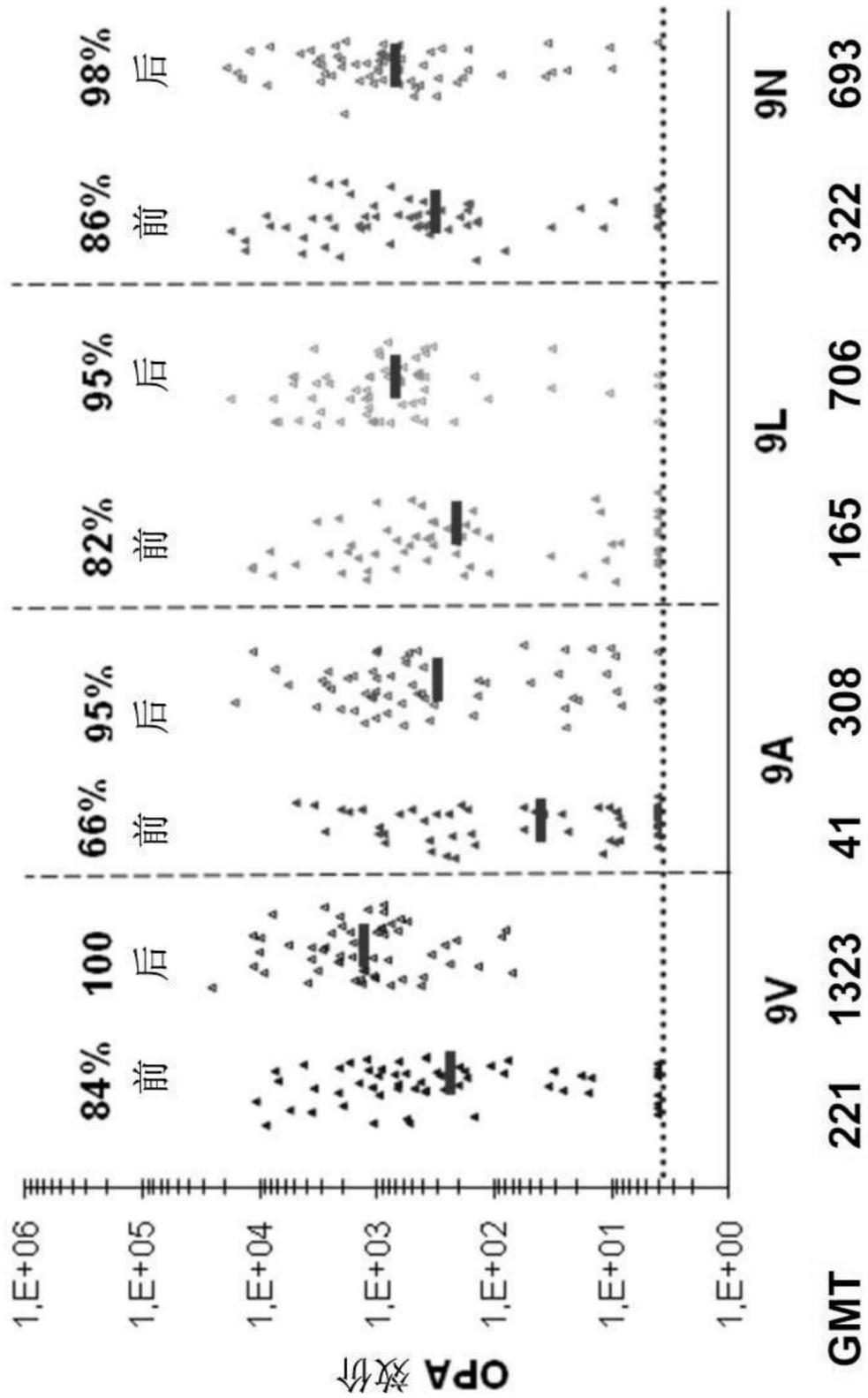


图12

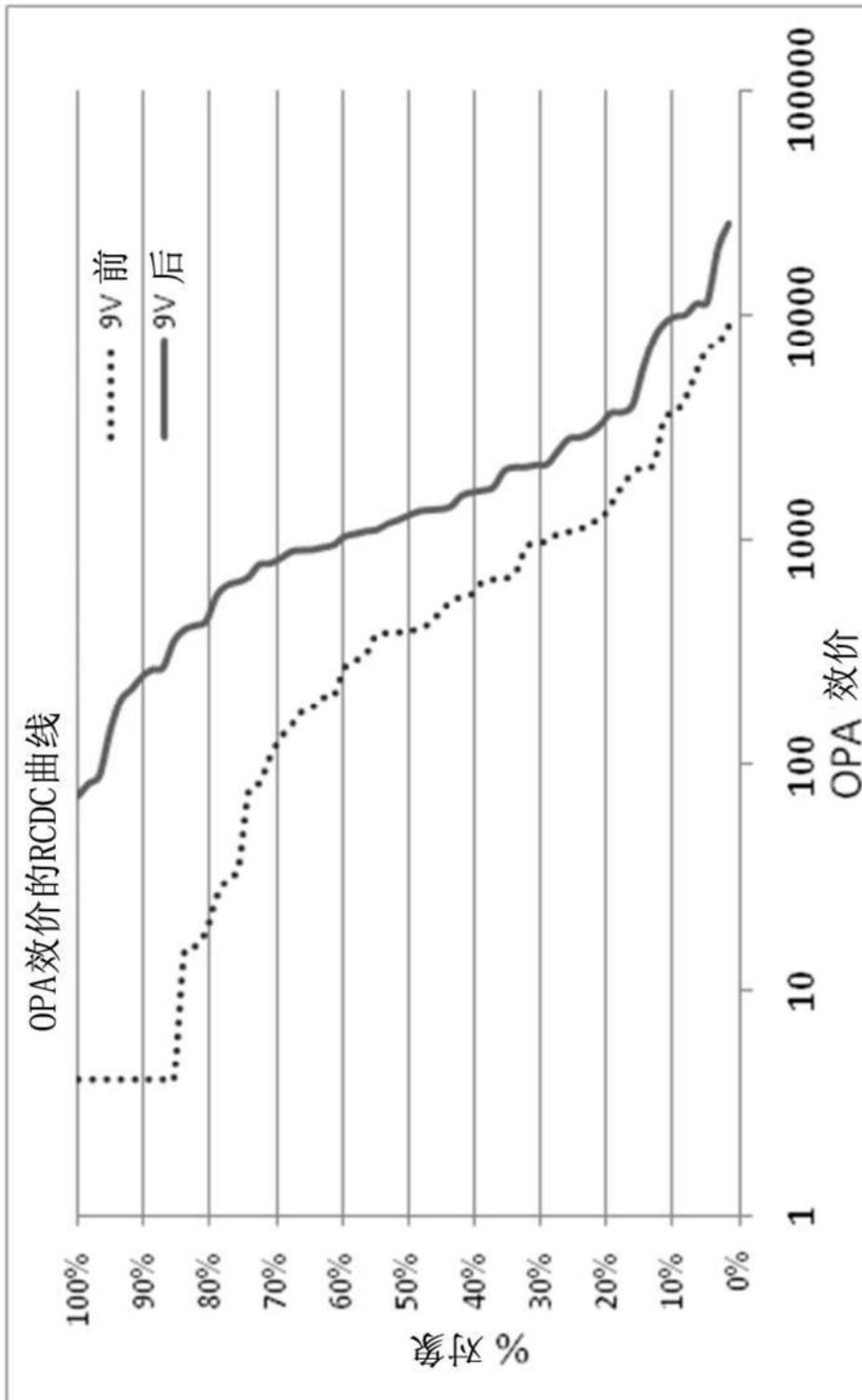


图13

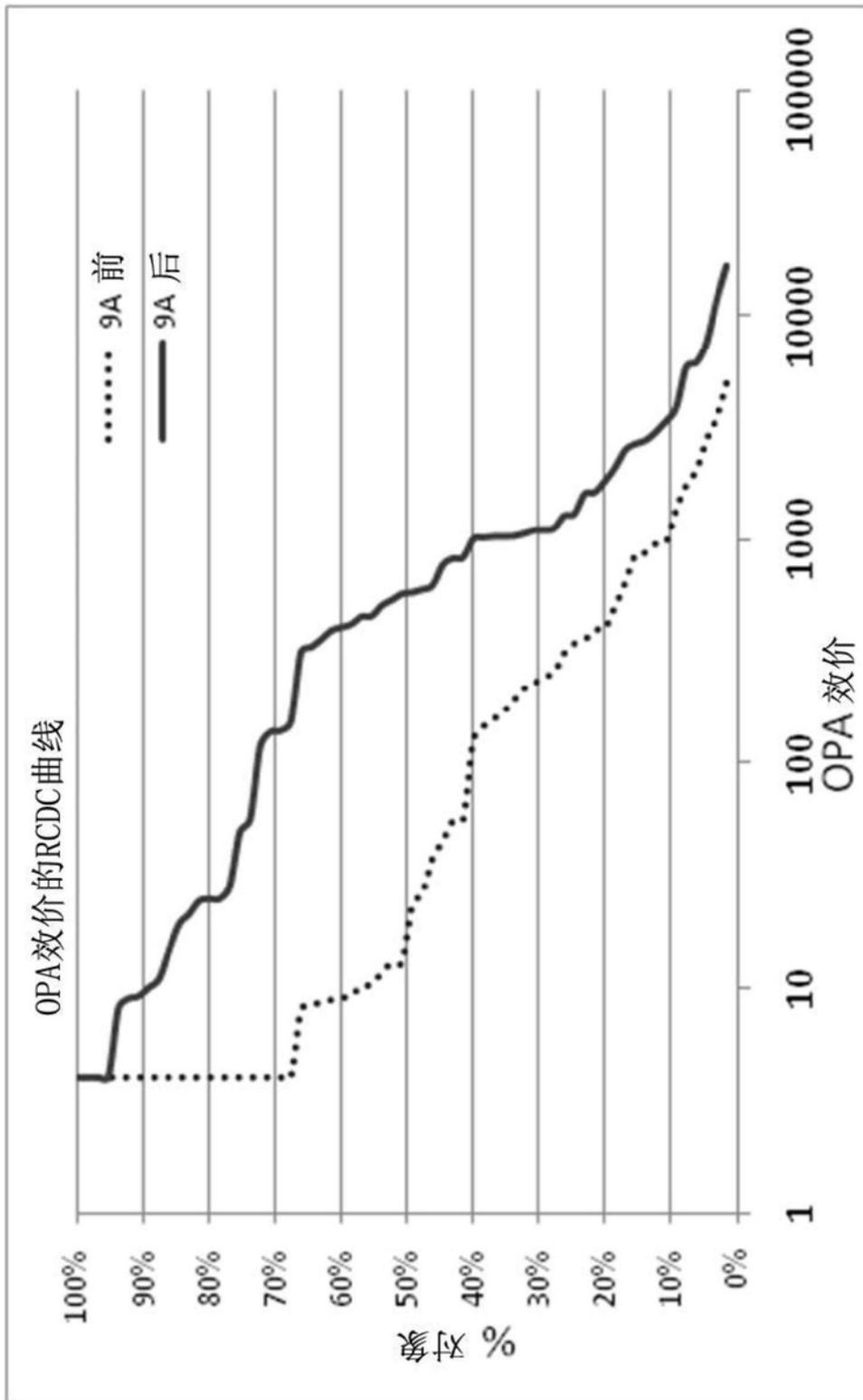


图14

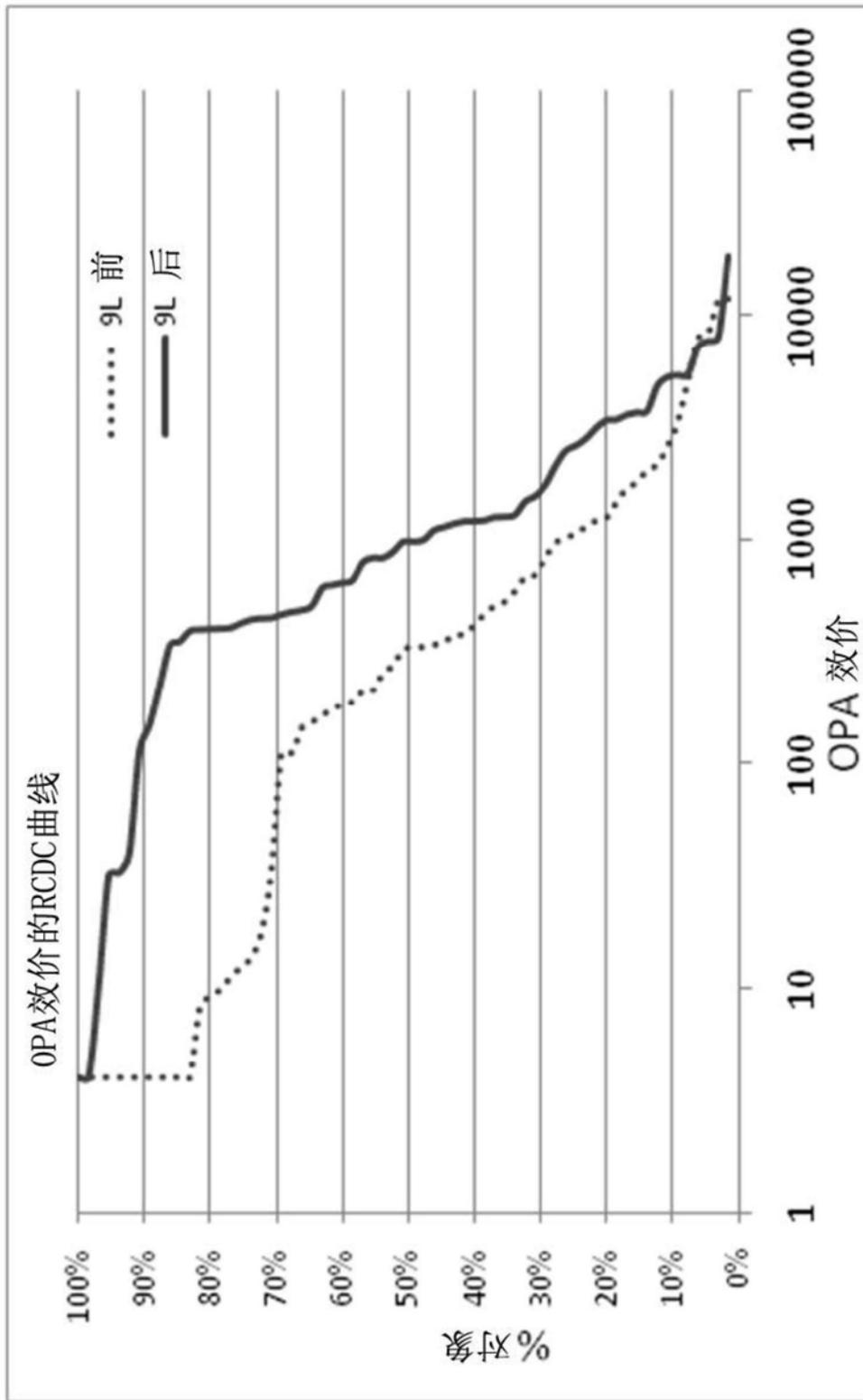


图15

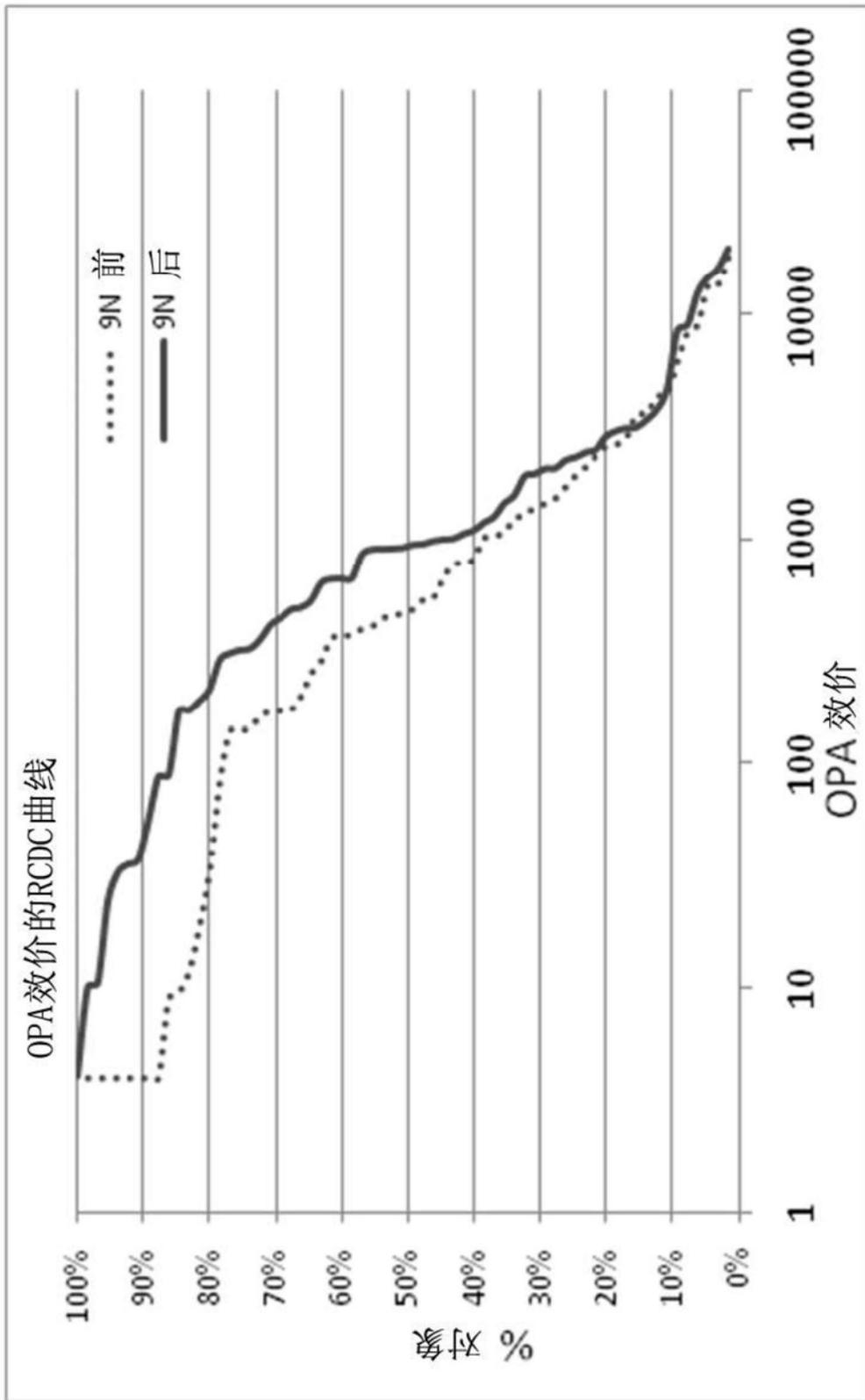


图16