



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116898960 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 20

(21) 申请号 202310424738.X

(22) 申请日 2023.04.19

(66) 本国优先权数据

202210411983.2 2022.04.19 CN

(71) 申请人 上海瑞宙生物科技有限公司

地址 201210 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区高科中路1976号1幢  
B201室

申请人 上海微宙生物科技有限公司

(72) 发明人 祝先潮 陈华根 李颖 王娟娟

熊细双 刘畅 夏清风 毛意芝

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陶启长 韦东

(51) Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

细菌多糖蛋白缀合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及多糖蛋白缀合物,具体地,本发明提供一种具有免疫原性的多糖蛋白缀合物,含有源自细菌性脑膜炎致病菌的多糖以及与其缀合的载体蛋白,所述载体蛋白包括TTD或其变体。本发明的多糖蛋白缀合物可以有效地提高细菌性脑膜炎致病菌多糖的免疫原性,诱导特异性抗体。

1. 一种具有免疫原性的多糖蛋白缀合物, 含有源自细菌性脑膜炎致病菌的多糖以及与其缀合的载体蛋白, 所述载体蛋白包括TTD或其变体,

优选地, 所述TTD是TT的C端结构域,

更优选地, 所述TTD具有SEQ ID NO:2所示的序列, 所述TTD变体具有与SEQ ID NO:2有至少70%序列相同性的序列。

2. 如权利要求1所述的多糖蛋白缀合物, 其特征在于, 所述细菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌,

优选地, 所述载体蛋白与多糖共价连接。

3. 如权利要求1或2所述的多糖蛋白缀合物, 其特征在于, 所述细菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌,

优选地, 所述多糖与载体蛋白的重量比为0.2-3.0。

4. 制备权利要求1-3中任一项所述的多糖蛋白缀合物的方法, 包括步骤:

(1) 获得所述源自细菌性脑膜炎致病菌的多糖,

(2) 活化所述多糖, 任选衍生活化的多糖,

(3) 将多糖与载体蛋白偶联, 获得多糖蛋白缀合物,

优选地,

步骤(2)包括: 使多糖与高碘酸盐溶液孵育或CDAP孵育, 获得活化的多糖, 和/或

步骤(3)包括: 将多糖与载体蛋白在EDAC存在的条件下孵育, 获得多糖蛋白缀合物。

5. 如权利要求4所述的方法, 其特征在于,

步骤(1)包括: 将细菌灭活后经过滤获得粗糖液, 加入多糖沉淀剂并纯化获得多糖, 和/或

步骤(2)还包括: 将活化的多糖与ADH孵育, 和/或

步骤(3)中, 多糖与载体蛋白的重量比为0.2-3.0。

6. 一种免疫原性组合物, 其包含权利要求1-4中任一项所述的多糖蛋白缀合物以及佐剂,

优选地, 所述佐剂包括选自氢氧化铝、磷酸铝、单磷酰基脂A、QS21、CpG、硬脂酰酪氨酸和弗氏佐剂中的一种或多种。

7. 一种导致被动免疫的免疫组合物, 包括靶向细菌性脑膜炎致病菌的杀菌抗体, 所述抗体是由权利要求6所述的免疫原性组合物免疫哺乳动物而获得,

优选地, 所述杀菌抗体存在于血清、 $\gamma$ 球蛋白部分或纯化的抗体制剂中。

8. 一种疫苗, 其含有权利要求6所述的免疫原性组合物和药学上可接受的辅料。

9. 权利要求1-4中任一项所述的多糖蛋白缀合物或权利要求6所述的免疫原性组合物在制备用于提供对抗细菌性脑膜炎致病菌感染的保护的药物中的用途。

10. 如权利要求9所述的用途, 其特征在于, 所述细菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌,

优选地, 所述细菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌。

## 细菌多糖蛋白缀合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于疫苗领域,具体涉及细菌多糖蛋白缀合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 细菌性脑膜炎是由于感染致病性细菌引起的,严重危害人类的生命健康,其中常见的致病菌有奈瑟脑膜炎球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、李斯特菌等。细菌性脑膜炎感染后果严重,致死率高,恢复的病人往往有永久的后遗症,如大脑损伤、失去听力,或学习障碍等。

[0003] 奈瑟脑膜炎球菌为革兰氏阴性菌。根据荚膜多糖的化学结构,分为13个血清群。其中A、B、C、Y、W135群是主要的流行菌群。

[0004] 流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是由脑膜炎球菌感染引起的一种急性呼吸道传染病,已成为全球严重的公共卫生问题之一。据统计全世界每年约发生50万流脑病例,即使应用抗生素和经过严密治疗后,在发达国家死亡率仍高达5%~10%,发展中国家甚至可达20%。

[0005] 流感嗜血杆菌可引起多种感染,如肺炎、中耳炎、菌血症和脑膜炎,其中b型流感嗜血杆菌(Hib)是引起侵袭性感染的主要致病菌,严重的可致死。

[0006] 疫苗的免疫接种是目前预防细菌性脑膜炎的最经济有效的措施。目前预防性疫苗有两类:多糖疫苗和多糖-蛋白结合疫苗。荚膜多糖是细菌的主要保护性结构成分和毒力因子,是预防性疫苗开发的重要抗原。但荚膜多糖是胸腺非依赖性抗原,根据已上市细菌疫苗的临床试验结果,荚膜多糖疫苗诱导的免疫原性低、不能诱导免疫记忆,对免疫力低下人群如2岁以下婴幼儿及老年人无保护作用;而将多糖与载体偶联而成的结合疫苗是胸腺依赖性抗原,具有较强的免疫原性,能形成免疫记忆,有更好和更持久的免疫保护作用。

[0007] 目前已上市的细菌性脑膜炎多糖结合疫苗包含的载体蛋白主要包括破伤风类毒素(TT),白喉类毒素(DT),以及白喉毒素无毒变异体蛋白CRM197。TT和DT蛋白是通过分别对破伤风毒素和白喉毒素脱毒后制备的,具有脱毒不完全、脱毒后蛋白结构不稳定、不均一,以及引发过敏反应等缺点。另外,TT、DT和CRM197是婴幼儿多个疫苗中常用的抗原成分,所以诱导的预存抗体,对多糖蛋白结合疫苗中的载体蛋白存在潜在的免疫抑制作用,从而影响疫苗的有效性。所以开发新型多糖结合疫苗的载体蛋白对提高疫苗的安全性和有效性有重要的临床意义。

### 发明内容

[0008] 为了解决多糖免疫原性低和保护力差问题,以及多糖缀合物中载体蛋白脱毒不完全及免疫原性低问题,本发明提供了一种保护哺乳动物不受细菌性脑膜炎感染的免疫原性组合物。本发明提供的细菌性脑膜炎多糖结合物能有效提高脑膜炎球菌多糖及b型流感嗜血杆菌多糖的免疫原性,而且在与现有常用的载体蛋白制备的多糖结合物比较,可诱导更高的免疫原性。

[0009] 本发明第一方面提供一种具有免疫原性的多糖蛋白缀合物,含有源自细菌性脑膜炎致病菌的多糖以及与其缀合的载体蛋白。

[0010] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌。

[0011] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌。

[0012] 在一个或多个实施方案中,所述多糖是荚膜多糖。

[0013] 在一个或多个实施方案中,所述载体蛋白包括TTD或其变体。

[0014] 在一个或多个实施方案中,TTD具有SEQ ID NO:2所示的序列,TTD变体具有与SEQ ID NO:2有至少70%、至少80%、或至少90%序列相同性的序列。

[0015] 在一个或多个实施方案中,所述载体蛋白与多糖共价连接。

[0016] 在一个或多个实施方案中,所述多糖与载体蛋白的重量比为0.2-3.0,例如0.5-2.5。

[0017] 本发明还提供制备本文任一实施方案所述的多糖蛋白缀合物的方法,包括步骤:

[0018] (1) 获得源自细菌性脑膜炎致病菌的多糖,

[0019] (2) 活化所述多糖,任选衍生活化的多糖,

[0020] (3) 将多糖与载体蛋白偶联,获得多糖蛋白缀合物。

[0021] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌。

[0022] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌。

[0023] 在一个或多个实施方案中,步骤(1)包括:将细菌灭活后经过滤获得粗糖液,加入多糖沉淀剂并纯化获得多糖。

[0024] 在一个或多个实施方案中,步骤(2)包括:使多糖与高碘酸盐溶液孵育或CDAP孵育。优选地,步骤(2)还包括:将活化的多糖与ADH孵育。

[0025] 在一个或多个实施方案中,步骤(3)包括:将多糖与载体蛋白在EDAC存在的条件下孵育,获得多糖蛋白缀合物。优选地,步骤(3)中,多糖与载体蛋白的重量比为0.2-3.0。优选地,步骤(3)中,孵育持续至少30分钟,优选至少2小时。

[0026] 在一个或多个实施方案中,步骤(3)中活化的多糖与载体蛋白的重量比为0.5-2.5。优选地,步骤(3)还包括分离多糖蛋白缀合物的过程,例如超滤或层析。在一个或多个实施方案中,氰基硼氢化钠的浓度为10-200mM,优选50-150mM,更优选约100mM。在一个或多个实施方案中,多糖与载体蛋白孵育至少2小时,优选至少12小时,更优选16-48小时。

[0027] 本发明还提供一种免疫原性组合物,其包含本文任一实施方案所述的多糖蛋白缀合物以及佐剂。

[0028] 在一个或多个实施方案中,免疫原性组合物包含选自以下的一种或多种:(1) 奈瑟脑膜炎球菌A血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白,(2) 奈瑟脑膜炎球菌C血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白,(3) 奈瑟脑膜炎球菌Y血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白,(4) 奈瑟脑膜炎球菌W135血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白,(5) b型流感嗜血杆菌的多糖以及与其缀合的载体蛋白。在一个或多个实施方案中,免疫原性组合物包含上述(1)-

(4)或(1)-(5)。

[0029] 在一个或多个实施方案中,所述多糖是荚膜多糖。

[0030] 在一个或多个实施方案中,所述载体蛋白包括TTD或其变体。

[0031] 在一个或多个实施方案中,TTD具有SEQ ID NO:2所示的序列,TTD变体具有与SEQ ID NO:2有至少70%、至少80%、或至少90%序列相同性的序列。

[0032] 在一个或多个实施方案中,所述载体蛋白与多糖共价连接。

[0033] 在一个或多个实施方案中,所述多糖与载体蛋白的重量比为0.2-3.0,例如0.5-2.5。

[0034] 在一个或多个实施方案中,所述佐剂包括选自氢氧化铝、硫酸铝、磷酸铝、单磷酰基脂A、QS21、硬脂酰酪氨酸和弗氏佐剂中的一种或多种。

[0035] 在一个或多个实施方案中,所述免疫原性组合物还含有载剂。优选地,所述载剂选自盐水、林格氏溶液和磷酸盐缓冲盐水中的一种或多种。

[0036] 本发明还提供一种导致被动免疫的免疫组合物,包括靶向细菌性脑膜炎致病菌的杀菌抗体,所述抗体是由本文任一实施方案所述的免疫原性组合物免疫哺乳动物而获得。在一个或多个实施方案中,所述杀菌抗体存在于血清、 $\gamma$ 球蛋白部分或纯化的抗体制剂中。

[0037] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌。

[0038] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌。

[0039] 本发明还提供一种疫苗,其含有本文任一实施方案所述的免疫原性组合物和药学上可接受的辅料。

[0040] 本发明还提供本文任一实施方案所述的多糖蛋白缀合物或免疫原性组合物在制备用于提供对抗细菌性脑膜炎致病菌感染的保护的药物中的用途。

[0041] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌。

[0042] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌。

[0043] 本发明还提供一种免疫哺乳动物对抗细菌性脑膜炎致病菌感染的方法,该方法包括给予个体致免疫量的本文任一实施方案所述的免疫原性组合物或多糖蛋白缀合物。在一个或多个实施方案中,所述哺乳动物是小鼠、大兔或人。

[0044] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌。

[0045] 在一个或多个实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌选自奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清型、b型流感嗜血杆菌。

[0046] 本发明优点:

[0047] (1) 本发明提供一种免疫途径解决脑膜炎致病菌(例如奈瑟脑膜炎球菌和b型流感嗜血杆菌)感染问题

[0048] (2) 本发明发现一种重组破伤风类毒素片段(TTD)作为载体蛋白可以有效提高脑膜炎致病菌多糖的免疫原性,比白喉杆菌素无毒变异蛋白(CRM197)载体诱导产生更多特异

性多糖功能性抗体。

[0049] (3) 本发明提供一种免疫原可诱导特异性抗脑膜炎致病菌表面多糖抗体,从而起到预防或治疗作用。

[0050] (4) 提供一种免疫结合物,其中使用的载体蛋白可以有效地提高脑膜炎致病菌多糖的免疫原性,诱导针对脑膜炎细菌多糖特异性抗体。

### 附图说明

[0051] 图1:TTD和CRM197载体蛋白增强W135群多糖免疫原性比较。

[0052] 图2:分别以TTD和CRM197载体蛋白的W135群多糖结合物免疫血清SBA杀菌曲线。

[0053] 图3:TTD和CRM197载体蛋白增强Y群多糖免疫原性比较。

[0054] 图4:分别以TTD和CRM197载体蛋白的Y群多糖结合物免疫血清SBA杀菌曲线。

[0055] 图5:TTD和CRM197载体蛋白增强C群多糖免疫原性比较。

[0056] 图6:分别以TTD和CRM197载体蛋白的C群多糖结合物免疫血清SBA杀菌曲线。

[0057] 图7:TTD和CRM197载体蛋白增强A群多糖免疫原性比较。

[0058] 图8:分别以TTD和CRM197载体蛋白的A群多糖结合物免疫血清SBA杀菌曲线。

[0059] 图9:TTD和CRM197载体蛋白增强Hib多糖免疫原性比较。

[0060] 图10:分别以TTD和CRM197载体蛋白的Hib多糖结合物免疫血清SBA杀菌曲线。

[0061] 图11:小鼠体内不同载体蛋白的四价脑膜炎多糖结合疫苗的免疫原性比较。

[0062] 图12:小鼠体内ACYW135脑膜炎多糖结合疫苗与HIB的联合疫苗免疫血清的各型多糖IgG抗体滴度水平。

### 具体实施方式

[0063] 本发明提供一种新型的脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白缀合物。缀合物的制备是通过纯化提取的脑膜炎致病菌荚膜多糖经过处理得到的多糖片段通过化学偶联方式连接到载体蛋白上。该缀合物能有效诱导脑膜炎致病菌多糖的免疫原性,对细菌性脑膜炎致病菌的感染有较好的保护作用。

[0064] 本发明首先提供一种保护哺乳动物不受细菌性脑膜炎致病菌感染的免疫原性组合物。该免疫原性组合物含有致免疫量的分离的细菌性脑膜炎致病菌荚膜多糖。

[0065] 本文所述“细菌性脑膜炎致病菌”或“脑膜炎致病菌”是指能引起细菌性脑膜炎的细菌。包括但不限于奈瑟脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌,例如奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌中的1、2、3、4或5种。在一些实施方案中,A、C、Y、W135血清群、b型流感嗜血杆菌的多糖分子量在40-400kD之间。在一些实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌包括奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y和W135血清群。在一些实施方案中,所述细菌性脑膜炎致病菌包括奈瑟脑膜炎球菌A、C、Y、W135血清群和b型流感嗜血杆菌。

[0066] 存在于免疫原性组合物中的脑膜炎致病菌荚膜多糖作为缀合物的一个组分,在缀合物中多糖与蛋白质共价相连。天然或重组细菌蛋白如破伤风类毒素、霍乱毒素、白喉类毒素、或CRM197都是可用作缀合物的适宜蛋白质的实例。除了多糖蛋白缀合物之外,免疫原性组合物还可以包含载剂,例如盐水、林格氏溶液或磷酸盐缓冲盐水。

[0067] 在一个或多个实施方案中,免疫原性组合物包含选自以下的一种或多种:(1)奈瑟

脑膜炎球菌A血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白, (2) 奈瑟脑膜炎球菌C血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白, (3) 奈瑟脑膜炎球菌Y血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白, (4) 奈瑟脑膜炎球菌W135血清群的多糖以及与其缀合的载体蛋白, (5) b型流感嗜血杆菌的多糖以及与其缀合的载体蛋白。在一个或多个实施方案中, 免疫原性组合物包含上述(1)-(4)或(1)-(5)。

[0068] 在本发明优选的实施方案中, 脑膜炎致病菌荚膜多糖与蛋白质共价相连形成缀合物。因而, 个体可接受的、并能诱导免疫细胞(例如T-细胞)依赖性应答的任何蛋白质或其片段都适宜与脑膜炎致病菌荚膜多糖缀合。基本上任何蛋白质都能作为缀合蛋白。特别是所选择的蛋白质必须具有至少一个自由氨基, 用于与多糖的缀合。优选蛋白质是任何天然或重组细菌蛋白, 并且其本身是诱导年轻和成年哺乳动物中T-细胞依赖性应答的免疫原。这样的蛋白质的例子包括, 但不限制于, 破伤风类毒素、霍乱毒素、白喉类毒素。其它缀合蛋白的候选物包括假单胞菌、葡萄球菌、链球菌、百日咳和包括大肠杆菌的产肠毒素细菌的毒素或类毒素。

[0069] 脑膜炎致病菌荚膜多糖与之缀合的蛋白质(即载体蛋白)可以是天然毒素或去毒后的毒素(即类毒素), 例如TT、DT。另外, 还可以使用蛋白毒素的非毒性突变形式。优选这样的突变保留了天然毒素的表位。这些突变后的毒素被称作“交叉反应物质”或CRM。CRM197载体蛋白(NCBI:AMV91693.1, SEQ ID NO:3)是白喉杆菌素的无毒变异体, 该蛋白没有毒性, 但保留了白喉毒素的免疫原性。CRM197比活性白喉毒素有一个氨基酸不同并且与之在免疫学上不可区分, CRM197是流感嗜血杆菌缀合疫苗的一个组分, 在公开的文章和专利中可获得其发酵和纯化方法(US5614382)。还可以用这些蛋白质的片段与脑膜炎致病菌荚膜多糖缀合, 其条件是这些片段应足够长, 即优选至少10个氨基酸以确定T-细胞表位。

[0070] 破伤风类毒素蛋白(TT)在公开文献中有很多报道。发明人发现了TT蛋白的变体TTD蛋白。该蛋白没有毒性, 但保留了TT蛋白的免疫原性。TTD蛋白位于TT蛋白的重链C-末端, 相对分子量50KDa, 是毒素的受体结合区域, 没有毒性, 具有良好的免疫原性, 其过敏性低于破伤风类毒素, 是潜在的破伤风疫苗抗原成分及载体蛋白。TTD可以通过重组表达纯化得到(Immunobiology, Vol.216, Issue 4, 2011, P 485-490)。

[0071] 示例性的TTD表达纯化方法包括: 将表达TTD的DNA序列(SEQ ID NO:1)克隆到蛋白表达质粒pET21中, 构建重组表达TTD蛋白(SEQ ID NO:2)的工程菌(例如大肠杆菌BL21(DE3))。挑取重组工程菌单克隆菌落在合适的培养基和条件中扩增(例如BL21(DE3)在10mL的LB(Amp)液体培养基中, 37°C, 250rpm培养至OD600至0.8后), 加入诱导剂培养(例如加入0.1mM IPTG, 在25°C, 250rpm继续培养4h), 然后从培养物中分离TTD。从培养物中分离蛋白的过程本领域熟知, 例如以下步骤: 培养液8000rpm, 4°C离心, 然后用PBS重悬后破碎(超声波破碎)细胞, 破碎液在8000rpm, 4°C离心, 收取包含TTD蛋白的上清。从上清中纯化TTD蛋白的方法可使用本领域常用从液体中纯化蛋白的方法, 例如通过硫酸铵沉淀、澄清过滤、组合层析如离子交换层析、复合介质层析和/或亲和层析等层析方法得到, 纯度在95%以上。通过质谱测定的分子量与理论分子量一致。

[0072] 在优选的实施方案中, 本发明的缀合物分子含有多糖和载体蛋白, 多糖和载体蛋白通过化学偶联形成交联多糖-蛋白缀合物。每个蛋白质与脑膜炎致病菌荚膜多糖通过末端或非末端活化还原糖或衍生修饰后与之相连。因此这样的缀合分子平均每个载体蛋白含

有多个脑膜炎致病菌荚膜多糖的重复单元。优选多个脑膜炎致病菌荚膜多糖重复单元,特别是平均约20-400、30-300、40-300、50-250个脑膜炎致病菌荚膜多糖重复单元与每个蛋白相连。更优选至少平均约50-200个脑膜炎致病菌荚膜多糖重复单元与每个蛋白相连。

[0073] 在另一个实施方案中,脑膜炎致病菌荚膜多糖通过每个脑膜炎致病菌荚膜多糖上的两个或多个位点与蛋白质相连。由于杀菌表位可能是出现在脑膜炎致病菌荚膜多糖重复单元的支链上,因此脑膜炎致病菌荚膜多糖的官能化以及与蛋白质的连接应该是以保持致免疫量的杀菌表位的方式来实现。

[0074] 本文中,在多糖蛋白缀合物或免疫原性组合物中,脑膜炎致病菌荚膜多糖与载体蛋白的比例(w/w)为0.2-3.0,例如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、3.0或上述任意两个数值之间的范围,优选0.5-2.5,0.5-2.0,0.5-1.5,更优选0.6-2.5,0.6-2.0,0.6-1.5。

[0075] 该免疫原性组合物还可用作疫苗,并可进一步含有佐剂如硫酸铝、氢氧化铝、磷酸铝、单磷酸基脂A、QS21、CpG、硬脂酰酪氨酸、不完全或完全弗氏佐剂。如本文定义的,“佐剂”是用于增强本发明的免疫原性组合物的免疫原性的物质。从而,通常给予佐剂以加强免疫应答并且佐剂是技术人员公知的。用于增强组合物的有效性的合适的佐剂包括但不限于:(1)铝盐,如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝,等等;(2)水包油乳液制剂,如MF59、SAF、Ribi™佐剂系统(RAS), (Corixa, Hamilton, MT); (3)皂苷佐剂,如QuilA或STIMULONTM QS-21; (4)细菌脂多糖(如氨基烷基葡糖胺磷酸酯化合物(AGP)或者其衍生物或类似物),合成的多核苷酸(如含有CpG基序的寡核苷酸); (5)细胞因子,如白介素(例如,IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18,等),干扰素(例如, $\gamma$ 干扰素),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),肿瘤坏死因子(TNF),共刺激分子B7-1和B7-2,等等;(6)细菌ADP-核糖基化毒素的脱毒突变体,如野生型或者突变型的霍乱毒素(CT),百日咳毒素(PT),或者大肠杆菌不耐热毒素(LT)(参见例如W093/13302和W092/19265);和(7)作为免疫刺激剂以增强组合物的有效性的其他物质。

[0076] 本发明的免疫原性组合物能诱发对脑膜炎致病菌感染的主动和被动保护。对于被动保护,免疫原性抗体是通过用本发明的免疫原性组合物制成的疫苗来免疫哺乳动物,然后从哺乳动物回收免疫原性抗体来生产的。本发明还提供了通过给予致免疫量的本发明的组合物来免疫哺乳动物抵抗脑膜炎致病菌感染的方法。

[0077] 本发明还提供制备本文任一实施方案所述的多糖蛋白缀合物(或称多糖-蛋白结合物)的方法。可用许多缀合方法产生本发明的多糖-蛋白质缀合物。在多糖-蛋白结合反应过程中,通常包括多糖活化和蛋白缀合步骤。通过控制多糖的分子量、多糖活化反应、多糖-蛋白的反应比例、反应温度、反应时间及反应液pH值等参数,得到最终多糖蛋白缀合物。所得的多糖蛋白缀合物通过进一步纯化,去除未反应物及杂质,通过质量分析,定量其多糖-蛋白交联度及残留杂质,确保批次的一致性和可比性。

[0078] 例如,当单个脑膜炎致病菌荚膜多糖连接两个或多个蛋白分子时,所得缀合物对蛋白质来说是交叉连接的。可以通过偶联或结合反应中所用条件的常规变化来调节交叉连接的程度和缀合物分子的整个大小,这对于本领域普通技术人员来说是已知的。这些变化包括,例如,缀合反应的速率以及反应混合物中存在的蛋白质与脑膜炎致病菌荚膜多糖的比值。在一些实施方案中,缀合反应体系中加入的脑膜炎致病菌荚膜多糖与载体蛋白的比

例(w/w)为0.2-3.0,例如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、3.0或上述任意两个数值之间的范围,优选0.5-2.5,0.5-2.0,0.5-1.5,更优选0.6-2.5,0.6-2.0,0.6-1.5。

[0079] 在示例性实施方案中,源自脑膜炎球菌A血清群的多糖与载体蛋白的重量比为0.5-1.1,优选0.7-0.9;源自脑膜炎球菌C血清群的多糖与载体蛋白的重量比为1.0-1.8,优选1.2-1.6;源自脑膜炎球菌Y血清群的多糖与载体蛋白的重量比为1.4-2.3,优选1.6-2.1;源自脑膜炎球菌W135血清群的多糖与载体蛋白的重量比为0.7-1.4,优选0.9-1.2;源自b型流感嗜血杆菌的多糖与载体蛋白的重量比为0.8-1.8,1.0-1.6。

[0080] 将多糖与蛋白质缀合的各种化学方法是已知的并在文献中有所描述。例如,作为参考文献引入本发明的美国专利4,644,059描述了用己二酸二酰肼(ADH)作为同双功能连接物制备的缀合物。也作为参考文献引入本发明的美国专利4,695,624描述了制备多糖以及用属间间隔基制备缀合物的方法。在Dick、William E. 和Michel Beurret的Contrib.Microbiol.Immunol.(1989),Vol.10,pp.48-114中讨论了对各种用于设计缀合物的制备方法和因素的概括性研究,其也作为参考文献引入本发明。优选的缀合本发明脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白质缀合物的方法是CDAP法(参见例如EP0720485,US5651971)。

[0081] 本文中,制备多糖蛋白缀合物的方法包括步骤:获得脑膜炎致病菌荚膜多糖;使用CDAP活化多糖,然后使用己二酸二酰肼(ADH)溶液得到衍生多糖;将衍生后的多糖与缓冲液中的蛋白质合并,加入一定量的EDAC,反应一定时间,获得多糖蛋白缀合物,然后从缓冲液中分离多糖蛋白缀合物。

[0082] 可采用本领域周知的方法从脑膜炎致病菌中获得荚膜多糖。通常包括:将细菌灭活后经过滤(例如微滤或超滤)获得粗糖液,之后加入多糖沉淀剂(例如乙醇、CTAB)并纯化(例如沉淀、解离、离心、超滤、层析)获得精制多糖。对所得多糖进行质量分析的方法本领域已知,例如通过核磁共振。

[0083] 然后,可使用化学(例如酸或碱水解)或物理方法处理脑膜炎球菌荚膜多糖以降低分子量。示例性地,可使用冰醋酸(例如至少0.1M)或盐酸或高压匀质(例如压力至少800Bar)处理多糖以降低分子量或提高多糖氧化结合效率。在一些实施方案中,还可进一步使用层析等方法将不同大小的多糖分别纯化。

[0084] 具有免疫原型的多糖在与蛋白缀合前通常需要活化和/或衍生。常用的多糖活化方法有溴化氰法(US6375846B1)、水解(US4761283)、1-氰基-4-二甲氨基吡啶四氟硼酸酯(CDAP)(EP0720485)、高碘酸氧化法(US4711779)。活化的多糖可经过超滤与其他杂质分离。常用的多糖衍生方法包括ADH法。

[0085] 例如,用高碘酸盐(例如高碘酸钠)或其等同物的选择性氧化反应来氧化先前糖部分的羟基而形成醛基。这形成了活化的脑膜炎致病菌荚膜多糖,其现在能与选择的蛋白质载体共价相连。例如在室温,用约1ml约20mM的高碘酸钠溶液适宜地氧化约10mg的多糖约10-15分钟;或者,加入多糖的0.05-2个当量的高碘酸盐氧化12-24小时。反应时间可随其它数量的高碘酸盐而变化以得到同等的氧化。糖的还原和开环使得还原糖的邻位羟基活化成醛基。多糖活化结束后,可通过超滤浓缩除去反应中的小分子物质。

[0086] 又如,将纯化多糖在缓冲液溶解,配制成溶液,将pH调至8.7,搅拌下加入CDAP,维持反应1h。然后加入ADH在维持反应2h,反应结束后将该反应物进行超滤,制备得到多糖衍

生物。本文所述缓冲液均为常用缓冲液，本领域技术人员可根据常规知识选择。

[0087] 缀合物的制备是通过纯化提取的脑膜炎致病菌荚膜多糖经过处理得到的多糖片段通过化学偶联方式连接到载体蛋白上。多糖-蛋白结合物可以通过直接化学偶联或通过连接子实施得到，如利用连接子己二酸二酰肼进行偶联。将多糖与蛋白质缀合的各种化学方法是已知的并在文献中有所描述。通常方法有溴化氰法、CDAP法或还原胺化法(US5952454, EP0720485, US4711779)。例如，作为参考文献引入本发明的美国专利4,644,059描述了用己二酸二酰肼(ADH)作为同双功能连接物制备的缀合物。也作为参考文献引入本发明的美国专利4,695,624描述了制备多糖以及用属间间隔基制备缀合物的方法。在Dick、William E.和Michel Beurret的Contrib. Microbiol. Immunol. (1989), Vol. 10, pp. 48-114中讨论了对各种用于设计缀合物的制备方法和因素的概括性研究，其也作为参考文献引入本发明。通过偶联得到的多糖-蛋白缀合物能诱导比较强的免疫原性，可同时诱导抗多糖和抗蛋白的特异性抗体。

[0088] 优选的缀合本发明脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白质缀合物的方法是活化酯法(EP0720485)。在偶联反应中，多糖与载体蛋白的比例控制在0.5-2.5之间，反应过程中将衍生多糖与载体蛋白按比例进行混合调节，然后加入一定量(例如10mM~30mM)的碳二亚胺(EDAC)反应至少半小时。反应结束后通过超滤换液或层析，去除反应中的杂质或没有反应的底物，最后通过0.22um过滤器无菌过滤，将多糖-蛋白结合物溶液放在2-8℃下保存。所有多糖-蛋白结合物通过质量分析，游离多糖含量控制在20%以内，游离蛋白含量在2%以内，多糖-蛋白比在0.5-2.5之间，内毒素及其它杂质含量都控制在安全、可接受范围内。

[0089] 示例性地，获得本发明脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白质缀合物的方法包括：多糖通过CDAP活化后连接到ADH连接器，再通过将载体蛋白与脑膜炎致病菌荚膜多糖衍化物偶联使脑膜炎致病菌荚膜多糖与所选择的缀合蛋白缀合。得到的脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白缀合物优选能溶于水溶液。这使本发明的脑膜炎致病菌荚膜多糖-蛋白缀合物成为用作疫苗的优选候选物。缀合的条件可根据多糖的分子量和具体蛋白进行调整。在多糖蛋白结合反应中，活化多糖与载体蛋白的比例控制在0.5-3.0之间。反应结束后通过超滤换液或层析，去除反应中的杂质或没有反应的底物，最后通过0.22um过滤器无菌过滤，将多糖-蛋白结合物溶液放在2-8℃下保存。

[0090] 荚膜多糖缀合到载体蛋白后，通过多种技术纯化多糖-蛋白质缀合物。这些技术包括浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱和柱层析。

[0091] 纯化各复合糖后，将它们混合以配制本发明的免疫原性组合物，其可以用作疫苗。使用本领域公知的方法可以完成本发明的免疫原性组合物的配制。例如，可以用药学上可接受的辅料配制细菌性脑膜炎致病菌缀合物以制备组合物。此类载体的实例包括，但不限于，水、缓冲盐水、多元醇(例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)和葡萄糖溶液。

[0092] 本发明提供可用于增加具有预防和诊断目的用途的抗体的免疫原性组合物。本发明另一个目的是提供一种通过给予致免疫量的脑膜炎荚膜多糖使哺乳动物对脑膜炎致病菌免疫的方法。本文所述多糖蛋白缀合物或免疫原性组合物的用途，用于制备用于提供对抗脑膜炎致病菌感染的保护的药物。

[0093] 本发明提供了使用本文所述的多糖蛋白缀合物或免疫原性组合物保护哺乳动物，特别是人，抵抗脑膜炎致病菌感染的免疫方法。该多糖蛋白缀合物是通过将脑膜炎致病菌

荚膜多糖与适宜的蛋白质共价连接而构成的。

[0094] 本发明的免疫原性组合物可用作增加用于预防和诊断目的的抗体的手段。诊断尤其适用于监视和检测各种由脑膜炎致病菌引起的感染和疾病此处所用的本发明的疫苗能诱导用于提供对脑膜炎致病菌感染的保护的抗体。

[0095] 本发明的免疫原性组合物和疫苗可通过将脑膜炎致病菌荚膜多糖或缀合物分散到适宜的药学上可接受的辅料而典型地形成。所述辅料包括但不限于稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。辅料优选地在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,例如:盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。在某些实施方案中,组合物可含有用于改善、维持或保留例如组合物的pH、渗透性、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的物质。这些物质为现有技术已知。可视预期的施用途径、递送方式和所需的剂量来确定最佳的药物组合物。也可以存在疫苗中常用的添加剂,例如稳定剂如乳糖或山梨糖醇和佐剂如磷酸铝、氢氧化铝、硫酸铝、CpG、单磷酰基脂A、QS21或硬脂酰酪氨酸。

[0096] 本发明的免疫原性组合物和疫苗的保护或者治疗作用可通过全身或者粘膜途径施用疫苗来完成。这样的施用包括胃肠外给药,例如通过肌内、腹膜内、皮内或者皮下途径注射,或者通过粘膜施用于口/消化道、呼吸道。

[0097] 免疫原性组合物的剂量应是能达到致免疫作用效果的剂量。选择每个疫苗剂量中缀合物的量作为诱导免疫保护而无显著的不利作用的量。此类量可以取决于细菌血清群而变。通常,每剂将包含0.1 $\mu$ g到100 $\mu$ g多糖或缀合物,优选1 $\mu$ g到50 $\mu$ g,更优选5 $\mu$ g到25 $\mu$ g。可以给出一系列最佳免疫剂量。单位剂型的疫苗可含有约0.1 $\mu$ g至约100 $\mu$ g相当量的脑膜炎致病菌荚膜多糖或缀合物,例如1 $\mu$ g到30 $\mu$ g,或5 $\mu$ g到25 $\mu$ g。

[0098] 通过包括观察受试者中合适的免疫应答的标准研究确定具体疫苗的组分的最佳量。最初接种后,受试者可以接受足够间隔的一次或几次加强免疫。本发明的免疫原性组合物适于婴儿、儿童、青少年和成人使用。其免疫方案可由有经验的临床医生确定。

[0099] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解,这些实施例仅仅是阐述性的,并非意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法和材料,除非另有说明,否则均为本领域常规的材料和方法。

[0100] 实施例

[0101] 实验方法

[0102] 奈瑟脑膜炎球菌荚膜多糖的培养、发酵与纯化

[0103] 将脑膜炎球菌菌种(美国典型生物资源保藏中心)接种在含5%~10%羊血普通琼脂培养基(巧克力培养基)上,于35~37 $^{\circ}$ C、二氧化碳的环境中培养16~20小时至菌苔肉眼可见,之后刮取菌苔转入至流脑固体培养基中,35~37 $^{\circ}$ C培养14~16小时,至菌苔肉眼可见,之后再度刮取菌苔,转入含改良半综合液体培养基的摇瓶中,35~37 $^{\circ}$ C培养箱中培养过夜,培养结束后,镜检,结果正常,就将培养液接种至10L发酵罐中,培养8-12小时。培养完成后,加1%甲醛灭活,然后通过离心获得澄清的培养液,之后通过微滤、超滤获得粗糖培养液(黄镇,等.A、C、W135、Y群脑膜炎球菌多糖疫苗的研制[J].中国生物制品学2007.Vol.20No.4:273-275)。

[0104] 向粗糖培养液中加入多糖沉淀剂,得到复合多糖,复合多糖解离之后通过一系列

的纯化步骤如乙醇沉淀、解离、超滤、脱氧胆酸钠处理、层析等工艺得到精制多糖。通常精制多糖的纯化工艺包括并不限于乙醇沉淀、解离、离心、超滤、脱氧胆酸钠处理,层析等步骤,其中层析法可根据不同的多糖采用不同的层析法得到精制多糖(Biologicals,Volume 43, Issue 5,September 2015,Pages383-389)。得到的多糖通过分析唾液酸、O-乙酰基和磷含量确认脑膜炎球菌荚膜多糖有效成分,通过SEC-HPLC和核磁检测进一步对其大小和结构进行确认,另外将主要杂质如核酸和蛋白等指标控制在1%以内,符合药典标准。

[0105] B型流感嗜血杆菌荚膜多糖的培养、发酵与纯化

[0106] 将冻存菌种接种至Hib综合固体培养基中35~37℃、二氧化碳的环境中活化培养,培养15~20小时至菌苔肉眼可见,之后刮取菌苔,转入含Hib综合液体培养基的摇瓶中,35-37℃,250rpm摇床中培养。培养至OD<sub>600</sub> 1.5-2.5后,将培养液接种到10L发酵罐中进行发酵培养,培养温度为35-37℃,空气流量为2-3L/min,搅拌200-300rpm,培养约8-9小时。发酵完成后,加1%甲醛灭活,然后通过离心获得澄清的培养液,之后通过微滤、超滤获得粗糖培养液(吴全忠等.b型流感嗜血杆菌的发酵培养及PRP多糖的纯化)。

[0107] 向粗糖培养液中加入阳离子表面活性剂CTAB得到多糖复合物,多糖复合物解离后通过一系列纯化步骤如乙醇沉淀、超滤、层析等工艺得到精制多糖(尹珊珊等.b型流感嗜血杆菌荚膜多糖纯化方法的优化,动物医学进展,2009,30(1):50~52.)。精制多糖通过检测核糖和磷含量确认b型流感嗜血杆菌荚膜多糖的有效成分,核磁检测对其结构进行确认,并将主要杂质蛋白质和核酸含量控制在1%以内,精制多糖符合中国药典标准。

[0108] 载体蛋白制备

[0109] 1、白喉杆菌素无毒变异蛋白(CRM197)制备

[0110] CRM197载体蛋白是白喉杆菌素无毒变异体,该蛋白没有毒性,但保留了白喉毒素的免疫原性。在公开的文章和专利中都有报道其发酵和纯化方法(US5614382)。通常通过将Corynebacterium diphtheriae菌种接种到培养基中,在37℃下,搅拌20-30小时,然后通过离心去除菌体,保留上清。将发酵上清通过超滤换液后,加入硫酸铵沉淀,收取沉淀物。然后将沉淀物溶解,换液,再通过柱层析,纯化得CRM197蛋白,其纯度在95%以上,用于结合反应。

[0111] 2、载体蛋白TTD的制备

[0112] TTD载体蛋白是通过基因工程重组蛋白技术得到(Immunobiology,Vol.216,Issue 4,2011,P 485-490)。具体步骤如下:将表达TTD的DNA序列优化后(SEQ ID NO:1)克隆到蛋白表达质粒pET21中,构建重组表达TTD蛋白(SEQ ID NO:2)的大肠杆菌BL21(DE3)。挑取重组BL21(DE3)单克隆菌落在10mL的LB(Amp)液体培养基中,37℃,250rpm培养至OD<sub>600</sub>至0.8后,加入0.1mM IPTG,在25℃,250rpm继续培养4h。培养液在8000rpm,4℃离心,收集菌体,然后用PBS重悬后破碎。破碎液在8000rpm,4℃离心,收取包含TTD蛋白的上清。TTD蛋白的纯化是通过硫酸铵沉淀、澄清过滤、组合层析(离子交换层析、复合介质层析、亲和层析等层析)方法得到,纯度在95%以上。通过质谱测定的分子量与理论分子量一致。

[0113] 3、多糖-蛋白结合物的制备

[0114] 本文的细菌多糖分别与CRM197和TTD载体蛋白通过化学偶联制备得到多糖蛋白结合物。所得的不同血清群多糖-蛋白结合物具有良好的理化特性,如多糖蛋白比在0.5-2.5之间,游离糖含量在20%以下,其它残留杂质都控制在很低的范围内。

[0115] 细菌性脑膜炎致病菌多糖-蛋白结合物的制备主要包括如下步骤:多糖活化衍生和衍生多糖-蛋白的偶联。

[0116] 细菌性脑膜炎致病菌多糖活化衍生:多糖活化是通过加入CDAP溶液进行的(US5651971)。将纯化多糖在缓冲液溶解,配制成溶液,将pH调至8.7,搅拌下加入CDAP,维持反应1h,然后加入ADH在维持反应2h,反应结束后将该反应物进行超滤,制备得到多糖衍生物。

[0117] 细菌性脑膜炎致病菌多糖-蛋白结合物制备:多糖-蛋白的化学偶联是通过活化酯法进行(EP0720485)。在偶联反应中,多糖与载体蛋白的比例控制在0.5-2.5之间,反应过程中将衍生多糖与载体蛋白按比例进行混合调节,然后加入一定量(例如10mM~30mM)的EDAC反应2h。反应结束后通过超滤换液或层析,去除反应中的杂质或没有反应的底物,最后通过0.22um过滤器无菌过滤,将多糖-蛋白结合物溶液放在2-8℃下保存。所有多糖-蛋白结合物通过质量分析,游离多糖含量控制在20%以内,游离蛋白含量在2%以内,多糖-蛋白比在0.5-2.5之间,内毒素及其它杂质含量都控制在安全、可接受范围内。

[0118] 4、多糖-蛋白结合疫苗的配制

[0119] 单价多糖-蛋白结合物疫苗是通过将单价多糖-蛋白结合物原液与佐剂混合得到。多价多糖-蛋白结合疫苗是通过将多糖-蛋白单价结合物原液用pH 6.0的缓冲溶液稀释后混合,然后加入一定量的铝佐剂搅拌后制备得到。

[0120] 5、多糖-蛋白结合物的免疫原性评价

[0121] ELISA法评价多糖免疫原性:将多糖-蛋白结合物免疫动物,收集抗血清后进行ELISA检测。将细菌多糖包被到酶标板100μl/孔,2~8℃过夜后洗板(A、C、Y、W135群多糖需与mHSA吸附后包被、Hib多糖以来源于NIBSC的Hb0-HA作为包被抗原),经新生牛血清封闭后,再将小鼠抗血清先以1:100稀释,后2.5倍梯度稀释,稀释8个梯度,再加入酶标板中,每孔100μl,孵育过夜。洗板后,将二抗以1:2万稀释后加入酶标板中,每孔100μl,孵育过2小时洗板,然后加入1mg/ml的PNPP-Na显色底物,每孔100μl,孵育2小时后,以50μl/孔加入3M NaOH中止反应,上机读取OD405数值。测定孔OD值与阴性孔OD值比值大于或等于2.1判定为阳性,以稀释最大倍数为阳性的稀释度的倒数定为每个血清的抗体滴度,并计算每组免疫动物的抗体滴度几何平均值。

[0122] 6、脑膜炎球菌荚膜多糖和b型流感嗜血杆菌荚膜多糖特异性抗体杀菌试验(SBA)

[0123] 参考文献SBA方法对多糖特异性抗体的杀菌效力进行评价。(Maslanka SE, heesling L L, Libutti D E, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of Neisseria meningitidis serogroup A and C serum bactericidal assays. The Multilaboratory Study Group. [J]. Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology, 1997, 4(2): 156.)

[0124] (1)板A:平底的96孔培养板中准备菌种

[0125] 脑膜炎菌种经平板复苏及平板划线培养后,用D-PBS缓冲液洗涤,并调整到菌种浓度4000~4800CFU/ml,25μl/孔加入到96孔组织培养板中(平底)。222286Z1 1CN CN

[0126] (2)板B:U形底的96孔培养板中稀释血清样品

[0127] 在板B中(96孔组织培养板、U形底)取56℃30min灭活后的供试品血清100μl以1:4起二倍梯度稀释(共8个梯度),每孔50μl。

- [0128] (3)板C:在平底96孔培养板中加入将板B中的稀释血清吸取25 $\mu$ l/孔。
- [0129] (4)补体与菌体共孵育
- [0130] 将适量稀释的补体25 $\mu$ l/孔加入到含25 $\mu$ l/孔稀释菌体的A板中,在振荡器中混匀,37 $^{\circ}$ C10min。
- [0131] (5)从步骤(4)的A板中取25 $\mu$ l/孔到板C,37 $^{\circ}$ C,孵育60min~90min。
- [0132] (6)用八通道排枪取12.5 $\mu$ l/孔进平板中点板,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养过夜后进行菌落计数。
- [0133] (血清特异性抗体体外杀菌率 = (1 - 供试品血清组菌落数 / 阴性血清对照菌落数)  $\times$  100%)。
- [0134] 实施例1,脑膜炎球菌多糖结合物W135群多糖-TTD在小鼠中的免疫效果评价
- [0135] 将W135群多糖-CRM197结合物、W135群多糖-TTD结合物分别加入磷酸铝佐剂,配制成免疫抗原,以生理盐水组为对照。选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5个小鼠,每次免疫剂量为5微克,分别在0天、14天、21天进行免疫,并在35天抽血评价其多糖的免疫原性和SBA杀菌试验(图1和2)。

[0136] 表1:不同载体蛋白的W135多糖-结合物的免疫原性比较

	结合物	载体蛋白	抗体滴度水平 (ELISA 法)	杀菌滴度 (SBA 方法)
[0137]	W135 群多糖-CRM197 结合物	CRM197	20326.01	639.6
	W135 群多糖-TTD 结合物	TTD	12279.63	1833
	生理盐水	N/A	300.28	N/A

[0138] 由表1可知,TTD作为载体蛋白的W135群多糖结合物虽然免疫血清抗体滴度水平低于CRM197载体,但其功能性的抗体杀菌滴度高于CRM197载体。

[0139] 实施例2,脑膜炎球菌多糖结合物Y群多糖-TTD在小鼠中的免疫效果评价

[0140] 将Y群多糖-TTD结合物、Y群多糖-CRM197结合物加入磷酸铝佐剂,配制成免疫抗原,以生理盐水为阴性对照。选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5个小鼠,每次免疫剂量为5微克,分别在0天、14天、21天进行免疫,并在35天抽血评价其多糖的免疫原性(如图3)和血清SBA杀菌滴度(如图4)。

[0141] 表2:不同载体蛋白的Y多糖-结合物的免疫原性比较

	结合物	载体蛋白	抗体滴度水平 (ELISA 法)	杀菌滴度 (SBA 方法)
[0142]	Y 群多糖-CRM197 结合物	CRM197	16922	1459
	Y 群多糖-TTD 结合物	TTD	35222	3632
	生理盐水	N/A	200	N/A

[0143] 由表2可知,Y群多糖结合物以TTD为载体蛋白相比CRM197载体蛋白有更高的抗体滴度水平及杀菌滴度。

[0144] 实施例3,脑膜炎球菌多糖结合物C群多糖-TTD小鼠中的免疫效果评价

[0145] 将C群多糖-TTD结合物、C群多糖-CRM197结合物,以生理盐水为阴性对照。选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5个小鼠,每次免疫剂量为5微克,分别在0天、14天、21天进行免疫,并在35天抽血评价其多糖的免疫原性(如图5)和血清SBA杀菌滴度(如图6)。

[0146] 表3:不同载体蛋白的C多糖-结合物的免疫原性比较

结合物	载体蛋白	抗体滴度水平 (ELISA 法)	杀菌滴度 (SBA 方法)
[0147] C 群多糖-CRM197 结合物	CRM197	1083.4	283.1
C 群多糖-TTD 结合物	TTD	6768.99	930.8
生理盐水	N/A	100	N/A

[0148] 由表3可知,C群多糖结合物以TTD为载体蛋白相比CRM197载体蛋白有更高的抗体滴度水平( $P < 0.05$ )及杀菌滴度。

[0149] 实施例4,脑膜炎球菌多糖结合物A群多糖-TTD在小鼠中的免疫效果评价

[0150] 将A群多糖-TTD结合物、A群多糖-CRM197结合物,选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5个小鼠,每次免疫剂量为1微克,分别在0天、14天、28天进行免疫,并在42天抽血评价其多糖的免疫原性(如图7)和血清SBA杀菌滴度(图8)。

[0151] 表4:不同载体蛋白的A多糖-结合物的免疫原性比较

结合物	载体蛋白	抗体滴度水平 (ELISA 法)	杀菌滴度 (SBA 方法)
[0152] A 群多糖结合物-CRM197	CRM197	16922.48	105.6
A 群多糖结合物-TTD	TTD	11729.74	114.7
生理盐水	N/A	100.00	N/A

[0153] 由表4可知,A群多糖结合物以CRM197载体比TTD载体虽然诱导更高的抗体滴度水平,但二种载体蛋白疫苗的免疫血清杀菌效果相当。

[0154] 实施例5,b型流感菌多糖结合物Hib多糖-TTD在小鼠中的免疫效果评价

[0155] 将Hib多糖-TTD结合物、Hib多糖-CRM197结合物,以生理盐水为阴性对照,选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5个小鼠,每次免疫剂量为2微克,分别在0天、14天、28天进行免疫,并在42天抽血评价其多糖的免疫原性(如图9)和血清SBA杀菌滴度(如图10)。

[0156] 表5:不同载体蛋白的Hib多糖-结合物的免疫原性比较

结合物	载体蛋白	抗体滴度水平 (ELISA 法)	EC50 杀菌滴度 (SBA 方法)
[0157] Hib 多糖结合物-CRM197	CRM197	10950.72	202..2
Hib 多糖结合物-TTD	TTD	12279.63	287.5
生理盐水	N/A	125.74	N/A

[0158] 由表5可知,Hib群多糖结合物以TTD载体比CRM197载体诱导更高的抗体滴度水平和血清杀菌滴度。

[0159] 实施例6,四价细菌性多糖结合疫苗在小鼠中的免疫效果评价

[0160] 将分别以TTD和CRM197为载体蛋白的A、C、Y、W135四价脑膜炎多糖结合疫苗,以生理盐水作为阴性对照。选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组5只小鼠,每次免疫剂量为1微克,分别在0天、14天、28天进行免疫,并在免疫前、第14天、第28天、第42天抽血评价

其多糖的免疫原性。

[0161] 如图11所示,第42天血清滴度经t-test检验分析TTD载体的MCV4疫苗,Y群和W135群免疫血清IgG抗体滴度水平显著高于CRM197载体的MCV4疫苗( $P < 0.05$ );A群和C群二种载体的免疫血清IgG抗体滴度水平相当( $P > 0.05$ )。

[0162] 实施例7,ACYW135脑膜炎多糖结合疫苗与Hib的联合疫苗在小鼠中的免疫效果评价

[0163] 将以TTD为载体蛋白的A、C、Y、W135、Hib多糖结合物,配制成联合结合疫苗,同时以生理盐水作为阴性对照。选择6-8周龄的Balb/c小鼠进行腹腔免疫,每组8个小鼠,每次免疫剂量为1微克,分别在0天、14天、28天进行免疫,并在第42天抽血评价其多糖的免疫原性。

[0164] 结果如图12所示,42天后,TTD为载体蛋白的A、C、Y、W135、Hib联合多糖结合疫苗,免疫三剂后均有较好的免疫原性,经T-test统计分析各型多糖抗体滴度水平均显著高于生理盐水组( $P < 0.05$ )。

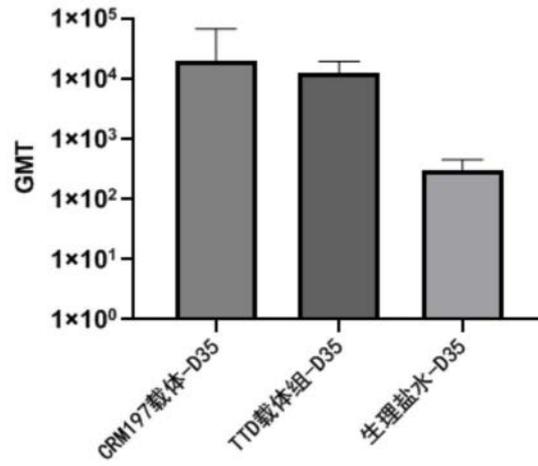


图1

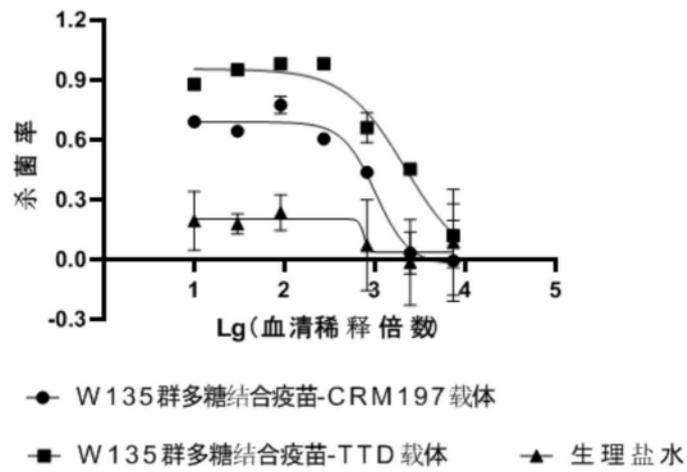


图2

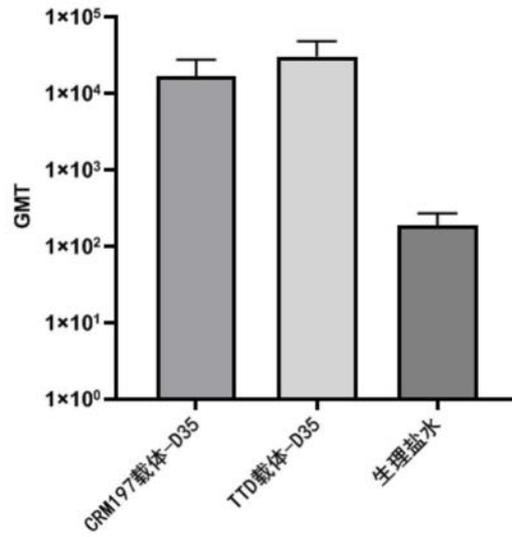


图3

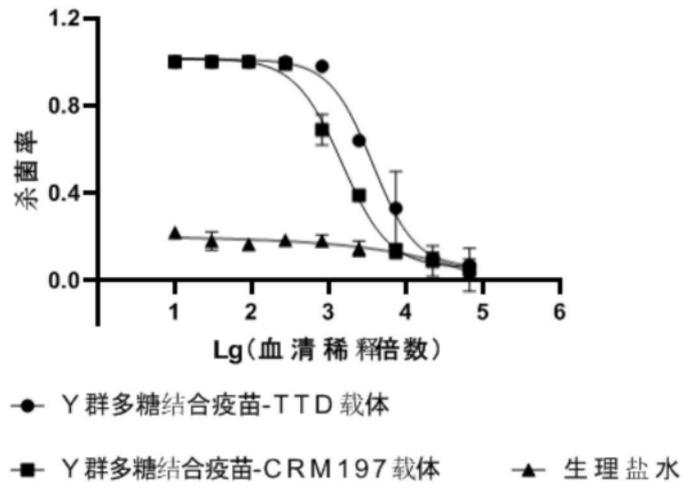


图4

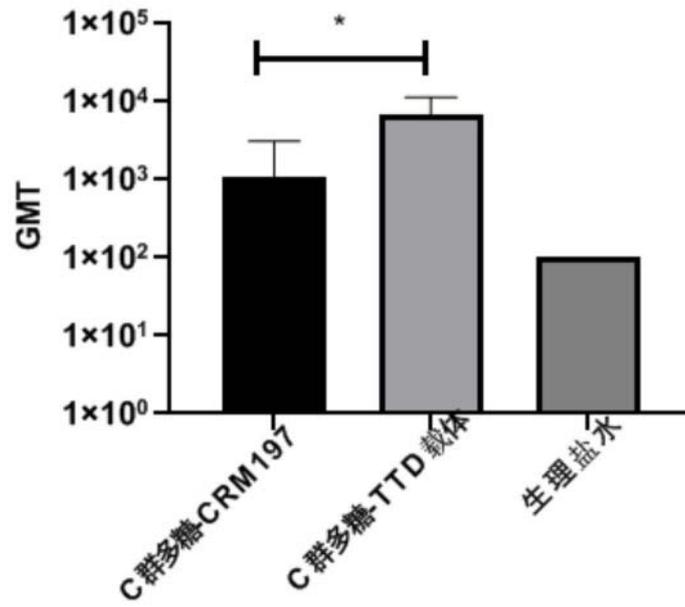


图5

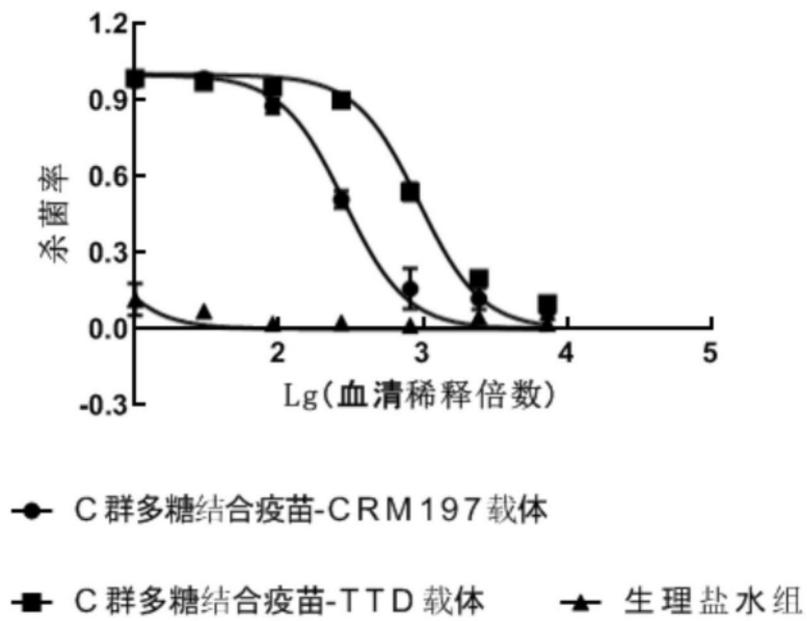


图6

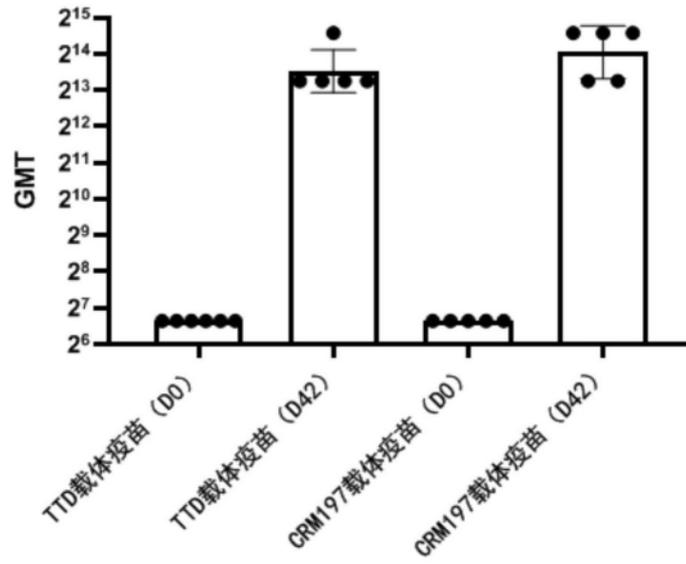


图7

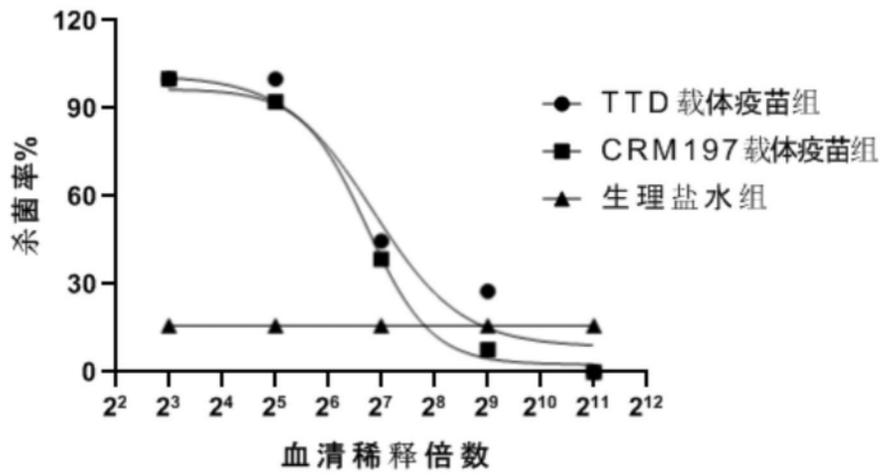


图8

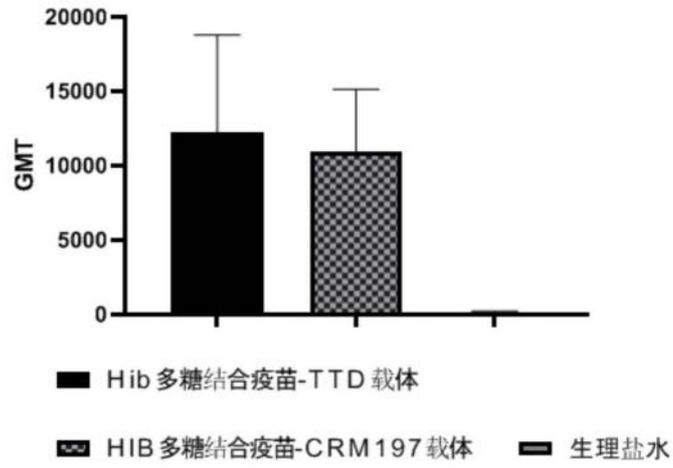


图9

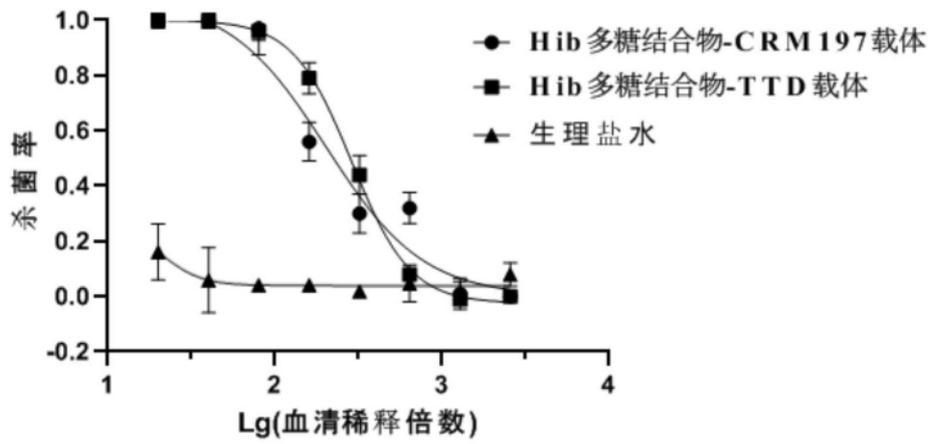


图10

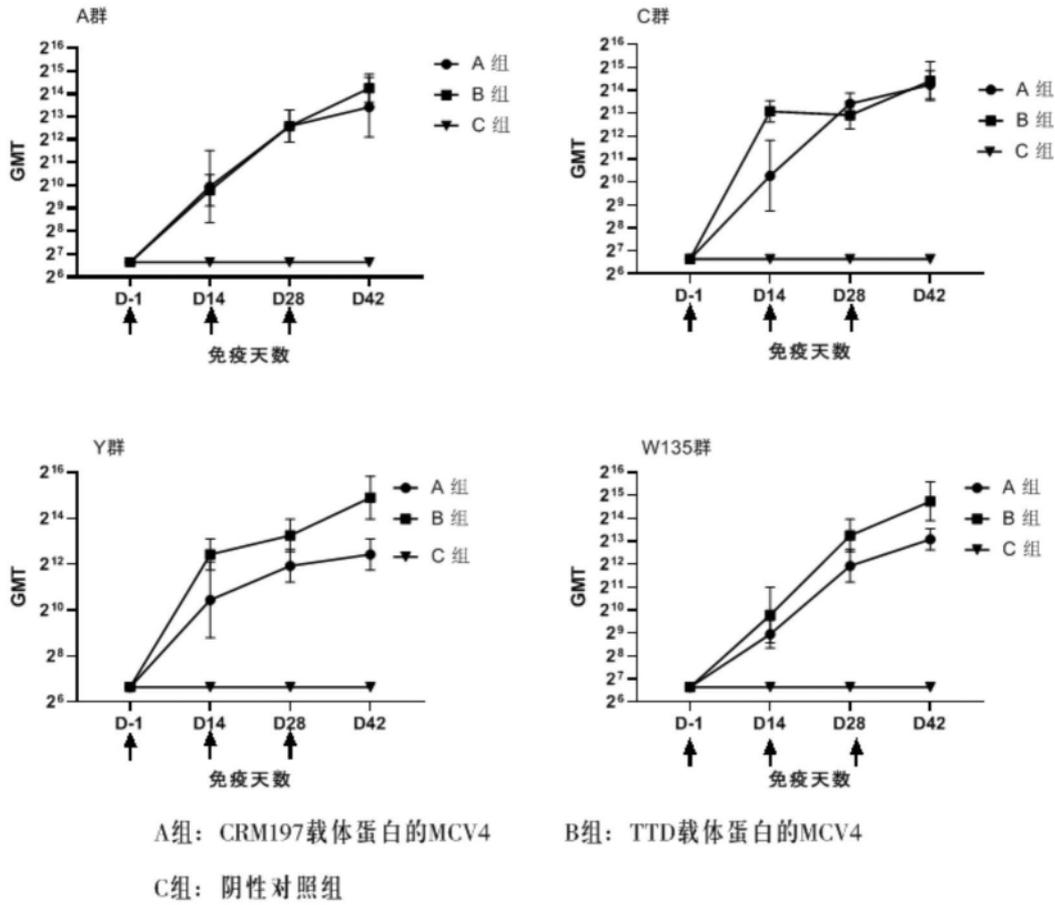


图11

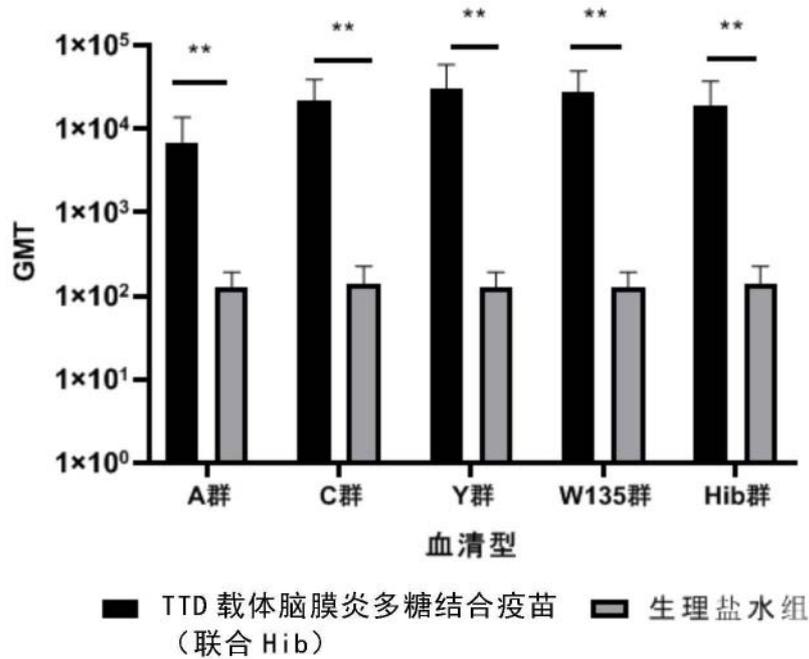


图12